

**UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE**

---

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Dottorato in Salute dell'Uomo

Ciclo XV



**RUOLO DI LXR  
NELLA MODULAZIONE DEL DANNO EPATICO  
MEDIATO DALL'ATTIVAZIONE DELL'ASSE  
FEGATO-INTESTINO**

Dottorando:  
Claudio Pinto

Relatore: *Chiar.mo*  
Prof. Gianluca Svegliati Baroni

---

ANNO ACCADEMICO 2015-2016



# INDICE

<b>RIASSUNTO</b>	<b>IV</b>
<b>INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Il colesterolo</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Sintesi del colesterolo</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Traffico del colesterolo</b>	<b>5</b>
1.3.1 Traffico del colesterolo intracellulare	5
1.3.2 Traffico del colesterolo extracellulare	6
1.3.2.1 “Forward” Cholesterol Transport	6
1.3.2.2 Reverse Cholesterol Transport	12
<b>1.4 Smaltimento del colesterolo HDL</b>	<b>16</b>
1.4.1 Contributo epatico	16
1.4.2 Contributo intestinale	17
<b>1.5 I trasportatori ABC</b>	<b>21</b>
1.5.1 ABCA1	23
1.5.2 ABCG1	25
1.5.3 ABCG5 e ABCG8	27
<b>1.6 Recettori Nucleari</b>	<b>29</b>
1.6.1 Struttura dei recettori nucleari	32
<b>1.7 Liver X Receptor</b>	<b>36</b>
1.7.1 LXR: gene e proteina	40
1.7.2 LXR: regolazione dell’espressione e attività	42
<b>1.8 Ligandi di LXR</b>	<b>46</b>
1.8.1 Ligandi fisiologici di LXR: gli ossisteroli	46
1.8.2 Ligandi di LXR non appartenenti agli ossisteroli	48
1.8.2.1 Agonisti sintetici	48
1.8.2.2 Agonisti naturali	50
1.8.3 Antagonisti di LXR	52
<b>1.9 Effetti metabolici di LXR (LXR e Metabolismo)</b>	<b>54</b>
1.9.1 LXR e metabolismo del colesterolo	55
1.9.2 LXR e il trasporto inverso del colesterolo	58
1.9.3 Metabolismo del colesterolo e infiammazione	61
1.9.4 LXR e metabolismo degli acidi grassi	64
1.9.5 LXR e metabolismo del glucosio	66
<b>1.10 NAFLD, NASH e FIBROSI EPATICA</b>	<b>70</b>

---

1.10.1 NAFLD	70
1.10.2 NASH	72
1.10.3 Fibrosi Epatica	75
1.10.3.1 Patogenesi della fibrosi epatica	76
1.10.3.2 Attivazione dei miofibroblasti epatici	77
1.10.3.3 Terapie per la fibrosi epatica	83
<b>SCOPO DELLA TESI</b>	<b>87</b>
<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>88</b>
3.1 Colture cellulari	88
3.2 Animali	89
3.3 Genotipizzazione dei modelli murini	90
3.3 Estrazione dell'RNA, retrotrascrizione e Real Time qPCR	90
3.4 Analisi del profilo lipidico e lipoproteico: plasma e fegato	93
3.5 Western Blot	94
3.6 Analisi istologica e immunohistochimica	96
3.7 Quantificazione del contenuto epatico di idrossiprolina	97
3.8 Analisi statistica	98
<b>RISULTATI</b>	<b>99</b>
4.1 Attivazione selettiva di LXR nell'intestino	99
4.2 L'attivazione intestinale di LXR $\alpha$ riduce l'infiammazione epatica	102
4.3 L'attivazione intestinale di LXR $\alpha$ riduce l'attivazione delle HSC	104
4.4 L'attivazione intestinale di LXR $\alpha$ riduce la fibrosi epatica	106
4.5 L'attivazione intestinale di LXR $\alpha$ non induce steatosi epatica	108
4.6 L'attivazione intestinale di LXR $\alpha$ induce il "reverse cholesterol transport" e aumenta la concentrazione di HDL	110
4.7 L'attivazione intestinale di LXR $\alpha$ non induce la <i>de novo</i> sintesi del colesterolo	113
4.8 Le HDL contribuiscono alla riduzione del danno infiammatorio endoteliale	115
4.9 Le HDL contribuiscono alla riduzione del danno mediata dai macrofagi	118

<b>4.10 Il pretrattamento con HDL riduce l'infiammazione <i>in vitro</i> a seguito di uno stimolo pro-infiammatorio</b>	<b>122</b>
<b>4.11 Integrazione del flusso biliare e non biliare per il RCT</b>	<b>124</b>
<b>DISCUSSIONE</b>	<b>127</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>134</b>

## RIASSUNTO

La fibrosi epatica rappresenta la risposta del fegato al danno epatico cronico ed è caratterizzata dalla deposizione di proteine della matrice extracellulare con progressiva alterazione anatomica e funzionale epatica. La patogenesi della fibrosi epatica non è ancora del tutto chiarita portando di conseguenza a lacune nelle terapie. I liver X receptors (LXR  $\alpha/\beta$ ) sono importanti regolatori del metabolismo lipidico. Mentre nel fegato LXRs regolano il metabolismo di acidi grassi e colesterolo, a livello intestinale una sua attivazione è associata ad un aumento del *reverse cholesterol transport* (RCT) e di conseguenza a quello delle HDL circolanti.

L'obiettivo del nostro progetto è stato quello di valutare gli effetti dell'attivazione intestinale di LXR $\alpha$  nello sviluppo e progressione della fibrosi epatica associata ad un danno cronico indotto.

A tal fine, topi maschi FVB/N (8-10 settimane di età) con attivazione intestinale costitutiva di LXR $\alpha$  e i rispettivi controlli (VP16), sono stati trattati per due mesi con due iniezioni intraperitoneali a settimana di Tetracloruro di Carbonio (CCl<sub>4</sub>) alla dose di 1 $\mu$ l/gr di peso corporeo. Gli organi sono stati prelevati per le successive valutazioni molecolari ed istochimiche.

L'espressione genica delle citochine pro-infiammatorie IL-6 e TNF $\alpha$  e del fattore di trascrizione NF-kB risultava significativamente ridotta nei topi iVP16LXR $\alpha$  trattati con CCl<sub>4</sub>. L'immunoistochimica per il marker macrofagico F4/80 indicava un minor infiltrato nel fegato dei topi iVP16LXR $\alpha$  e anche la sintesi

e la deposizione di collagene era significativamente ridotta nel confronto con i topi VP16 di controllo come determinato dall'mRNA del Collagene di tipo 1 $\alpha$  e del TGF- $\beta$ , e dalla morfometria per il Sirius Red. Per studiare il meccanismo associato agli effetti anti infiammatori dell'attivazione intestinale di LXR $\alpha$ , abbiamo comprovato il *reverse cholesterol transport* attraverso la misurazione intestinale dell'espressione genica del trasportatore ABCA1, che promuove l'efflusso del colesterolo nelle pre- $\beta$ -HDL e dell'Apolipoproteina A1 che rappresenta la principale componente proteica delle HDL; entrambi risultavano over espressi nei iVP16LXR $\alpha$ , risultati che erano in linea con l'aumento delle HDL misurato nell'analisi del profilo lipoproteico del siero. Inoltre, l'attivazione intestinale di LXR $\alpha$  non è associata a de novo lipogenesi e a de novo sintesi del colesterolo come dimostrato dall'invariata espressione genica dei target SREBP1c, FAS e SCD-1 e da SREBP2 e HMG CoA Red rispettivamente. Anche il contenuto epatico di trigliceridi e colesterolo risultava inferiore nei topi iVP16LXR $\alpha$  rispetto ai controlli.

Concludendo, la specifica attivazione intestinale di LXR $\alpha$  riduce il danno epatico aumentando i livelli delle HDL circolanti che esercitano il proprio effetto anti infiammatorio e anti fibrotico a diversi livelli, portando in questo modo, ad una diminuzione della fibrosi epatica. L'attivazione selettiva di LXR $\alpha$  può essere considerata come un nuovo approccio terapeutico per ridurre la fibrosi del fegato senza gli effetti collaterali dovuti all'attivazione sistemica di LXR che si associa alla comparsa di effetti collaterali, quali la steatosi epatica.

# INTRODUZIONE

## 1.1 Il colesterolo

Il colesterolo è un componente fondamentale della membrana plasmatica e un indispensabile precursore della sintesi degli ormoni steroidei. La molecola consiste di 4 anelli (A, B, C, D) fusi insieme, con due gruppi metili in posizione C10 e C13. Tali caratteristiche sono riscontrabili in tutti gli steroidi di origine naturale. Il colesterolo contiene anche un gruppo 3 $\beta$ -OH sull'anello A, un doppio legame tra il C5 e il C6 e una catena laterale isotilica in posizione C17 (Figura 1).

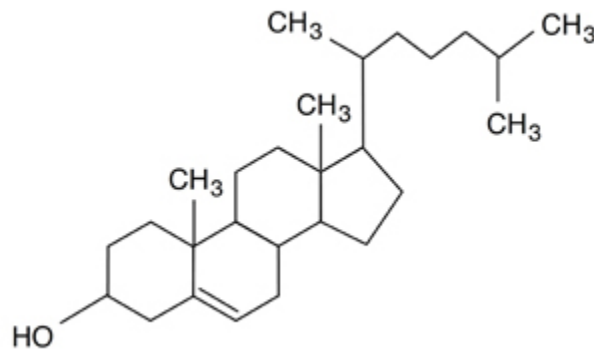


Figura 1. Molecola del colesterolo



## 1.2 Sintesi del colesterolo

Il colesterolo viene principalmente sintetizzato a livello del reticolo endoplasmatico nel fegato. La biosintesi del colesterolo inizia dal mevalonato generato dall'unione dell'acetoacetil-CoA con l'acetil-CoA ad opera di HMG-CoAR (*3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase*), enzima limitante di questa *pathway*. Il mevalonato è poi convertito in squalene mediante una serie di reazioni enzimatiche (Figura 2). È importante notare che gli intermedi isoprenoidi del pre-squalene forniscono precursori non solo per la sintesi del colesterolo ma anche per una serie di biomolecole coinvolte nella trascrizione (isopentenil RNA), nel N-glicosilazione e nella prenilazione delle proteine e nella catena di trasporto degli elettroni a livello mitocondriale. Lo *step* successivo nella biosintesi del colesterolo è catalizzato dalla squalene ciclasi che porta alla formazione di lanosterolo, in una reazione che richiede una molecola di O<sub>2</sub> ed è, pertanto, possibile solo in condizioni aerobiche. Un complesso set di reazioni, che consuma ulteriori 10 molecole di O<sub>2</sub>, porta alla modificazione del colesterolo attraverso demetilazioni e riduzione di doppi legami. Il colesterolo può essere quindi esterificato per formare esteri del colesterolo, oppure ossidato per formare ossisteroli, acidi biliari e ormoni steroidei.

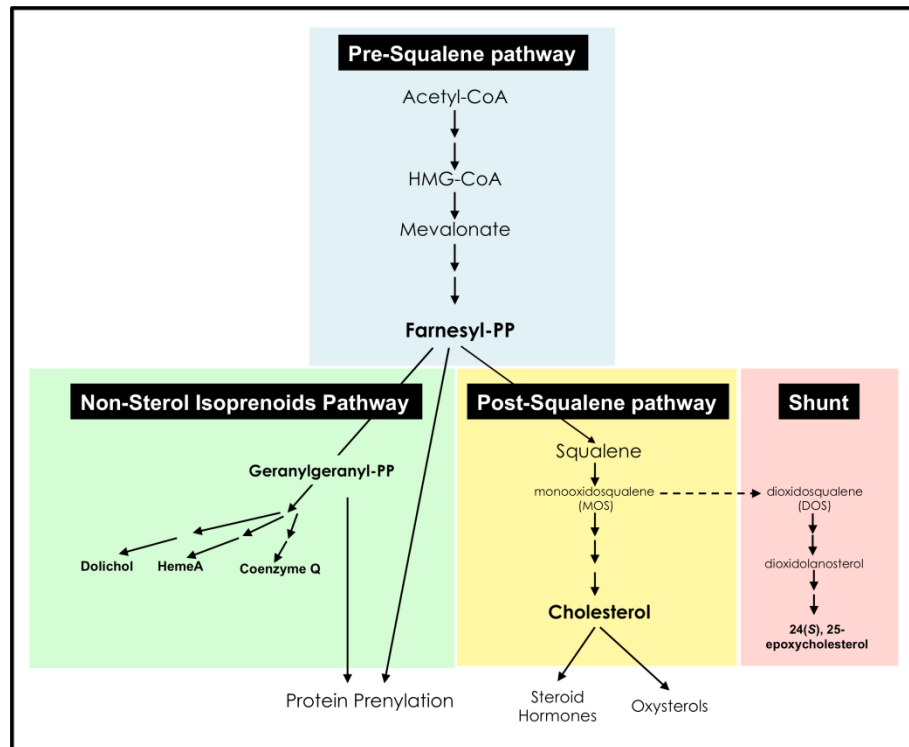


Figura 2. Sintesi del Colesterolo

La sintesi del colesterolo è controllata dal fattore di trascrizione *Sterol regulatory element-binding protein 2* (SREBP2) che agisce regolando l'espressione di geni target quali la HMG-CoA sintasi, HMG-CoAR, farnesil difosfato sintasi, squalene sintasi e il recettore per le LDL [1,2]. SREBP2 è localizzato nel reticolo endoplasmatico ed è attivato in condizioni di carenza di steroli tramite trasporto nell'apparato di Golgi dove va incontro a processi proteolitici [3]. I frammenti risultanti da questo processo vengono quindi trasportati nel nucleo, dove attivano la trascrizione di geni target.

SREBP2 è inibito dagli steroli con un meccanismo a feedback negativo, grazie all'induzione di cambi conformazionali in due *chaperones*, SCAP (*SREBP*

*cleavage-activating protein*) e INSIG (*Insulin-Induced Gene*). In condizioni in cui gli steroli sono abbondanti, queste due proteine interagiscono con SREBP2 e con il reticolo endoplasmatico funzionando quali ancore [4,5]. Il colesterolo sintetizzato *de novo* lascia il reticolo endoplasmatico, il principale sito della sua sintesi, principalmente tramite meccanismi non-vescicolari [6]. Gli steroli biosintetici, come il colesterolo e alcuni fra i suoi precursori, sono rapidamente veicolati alla membrana plasmatica e diventano disponibili per accettori extracellulari [7].

## 1.3 Traffico del colesterolo

Il contenuto cellulare di colesterolo è il risultato della sintesi *de novo* e delle *pathways* di ingresso ed uscita. Il traffico di colesterolo implica sia processi intracellulari che extracellulari e il mantenimento della sua omeostasi richiede sia il trasporto del colesterolo tra le membrane sub-cellulari sia il suo scambio con accettori esterni. Il traffico intracellulare di colesterolo può essere classificato come *vescicolare* e *non vescicolare* in base al coinvolgimento di scambi di colesterolo trans-membrana o di proteine che trasportano i lipidi. Il trasporto del colesterolo plasmatico avviene attraverso specifiche proteine, chiamate apolipoproteine, che veicolano il colesterolo dal fegato o dall'intestino verso i tessuti periferici (*Forward Cholesterol Transport*) o dalle cellule periferiche agli organi secretori (*Reverse Cholesterol Transport*) [8,9].

### 1.3.1 Traffico del colesterolo intracellulare

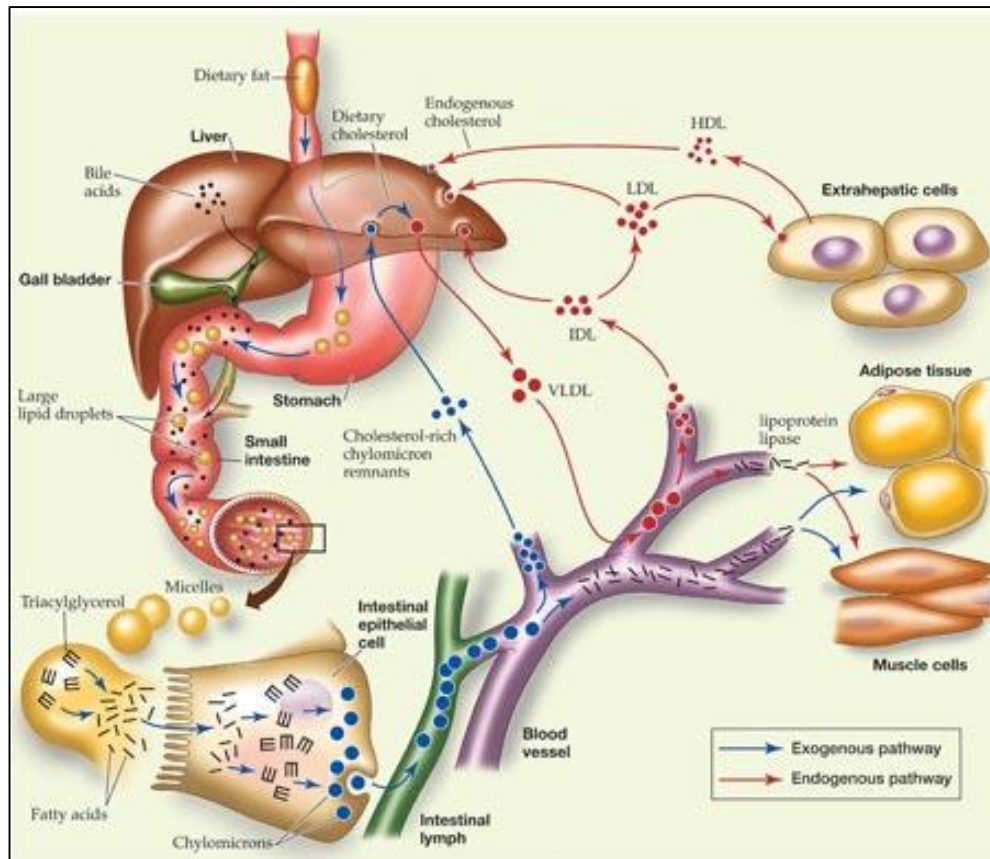
Il traffico del colesterolo intracellulare comprende una combinazione di meccanismi di trasporto subcellulare "da membrana a membrana" (trasporto *vescicolare*) o di trasporto *non vescicolare*. Nel trasporto *vescicolare*, il colesterolo può essere incorporato in vescicole di trasporto o in tubuli intermedi che trasportano i componenti dalle membrane da un organello all'altro [10]. Invece, il trasporto del colesterolo *non vescicolare* necessita di proteine che trasportano i lipidi, come SCP-2 (*Sterol Carrier Protein 2*), la famiglia delle ORP

(*Oxysterol-binding protein-related protein*), *START (Steroidogenic Acute Regulatory Protein-Related Lipid Transfer)* e le caveoline [11-13].

## **1.3.2 Traffico del colesterolo extracellulare**

### ***1.3.2.1 "Forward" Cholesterol Transport***

Per "*Forward*" *Cholesterol Transport* generalmente si intende il flusso del colesterolo dal fegato e dall'intestino alle cellule periferiche, inclusi adipociti e macrofagi [9]. In questo processo il fegato e l'intestino giocano un ruolo fondamentale in quanto sono entrambi dei siti di sintesi e *uptake* del colesterolo e di sintesi delle lipoproteine (Figura 3).



**Figura 3. Rappresentazione schematica del trasporto endogeno ed esogeno del colesterolo.** Il colesterolo assunto con la dieta raggiunge gli enterociti, attraverso la membrana luminale mediante l'interazione con le proteine trasportatrici responsabili del suo uptake. Una volta nell'enterocita, il colesterolo esogeno è caricato nei chilomicroni e secreto tramite il sistema linfatico. Il colesterolo presente in circolo deriva anche dalla sintesi *de novo* ed è trasportato tramite una via endogena. (Immagine tratta da Elizabeth Morales; Copyright 2007, John Wiley & Sons)

Il colesterolo può derivare sia dalla dieta sia dalla sintesi *de novo*, pertanto è possibile distinguere tra trasporto **esogeno** o **endogeno** del colesterolo in base alla rispettiva fonte di provenienza.

Nel trasporto **esogeno**, il colesterolo derivato dalla dieta raggiunge gli enterociti dove attraversa la barriera della membrana luminale e può così interagire con le proteine responsabili del suo uptake. NPC1L1 (*Niemann-Pick C1 like 1*) è uno dei principali e più importanti trasportatori del colesterolo che, se deleto o farmacologicamente inibito, porta ad una significativa riduzione della frazione di colesterolo assorbito [14,15].

Inoltre, altre proteine come SR-BI (*Scavenger Receptor class B type I*), CD36 e ACAT2 (Acetyl-CoA Acetyltransferase 2) giocano un ruolo fondamentale nel regolare l'assorbimento del colesterolo [16,17]. ACAT2 esterifica il colesterolo proveniente dalla dieta per favorirne la sua incorporazione all'interno dei chilomicroni [18]. L'importanza di tale enzima nell'assorbimento del colesterolo è confermata dal fatto che modelli animali knockout per ACAT2 mostrano una riduzione dei livelli circolanti di colesterolo di circa il 30-40%, confermando il ruolo centrale dell'enzima in questo processo. Una volta entrato negli enterociti, il colesterolo esogeno è incorporato nei chilomicroni e secreto nel sistema linfatico.

I chilomicroni sono grandi particelle sferiche ricche di trigliceridi, che contengono fosfolipidi, colesterolo, vitamina E, vitamina A e proteine. Una componente strutturale fondamentale dei chilomicroni è la proteina idrofobica

ApoB48; anche ApoAI, ApoAIV e ApoC si possono frequentemente trovare associate ai chilomicroni nascenti. L'assemblaggio dei chilomicroni implica la lipidazione di ApoB48, regolata da MTP (*Microsomal Triglyceride Transferase Protein*). Nel primo step della lipidazione, MTP trasferisce i trigliceridi e successivamente gli esteri del colesterolo nelle particelle primordiali e nei pre-chilomicroni [19]. I pre-chilomicroni sono quindi caricati con ApoAV nel reticolo endoplasmatico e infine processati nel Golgi, dove i chilomicroni maturi sono secreti tramite la membrana basolaterale. Nei capillari tissutali, i trigliceridi dei chilomicroni sono idrolizzati da LPL (*Lipoprotein Lipase*), rilasciando acidi grassi liberi che sono assorbiti dai tessuti periferici. Queste modificazioni generano chilomicroni *remnant* (lett. rimanenti), ricchi in colesterolo. Durante questo processo i chilomicroni perdono ApoC e acquisiscono ApoE che viene riconosciuta da LDLR (*Low Density Lipoprotein Receptor*) e LRP (*LDLR Related Protein*). Questi due recettori, insieme con SR-BI e HL (*Hepatic Lipase*), sono i principali responsabili dell'eliminazione dei chilomicroni *remnant* a livello epatico. Attraverso questa *pathway*, il colesterolo assorbito dall'intestino viene veicolato al fegato dove è utilizzato per la generazione di membrane, secreto come VLDL o catabolizzato in acidi biliari.

Il colesterolo circolante può anche derivare dalla sintesi *de novo* e il suo trasporto è di tipo **endogeno**. In condizioni di digiuno, quando i lipidi provenienti dalla dieta non sono disponibili, aumenta la sintesi del colesterolo e la secrezione dei trigliceridi. Il fegato gioca un ruolo fondamentale in questo processo; infatti, il colesterolo e i trigliceridi vengono incorporati in VLDL (*Very Density Low*



*Lipoprotein*) di nuova sintesi, lipoproteine responsabili dell'impacchettamento, trasporto e rilascio dei lipidi.

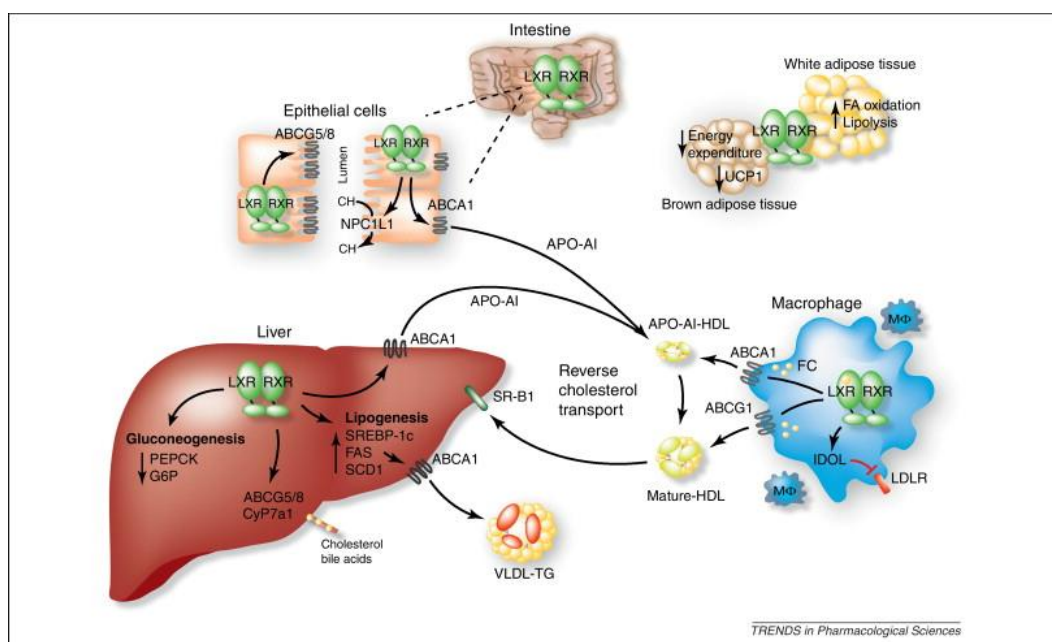
Le VLDL epatiche sono formate da una parte centrale di lipidi neutri, contenente esteri colesterinici e trigliceridi, da una superficie formata da un unico strato di fosfolipidi, colesterolo libero e apolipoproteine. L'assemblaggio delle VLDL consiste in un processo di lipidazione guidato dalla proteina MTP e che coinvolge tre tipi di particelle: pre-VLDL, lipoproteina primordiale non secreta; VLDL2, una forma di VLDL povera in trigliceridi; VLDL1, una forma di VLDL ricca in trigliceridi e altamente aterogena [20]. Le VLDL secrete vanno incontro a lipolisi da parte di LPL e del suo cofattore ApoCII, che idrolizza i trigliceridi in acidi grassi liberi e glicerolo. Il risultato è la produzione di VLDL più piccole, chiamate IDL (*Intermediate Density Lipoprotein*), in cui sono presenti livelli ridotti di ApoE e ApoC. Parte delle IDL vengono rimosse in seguito all'interazione di ApoE con LDLR nel fegato. Quando le IDL vengono idrolizzate dall'azione combinata di LPL e HL o il successivo arricchimento con esteri colesterinici catalizzato da CEPT (*Cholesteryl Ester Transfer Protein*), diventano LDL (*Low Density Lipoprotein*).

Le LDL possono avere un duplice destino: possono essere assorbite dal fegato tramite LDLR o essere internalizzate nei macrofagi tramite l'interazione con recettori *scavenger*, come CD36 o SR-A. L'*uptake* di LDL da parte dei macrofagi nell'intima dei vasi sanguigni, è responsabile della formazione delle *foam cells*. La formazione di queste cellule *foam* innesca la reazione infiammatoria che, unitamente alla deposizione di piastrine e fibrina, porta alla

formazione della placca ateromasica. Inoltre, la lipolisi dei trigliceridi nelle LDL può generare small dense-LDL, più aterogene delle LDL normali, in quanto possono entrare con maggiore facilità nell'intima dell'arteria e, poiché tendono ad ossidarsi, portano ad un aumentato *uptake* di macrofagi e sviluppo delle *foam cells*.

### 1.3.2.2 Reverse Cholesterol Transport

Il trasporto inverso del colesterolo (*Reverse Cholesterol Transport, RCT*) è generalmente definito come trasporto del colesterolo dai tessuti periferici al fegato, dove il colesterolo può essere secreto nella bile ed escreto nelle feci (Figura 4).



**Figura 4. Rappresentazione schematica del trasporto inverso del colesterolo.** Il colesterolo è trasportato dai tessuti periferici al fegato mediante la formazione di particelle discoidali pre-β-HDL che vengono poi caricate di ulteriore colesterolo e fosfolipidi portando alla formazione di HDL mature. La clearance delle HDL avviene principalmente nel fegato, nei reni e nei tessuti steroidogenici, dove le HDL sono catabolizzate mediante due possibili vie: il *selective cholesterol uptake* e il *holoparticle HDL uptake*. (Immagine tratta da "Liver X receptor biology and pharmacology: new pathways, challenges and opportunities" [21]).

Le HDL (*High Density Lipoprotein*) sono il mezzo di trasporto di elezione del colesterolo nel RCT. Le HDL rappresentano la classe di lipoproteine più piccola e più pesante, in quanto contengono un'alta proporzione di proteine come ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoC-I, ApoC-II e ApoC-III, ApoE e ApoM e SAA (*Serum Amyloid A*).

ApoA-I costituisce il 70% del contenuto totale dell'apolipoproteina ed è sintetizzata sia dal fegato che dall'intestino. La stretta relazione tra ApoA-I e HDL è denotata anche dagli elevati livelli di HDL trovati negli animali transgenici overesprimenti ApoI. Oltre agli stimoli fisiologici, farmacologici e nutrizionali, i livelli di ApoA-I possono essere influenzati anche dai livelli plasmatici di HDL. ApoA-I è secreta quale proteina povera di lipidi e acquisisce fosfolipidi e colesterolo dall'intestino e dal fegato mediante differenti meccanismi, come processi mediati da trasportatori o diffusione passiva, che portano alla formazione di particelle pre $\beta$ -HDL di forma discoidale [22-24]. Una delle più importanti proteine coinvolte in questo processo è ABCA1.

Le pre $\beta$ -HDL acquisiscono ulteriori fosfolipidi e colesterolo mediante l'interazione con ApoB posta sulla superficie di VLDL e chilomicroni durante la lipolisi intravascolare mediata da LPL. I livelli plasmatici di HDL sono modulati non solo dalla regolazione trascrizionale o post-trascrizionale di ApoA-I, ma anche dalla modulazione di proteine coinvolte nel trasferimento dei lipidi nelle lipoproteine, nella composizione e dimensione delle HDL e nel catabolismo delle HDL. Pertanto, l'iniziale lipidazione delle HDL è seguita dalla maturazione intravascolare e dal rimodellamento innescato da diversi fattori implicati nel trasferimento dei lipidi ed enzimi lipolitici, come:

- LCAT (*Lecithin-Cholesterol Acyltransferase*), che catalizza il trasferimento di due gruppi acilici dalla lecitina al colesterolo libero, generando esteri del colesterolo che vengono incorporati nel centro

delle HDL. LCAT non è tuttavia necessario per l'efflusso del colesterolo dai macrofagi al siero [25]

- CETP (*Cholesterol Ester Transfer Protein*), una glicoproteina idrofobica che circola nel sangue legata alle lipoproteine, che promuove la redistribuzione e il bilanciamento di esteri del colesterolo e trigliceridi tra HDL e lipoproteine contenenti ApoB [26].
- PLTP (*Phospholipid Transfer Protein*) trasferisce fosfolipidi di superficie da lipoproteine ricche in trigliceridi alle HDL. Inoltre è capace di rimodellare le HDL in lipoproteine più grandi tramite fusione delle particelle e concomitante rilascio di ApoA-I povere in lipidi [27].
- LPL (*Lipoprotein Lipase*) agisce a livello della superficie luminale delle cellule endoteliali dove catalizza l'idrolisi di trigliceridi da lipoproteine ricche in trigliceridi, determinando il trasferimento di colesterolo, fosfolipidi e apolipoproteine nelle HDL[28].
- Molte altre lipasi sono coinvolte nel rimodellamento delle HDL, come HL (*Hepatic Lipase*), EL (*Endothelial Lipase*) e sPLA-IIA (*Secretory Phospholipase A2 group IIA*). Mediante la loro attività di lipasi di trigliceridi e fosfolipidi contribuiscono alla riduzione delle dimensioni delle HDL e del contenuto del colesterolo [29].

L'eliminazione delle HDL avviene principalmente nel rene, nel fegato e nei tessuti steroidogenici, dove le HDL possono essere catalizzate attraverso due distinti processi: il *selective cholesterol uptake* e l'*holoparticle HDL uptake*.

Il *selective cholesterol uptake* consiste nella rimozione del colesterolo e dei lipidi dalle particelle senza l'assorbimento della particella intera. La proteina maggiormente coinvolta in questo processo è SR-BI, tramite cui gli esteri del colesterolo e il colesterolo libero sono trasferiti dal centro delle HDL al fegato. Questo processo è suddiviso in due *step*: il primo è il legame delle HDL con il recettore SR-BI mentre il secondo è la diffusione dei lipidi nella membrana plasmatica senza la degradazione concomitante delle particelle. Topi con delezione genetica del recettore SR-BI hanno infatti mostrato elevati livelli di colesterolo HDL circolanti ma non dell'apolipoproteina ApoA-I, in accordo con i difetti nell' *uptake* selettivo del colesterolo HDL [30]. Dall'altro lato, l'overespressione di SR-BI in topi transgenici riduce il livello plasmatico di HDL ma anche di ApoA-I, poiché accelera l'eliminazione a livello epatico e renale delle particelle private di HDL in seguito all'interazione con SR-BI [31].

L'*holoparticle HDL uptake* e la degradazione dell'intera particella avviene sia nel fegato che nei reni. Nei reni, l'ApoA-I povera di lipidi è probabilmente filtrata a livello glomerulare e catabolizzata dai tubuli renali mediante il sistema cubulina/megalina [32]. Nel fegato, invece, l'internalizzazione avviene mediante endocitosi che coinvolge l'interazione con ApoA-I e proteine di superficie della cellula, portando alla formazione di vescicole rivestite di clatrina [33]. Le proteine della membrana plasmatica, tra cui HB1 e HB2 (*HDL binding protein*) e la catena  $\beta$  dell'ATP sintasi, sono state proposte quali candidati recettori per le HDL.

## 1.4 Smaltimento del colesterolo HDL

### 1.4.1 Contributo epatico

Il meccanismo più studiato e meglio conosciuto per la rimozione del colesterolo HDL a livello epatico è mediato dall'*uptake* di SR-BI. Il colesterolo presente sulla membrana plasmatica degli epatociti viene convogliato direttamente ai canalicoli biliari.

SR-BI, tuttavia, sembra essere importante ma non necessario in questo processo. Infatti, topi *knockout* per SR-BI presentano una secrezione alterata del colesterolo a livello biliare quando nutriti con una dieta con bassi livelli di colesterolo, ma non se sottoposti a una dieta litogenica, suggerendo pertanto l'esistenza di un sistema ridondante [30,34]. L'escrezione di colesterolo dagli epatociti alla bile può avvenire sia tramite un processo passivo, legato alle proprietà detergenti dei sali biliari sia tramite un processo attivo, mediato da specifiche proteine trasportatrici.

Negli ultimi anni, diversi studi hanno permesso di approfondire i meccanismi di trasporto dei soluti attraverso la membrana canalicolare degli epatociti mediata da proteine. I trasportatori ABC (*ATP Binding Cassette*) sono proteine di membrana che utilizzano l'energia ricavata dall'idrolisi dell'ATP per trasportare i soluti contro il loro gradiente di concentrazione. Tra questi troviamo, ABCB11 (precedentemente conosciuto come BSEP, *Bile Salt Export Salt*) ossia il trasportatore degli acidi biliari, ABCB4 (precedentemente indicato come MDR2 nel topo e MDR3 nell'uomo, *Multi-Drug-Resistance*) che agisce

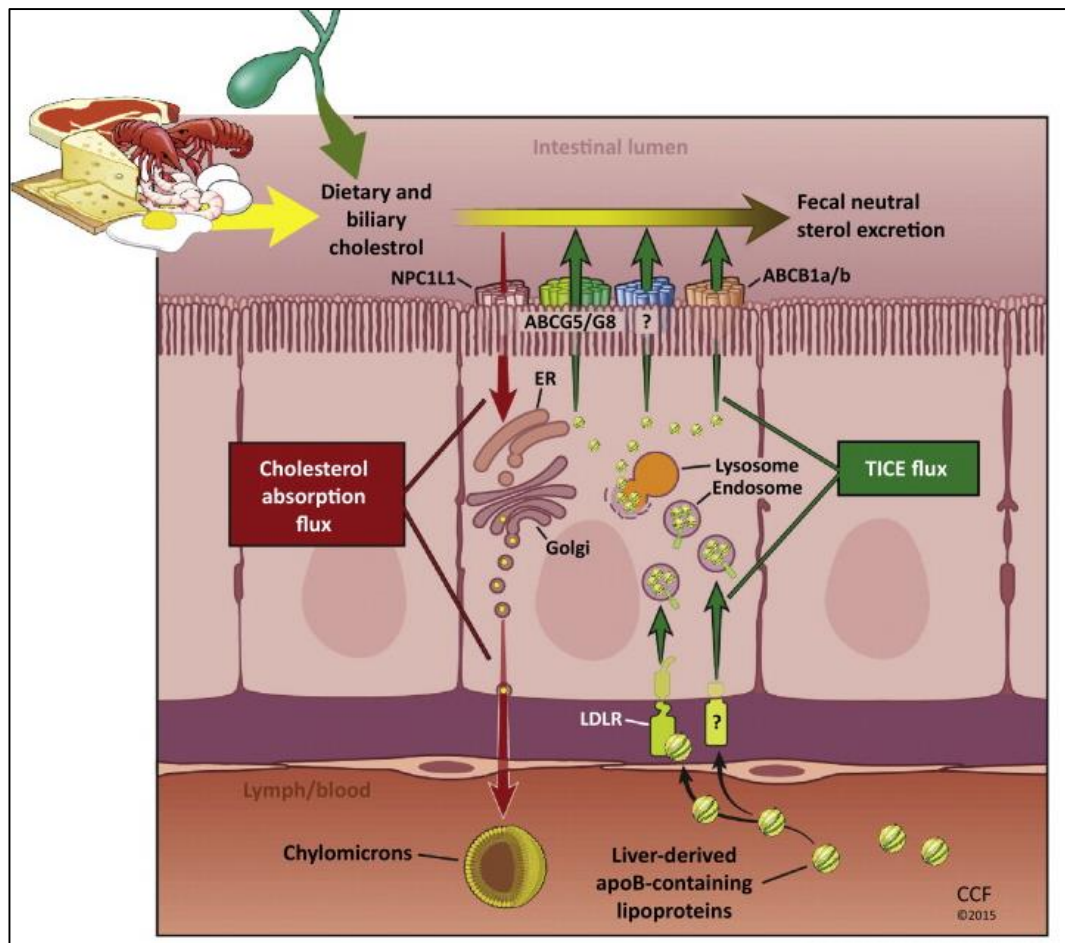
come “flippasi” dei fosfolipidi, traslocando la fosfatidilcolina dal foglietto interno al foglietto esterno della membrana canalicolare, ABCG5 che forma un eterodimero con ABCG8 per liberare il colesterolo dal doppio foglietto della membrana plasmatica, probabilmente attraverso un procedimento simile a quello delle flippasi. L'importanza di ABCG5 e ABCG8 nel trasporto del colesterolo è stata confermata da studi effettuati utilizzando sia animali con “overespressione” di entrambi i trasportatori, sia in animali knockout per ABCG5/G8. Mentre i primi presentavano un incremento del contenuto di colesterolo nella cistifellea di circa cinque volte, negli animali knockout tale contenuto era diminuito del 90% [35,36].

Lo *step* finale dell'eliminazione del colesterolo HDL consiste nello smaltimento del colesterolo attraverso le feci. Questa *pathway* prende il nome di “via epatobiliare” ed è considerata quale la più importante via di eliminazione del colesterolo attraverso il RCT. In questa via, il colesterolo biliare, secreto nel lume intestinale, è in parte riassorbito ed in parte eliminato attraverso le feci.

#### **1.4.2 Contributo intestinale**

Sebbene l'ipotesi sia ancora molto dibattuta, i risultati ottenuti utilizzando animali geneticamente modificati supportano l'eliminazione fecale degli steroli indipendente dalla bile, sostenendo la possibilità di una escrezione trans-intestinale diretta del colesterolo plasmatico (TICE, *Trans-Intestinal Cholesterol Excretion*) (Figura 5).





**Figura 5. Rappresentazione schematica della TICE.** L'eliminazione del colesterolo nelle feci può avvenire mediante una via classica epatobiliare, oppure mediante una via trans-intestinale diretta. Tramite quest'ultima si evidenzia un ruolo fondamentale svolto dall'intestino tenue nell'omeostasi del colesterolo. (Immagine tratta da "A new model of reverse cholesterol transport: enTICEing strategies to stimulate intestinal cholesterol excretion" [37]).

La prima evidenza sperimentale che ha consentito di supportare l'esistenza della TICE è stata ottenuta grazie all'utilizzo di topi con delezione genetica di *Cyp7a1* (*Cholesterol 7 alpha-hydroxylase*), enzima fondamentale per la biosintesi degli acidi biliari. In questi topi, il contenuto fecale di steroli era il doppio rispetto agli animali *wild-type*, senza apparenti modificazioni nell'output di steroli biliari [38]. Allo stesso tempo, topi deficitari per ApoA1 hanno permesso di rivelare che il flusso del colesterolo dai tessuti periferici al fegato non è totalmente dipendente dalla concentrazione plasmatica di colesterolo HDL o di

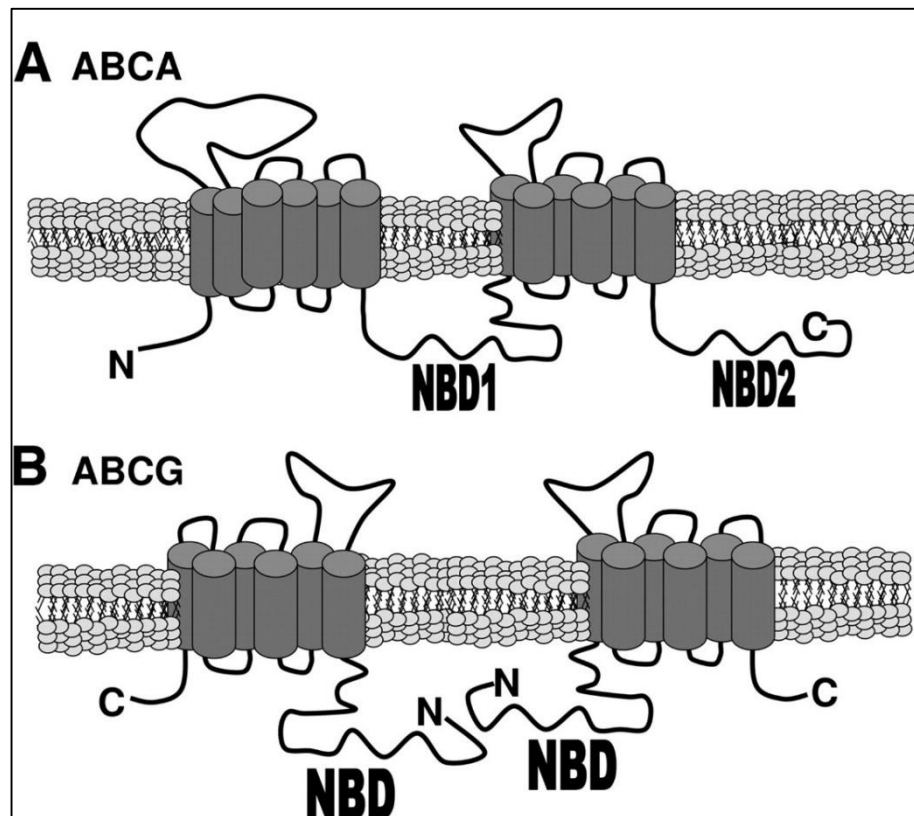
ApoA1[39]. Inoltre, topi con ablazione di ABCG5/G8 non presentano una riduzione dell'escrezione di steroli nelle feci, nonostante la secrezione epatobiliare del colesterolo sia fortemente ridotta [35]. Recentemente, è stato dimostrato come topi in cui l'espressione di ABCB4 è assente, con conseguente assenza di escrezione di colesterolo nella bile, non presentano alterazioni nella perdita fecale di steroli [40]. Inoltre, utilizzando un sistema di perfusione intestinale nel topo, è stato dimostrato che nell'intestino tenue il colesterolo plasmatico può attraversare gli enterociti passando dalla membrana basolaterale a quella apicale in modo dipendente dalla presenza di accettori nel lume intestinale [41]. Il TICE del colesterolo derivato dal sangue rappresenta quindi la via principale della perdita degli steroli nelle feci e l'attivazione farmacologica di LXR attiva fortemente questo processo [42]. Infine, utilizzando un approccio genetico e chirurgico è stato dimostrato che la perdita di steroli nelle feci e il RCT a livello dei macrofagi possono funzionare anche in assenza della secrezione biliare degli steroli [43,44]. Pertanto, l'"overespressione" epatica di NPC1L1, che determina una diminuzione del 90% della secrezione del colesterolo nella bile, o la deviazione chirurgica del flusso biliare annullano il riversamento della bile nell'intestino, ma non ostacolano il RCT mediato dai macrofagi. Le proteine coinvolte nel trasporto del colesterolo dal sangue verso gli enterociti e quindi nel lume intestinale rimangono ancora da identificare.

Nell'insieme questi dati supportano l'idea che la perdita di steroli nelle feci, il punto finale del RCT, è costituita da colesterolo derivato dalla dieta, dalla bile e dall'intestino, che contribuiscono in maniera differente e che possono

rappresentare tre diversi nuovi target per lo sviluppo di una terapia farmacologica.

## 1.5 I trasportatori ABC

Le proteine ABC (*ATP-Binding Cassette*) appartengono ad una grande famiglia di trasportatori transmembrana che legano e idrolizzano l'ATP per fornire l'energia necessaria per trasportare dei substrati contro il loro gradiente di concentrazione attraverso le membrane. Possono trasportare un'ampia varietà di substrati, quali fosfolipidi, steroli, acidi biliari, peptidi, prodotti metabolici e farmaci. Negli umani sono stati identificati 48 trasportatori ABC, divisi in sette gruppi (da ABC-A ad ABC-G). Strutturalmente i trasportatori ABC sono composti da due domini citoplasmatici in grado di legare ATP (NBD, *Nucleotide Binding Domain*) e da due set di 6  $\alpha$ -eliche trans-membrana (TMD, *Trans Membrane Domain*). Dal punto di vista strutturale le proteine ABC esistono sia come trasportatori pieni (*full transporters*) sia come emi-trasportatori (*half transporters*). I trasportatori pieni comprendono tutti e 4 i domini (2 TMD e 2 NBD) all'interno di una singola catena polipeptidica. Gli emi-trasportatori, invece, hanno una catena polipeptidica contenente un solo TMD e un solo NBD citosolico. Questi ultimi omo/etero-dimerizzano per formare un trasportatore pieno funzionale (Figura 6).



**Figura 6. Schematizzazione dei modelli di trasportatori ABC.** A) ABCA, un trasportatore pieno. B) ABCG, un emi-trasportatore. NBD indica il dominio di legame per l'ATP. (Immagine tratta da "ATP-Binding Cassette Cholesterol Transporters and Cardiovascular Disease" [45]).

Sebbene il colesterolo costituisca il substrato diretto o indiretto di sette membri dei trasportatori ABC, solo quattro di questi giocano un ruolo fondamentale nel metabolismo del colesterolo: **ABCA1**, che media l'efflusso di colesterolo e fosfolipidi dalla cellula alle particelle HDL povere in lipidi; **ABCG1**, un omodimero che media il trasporto del colesterolo cellulare alle lipoproteine lipidate; **ABCG5** e **ABCG8**, che formano eterodimeri, promuovendo l'escrezione del colesterolo sia dall'intestino che dalla bile. Questi quattro membri della famiglia dei trasportatori ABC sono tutti regolati a livello trascrizionale dal

recettore nucleare LXR (*Liver X Receptor*) e agiscono in maniera coordinata per rimuovere l'eccesso di colesterolo dai tessuti.

### **1.5.1 ABCA1**

Il trasportatore ABCA1 (*ATP-Binding Cassette A1*) è ampiamente espresso in quasi tutte le cellule e i tessuti del nostro organismo; prevalentemente a livello epatico, intestinale, surrenale, polmonare, cerebrale e macrofagico.

L'importanza di ABCA1 è stata evidenziata in seguito a studi sulla malattia di Tangier, in cui il gene codificante per questo recettore presenta delle mutazioni [46,47]. Questa malattia è caratterizzata dalla completa assenza di HDL plasmatiche, dall'accumulo di esteri del colesterolo nelle cellule del reticolo endoteliale di diversi tessuti e dall'insorgenza anticipata dell'aterosclerosi. Questi studi hanno permesso di comprendere il ruolo di ABCA1 quale trasportatore di colesterolo, fosfolipidi e altre molecole lipofile attraverso la membrana verso specifiche accettori, come le particelle HDL povere di lipidi.

L'esatta modalità mediante la quale ABCB1 mobilita i lipidi non è ancora completamente chiarita, sebbene siano stati proposti due modelli, quello della *flippasi* e quello della *retroendocitosi*.

Nel modello della *flippasi*, sfruttando l'energia derivante dall'idrolisi dell'ATP, ABCA1 consente la traslocazione dei lipidi dal foglietto interno della membrana cellulare a quello esterno, dove si viene quindi a creare un accumulo di lipidi. Successivamente, ABCB1 interagisce con ApoA1, stabilizzandosi a livello

della membrana cellulare e indirizzando ApoA1 verso gli accumuli di lipidi. ApoA1 si “carica” di lipidi (colesterolo, fosfolipidi) ed assume una forma discoidale, consentendo così l’inizio di un nuovo ciclo [48].

Nel modello della *retroendocitosi* ApoA1 interagisce con ABCA1 a livello della membrana cellulare; questa interazione provoca l’internalizzazione della apolipoproteina (endocitosi) e l’interazione di questa con i pools lipidici endocellulari. ApoA1, una volta arricchitasi di lipidi, viene rilasciata dalla cellula mediante esocitosi.

I livelli proteici e l’attività di ABCA1 sono regolati da diversi meccanismi trascrizionali e post-trascrizionali. Il principale meccanismo trascrizionale è rappresentato da LXR [49], che può essere considerato come un sensore dei livelli di colesterolo intracellulari. In condizioni di elevate concentrazioni di colesterolo, l’attivazione di LXR induce l’espressione di ABCA1 che consente l’abbassamento dei livelli intracellulari di colesterolo. La regolazione post-trascrizionale di ABCA1 è invece regolata da i livelli intracellulari di cAMP, dalla fosforilazione da parte di PKC (*Protein Kinase C*), dagli acidi grassi insaturi liberi e dalla degradazione mediata dai microRNA [50-53].

La funzione a livello epatico di ABCA1 è stata dimostrata mediante l’impiego sia di animali knockout per il trasportatore, che presentavano una riduzione di circa l’80% dei livelli plasmatici di HDL, che di animali overesprimenti ABCA1, in cui i livelli di HDL erano fortemente aumentati nel plasma [54,55]. Sebbene la correlazione inversa tra i livelli di HDL e l’insorgenza di malattie cardiovascolari sia stata largamente dimostrata, l’influenza dell’espressione

epatica di ABCA1 è ancora fortemente dibattuta. Se alcuni studi hanno provato che l'overespressione di ABCA1 nel fegato e nei macrofagi comporti uno spiccato incremento nei livelli plasmatici di HDL e ApoB (*Apolipoprotein B*), con conseguente formazione di placche aterosclerotiche in modelli animali in cui ApoE (*Apolipoprotein E*) o LDLR (*Low Density Lipoprotein Receptor*) sono assenti, altri studi hanno dimostrato che l'overespressione di ABCA1 in un contesto di deficit di LRLR conferisce protezione dallo sviluppo dell'aterosclerosi [56,57].

A livello intestinale, l'assenza di ABCA1 determina un decremento del colesterolo assunto con la dieta nelle HDL, poiché l'assorbimento del colesterolo totale non è alterato [58]. Ciò dimostra l'importanza rivestita dall'intestino nella produzione delle HDL.

L'espressione di ABCA1 nei macrofagi è fondamentale per la regolazione dell'omeostasi delle HDL e per i processi di RCT. Topi *knockout* per ABCA1 presentano accumulo di colesterolo in tessuti normalmente ricchi di macrofagi quali polmoni, milza, linfonodi, timo e pelle [59].

### **1.5.2 ABCG1**

Dal punto di vista strutturale ABCG1 è un omo-dimero costituito da 2 metà identiche, ciascuna formata da un TMD e un NBD N-terminale. Sebbene anche questo trasportatore sia espresso in tessuti implicati nel metabolismo del colesterolo, a differenza del trasportatore ABCA1, ABCG1 media selettivamente l'efflusso del colesterolo cellulare solo verso le ApoA1 lipidate e le HDL nascenti,



ma non verso le ApoA1 povere di lipidi [60]. Questa caratteristica peculiare di ABCG1 ha permesso formulare un'ipotesi per cui ABCA1 e ABCG1 possono agire in maniera sinergica al fine di rimuovere il colesterolo dalle cellule. In effetti è stato riportato che ABCA1 è in grado di convertire ApoA1 povere di lipidi in lipoproteine parzialmente lipidate che costituiscono gli accettori del colesterolo esportato da ABCG1 [61].

I livelli di espressione di ABCG1 sono indotti in seguito ad incubazione con specifici ossisteroli o quando i macrofagi sono carichi di lipidi, suggerendo che il recettore nucleare LXR sia un possibile candidato per la regolazione trascrizionale di ABCG1 [49].

Modelli murini *knockout* per ABCG1 presentano un accumulo lipidico a livello del polmone, senza alterazioni nel profilo plasmatico delle lipoproteine. Tale squilibrio lipidico è aggravato quando gli animali sono sottoposti a dieta con alti livelli di colesterolo, per cui fosfolipidi e colesterolo si accumulano anche a livello di epatociti e macrofagi [62]. Tali osservazioni suggeriscono che ABCG1 possa svolgere un ruolo anti-aterosclerotico.

Per valutare il coinvolgimento dell'espressione del trasportatore ABCG1 nella formazione delle placche aterosclerotiche, sono stati effettuati diversi esperimenti in cui il midollo osseo proveniente da topi ABCG1 *knockout* è stato trapiantato in topi knockout per LDLR. Mentre alcuni ricercatori hanno osservato un moderato incremento del rischio di insorgenza di aterosclerosi, altri hanno riportato una diminuzione delle lesioni aterosclerotiche dovuto sia all'incremento della secrezione di ApoE sia all'aumento dei fenomeni apoptotici

[63-65]. Sebbene il ruolo potenziale di ABCG1 nell'aterosclerosi sia ancora poco chiaro, un insieme di studi dimostrano un possibile coinvolgimento nell'infiammazione e nella proliferazione cellulare [66,67].

### **1.5.3 ABCG5 e ABCG8**

L'efflusso del colesterolo e degli steroli vegetali a livello epatico e intestinale è mediato dal trasportatore etero-dimerico obbligato ABCG5/G8. Le singole unità devono, dunque, assemblarsi per costituire un trasportatore funzionale. Sono localizzati esclusivamente sulle membrane cellulari di epatociti ed enterociti [68].

La funzione di questi trasportatori è svolta sia sulla membrana apicale degli enterociti, dove ABCG5/G8 limitano l'assorbimento degli steroli vegetali, sia nella membrana canalicolare degli epatociti, dove promuovono l'escrezione degli steroli nella bile [35,36].

Il ruolo di questi recettori è stato ulteriormente confermato da studi di *gain e loss of function*. Topi *knockout* per l'eterodimero ABCG5/G8 presentano un'alterata secrezione del colesterolo nella bile e accumulo di colesterolo a livello epatico quando sottoposti a una dieta ricca in colesterolo [35]. Inoltre, tali modelli murini presentano un'aumentata capacità di assorbimento degli steroli vegetali con conseguente aumento dei livelli plasmatici e tissutali degli stessi. Inoltre, cambiamenti dei livelli di colesterolo nella dieta comportano alterazioni nei livelli plasmatici di colesterolo senza effetti constatabili nella quantità o

composizione degli acidi biliari. Questi risultati indicano che ABCG5 e ABCG8 sono specifici per gli steroli neutrali e che la secrezione dei fosfolipidi nella dieta può comunque avvenire anche in assenza della secrezione del colesterolo. L'overespressione dei trasportatori ABCG5/G8 nei topi comporta una riduzione dell'assorbimento di colesterolo proveniente dalla dieta pari a circa il 50% e un accentuato incremento della secrezione degli steroli nella bile [36]. Tali effetti sono stati direttamente associati con un aumento nell'escrezione di steroli neutrali nelle feci e con un incremento della sintesi epatica di colesterolo.

Pertanto, ABCG5 e ABCG8 nel traffico del colesterolo a livello enteroepatico e i livelli di espressione di queste proteine possono influenzare il tasso di escrezione degli steroli dalla bile.

## 1.6 Recettori Nucleari

I Recettori Nucleari (NR) sono una superfamiglia di fattori di trascrizione che agiscono quali regolatori trascrizionali in seguito al legame con ligandi specifici. Tali ligandi sono generalmente piccole molecole lipofile che possono facilmente penetrare attraverso il doppio strato lipidico della membrana plasmatica e, legandosi ai recettori nucleari, controllano l'attività di geni coinvolti in numerosi processi fondamentali per l'organismo, quali lo sviluppo, la risposta immunitaria, la proliferazione cellulare e il metabolismo lipidico [69].

Ad oggi, la famiglia dei recettori nucleari conta più di 150 membri. Sulla base dei loro ligandi e della loro funzione, i recettori nucleari sono stati classificati in tre sottogruppi (Figura 7).

Human Nuclear Hormone Receptor Super Family		
Endocrine Receptors	Adopted Orphan Receptors	Orphan Receptors
<p><b>Steroid Receptors</b></p> <p>GR glucocorticoid MR mineralocorticoid PR progesterone AR androgen ER<math>\alpha,\beta</math> estrogen</p>	<p><b>Lipid sensors</b></p> <p>RXR<math>\alpha,\beta,\gamma</math> 9cRA PPAR<math>\alpha,\delta,\gamma</math> fatty acids LXR<math>\alpha,\beta</math> oxysterol FXR bile acids PXR xenobiotics</p>	<p>SHP ? DAX-1 ? TLX ? PNR ? GCNF ? TR2,4 ? NR4A<math>\alpha,\beta,\gamma</math> ? Rev-erb<math>\alpha,\beta</math> ? COUP-TF<math>\alpha,\beta,\gamma</math> ?</p>
<p><b>Heterodimeric Receptors</b></p> <p>TR<math>\alpha,\beta</math> thyroid hormone RAR<math>\alpha,\beta,\gamma</math> retinoic acid VDR vitamin D (bile acid)</p>	<p><b>Enigmatic Orphans</b></p> <p>CAR androstane HNF-4<math>\alpha,\gamma</math> fatty acids SF-1/LRH-1 phospholipids ROR<math>\alpha,\beta,\gamma</math> &lt; cholesterol ERR<math>\alpha,\beta,\gamma</math> retinoic acid estrogen?</p>	

**Figura 7. Superfamiglia dei recettori nucleari umani.** Nell'uomo la famiglia dei recettori nucleari comprende 48 membri. I ligandi (indicati a destra di ciascun recettore) sono stati identificati solo per i recettori Endocrini e per gli Orfani Adottati. (Immagine modificata da "Nuclear Receptors: Decoding Metabolic Disease" [70]).

I **Recettori Endocrini** costituiscono il primo gruppo ad essere stato identificato. Essi presentano una notevole affinità per gli ormoni liposolubili e per le vitamine. Tale gruppo comprende NR fondamentali per il controllo omeostatico del sistema endocrino, quali i recettori per gli ormoni steroidei (Glucocorticoidi (GR), Mineralcorticoidi (MR), Androgeni (AR) ed Estrogeni (ER)), il recettore per gli ormoni tiroidei (TR) e i recettori per le vitamine A e D (Recettore dell'Acido Retinoico (RAR) e Recettore della Vitamina D (VDR)). Mentre i recettori per gli ormoni steroidei funzionano quali eterodimeri, TR, RAR e VDR formano degli eterodimeri funzionanti con RXR (Recettore Retinoico X).

Alcuni recettori nucleari sono stati inizialmente definiti “orfani”, poiché non era noto il ligando che li attivasse. Successivi studi hanno permesso di identificare alcuni di questi recettori, sia sulla base dell’omologia di sequenza con i recettori steroidei, sia grazie all’utilizzo di strategie di identificazione del ligando, come quella definita “endocrinologia inversa” [71], che si serve del recettore per scoprire i ligandi naturali. Tale saggio utilizza un pool di molecole candidate, derivate da estratti lipidici sia cellulari che da tessuti frazionati, da composti lipofili naturali o sintetici, da molecole di librerie chimiche, che viene testato su colture cellulari in cui il cDNA del recettore nucleare orfano è stato cotrasfettato insieme ad un gene reporter, la luciferasi. Misurando l’attività della luciferasi è quindi possibile identificare il ligando responsabile dell’attivazione del recettore nucleare [72].

Mediante l’utilizzo di questo saggio molti NR orfani sono stati identificati. Questi recettori, denominati come **Recettori Orfani Adottati** (*Adopted Orphan Receptor*), presentano una debole affinità per i metaboliti lipidici e xenobiotici ed agiscono formando eterodimeri con RXR. Fanno parte di questo gruppo i recettori per gli acidi grassi (PPARs), il recettore per gli acidi biliari (FXR) e i recettori per gli ossisteroli (LXR). Tuttavia, all’interno di questo gruppo, è possibile evidenziare un sottogruppo di Recettori Orfani Adottati Enigmatici, che comprende NR per i quali è noto il ligando ma non è stato ancora compreso il meccanismo e il ruolo fisiologico. Alcuni di questi recettori interagiscono con cofattori modulati da ormoni o lipidi altri, invece, presentano un’interazione con componenti strutturali spesso coinvolte nell’interazione ligando-recettore.

Appartengono a questo gruppo i Recettori Orfani Correlati a quelli degli Estrogeni (ERR $\beta$  e ERR $\gamma$ ), il Recettore Costitutivo degli Androstani (CAR) e i Recettori Orfani Correlati a quelli dei Retinoidi (ROR $\alpha$  e ROR $\beta$ ).

Infine, i **Veri Recettori Orfani** (*True Orphan Receptors*) sono caratterizzati dall'assenza di ligandi noti e la loro attività è maggiormente regolata da interazioni con cofattori e da modificazioni traslazionali o post-traslazionali.

### 1.6.1 Struttura dei recettori nucleari

I Recettori Nucleari derivano da un unico comune progenitore, perciò, nonostante siano stati divisi in diversi gruppi, mostrano una struttura comune (Figura 8). Nello specifico, tutti i NR presentano una regione N-terminale caratterizzata da un dominio di attivazione ligando indipendente (AF1) e un dominio di legame al DNA (*DNA Binding Domain*, DBD). Il DBD è formato da circa 66 residui amminoacidici organizzati in due motivi *Zinc-Finger* altamente conservati, seguito da una regione di estensione all'estremità carbossi-terminale (CTE). La regione DBD è estremamente specifica, al fine di permettere l'interazione del recettore nucleare con specifiche sequenze di DNA definite xRE (*x-Response Element*).

Le xRE sono sequenze di DNA direttamente riconosciute dai recettori nucleari che si trovano nelle regioni regolatrici dei geni target. Esse sono composte da una sequenza consenso fondamentale di sei nucleotidi, AGGTCA, ripetuta due volte e separata da 1 fino a 8 nucleotidi, può trovarsi diversamente orientata: due moduli in tandem ripetuti in modo diretto (*Direct Repeats*, DR),

invertito diretto (*Inverted Repeats, IR*) oppure invertito opposto (*Everted Repeats, ER*). La differente organizzazione strutturale rispecchia il tipo di recettore legato (eterodimero, omodimero o monodimero). La configurazione più comune è la DR che può essere legata sia da eterodimeri che da omodimeri, non possedendo caratteristiche di simmetria [69].

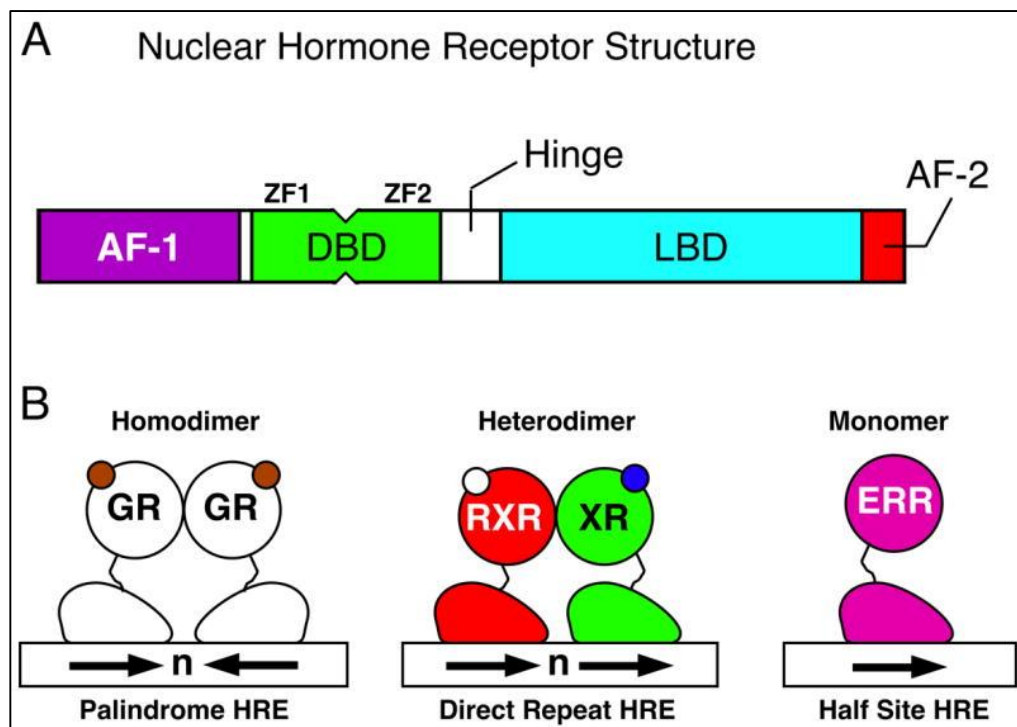


Figura 8. Rappresentazione schematica della struttura e del legame al DNA dei recettori nucleari. (Immagine modificata da "Nuclear Receptors: Decoding Metabolic Disease" [70]).

Nella regione centrale si può riconoscere una regione altamente variabile di collegamento necessaria per garantire flessibilità alla struttura (*hinge region*).

Infine nella regione C-terminale si possono distinguere due regioni, una di interazione con il ligando (*Ligand-Binding Domain, LBD*), che assicura specificità e selettività nell'interazione ligando-recettore, e una regione di attivazione



variabile (AF2) con attività ligando-dipendente. Composto da circa 225 aminoacidi, LBD è un dominio di modulazione allosterica del recettore, in quanto il legame con il ligando comporta una modificazione conformazionale del recettore che consente il passaggio da uno stato "inattivo" ad uno stato "attivo". Nello stato attivato, il recettore si dissocia dai corepressori ed interagisce con i coattivatori. Tali cofattori formano complessi di più subunità capaci di alterare la struttura locale della cromatina e di reclutare il macchinario trascrizionale a livello dei promotori dei geni target. In questo modo, il recettore può attivare l'espressione dei suoi geni target [69,73]. La regione AF2 svolge un ruolo importante nel passaggio del recettore dallo stato represso allo stato attivato. Analisi cristallografiche hanno dimostrato che, in assenza dell'agonista, l' $\alpha$ -elica del dominio AF2 si estende nel solvente con un angolo di circa 45° rispetto al cuore centrale del LBD, mentre in presenza dell'agonista l'elica è richiamata verso il corpo principale del recettore, entrando a far parte della tasca idrofobica di interazione [74].

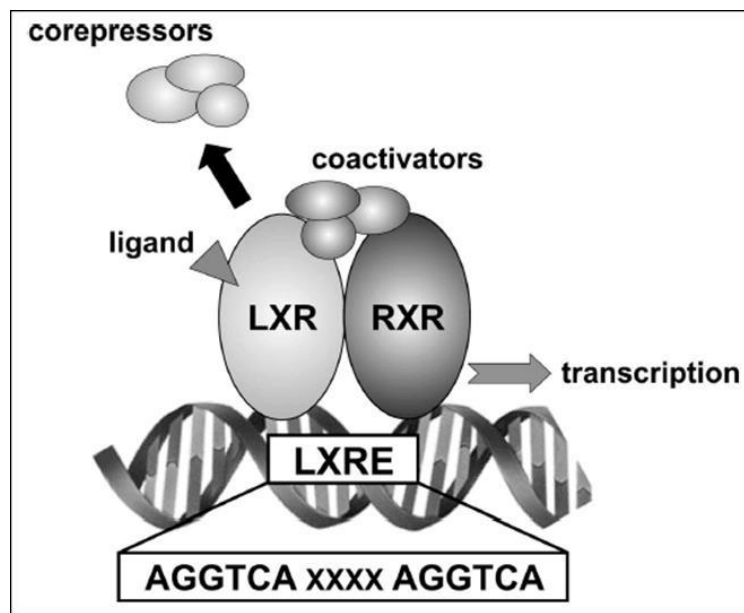
Il meccanismo molecolare di azione dipende in maniera specifica dal recettore nucleare. In assenza di ligando, i NR steroidei sono presenti nel citoplasma legati a *Heat Shock Protein* (HSP) e proteine *chaperon* [75]. Al contrario, i NR non-steroidi sono localizzati nel nucleo legati a specifici xRE e associati a corepressori quali HDAC e SMRT/NCOR [76]. In seguito al legame con il ligando, i NR steroidei si dissociano dai complessi di repressione formati da HSP e proteine *chaperon*, traslocano nel nucleo dove legano sequenze xRE e promuovono la trascrizione di geni target. Diversamente, nei NR non-steroidi il

legame con il ligando promuove delle modifiche traslazionali nell'elica AF2 che rendono possibile l'interazione con i coattivatori [77,78].

## 1.7 Liver X Receptor

I recettori LXR (*Liver X Receptor*) sono membri della superfamiglia dei recettori nucleari. Inizialmente isolato da una libreria di cDNA di tessuti umani epatici, LXR era stato classificato come recettore orfano. Successivi studi hanno permesso di identificare negli ossisteroli, composti ossidati derivati dal colesterolo, i ligandi naturali specifici di LXR. Gli LXRs sono a tutt'oggi considerati come i più importanti recettori nucleari responsabili dell'omeostasi del colesterolo.

I recettori LXR agiscono sotto forma di eterodimeri permissivi con il recettore RXR. I dimeri permissivi, formati dal legame di RXR con un recettore nucleare, possono essere attivati sia da ligandi agonisti di RXR sia del NR, in maniera dipendente o sinergica, con lo scopo probabile di mantenere l'espressione basale degli enzimi coinvolti in diverse vie metaboliche e di trasporto. Il complesso LXR/RXR, una volta attivato dall'agonista, si siede sul DNA a livello delle LXRE (*LXR Responsive Element*), regioni regolatrici dei geni target (Figura 9). LXRE è costituito da una sequenza ripetuta diretta separata da 4 nucleotidi (DR4), del tipo AGGTCAnnnnAGGTCA. L'analisi comparata di LXRE funzionali a livello di diversi geni target ha evidenziato che la sequenza consenso contiene un numero di nucleotidi invariati in ciascun "mezzo-sito", mentre i nucleotidi nelle altre posizioni possono differire in maniera significativa (A/G G G/T T C/T A n n n A/G G G/T T C/T A) [79]. LXR ha due isoforme, LXR $\alpha$  e LXR $\beta$ , che presentano entrambe lo stesso grado di affinità per l'elemento di risposta "ideale", ma diversi gradi di affinità per le sequenze non canoniche [80,81].



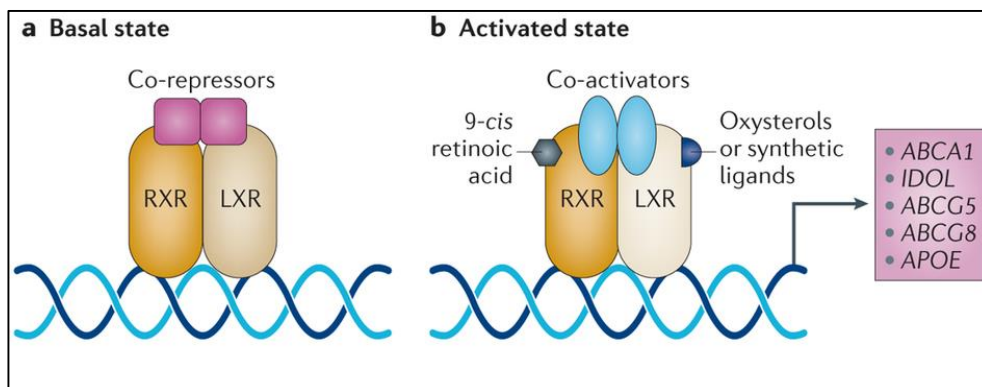
**Figura 9. Meccanismo della regolazione trascrizionale mediata da LXR.**  
 LXR, Liver X Receptor; RXR, Retinoid X Receptor; LXRE, LXR Response Element  
 (Immagine tratta da "Biological role of Liver x Receptors" [82])

Il modello di azione di LXR è costituito da 3 fasi (Figura 10):

1. In assenza di ligandi, l'eterodimero LXR/RXR inibisce la trascrizione tramite il reclutamento di corepressori a livello nucleare.
2. Il legame del ligando determina una modificazione conformazionale del recettore che porta alla dissociazione dal corepressore, con conseguente modesta stimolazione della trascrizione.
3. Il dimero LXR/RXR promuove il reclutamento di un complesso coattivatore che comporta una massima attivazione dell'espressione genica.

In alcuni contesti, sono stati osservati anche fenomeni di inibizione trascrizionale in seguito all'attivazione ligando-dipendente di LXR. Sebbene ad

oggi non esistano prove evidenti del coinvolgimento diretto di LXR nei processi di repressione, sono stati ipotizzati meccanismi indiretti, quali la stimolazione di proteine regolatrici capaci di inibire la trascrizione o di destabilizzare l'RNA messaggero.



**Figura 10. Modello di azione di LXR.** Nello stato basale, in assenza di ligandi, il dimero LXR/RXR inibisce la trascrizione mediante il reclutamento di co-repressori. In seguito al legame di ligandi naturali o sintetici, il dimero LXR/RXR recluta coattivatori che consentono la massima espressione dei geni target. (Immagine da "Liver X receptors in lipid metabolism: opportunities for drug discovery" [83])

I recettori LXR svolgono un ruolo cardine quali sensori del colesterolo nell'intero organismo. La loro attivazione risulta in una netta eliminazione del colesterolo dal corpo e in un miglioramento del profilo plasmatico delle lipoproteine, in quanto LXR mobilita il colesterolo dai tessuti periferici [49,84], promuove a livello epatico l'escrezione del colesterolo limitando al contempo il suo assorbimento ([85-87], riduce l'*uptake* cellulare [88] e, in modelli murini, promuove la conversione del colesterolo in acidi biliari [89].

Inoltre, studi condotti in topi LXR $\alpha$  *knockout* hanno evidenziato la capacità di LXR di regolare la sintesi degli acidi grassi. In tali modelli murini,

infatti, l'espressione di geni coinvolti nella sintesi degli acidi grassi, quali SREBP1C (*Sterol Regulatory Element-Binding Protein*) e i suoi target genici ACC (*Acetyl-coA Carboxylase*), SCD-1 (*Stearoyl-CoA desaturasi-1*) e FASN (*Fatty Acid Synthase*) risulta ridotta [89]. Successive analisi hanno identificato tali geni quali target diretti di LXR $\alpha$  [90-93].

Infine, LXRs svolge un ruolo importante nell'omeostasi del glucosio [94,95], nella risposta immunitaria innata [96] e nella proliferazione cellulare [97,98].

L'abilità di LXR nella regolazione di molteplici aspetti del metabolismo lipidico cellulare rendono questi recettori un allettante target terapeutico e farmacologico per il *management* di diverse malattie, dall'aterosclerosi al diabete, dal cancro alle patologie infiammatorie.

### 1.7.1 LXR: gene e proteina

Nei mammiferi sono presenti due isoforme di LXR, LXR $\alpha$  (NR1H3) e LXR $\beta$  (NR1H2) (*Nuclear Receptor Nomenclature Committee*, 1999). I geni codificanti per le due isoforme sono localizzati in due diversi cromosomi: il gene codificante per LXR $\alpha$  si trova in posizione 11p11.2, mentre quello per LXR $\beta$  è localizzato in posizione 19q13.3 [89]. Tuttavia, sebbene le due proteine siano il prodotto di due geni indipendenti, la loro omologia di sequenza amminoacidica è pari al 78%, sia a livello del Dominio di Legame al DNA (DBD) sia in quello di legame al ligando (LBD).

Il gene che codifica per LXR $\alpha$  è lungo circa 20kb ed è formato da 12 esoni, 3 dei quali codificano per la regione non tradotta al 5' (5'UTR), mentre gli altri 9 sono necessari per la sintesi dell'RNA messaggero [89,99,100]. Il dominio LBD è codificato da 5 esoni mentre, a differenza degli altri recettori nucleari, il dominio DBD è contenuto in un singolo esone. Nel 2005, Chen e colleghi hanno identificato un totale di tre isoforme umane del gene LXR $\alpha$ , chiamate LXR $\alpha$ 1, LXR $\alpha$ 2 e LXR $\alpha$ 3 [99]. Queste tre isoforme, generate dallo *splicing* alternativo e dall'utilizzo di differenti promotori, sono espresse in maniera differente nei diversi tessuti umani. LXR $\alpha$ 1 è abbondantemente espresso in tessuti metabolicamente attivi, quali fegato, intestino, milza e tessuto adiposo [99]. LXR $\alpha$ 2, sebbene presenti un pattern di distribuzione simile a quello di LXR $\alpha$ 1, trova massima espressione nel testicolo. LXR $\alpha$ 3 è presente a bassi livelli nella maggior parte dei tessuti umani in condizioni fisiologiche, mentre è fortemente espresso nelle cellule tumorali.

LXR $\beta$ , invece, è codificato da un gene lungo 5kb e composto da 10 esoni. In maniera simile a LXR $\alpha$ , il dominio DBD è contenuto in un singolo esone. Al contrario, invece, il dominio LBD è codificato da 4 esoni [100]. Recentemente, è stata identificata una variante di *splicing* per LXR $\beta$ , chiamata LXRBSV (LXR –beta *splicing variant*), che è formata da 64 aminoacidi che concorrono a formare una proteina di circa 22kDa [101]. Curiosamente, contrariamente a LXR $\beta$  che è espresso in modo ubiquitario nell'organismo [102], la distribuzione tissutale di questa variante di *splicing* è elevata nel fegato e nel cervello, in particolare nella ghiandola pituitaria, permettendo delle speculazioni riguardo ad un possibile ruolo di LXR $\beta$  nello sviluppo di patologie pituitarie quali l'adenoma [103].

La struttura proteica dei recettori LXR consiste di domini funzionali organizzati strutturalmente in maniera simile agli altri recettori della superfamiglia dei NR. Nello specifico si possono distinguere quattro domini: un dominio N-terminale di attivazione ligando-indipendente (AF1), che può stimolare la trascrizione in assenza di ligando; un dominio di legame al DNA (DBD), che conferisce specificità di legame alle regioni LXRE; un dominio idrofobico di interazione con il ligando (LBD), necessario per il legame del ligando e la dimerizzazione del recettore; e un dominio C-terminale di trans-attivazione ligando-dipendente (AF2), che stimola la trascrizione in risposta al legame con uno specifico ligando.



## 1.7.2 LXR: regolazione dell'espressione e attività

L'attività dei recettori LXR può essere modificata non solo dal legame con molecole agoniste e antagoniste (Vedi Paragrafo 1.2.3), ma anche da cambiamenti nell'espressione del recettore e da modificazioni post-traslazionali.

Studi mirati alla caratterizzazione strutturale di LXR $\alpha$  e LXR $\beta$  hanno evidenziato che i promotori di questi due geni non presentano TATA box o elementi CAAT posizionati a monte del putativo sito di inizio della trascrizione [100]. Tuttavia, sul promotore di LXR $\alpha$  sono stati identificati due siti di legame per Sp1 (*Stimulatory Protein 1*) e tre siti per MAZ (*Myc-associated zinc finger protein*), mentre sul promotore di LXR $\beta$  insieme ai siti Sp1 sono stati identificati differenti siti per Ets (*E-twenty six transcription Factors*).

L'analisi della regione a monte del promotore di LXR hanno permesso di ipotizzare un *loop* autoregolatorio del recettore. Infatti, sul promotore del gene umano codificante per LXR $\alpha$  sono stati identificati tre diversi LXRE. Il primo, LXRE di tipo I, localizzato a circa 4Kb a monte del codone di inizio, funziona quale sito di legame ad elevata affinità per eterodimeri LXR $\alpha$ /RXR e LXR $\beta$ /RXR e giocano un ruolo critico nel mediare la risposta a LXR. Altri due siti, LXRE di tipo II, sono stati identificati all'interno di elementi Alu nel promotore di LXR $\alpha$  nell'uomo. Tali regioni, tuttavia, funzionano quali siti di legame a bassa affinità selettivi per l'eterodimero LXR $\alpha$ /RXR e sembrano giocare un ruolo minimo nell'induzione del gene hLXR $\alpha$  da parte di LXR $\alpha$ . Benché questi risultati suggeriscano che gli LXRE di tipo II non siano importanti nell'induzione di hLXR da parte dei ligandi di LXR, la presenza di queste sequenze rimane particolarmente interessante [104,105].

Inizialmente, si riteneva che il *loop* autoregolatorio di LXR fosse un meccanismo specie-specifico, in quanto studi condotti su linee cellulari murine non avevano riportato questa auto-attivazione [104]. Tuttavia, fu in seguito dimostrato come anche il promotore murino di LXR possedesse un attivo sito LXRE e che specifici ligandi di LXR erano in grado di indurre nel topo il *loop* autoregolatorio in maniera specifica nel tessuto adiposo, ma non nel fegato o nei macrofagi [106].

Diversi studi hanno inoltre dimostrato che l'espressione di LXR è regolata anche dai recettori PPAR (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*), in quanto sono stati identificati diversi siti di legame per PPAR (PPRE, *PPAR Responsive Element*) nella regione prossimale all'estremità 5' del gene che codifica per LXR $\alpha$  [107,108]. Tali evidenze sono state poi confermate da studi condotti sia *in vivo* che *in vitro*, in cui la somministrazione di ligandi di PPAR $\alpha$  e PPAR $\gamma$  comportava un aumento di espressione di LXR $\alpha$ , ma non di LXR $\beta$  [108].

Infine, un altro fattore coinvolto nel controllo dell'espressione di LXR $\alpha$  è l'insulina, in grado di incrementare i livelli di mRNA di LXR $\alpha$  negli epatociti di ratto con meccanismo dose-dipendente [109]. Sebbene l'esatto meccanismo non sia stato ancora completamente elucidato, la correlazione tra gli aumentati livelli di mRNA di LXR $\alpha$  e la sintesi proteica *de novo* in seguito a stimolazione da parte dell'insulina, suggeriscono che altri fattori a monte possano essere influenzati dall'insulina a livello trascrizionale o post-trascrizionale.

L'attività dei recettori LXR è regolata anche a livello post-trascrizionale. In entrambe le isoforme, LXR presenta in posizione 198 un sito di fosforilazione

(Ser198) che viene riconosciuto e fosforilato in maniera specifica dalle MAP (*Mitogen Activated Protein*) chinasi [110]. Nonostante la fosforilazione in Ser198 possa rappresentare un importante meccanismo di regolazione di LXR, non sono stati riportati cambiamenti consistenti nell'attività del recettore in seguito a fosforilazione. Tuttavia la fosforilazione non altera la capacità di LXR di legarsi a regioni LXRE o di transattivare geni target.

Recentemente è stato dimostrato che la fosforilazione di LXR mediata da PKA (*Protein Kinase A*) è associata con una forte inibizione della via di segnale di LXR e risulta in una repressione di SREBP1c sia *in vitro* che *in vivo* [111]. La relazione tra LXR, PKA e SREBP1c assume una notevole rilevanza in ambito fisiologico se si considerano gli effetti del digiuno sulla sintesi dei trigliceridi. Infatti, il digiuno è il primo segnale che induce la secrezione di glucagone e del suo mediatore cellulare cAMP (Adenosina Monofosfato ciclico), il quale reprime l'espressione di SREBP1c in seguito all'attivazione di PKA [112]. Probabilmente LXR rappresenta un intermediario in questa via di segnale. La fosforilazione di LXR indotta da PKA determina cambiamenti conformazionali a livello del recettore che non riesce né a dimerizzare con RXR, con conseguente incapacità di legare motivi LXRE, né ad attivarsi in seguito al legame con il ligando. Tale meccanismo di azione è stato poi confermato mediante studi di delezione sul promotore di SREBP1c che hanno rilevato la necessità di LXRE per mediare la soppressione di SREBP1c mediata da PKA.

L'assunzione di cibo, in seguito ad un periodo di digiuno, comporta un'attivazione di LXR e il conseguente controllo di una pletora di geni coinvolti

nell'omeostasi del colesterolo. Inoltre, il conseguente aumento della glicemia dovuto all'ingestione di cibo, induce LXR a svolgere un ruolo rilevante nella lipogenesi, attraverso l'attivazione di SREBP1c. Questo meccanismo è attribuibile all'aumento dei livelli di glucosio in circolo che risultano nella glicosilazione dei residui di serina e treonina a livello della proteina LXR [113]. È stato descritto come questo processo di glicosilazione avvenga sui medesimi residui amminoacidici target della fosforilazione, suggerendo come una specie di *switch* tra fosforilazione e glicosilazione sia alla base di un meccanismo per la regolazione nutrizionale della trascrizione di SREBP1c mediata da LXR.

Un'ulteriore modificazione post-trascrizionale di LXR è la deacetilazione ad opera della Sirtuina 1 (SIRT1). Le Sirtuine sono proteine NAD<sup>+</sup>-dipendenti che mediante attività di deacetilazione sono in grado di attivare o reprimere l'attività trascrizionale delle proteine bersaglio [114]. La SIRT1 deacetila LXR a livello del residuo Lys432, in seguito al legame del ligando al recettore, promuovendo il turnover di LXR mediato dall'ubiquitina con l'effetto finale di liberare il promotore da LXR e promuovere un nuovo ciclo di trascrizione.

## 1.8 Ligandi di LXR

### 1.8.1 Ligandi fisiologici di LXR: gli ossisteroli

I ligandi naturali di LXR sono i derivati monossigenati del colesterolo, gli ossisteroli. I recettori LXR appartengono alla famiglia dei NR non ormonali, i quali sono attivati da intermedi metabolici che solitamente si trovano ad elevate concentrazioni nell'organismo. Infatti l' $EC_{50}$  della maggior parte degli ossisteroli che legano LXR è in un *range* micromolare, simile ai livelli fisiologici degli ossisteroli che si trovano nel plasma e nei tessuti.

Gli ossisteroli sono considerati delle molecole regolatrici ideali. Poiché nell'organismo il loro destino metabolico è più rapido rispetto a quello del colesterolo, piccole variazioni nella concentrazione degli ossisteroli rispecchiano meglio le alterazioni nell'omeostasi del colesterolo, consentendo una risposta più rapida. I recettori LXR possono quindi essere definiti quali "sensori del colesterolo", che agiscono in risposta ad un eccesso di colesterolo intracellulare, stimolandone il catabolismo.

Negli organismi animali, gli ossisteroli provengono da tre diverse fonti: la produzione endogena attraverso reazioni enzimatiche, la produzione endogena non enzimatica per ossidazione del colesterolo da parte di specie reattive dell'ossigeno (ROS) ed infine il rilascio da parte degli alimenti.

Gli ossisteroli prodotti per via enzimatica si distinguono in:

- Intermedi della via biosintetica del colesterolo, come ad esempio il 24(S), 25-epossicolesterolo, prodotto in epatociti e macrofagi;

- Intermedi della sintesi degli ormoni steroidei, quali il 22(R)-idrossicolesterolo e il 20(S)-idrossicolesterolo;

- Composti prodotti dalle proteine idrolasi degli steroli (CYP), che includono il 24(S)-idrossicolesterolo, abbondante nel tessuto cerebrale, il 25-idrossicolesterolo e il 27-idrossicolesterolo, prodotti nei macrofagi in risposta all'accumulo di colesterolo, e l'acido colestenoico.

Gli ossisteroli prodotti per via enzimatica sono agonisti più potenti rispetto a quelli provenienti da altre sorgenti perché le forme enantiomeriche naturali posseggono una maggiore affinità per i recettori LXR rispetto agli stereoisomeri che non sono generati in modo endogeno. Perché un ossisterolo si configuri come un agonista specifico di LXR è necessaria la presenza di un gruppo ossidrilico in posizione 3 $\beta$  e di un altro ossidrilico sulla catena laterale [115]. Il 22(R)-idrossicolesterolo ( $EC_{50}=300nM$ ), il 24(S),25-epossicolesterolo ( $EC_{50}=500nM$ ), il 20(S)-idrossicolesterolo ( $EC_{50}=500nM$ ) e il 24(S)-idrossicolesterolo ( $EC_{50}=130nM$ ) sono stati identificati come i più potenti attivatori di LXR. Diversi studi hanno inoltre dimostrato che un'alterazione nell'orientamento spaziale dell'ossigeno legato al carbonio C24 sulla catena sterolica, passando dalla configurazione (S) a quella (R), comporta una riduzione del 50% dell'attivazione trascrizionale insieme ad una marcata riduzione dell'affinità di legame nei confronti di entrambe le isoforme di LXR [115].

Gli ossisteroli provenienti dall'ossidazione non enzimatica del colesterolo mediata dai ROS e quelli provenienti dalla dieta non sono considerati ligandi di LXR, poiché la loro concentrazione plasmatica è di gran lunga inferiore a quella

degli ossisteroli generati per via enzimatica e la loro abbondanza risulta essere significativa solo in condizioni patologiche in cui sono coinvolti stress ossidativo oppure diete ricche in colesterolo.

## **1.8.2 Ligandi di LXR non appartenenti agli ossisteroli**

### ***1.8.2.1 Agonisti sintetici***

Allo scopo di elucidare le funzioni biologiche dei recettori nucleari LXR, sono stati sintetizzati due composti agonisti non steroidei: il T0901317, con un  $EC_{50}$  pari a 20nM [116], e il GW3965 [117]. Il T0901317 è in grado di legarsi a LXR nello stesso sito utilizzato dai ligandi endogeni. Tuttavia, il T0901317 ha dimostrato avere un'elevata affinità non solo per l'isoforma LXR $\alpha$ , ma anche una moderata affinità per PXR (*Pregnane X Receptor*) e FXR [118,119]. Il GW3965 è stato sviluppato con delle differenze strutturali rispetto alle classi di ossisteroli che attivano LXR. Il GW3965 presenta una maggiore affinità per LXR $\beta$  ( $EC_{50}$ =30nM) rispetto a LXR $\alpha$  ( $EC_{50}$ =190nM) [117]. Tuttavia la differente affinità del GW3965 non è sufficiente per discriminare l'attivazione delle due isoforme. La somministrazione *in vivo* di tali agonisti è in grado di indurre la trascrizione di noti target genici di LXR, come la proteina ABCA1 (*ATP-Binding Cassette A1*) di aumentare il colesterolo HDL e di promuovere il trasporto inverso del colesterolo [120]. Tuttavia, entrambi questi agonisti sintetici sono capaci di esercitare marcati effetti lipogenici, quali ipertrigliceridemia e steatosi epatica, che ne precludono un effettivo impiego nella pratica clinica.

La necessità di sviluppare composti in grado di promuovere gli effetti ateroprotettivi e anti-infiammatori tipici dell'attivazione dei recettori LXR senza indurre processi di lipogenesi, ha permesso di generare un'ampia gamma di composti, il cui tropismo tissutale e la cui specificità cellulare sono stati testati. Un esempio sono il N,N-dimetil-3 $\beta$ -idrossicolenamida (DMHCA), con ridotti effetti nell'attivazione di SREBP1c a livello epatico, ma capace di indurre fortemente l'espressione di ABCA1 a livello del fegato e dei macrofagi [121], e il GW3965, chiamato GW6340, capace di promuovere l'espressione di ABCA1 e di altri target genici di LXR nell'intestino. Tale attivazione determina un aumento dei livelli plasmatici di colesterolo e promuove un incremento del flusso del colesterolo dalle cellule periferiche alle feci, sottolineando così il ruolo fondamentale dell'intestino nel catabolismo del colesterolo [122].

Al fine di eliminare gli effetti collaterali dovuti all'attivazione dei processi di lipogenesi dipendenti da LXR e migliorare così l'indice terapeutico degli agonisti di LXR, sono stati sviluppati agonisti specifici per l'isoforma LXR $\beta$  in quanto l'isoforma LXR $\alpha$  è quella maggiormente responsabile degli effetti lipogenici indesiderati [123]. Tuttavia questo approccio si è rivelato difficoltoso, a causa dell'elevata omologia di sequenza caratterizzante le due isoforme. Recentemente è stato identificato il WYE-672 (*phenyl sulfone substituted quinoxaline*) che presenta una minima affinità di legame per LXR $\alpha$ , con conseguente incapacità di reclutare i coattivatori necessari ad esplicare le funzioni di LXR $\alpha$ . Al tempo stesso WYE-672 è in grado di ridurre efficacemente la progressione delle lesioni aterosclerotiche senza comportare aumenti sierici o



epatici dei trigliceridi, sottolineando così una sua possibile applicazione a livello farmacologico [124].

### 1.8.2.2 Agonisti naturali

Negli ultimi anni, molecole isolate da fonti naturali, quali piante, funghi e microorganismi, hanno raggiunto un forte riconoscimento popolare per la prevenzione e il trattamento di differenti patologie. Molti di questi prodotti naturali sono stati identificati quali ligandi per molteplici NR ormonali. Spesso questi composti naturali sono impiegati come complemento dietetico per trattare innumerevoli disturbi (es. ipercolesterolemia, ridotte funzioni cognitive).

La paxillina è stato il primo agonista naturale di LXR ed essere identificato. La paxillina, isolata dal fungo *Penicillium paxili*, è attiva su entrambe le isoforme di LXR ed è efficace nell'indurre l'espressione dei suoi geni target, come ABCA1, a livelli simili a quelli mostrati in seguito all'attivazione di LXR da parte del ligando naturale 22(R)-idrossicolesterolo. Tuttavia, essendo un forte antagonista dei canali del potassio indotti dal calcio, la paxillina è estremamente tossica e non è mai stata applicata *in vivo* [125].

Un ulteriore composto identificato è Riccardin C, prodotto naturale non steroideo isolato dalla *Marchantia polymorpha*, presenta un'attività agonista nei confronti di LXR $\alpha$  e antagonista per LXR $\beta$ . Studi *in vitro* hanno dimostrato che Riccardin C si lega ad entrambe le isoforme del recettore LXR, ma, mentre LXR $\alpha$  è in grado di reclutare il coattivatore SRC-1 con conseguente aumento della trascrizione dei geni target, il complesso Riccardin C-LXR $\beta$  non è in grado di

legare il complesso di coattivazione. Mentre in linee cellulari macrofagiche (THP-1) questo agonista naturale è capace di incrementare l'espressione di ABCA1, ABCG1 e SREBP1c, in colture cellulari di epatociti (HepG2) gli stessi geni non vengono indotti [126].

Infine, TR1 ((20S)-2 $\alpha$ , 3 $\beta$ , 12 $\beta$ , 24(S)-pentaidrossidammar-25-ene-20-O- $\beta$ -d-glucopiranoside) è una ginosaponina isolata dall'erba medicinale *Gynostemma pentaphyllum*. TR1 presenta una maggiore selettività per LXR $\alpha$  rispetto a LXR $\beta$  ed è in grado di indurre l'espressione di ABCA1 e ApoE (*Apolipoprotein E*) in cellule derivate da macrofagi [127].

Recentemente, diversi studi hanno evidenziato un possibile ruolo degli steroli di origine vegetale quali ligandi di LXR. Al posto del colesterolo, le piante sintetizzano altri steroli che possiedono una struttura chimica simile, come sitosteroli, stigmasteroli, campesteroli, brasicasteroli ed ergosteroli. Gli steroli di origine vegetale sono riconosciuti per il potenziale terapeutico in qualità di antiaterosclerotici, poiché sono in grado di ridurre i livelli sierici di colesterolo mediante inibizione del suo assorbimento intestinale. Ulteriori analisi utilizzando saggi di luciferasi hanno dimostrato che lo stigmasterolo, ma non il sitosterolo, è in grado di attivare LXR $\alpha$  e che il composto YT-32 (la cui struttura è simile a quella dell'ergosterolo) attiva LXR $\alpha$  più efficacemente di agonisti noti come il 24(s),25-epossicolesterolo e il 22(R)-idrossicolesterolo [128].

### 1.8.3 Antagonisti di LXR

I potenti effetti dell'attivazione dei recettori LXR nell'omeostasi del colesterolo e contemporaneamente gli effetti avversi dovuti alla capacità di LXR di promuovere l'espressione di geni lipogenici ha suggerito la possibilità di controllare negativamente l'attività di LXR mediante l'uso di specifici antagonisti.

Il primo antagonista di LXR ad essere stato isolato è il GGPP (*geranyl-geranyl pyrophosphate*), un sottoprodotto del metabolismo del mevalonato. L'effetto negativo esercitato da GGPP sulle funzioni dell'eterodimero LXR/RXR è stato dimostrato sperimentalmente. Il trattamento di cellule THP-1 con GGPP è in grado di down-regolare l'espressione di ABCA1 tramite l'inibizione del reclutamento di SRC-1 su LXR [129]. Tuttavia, GGPP inibisce solo parzialmente gli effetti di LXR attivato dal legame con il ligando 22(R)-idrossicolesterolo, suggerendo che il sito di legame per GGPP sia differente da quello per i ligandi. Tali studi hanno inoltre dimostrato che differenti prodotti del metabolismo del mevalonato possono sia attivare (22(R)-idrossicolesterolo, 20(S)-idrossicolesterolo) sia inibire (GGPP) l'attivazione di LXR, che può quindi funzionare come sensore del flusso della via del mevalonato.

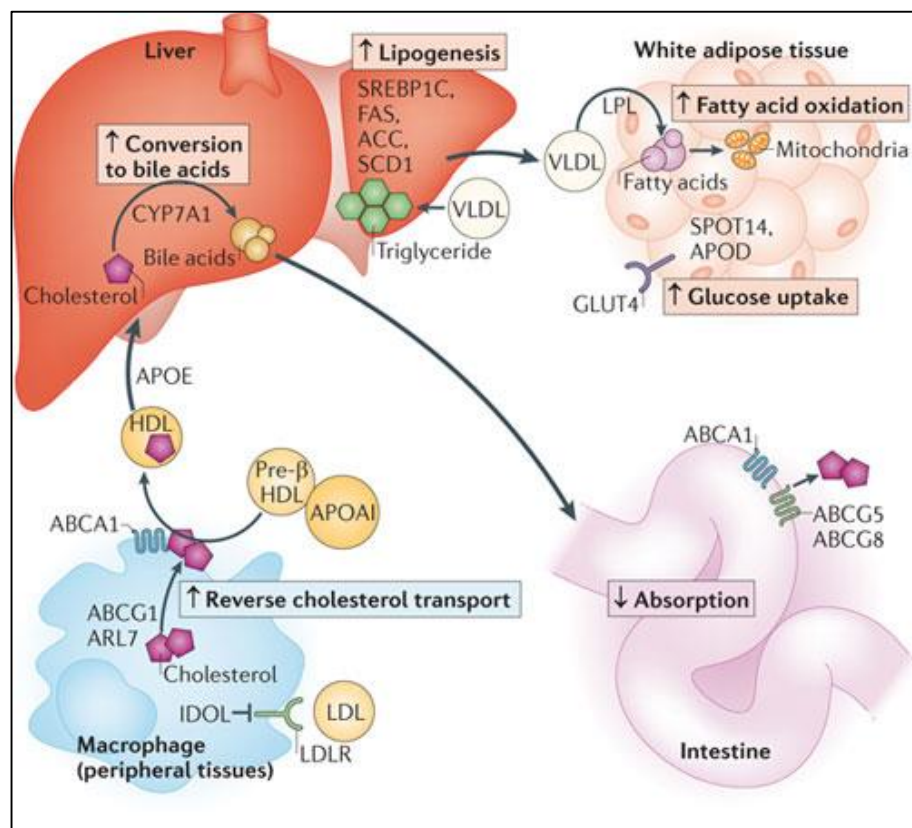
Uno dei più importanti e dibattuti target genici di LXR è SREBP1c. Questo gene può essere regolato a livello trascrizionale e post-trascrizionale dagli acidi grassi poli-insaturi (PUFA) [130-132]. L'effetto opposto esercitato da LXR e dai PUFA nei confronti di SREBP1c ha permesso di ipotizzare che i PUFA possano agire come antagonista di LXR. Nello specifico, i PUFA sopprimono l'espressione di SREBP1c tramite l'interazione con il dominio di legame (LBD) di LXR e di

conseguenza impediscono il legame dell'eterodimero LXR/RXR ai siti LXRE, che sono cruciali per l'espressione di SREBP1c [133,134]. I PUFA sono invece degli agonisti del recettore PPAR $\alpha$ , il quale è coinvolto nella regolazione dell'ossidazione degli acidi grassi. In condizioni di digiuno, quindi, gli acidi grassi vengono rilasciati dal tessuto adiposo nel torrente circolatorio, mediante l'azione delle lipasi. Una volta in circolo, gli acidi grassi possono essere captati dal fegato dove da un lato attivano PPAR $\alpha$  promuovendo la  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi, dall'altro inibiscono LXR riducendo la lipogenesi.

Infine, un importante ruolo nella modulazione dell'attività di LXR è giocato dai processi di sulfonilazione. Quando metaboliti del colesterolo quali 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epossicolesterolo e 7-cheto-colesterolo si auto ossidano, possono essere convertiti in derivati sulfonilati in grado di inibire l'attività di LXR [135]. È interessante notare come tali derivati siano stati riscontrati ad alte concentrazioni nelle lesioni aterosclerotiche e nel plasma di soggetti ipercolesterolemici [136]. Pertanto, gli effetti antagonisti di questi metaboliti del colesterolo autossidati e sulfonilati possono inibire le capacità antiaterosclerotiche di LXR.

## 1.9 Effetti metabolici di LXR (LXR e Metabolismo)

I recettori LXR giocano un ruolo fondamentale come regolatori dei livelli di colesterolo plasmatico poiché, avvertendone l'aumento, mettono in atto diversi meccanismi finalizzati alla protezione delle cellule dal sovraccarico di colesterolo. L'attivazione dei recettori LXR determina: 1) la stimolazione della rimozione del colesterolo dalle cellule, il suo trasporto nel fegato e la successiva secrezione a livello biliare, 2) l'incremento della secrezione del colesterolo da parte delle cellule intestinali nel lume intestinale, 3) l'inibizione della biosintesi del colesterolo e del suo *uptake* da parte delle cellule (Figura 11).



**Figura 11. Rappresentazione schematica dei diversi pathways di LXR.** Gli effetti metabolici di LXR sono tessuto specifici. Tuttavia, in generale LXR agisce come sensore del colesterolo in eccesso e innesca una serie di processi mirati a proteggere le cellule da un'eventuale sovraccarico. (Immagine tratta da "Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR" [137])

Insieme al prominente ruolo svolto nel metabolismo del colesterolo, è stato dimostrato che i recettori LXR regolano la biosintesi degli acidi grassi a livello epatico unitamente all'anabolismo e al catabolismo degli acidi biliari. Tutte queste funzioni hanno il netto risultato di facilitare l'eliminazione del colesterolo dall'organismo.

L'upregolazione di SCD-1 (*Stearoyl-CoA desaturase*) genera oleoyl-CoA, substrato di eccellenza per la formazione di esteri del colesterolo e per la sintesi dei trigliceridi [116]; [91] che contribuiscono alla rimozione del colesterolo dalle cellule mediante la formazione di VLDL. Infine, i recettori LXR attivano CYP7a1 (*Cytochrome P450 7a1*) nel fegato di modelli murini, il quale stimola la sintesi degli acidi biliari dal colesterolo e la loro successiva conversione, tramite UGT1A3 (*UDP-glucuronosyltransferase-1A3*), in metaboliti che possono essere escreti nelle urine [138].

### **1.9.1 LXR e metabolismo del colesterolo**

La rilevanza fisiologica dei recettori LXR nella regolazione del metabolismo del colesterolo è stata chiaramente dimostrata in seguito alla generazione di modelli murini knockout per LXR $\alpha$  e LXR $\beta$  [89,139].

In seguito al trattamento con diete ad alto livello di colesterolo, topi *knockout* per LXR $\alpha$ , ma non per LXR $\beta$ , presentano un fenotipo caratterizzato da epatomegalia e dall'accumulo di grandi quantità di colesterolo nei fegati. Tale fenotipo deriva dall'incapacità di up-regolare l'espressione di CYP7A1, responsabile della conversione del colesterolo in acidi biliari, e di promuovere la

sintesi degli acidi biliari e la loro secrezione nelle feci, in risposta ad una dieta ricca in colesterolo. Sebbene LXR $\beta$  fosse presente nel fegato di questi animali, la sua espressione non è in grado di compensare l'assenza di LXR $\alpha$ , probabilmente a causa della elevata specificità per l'isoforma trovata nel sito LXRE nella regione del promotore del gene Cyp7a1 [89,139]. Al contrario, topi in cui LXR $\beta$  è stato deleto sono in grado di adattarsi ad una dieta ricca in colesterolo, mantenendo i livelli di colesterolo epatico all'interno di un range di normalità [139].

Unitamente al ruolo giocato nella sintesi degli acidi biliari, l'attivazione di LXR promuove l'escrezione del colesterolo epatico supportando la trascrizione di ABCG5 e ABCG8 nel fegato [85]. Entrambi regolati dall'attivazione di LXR, ABCG5 e ABCG8 sono trasportatori che formano eterodimeri obbligati e che sono espressi sulla membrana canalicolare degli epatociti dove promuovono il trasporto di colesterolo nella bile [35]. Nell'uomo è stato riscontrato che mutazioni a carico di ABCG5 e ABCG8 nel fegato comportano un disordine genetico definito "sitosterolemia", caratterizzato da una diminuita secrezione degli steroli nella bile e da un aumentato assorbimento del colesterolo [140,141].

Il fegato è anche il principale sito della biosintesi e dell'*uptake* del colesterolo. Studi su topi *knockout* per LXR hanno evidenziato un'elevata espressione epatica di geni coinvolti nella biosintesi del colesterolo, quali SREBP2, HMG-CoA sintasi e reduttasi e squalene sintasi [89,139].

Inoltre, i recettori LXR influenzano il profilo delle lipoproteine circolanti. LXR inibisce la via di segnale del recettore per le LDL (*Low Density Lipoprotein*) mediante l'induzione dell'ubiquitina ligasi Idol (*Inducible degrader of the LDLR*)

[88,89]. Inoltre, LXR induce attivamente enzimi coinvolti nel rimodellamento delle lipoproteine come LPL (lipoproteina lipasi), che catalizza l'idrolisi delle lipoproteine ricche in trigliceridi [142], CETP, che media il trasferimento degli esteri del colesterolo in particelle ApoB in cambio di trigliceridi [143] e PLTP, che riveste un ruolo critico per la produzione di pre $\beta$ -HDL e per la secrezione di VLDL dal fegato [144].

Unitamente al ruolo giocato nel metabolismo del colesterolo epatico, LXR è anche in grado di modulare l'assorbimento e l'escrezione del colesterolo a livello intestinale. L'attivazione dei recettori LXR promuove l'espressione di ABCG5 e ABCG8 nell'intestino con conseguente aumento della quantità di colesterolo escreta nelle feci e concomitante diminuzione dell'assorbimento intestinale del colesterolo [35,85].

I recettori LXR sono, inoltre, coinvolti nell'eliminazione del colesterolo trans-intestinale (TICE, *Trans-Intestinal Cholesterol Elimination*), un processo attraverso il quale il colesterolo passa attraverso la barriera intestinale direttamente dai vasi sanguigni, evitando così il coinvolgimento della classica via epatobiliare. Una buona parte del colesterolo in eccesso è quindi eliminata direttamente tramite l'intestino, come evidenziato in studi condotti su topi deficitari per il trasportatore ABCB4, responsabile della secrezione del colesterolo nella bile: l'attivazione di LXR in questo modello murino promuove l'aumento della quantità di colesterolo escreto nelle feci [40,42,145].



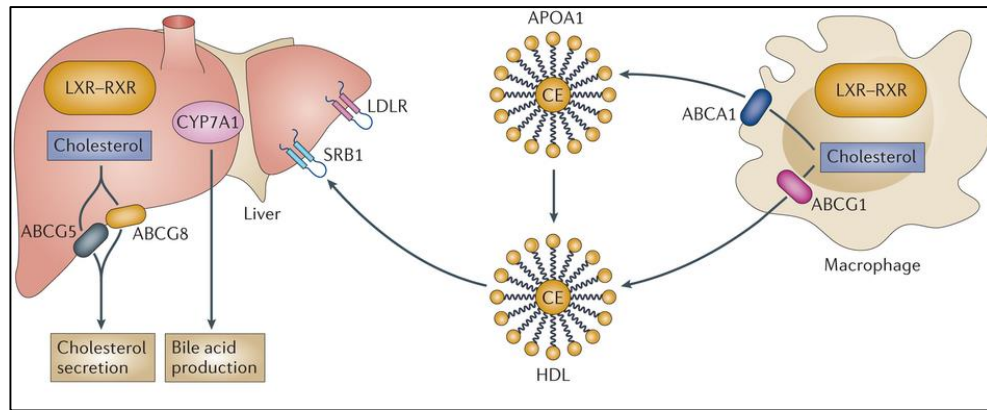
Infine, LXR promuove la down-regolazione dell'espressione di NPC1L1 (*Niemann-Pick 1-like-1*) negli enterociti, diminuendo di conseguenza l'assorbimento del colesterolo assunto con la dieta [86].

### **1.9.2 LXR e il trasporto inverso del colesterolo**

Il trasporto inverso del colesterolo (RCT, *Reverse Cholesterol Transport*) è una via attraverso cui il colesterolo in eccesso è trasportato dai tessuti periferici al fegato dove viene secreto nella bile e successivamente eliminato tramite le feci. La maggior parte dei passaggi cruciali del RCT sono regolati dai recettori LXR in diversi tessuti (Figura 12).

Il primo step del RCT consiste nella rimozione del colesterolo dai tessuti mediante le HDL (*High Density Lipoprotein*) o apolipoproteine libere dai grassi come ApoA-I e ApoE. Questo fondamentale processo è principalmente regolato dai trasportatori ABCA1 e ABCG1, noti target di LXR.

ABCA1 è responsabile del trasferimento del colesterolo e dei fosfolipidi dalla membrana plasmatica alle pre-HDL o alla apolipoproteina ApoA1, pertanto può essere considerato quale uno dei più importanti fattori nella formazione di HDL provenienti dal fegato e dall'intestino. L'ablazione di ABCA1 a livello intestinale nel topo presenta una riduzione del 30% nei livelli di HDL plasmatiche, mentre l'up-regolazione di ABCA1 successiva all'attivazione di LXR incrementa i livelli plasmatici di HDL e promuove il RCT [58,146].



**Figura 12. LXR regola il trasporto inverso del colesterolo (RCT).** L'attivazione di LXR inibisce l'*uptake* del colesterolo extracellulare e contemporaneamente aumenta l'efflusso di colesterolo dalle cellule periferiche come i macrofagi. (Immagine da "Liver X receptors in lipid metabolism: opportunities for drug discovery" [83])

Recentemente, i recettori LXR sono stati collegati all'induzione della TICE (Vedi 1.4.1), sottolineando ancora una volta il forte potenziale di un'induzione intestinale di LXR.

Inoltre, l'espressione di ABCA1 è up-regolata anche in macrofagi trattati con ligandi sintetici o naturali per LXR. Unitamente al ruolo svolto in processi immunitari, i macrofagi sono caratterizzati dalla capacità di accumulare colesterolo nelle pareti arteriose contribuendo allo sviluppo di lesioni aterosclerotiche. La capacità di LXR di aumentare il RCT e attenuare i processi di infiammazione nei macrofagi supporta l'ipotesi che l'attivazione di LXR nei macrofagi contribuisca a proteggere dallo sviluppo dell'aterosclerosi. Ciò è avvalorato dal fatto che il trapianto di midollo osseo da topi *knockout* per entrambe le isoforme di LXR in topi *knockout* per LDLR o ApoE aggrava l'aterosclerosi in questi animali nonostante i livelli di colesterolo plasmatici siano ridotti [147].

In maniera differente da ABCA1, ABCG1 trasferisce il colesterolo a particelle HDL-2 e HDL-3, ma non a ApoA-I povere in lipidi. Studi condotti su topi deficitari per ABCG1, hanno rivelato la sua abbondanza in macrofagi, cellule endoteliali, linfociti e fegato. La somministrazione di ligandi di LXR in questi modelli murini stimola l'efflusso di colesterolo verso le lipoproteine ApoA-I ma non verso le HDL [60,148]

Oltre ai trasportatori ABC, diverse apolipoproteine ed enzimi coinvolti nel metabolismo lipidico implicati nel RCT sono target trascrizionali di LXR. Tra questi, ApoE, l'intero cluster formato da ApoCI/ApoCIV/ApoCII nei macrofagi, ApoD nel tessuto adiposo, ApoAV nel fegato, LPL, PLTP e CEPT nel fegato e nei macrofagi [149-152].

L'apolipoproteina ApoE è localizzata sulla superficie delle lipoproteine plasmatiche ed è un ligando ad alta affinità per LDLR. ApoE è necessaria per l'*uptake* epatico dei chilomicroni, delle VLDL e di certi tipi di HDL e può funzionare quale recettore del colesterolo extracellulare esportato tramite ABCA1. Nei macrofagi e nel tessuto adiposo, Apo E è attivata in maniera selettiva da LXR grazie alla presenza di specifici siti LXRE posti in due *enhancers* [150]. Perciò l'up-regolazione di ApoE e la sua successiva secrezione promuovono l'incorporazione del colesterolo nelle HDL. Infatti, organismi umani e murini in cui ApoE risulta assente presentano un massiccio accumulo di lipoproteine a livello plasmatico [153,154].

ApoAV è l'unica apolipoproteina ad essere down-regolata da LXR tramite un processo che coinvolge SREBP1c e che potrebbe contribuire all'incremento

dei trigliceridi mediato da LXR [151]. Nonostante sia risaputo che ApoCI, ApoCII e ApoCIV siano capaci di accettare colesterolo da ABCA1 e che ApoD sia coinvolta nel trasferimento dei lipidi e nel RCT, ulteriori studi sono necessari al fine di chiarire il ruolo giocato da queste lipoproteine.

Infine, l'attivazione dei recettori LXR induce l'espressione di SR-BI nelle cellule di epatoma e negli adipociti [155]. SR-BI controlla il trasferimento del colesterolo dalle HDL agli epatociti, pertanto la sua regolazione potrebbe essere fondamentale nell'induzione del trasporto inverso del colesterolo mediato da LXR. Tuttavia, ad oggi, non è ancora stata dimostrata l'induzione *in vivo* di SR-BI da parte di LXR.

### **1.9.3 Metabolismo del colesterolo e infiammazione**

L'identificazione di LXR quale potenziale principale regolatore del trasporto inverso del colesterolo, ha permesso di evidenziare il ruolo giocato da questo recettore nella risposta infiammatoria ed il suo coinvolgimento nei processi di aterosclerosi, obesità e di alcune malattie autoimmuni [156-158].

In seguito all'assunzione di una dieta ricca in lipidi, i livelli di colesterolo aumentano nel sangue. L'ipercolesterolemia comporta un accumulo di colesterolo a livello dei macrofagi e di altre cellule immunitarie, promuovendo così l'insorgenza di una risposta infiammatoria. Sebbene l'accumulo di colesterolo possa avere degli effetti benefici nella risposta alle infezioni, in quanto promuove la risposta infiammatoria, peggiora quelle malattie che sono

associate ad una infiammazione metabolica cronica, come l'aterosclerosi o l'obesità.

Le principali lipoproteine circolanti con potenziale aterogenico sono le LDL. Alti livelli di LDL promuovono l'accumulo di colesterolo e la stimolazione di processi di infiammazione sulle pareti arteriose con conseguente formazione di placche aterosclerotiche. Al contrario, le HDL promuovono l'efflusso del colesterolo dalla cellula, opponendosi così all'insorgenza dell'infiammazione. Le LDL possono funzionare anche quali ligandi per i recettori di riconoscimento dei macrofagi, come i TLR (*Toll like receptor*) e possono quindi stimolare direttamente i processi infiammatori [159]. Inoltre, LDL modificate in seguito a processi di aggregazione e ossidazione possono essere fagocitate dai macrofagi causando un accumulo di colesterolo intracellulare che porta ad un'ulteriore attivazione dei TLR. L'aumento dell'attività dei TLR conduce ad un'amplificazione della risposta infiammatoria, dovuta alla stimolazione della produzione di chemochine e citochine. La formazione di cristalli di colesterolo intracellulari può portare all'attivazione dell'inflammosoma NLRP3 (*NOD-, LRR- and pyrin domain-containing 3*) [160].

Gli elevati livelli di colesterolo e dei suoi derivati all'interno della cellula causano l'attivazione di LXR che contrasta l'amplificazione del segnale di TLR dovuta all'accumulo di colesterolo, sia up-regolando l'espressione dei trasportatori ABC e iniziando il processo del RCT, sia promuovendo l'efflusso del colesterolo dai macrofagi. Tuttavia, l'attivazione di TLR comporta una diminuita trascrizione dei geni target di LXR nei macrofagi, quali ABCA1, ABCG1 e ApoE; di

conseguenza, l'efflusso del colesterolo dai macrofagi diminuisce e il segnale di TLR viene ulteriormente amplificato [161,162].

Un ulteriore meccanismo mediante il quale LXR può contrastare il processo infiammatorio e svolgere quindi un ruolo anti-aterosclerotico risiede nella sua capacità di reprimere la produzione dei mediatori infiammatori dei macrofagi. Il microambiente della placca aterosclerotica è pro-infiammatorio, a causa dell'attivazione della via classica dell'infiammazione e del rilascio dei mediatori infiammatori. Diversi studi hanno dimostrato che l'eccessiva infiammazione nella parete arteriosa è un alto fattore di rischio per lo sviluppo dell'aterosclerosi [163]. Nello specifico, i recettori LXR reprimono una serie di geni infiammatori in seguito alla stimolazione batterica, con LPS (lipopolisaccaride), TNF $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ) o IL1 $\beta$  (*Interleukin 1 $\beta$* ). Tra i geni repressi ci sono quelli coinvolti nella produzione di molecole bioattive come iNOS (*inducible nitric oxide synthase*), COX2 (*Cyclooxygenase 2*), IL6 (*Interleukin 6*), IL1 $\beta$ , MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) e MMP9 (*metalloprotease 9*) [81,161]. La repressione di questi geni da parte di LXR è persa solo nei macrofagi di animali doppi *knockout* per LXR $\alpha/\beta$ , ma non nei *knockout* per le singole isoforme, indicando che sia LXR $\alpha$  che LXR $\beta$  possiedono un'attività antiinfiammatoria. Il meccanismo attraverso cui i recettori LXR reprimono i geni dell'infiammazione non è ancora stato chiarito. L'assenza di siti LXRE sul promotore dei geni infiammatori, suggerisce l'esistenza di un meccanismo indiretto in cui LXR potrebbe attivare uno specifico repressore o competere in maniera diretta con altri fattori di trascrizione. Ad esempio, è stato descritto che

LXR trans-reprime il segnale di NF- $\kappa$ B [81] e che l'attivazione di LXR consente ai co-repressori NCoR e SMRT di localizzarsi sui promotori dei geni infiammatori, portando alla loro down-regolazione [164].

#### **1.9.4 LXR e metabolismo degli acidi grassi**

Oltre al ruolo chiave svolto nel metabolismo del colesterolo, i recettori LXR esercitano la loro funzione anche nel metabolismo degli acidi grassi a livello epatico. La maggior parte di questi effetti sono mediati dalla regolazione diretta di SREBP1c, il principale regolatore della sintesi degli acidi grassi e dei trigliceridi [1,90].

L'espressione di geni lipogenici è un effetto isoforma-specifico. Infatti, mentre in animali LXR $\beta$  *knockout* l'espressione di SREBP1c nel fegato è mantenuta a livelli normali, topi in cui LXR $\alpha$  è stato deletato presentano una notevole riduzione della sintesi epatica degli acidi grassi, dovuta al decremento dei livelli di SREBP1c e dei suoi geni target, tra cui FASN e SCD-1 [89,90,139]. Nello specifico, LXR $\alpha$  lega due siti funzionali LXRE sul promotore del gene che codifica per SREBP1c, necessari per promuovere l'espressione basale e indotta della proteina SREBP1c [165]. Inoltre, LXR $\alpha$  è capace di controllare direttamente l'espressione di alcuni geni target di SREBP1c coinvolti nella sintesi degli acidi grassi, che presentano dei siti LXRE sui loro promotori; tra questi, ACC, FASN e SCD-1 [91-93]. In accordo con questi dati, è stato osservato che la somministrazione di un ligando sintetico di LXR promuoveva l'incremento di

espressione di SREBP1c, ACC, FASN e SCD-1 negli animali *wild-type*, ma non in quelli in cui l'isoforma LXR $\alpha$  o entrambe le isoforme erano assenti, con conseguente accumulo di trigliceridi a livello epatico e plasmatico [116]. L'ipertrigliceridemia indotta dall'attivazione di LXR è ascrivibile all'aumentata secrezione epatica di VLDL-trigliceridi [166].

Oltre agli effetti sulla lipogenesi dovuti all'aumento di SREBP1c e di geni ad esso correlati, i recettori LXR partecipano ad una complessa regolazione del metabolismo dei lipidi. Infatti, l'attivazione di LXR mediante l'uso di ligandi sintetici o naturali comporta un aumento dei livelli di espressione epatici della *Angptl3 (Angiopoietin-like protein 3)*, la quale provoca un aumento dei livelli circolanti di trigliceridi attraverso l'inibizione dell'attività di LPL [167]. Inoltre, LXR sembra essere fondamentale nel diminuire l'eccesso di glucosio, poiché lo trasforma in lipidi. L'attivazione di LXR stimola l'aumento dell'espressione e dell'attività di ChREBP (*Carbohydrate response element binding protein*), unitamente all'incremento dei livelli epatici di mRNA dei geni da esso regolati. ChREBP è un fattore di trascrizione sensibile al glucosio che stimola l'espressione di geni lipogenici; in questo modo, i carboidrati in eccesso vengono convertiti in lipidi [168].

I recettori LXR sembrano oltremodo coinvolti nel metabolismo dei grassi in relazione alla dieta. Quando trattati con una dieta ad alti livelli di colesterolo, modelli murini in cui entrambe le isoforme di LXR sono state delete non sono obesi e presentano una migliore tolleranza al glucosio. Difatti, tali modelli bruciano il grasso nei tessuti periferici, evitando così che si depositi, con



conseguente aumento del tasso metabolico, e sopprimono l'espressione dei geni coinvolti nella sintesi degli acidi grassi [169].

Infine, occorre sottolineare come il colesterolo sia meno efficiente nell'indurre processi di lipogenesi rispetto all'utilizzo di agonisti. Tale effetto è probabilmente dovuto alla capacità del colesterolo e di alcuni ossisteroli di inibire l'attivazione della proteina SREBP1c. Pertanto, il colesterolo non induce un aumento della sintesi degli acidi grassi, mentre i ligandi sintetici non-steroidi provocano un notevole incremento dell'attività di SREBP1c, che risulta nell'over-stimolazione della sintesi degli acidi grassi.

Sicuramente l'induzione della lipogenesi dovuta all'utilizzo di recettori sintetici per LXR, che comporta lo sviluppo di forme severe di steatoepatite e l'aumento dei livelli ematici dei trigliceridi, è uno dei principali ostacoli all'applicazione clinica di queste molecole. Tuttavia, in specie più evolute come l'uomo, tali effetti avversi risultano ancora ambigui.

### **1.9.5 LXR e metabolismo del glucosio**

Una mole sempre più cospicua di studi sostiene che i recettori LXR svolgano un ruolo nella regolazione dell'omeostasi del colesterolo. Invero, risultati ottenuti da diversi gruppi di ricerca hanno dimostrato che il trattamento con agonisti di LXR riducono i livelli plasmatici del glucosio e aumentano la sensibilità nei confronti dell'insulina in numerosi modelli di diabete e di insulino-resistenza. Ciò è stato attribuito ad una coordinata regolazione trascrizionale dei

geni coinvolti nel metabolismo del glucosio sia nel fegato sia nei tessuti extraepatici. Infatti, l'attivazione dei recettori LXR comporta una notevole down-regolazione di enzimi chiave nel processo di gluconeogenesi, quali PEPCK (*Phosphoenolpyruvate carboxikinase*), G6Pase (*Glucose-6-phosphatase*), FBP1 (*Fructose-1,6-biphosphatase*) [170]. Inoltre, in animali sottoposti a dieta ricca di grassi, la somministrazione del ligando sintetico GW3965 aumenta l'espressione epatica di GK (*Glucokinase*) e di G6PDH (*Glucose 6-phosphate dehydrogenase*), comportando l'*uptake* di glucosio e il suo utilizzo a livello del fegato [94]. Tuttavia, il meccanismo di controllo dei geni gluconeogenici da parte di LXR non è ancora del tutto chiaro; ad esempio, è stato ipotizzato che la G6Pase non sia controllata in maniera diretta da LXR, quanto piuttosto dalla regolazione di un effettore secondario [171].

Due proteine sembrano giocare un ruolo fondamentale nella regolazione della gluconeogenesi da parte di LXR: PGC-1 $\alpha$  (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*), coinvolto nella produzione epatica di glucosio, è down-regolato in seguito all'attivazione di LXR ([94,172,173], e SREBP1c, responsabile della down-regolazione di PEPCK [174]. Ulteriori meccanismi proposti implicano la soppressione mediata da LXR della via di segnale dei glucocorticoidi, attraverso la riduzione di due importanti proteine quali il recettore dei glucocorticoidi e la 11 $\beta$ -HSD1 (*11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1*) in modelli murini wild-type e di dislipidemia diabetica (db/db) [170,175].

Oltre agli effetti sul metabolismo del glucosio a livello del fegato, l'attivazione dei recettori LXR può influenzare anche l'omeostasi del glucosio in altri tessuti, come il tessuto adiposo bianco (WAT, *White Adipose Tissue*), il muscolo e il pancreas. Ad esempio, nel WAT il trasportatore del glucosio GLUT4 (*Glucose Transporter 4*) è un target diretto di entrambe le isoforme di LXR, anche se solo i topi in cui LXR $\alpha$  è deletato, presentano un abbassamento dei livelli di mRNA di GLUT4 [95]. Si può quindi dedurre che l'attivazione di LXR possa migliorare l'insulino-resistenza stimolando l'*uptake* di glucosio da parte dei tessuti periferici. Ulteriori studi hanno identificato anche GLUT1 quale possibile target di LXR [94].

Contrariamente a quanto osservato nel WAT, nel muscolo scheletrico i risultati ottenuti non sono univoci: mentre alcuni gruppi osservano un'attivazione di LXR senza effetti sull'*uptake* di glucosio, altri hanno descritto un'attivazione di GLUT4 nei miotubi differenziati in soggetti diabetici e non, sottoposti a trattamento con T0901317 [173,176].

Infine, nel pancreas, le cellule  $\beta$  e le cellule che secernono l'insulina esprimono in modo esclusivo l'isoforma LXR $\beta$  [177]. L'incubazione delle isole pancreatiche e delle cellule secernenti insulina con i ligandi di LXR comporta un aumento della secrezione di insulina glucosio-dipendente [178]. Allo stesso modo, topi deficienti per LXR $\beta$  presentano una marcata diminuzione della tolleranza al glucosio causata da una compromessa secrezione dell'insulina [179].

I meccanismi coinvolti nell'induzione della secrezione dell'insulina mediata da LXR a livello pancreatico richiedono da un lato l'induzione di geni coinvolti nel metabolismo del glucosio, quali GLUT2, GK e piruvato carbossilasi, dall'altro l'induzione di geni lipogenici, classici target di LXR [177,178]. È stato dimostrato che una breve induzione della lipogenesi nelle cellule  $\beta$  del pancreas promuove la secrezione dell'insulina, ma l'attivazione cronica di LXR e geni correlati è associata a lipotossicità e apoptosi [180]. Pertanto, gli importanti effetti dei ligandi di LXR nell'abbassamento del glucosio suggeriscono un potenziale uso clinico nella terapia del diabete, ma questa entusiasmante ipotesi necessita di essere riconsiderata in virtù degli effetti avversi correlati all'induzione della lipogenesi.

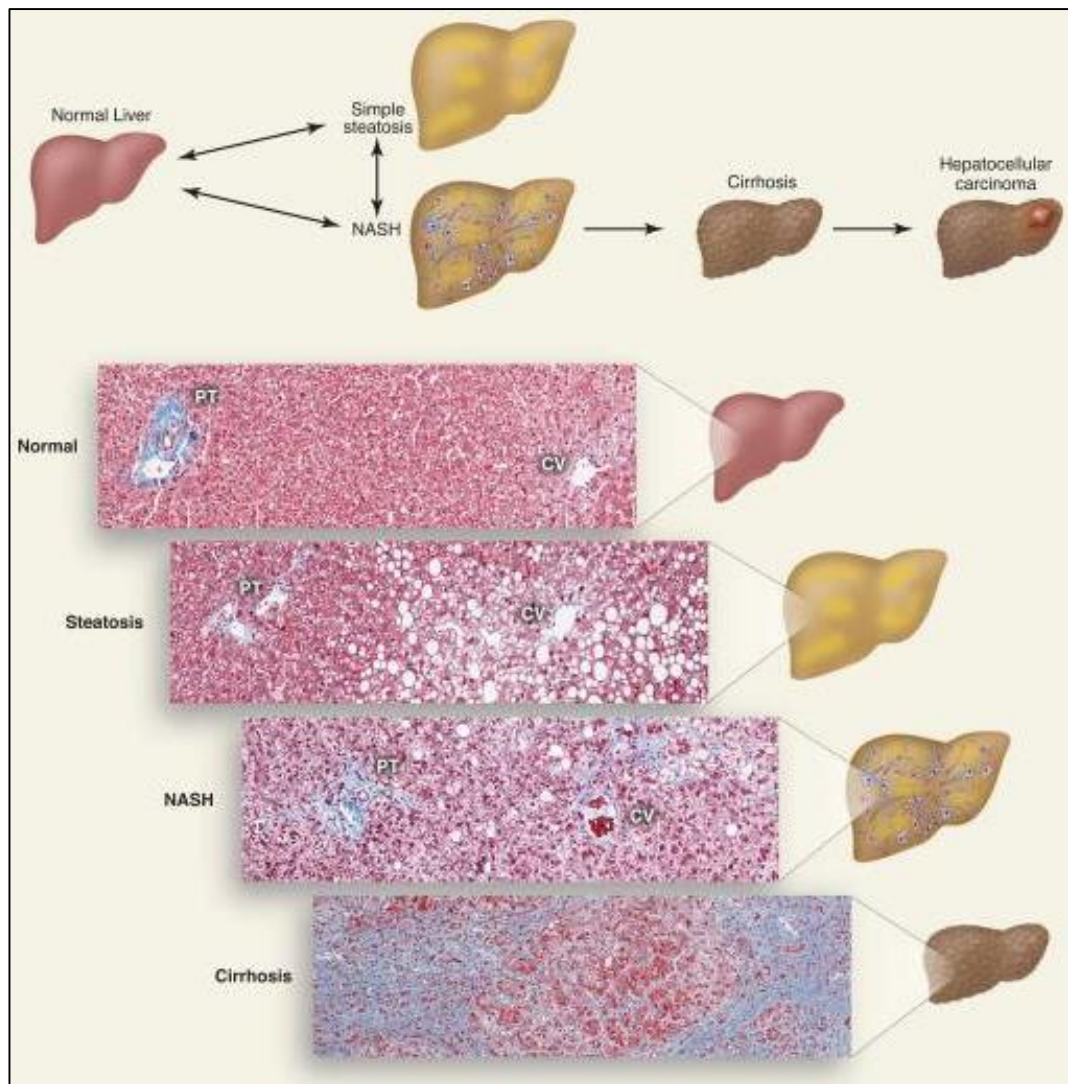
## **1.10 NAFLD, NASH e FIBROSI EPATICA**

### **1.10.1 NAFLD**

La steatosi epatica non alcolica (NAFLD, *Non Alcoholic Fatty Liver Disease*) è la patologia cronica epatica più diffusa nel mondo occidentale. Dal punto di vista isto-patologico, comprende un ampio spettro di malattie epatiche, dalla semplice steatosi alla steatoepatite non alcolica (NASH), che può poi evolvere in fibrosi e cirrosi (Figura 13).

Per steatosi epatica si intende l'accumulo di lipidi, generalmente costituiti da trigliceridi, all'interno dell'epatocita. Questo accumulo diventa patologico se supera il 5% del peso del fegato. Tale valutazione viene effettuata in soggetti che non fanno uso di alcol, o ne consumano in quantità limitate. Il limite alcolico imputabile di danno epatico varia in base a sesso, età e razza; tuttavia, è stato fissato un limite inferiore a 20g/die per le donne e 30g/die per gli uomini [181].

Poiché la steatosi è generalmente causata da una serie di alterazioni del metabolismo lipidico su base tossica, virale, dismetabolica, nutrizionale o ereditaria, è necessario distinguere queste forme secondarie dalla NAFLD propriamente detta. Infatti, la valutazione di NAFLD non è effettuabile in presenza di altre malattie epatiche o virali od in concomitanza con l'uso di farmaci steatogenici [181,182].



**Figura 13. Rappresentazione schematica della progressione della NAFLD.** In alto, l'accumulo di trigliceridi negli epatociti è la principale causa della steatosi. La steatosi, associata ad infiammazione, morte cellulare e fibrosi, è definita NASH. La NASH può progredire verso forme più gravi di cirrosi e epatocarcinoma. In basso, sezioni istologiche raffiguranti un fegato sano o in presenza di diverse malattie epatiche. Le fibre di collagene sono evidenziate dalla colorazione blu (*Masson's trichrome staining*). PT, triade portale (arteria epatica, vena porta e dotto biliare); CV, vena centrale. (Immagine modificata da "Human fatty liver disease: old questions and new insights" [183]).

La NAFLD è considerata la manifestazione clinica epatica della sindrome metabolica ed è correlata a forme di insulino-resistenza e di stress ossidativo, caratterizzanti disordini metabolici quali obesità, diabete mellito di tipo II e iperlipidemia [184]. La sindrome metabolica è una condizione clinica

caratterizzata dalla presenza di una quantità eccessiva di grasso corporeo, in particolare il grasso viscerale, con incremento del rapporto peso altezza (cosiddetto *Body mass index* BMI), elevati valori ematici di colesterolo LDL e trigliceridi e bassi livelli di HDL, ipertensione arteriosa (valori pressori >140/90) ed insulino-resistenza.

Oltre a costituire un parametro di rischio per lo sviluppo di forme più severe di NASH e cirrosi, la NAFLD può comportare un alto rischio di contrarre malattie cardiovascolari e sistemiche, quali coronaropatie e infarto [185].

### **1.10.2 NASH**

A differenza della NAFLD, la NASH è caratterizzata da una condizione più grave in cui il fegato, in seguito all'accumulo di lipidi, è soggetto a processi infiammatori, di cicatrizzazione e morte dei tessuti (necrosi), che alterano in modo definitivo la funzionalità dell'organo.

È noto che l'evoluzione clinica della NAFLD nel 20% dei casi porta ad insorgenza di NASH, che può poi evolvere in forme più gravi di fibrosi e cirrosi. I meccanismi coinvolti nella progressione della NAFLD in NASH sono complessi e non ancora ben conosciuti. Tuttavia, è noto che un'aumentata adiposità viscerale, unitamente ad Insulino Resistenza (IR) e incremento degli acidi grassi liberi (FFA) giocano un ruolo chiave nella progressione della steatosi in NASH.

L'ipotesi delle due "hit" (*Two hits hypothesis*) è il modello correntemente accettato per la progressione della steatosi in steatoepatite. Al danno al fegato

caratterizzante la NAFLD fa seguito un processo a più *hit* (lett. colpi, insulti), comprendente IR, stress ossidativo, apoptosi e cambiamenti nei livelli di adipochine, che non sono mutualmente esclusivi, ma agiscono in maniera coordinata e cooperativa per portare allo sviluppo della NASH.

L'ipotesi delle due "hit" prevede una prima degenerazione grassa del fegato (prima hit) alla quale fa seguito un altro insulto ossidativo (seconda hit) per far progredire la semplice steatosi in NASH [186].

Nello specifico, nella prima hit si assiste ad un accumulo negli epatociti di trigliceridi e acidi grassi liberi quale conseguenza dell'IR, dell'aumentato apporto dietetico e dell'incremento della lipogenesi a livello epatico. La seconda hit è invece caratterizzata da perossidazione dei lipidi, perdita delle funzioni mitocondriali e infiammazione, che comporta danno agli epatociti e conseguente sviluppo di fibrosi.

L'eccessivo apporto di FFA al fegato, comporta un aumento dell'ossidazione lipidica a livello mitocondriale e perossisomiale, promuovendo l'induzione microsomiale dei citocromi CYP4A1 e CYP2E1, che potrebbe causare un eccessivo accumulo di ROS (Specie Reattive dell'Ossigeno). I ROS promuovono il rilascio di citochine da parte del fegato, che intervengono in diversi meccanismi immuno-mediati sfociando in un aumentato danno al fegato [187].

I ROS sono inoltre in grado di favorire la perossidazione dei lipidi, un processo mediante il quale i lipidi contenenti acidi grassi insaturi e i loro esteri (es. lipidi costituenti la membrana plasmatica) vengono direttamente ossidati da radicali liberi contenenti ossigeno molecolare, portando così a danno cellulare. I



prodotti della perossidazione dei lipidi, come la malondialdeide e il 4-idrossi-2-nonenale, sono generalmente stabili e possono diffondere dalla cellula, agendo quali importanti mediatori del danno cellulare su bersagli lontani dal sito iniziale dell'evento ossidativo [188]. Inoltre, la perossidazione dei lipidi può comportare l'attivazione e la proliferazione delle cellule stellate che contribuiscono al deposito di nuovo collagene e al successivo sviluppo di fibrosi [189,190].

Lo stress ossidativo può comportare anche l'aumentata espressione di TNF $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ), il quale, insieme ai ROS, va a stimolare le cellule del Kupffer, attivandole. Una volta attivate, le cellule del Kupffer possono contribuire da un lato ai fenomeni di perossidazione lipidica, producendo loro stesse i ROS, dall'altro favorire i processi di morte cellulare inducendo l'apoptosi degli epatociti, mediante la sintesi e secrezione del TNF $\alpha$  [191].

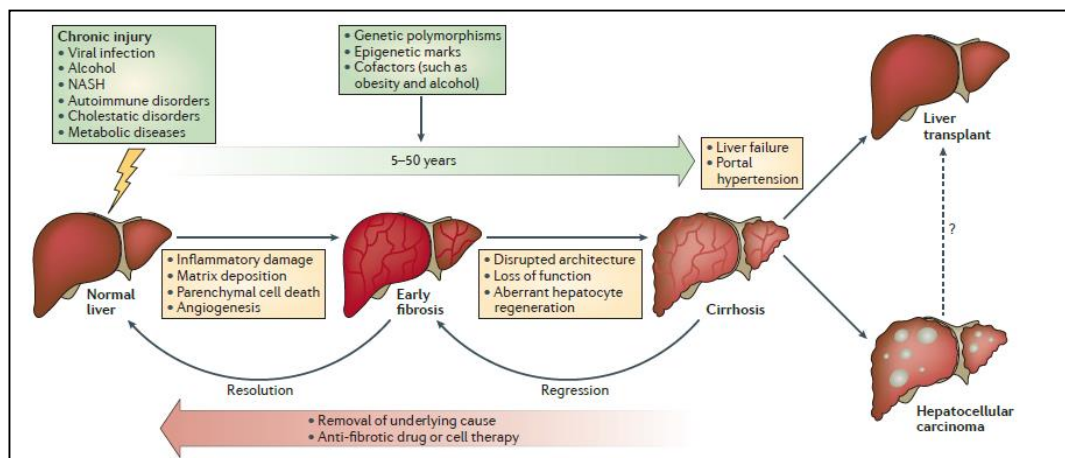
Altre molecole coinvolte nella progressione della NAFLD sono le adipochine (adiponectina, leptina e resistina) e le citochine (interleuchina-6, interleuchina-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ), secrete dagli adipociti o dalle cellule infiammatorie che infiltrano il tessuto adiposo in corso di insulino-resistenza [192,193].

L'attivazione di *pathway* infiammatorie è mediata e recettori PRR (*Pattern Recognition Receptors*), quali i *Toll-Like Receptors*, che portano alla attivazione di due vie di segnale intracellulari, mediate rispettivamente da NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor-KB*) e JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*). L'attivazione di NF- $\kappa$ B nella NASH porta all'attivazione di geni pro-infiammatori, mentre JNK provoca IR, riducendo la via di segnale intracellulare mediata dall'insulina in quanto fosforila e degrada il recettore per l'insulina IRS1 (*Insulin Receptor Substrate 1*) [194,195].

### 1.10.3 Fibrosi Epatica

La fibrosi epatica è il risultato di un danno cronico al fegato. La NASH è, ad oggi, la principale causa della fibrosi epatica; tuttavia, anche le infezioni croniche da HCV, HBV e l'abuso di alcol possono portare allo sviluppo di fibrosi.

La fibrosi epatica è un processo dinamico, caratterizzato dall'accumulo di proteine della matrice extracellulare (ECM) che, alterano la normale architettura del fegato e portano al successivo sviluppo di noduli di rigenerazione, caratteristici della cirrosi. La cirrosi epatica costituisce infine un fattore di rischio per lo sviluppo dell'epatocarcinoma (Figura 14) [196].



**Figura 14. Progressione della fibrosi epatica.** La fibrosi epatica può insorgere in seguito a diversi tipi di danno al fegato, tra cui NASH, infezioni virali e abuso di alcol. Indipendentemente dalla causa scatenante, la fibrosi è caratterizzata da danno infiammatorio, deposizione di matrice extracellulare, morte delle cellule del parenchima e angiogenesi. La progressione della fibrosi porta ad una alterata architettura epatica e alla rigenerazione aberrante degli epatociti, tipiche caratteristiche della cirrosi. Ad oggi, l'unico trattamento efficace nella cura della cirrosi è il trapianto di fegato. (Immagine tratta da "Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ" [197]).

### ***1.10.3.1 Patogenesi della fibrosi epatica***

Le cellule parenchimali, in seguito ad insulti epatici acuti, rigenerano andando incontro a replicazione, e sostituiscono così le cellule apoptotiche e necrotiche. Questo processo è associato ad una risposta infiammatoria e una limitata deposizione di ECM. Tuttavia, se tali insulti persistono e la rigenerazione epatica è insufficiente, il processo riparativo si perpetua portando alla produzione e deposizione di abbondante ECM e collagene fibrillare. Pertanto, in presenza di malattie croniche di danno al fegato è più facile che avvenga la progressione in fibrosi e, successivamente, in cirrosi.

Diverse sono le cellule epatiche che presentano un potenziale fibrogenico:

- Fibroblasti residenti, a cui afferiscono le cellule epatiche stellate (HSC) e i fibroblasti portalì;
- Cellule di transizione epitelio-mesenchimale;
- Fibrociti reclutati dal midollo osseo.

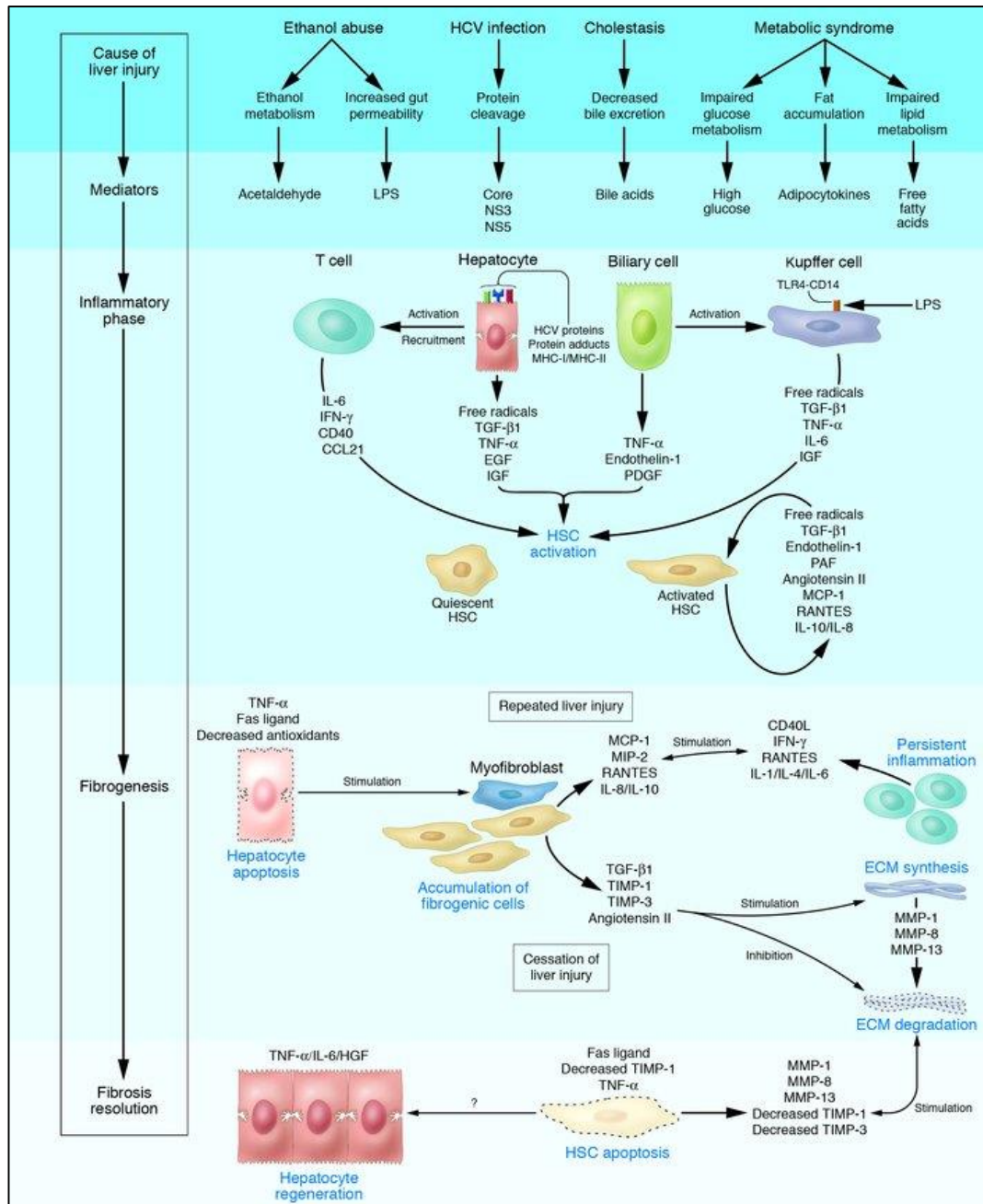
Nonostante l'origine differente, queste cellule vanno incontro ad un comune processo di transdifferenziazione, che le porta ad acquisire un fenotipo miofibroblastico. Le cellule miofibroblastiche sono infatti considerate i principali regolatori della risposta fibrotica, in seguito all'acquisizione di proprietà proliferative, migratorie, contrattili, immunomodulatorie, fagocitarie e di produzione di ECM.

Le HSC costituiscono la popolazione cellulare più importante nella fibrogenesi; queste sono localizzate nello spazio di Disse, tra gli epatoociti e le

cellule endoteliali. In seguito a danno cronico al fegato di qualsiasi natura, le HSC si attivano e trans-differenziano in miofibroblasti, caratterizzati dalla perdita dei vacuoli lipidici, da un'incrementata proliferazione e capacità migratoria, dalla secrezione eccessiva di proteine dell'ECM e dal rilascio di fattori pro-infiammatori e pro-fibrogenici come TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor  $\beta$* ). Mentre le HSC quiescenti esprimono marker caratteristici degli adipociti (PPAR $\gamma$ , SREBP-1c e Leptina), le HSC attivate presentano i marker delle cellule mesenchimali ( $\alpha$ -SMA, Collagene di tipo I).

### ***1.10.3.2 Attivazione dei miofibroblasti epatici***

Durante i processi di fibrogenesi epatica si assiste ad una complessa interazione tra i diversi tipi di cellule del fegato (Figura 15). Le cellule del parenchima epatico (epatociti e colangiociti), in seguito ai danni derivati dagli insulti cronici al fegato, rilasciano ROS e mediatori fibrogenici. Questi non solo attivano le HSC, aumentando così la produzione di collagene, ma inducono anche l'attivazione di una risposta infiammatoria mediante il reclutamento dei leucociti. Ciò porta alla formazione di un circolo vizioso in cui le cellule infiammatorie attivano le HSC per portare alla formazione di nuovo collagene e le HSC attivate secernono chemochine infiammatorie e molecole di adesione che permettono la regolazione dei linfociti [198,199].



**Figura 15. Meccanismi cellulari della fibrosi epatica.** Differenti agenti epatotossici possono produrre mediatori che inducono risposte infiammatorie in diverse tipologie di cellule epatiche. Il danno agli epatociti e ai colangiociti stimola il rilascio di citochine infiammatorie e di altri fattori solubili in grado di attivare le cellule del Kupffer e stimolare il reclutamento di linfociti T attivati. L'ambiente infiammatorio stimola l'attivazione delle HSC in miofibroblasti. Le HSC attivate da un lato secernono citochine che concorrono a perpetuare l'attivazione, dall'altro sintetizzano grandi quantità di proteine dell'ECM portando all'insorgenza della fibrosi epatica. (Immagine tratta da "Liver Fibrosis" [196]).

I ROS possono essere rilasciati da diverse cellule epatiche. I mitocondri sono i principali responsabili della produzione di ROS in cellule. In condizioni

fisiologiche, circa l'1% dei prodotti della fosforilazione ossidativa porta alla formazione di anione superossido, formato dalla riduzione dell'ossigeno molecolare. Questa reazione è catalizzata da enzimi come l'NADPH ossidasi e la Xantina Ossidasi [200]. La riduzione dell'ossigeno molecolare può anche avvenire per vie non-enzimatiche, come i composti semi-ubichinonici della catena di trasporto degli elettroni a livello mitocondriale. Infine, oltre al mitocondrio, i ROS possono anche essere prodotti a livello del reticolo endoplasmico dai citocromi P450 (Cyp), in risposta a stimoli quali l'abuso di alcol. Tale reazione può avvenire anche nei macrofagi, nei neutrofili e nelle HSC [201,202]. A livello fisiologico i ROS possono giocare un ruolo positivo nella cellula, poiché sono responsabili della trasduzione del segnale, dell'espressione genica e della difesa dagli organismi patogeni. Tuttavia, alterazioni a livello della catena di trasporto degli elettroni possono comportare un'aumentata produzione di anione superossido. L'aumento dei ROS a livello citoplasmatico promuove l'apoptosi negli epatociti e stimola processi infiammatori, con il netto risultato di portare all'evoluzione cronica del danno verso la fibrosi.

Studi condotti utilizzando modelli murini di fibrosi epatica hanno permesso di evidenziare dei geni chiave nella fibrogenesi epatica che possono concorrere all'attivazione dei miofibroblasti. Tra questi, i geni che regolano processi di apoptosi e necrosi (es. Fas, Bcl-xl) che influenzano l'estensione del danno epatico e la successiva risposta fibrogenica [203,204]; i geni che regolano la risposta infiammatoria al danno (es. IL-1 $\beta$ , IL-6 e INF- $\gamma$ ) e che determinano la risposta fibrogenica [205]; infine, di notevole importanza sono i geni che

codificano per i fattori di crescita (TGF- $\beta$ , FGF, PDGF), per sostanze vasocostrittrici (norepinefrina, angiotensina II) e per adipochine (leptina, adiponectina), in quanto sono necessari per lo sviluppo della fibrosi [206-208].

La secrezione di TGF- $\beta$  porta alla transdifferenziazione delle HSC in miofibroblasti, stimolando la sintesi delle proteine della ECM e inibendo al tempo stesso la loro degradazione. Inoltre TGF- $\beta$  promuove la sopravvivenza dei miofibroblasti attraverso l'attivazione di FAK (*focal adhesion kinase*) e AKT. Infatti, in modelli sperimentali in cui TGF- $\beta$  è stato deletato o è stata alterata la sua via di segnale, hanno rivelato una forte diminuzione della fibrosi [209].

PDGF- $\beta$  (*Platelet Derived Growth Factor*) è invece un potente mitogeno in grado di stimolare la proliferazione dei miofibroblasti. È generalmente up-regolato nel fegato fibrotico e la sua inibizione porta ad una marcata attenuazione della fibrosi [210].

Al contrario delle citochine vasodilatatrici che possiedono proprietà anti-fibrotiche, le sostanze vasocostrittrici svolgono un effetto opposto. Tra le varie citochine vasocostrittrici, l'angiotensina II sembra svolgere un ruolo principale nella fibrogenesi epatica. L'angiotensina II è l'effettore del sistema renina-angiotensina, responsabile della regolazione dell'omeostasi della pressione arteriosa. Nei miofibroblasti, i livelli di angiotensina II sono up-regolati e le HSC attivate ne producono di nuova. L'angiotensina II induce infiammazione a livello epatico e stimola una serie di azioni fibrogeniche nelle HSC attivate, incluse proliferazione cellulare, secrezione di citochine pro-infiammatorie e sintesi di collagene. La delezione genetica o lo spegnimento farmacologico del sistema

renina-angiotensina comporta una netta riduzione dei processi fibrotici [211-213].

Infine, le adipochine, citochine derivate principalmente dal tessuto adiposo, possono regolare la fibrogenesi epatica. Mentre la leptina è necessaria per l'attivazione delle HSC e la deposizione di collagene, l'adiponectina inibisce lo sviluppo della fibrosi [206,214].

Oltre agli stimoli paracrini, le HSC possono essere attivate dalla microflora intestinale. Il fegato è infatti il primo organo extra-intestinale che il sangue venoso incontra dopo aver lasciato l'intestino tenue e l'intestino crasso. A causa di ciò, il fegato può essere esposto a prodotti batterici originati nel lume intestinale e trasportati attraverso la vena porta. Se in un individuo sano la presenza di una integra parete intestinale fa in modo che solo una minima parte dei prodotti batterici intestinali raggiunga il fegato, la distruzione della barriera intestinale causata da malattie o insulti esterni può portare ad una aumentata traslocazione batterica nei vasi portali. La traslocazione dei batteri e dei prodotti batterici dall'intestino al fegato, può alterare l'omeostasi epatica e portare a fenomeni infiammatori attraverso l'attivazione del sistema immunitario innato. In particolare, i prodotti batterici traslocati possono aumentare l'attivazione delle cellule epatiche immunitarie attraverso i TLR. Inoltre, le cellule epatiche non-immunitarie (cellule endoteliali, HSC) possono mettere in atto delle risposte contro i prodotti batterici mediante attivazione dei TLR. I TLR attivati stimolano la risposta immunitaria innata, tramite la produzione di citochine nel fegato [215]. Ad esempio, nelle cellule del Kupffer, TLR4, che riconosce il lipopolisaccaride



presente nei batteri Gram-, porta all'attivazione della Caspasi1 necessaria per l'espressione della forma attiva di IL-1 $\beta$  e IL18. L'attivazione dei TLR, quindi, porta poi ad un'attivazione delle HSC e aumenta l'attivazione di TGF- $\beta$  con l'effetto di contribuire all'inizio e alla progressione della fibrosi epatica [216].

Riassumendo, danni al fegato portano a processi di necrosi e/o apoptosi a livello delle cellule del parenchima epatico. Tali cellule riversano non solo il loro contenuto cellulare, ma anche i ROS che comportano l'attivazione delle HSC. Contemporaneamente, si assiste a fenomeni chemoattrattivi nei confronti dei macrofagi, che portano alla loro attivazione. I macrofagi e le HSC attivati fagocitano le cellule morte e secernono mediatori pro-infiammatori, quali TGF- $\beta$ , che comporta la trans-differenziazione delle HSC in miofibroblasti, e PDGF, che invece stimola la proliferazione dei miofibroblasti. I miofibroblasti derivati dalle HSC esprimono  $\alpha$ -SMA ( *$\alpha$ -smooth muscle actin*) e Collagene di tipo I. I miofibroblasti producono anche TIMP (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*) che contrastano con l'azione di MMP (*Matrix Metalloproteinases*) secrete dai macrofagi. Infatti, mentre le MMP hanno la capacità di degradare la matrice del tessuto cicatriziale deposto, le TIMP promuovono la deposizione di nuovo collagene e ECM con conseguente formazione di nuove cicatrici. Infine, un'aumentata permeabilità intestinale comporta l'attivazione di TLR4 che attiva le HSC e promuove la produzione di citochine che richiamano i macrofagi nel sito dell'insulto. Insulti e infiammazione cronica al fegato portano alla perpetuazione di questo processo di fibrogenesi, con conseguente possibile sviluppo di malattie più gravi, quali cirrosi ed epatocarcinoma [197].

### ***1.10.3.3 Terapie per la fibrosi epatica***

La fibrosi epatica può progredire verso forme che portano ad una maggiore deposizione di collagene e all'insufficienza epatica, caratteristiche tipiche della cirrosi. Dal punto di vista clinico, la cirrosi epatica è correlata ad un alto rischio di contrarre infezioni, unitamente alla possibile evoluzione in epatocarcinoma. Sebbene numerose strategie preventive siano state messe in atto (i.e. antivirali contro HCV e HBV) provocando una diminuzione dei casi di cirrosi ed epatocarcinoma associate a forme virali, oggi si assiste ad un sempre più crescente numero di pazienti che sviluppano forme cirrotiche o tumorali come step successivo della NASH. Pertanto, vi è la necessità di trovare nuovi trattamenti anti-fibrotici mirati che prevenano l'evoluzione della fibrosi epatica in cirrosi o che inducano la regressione di stati avanzati di cirrosi o fibrosi.

La fibrosi è caratterizzata non solo dall'alterazione di processi che portano ad un accumulo di collagene (fibrogenesi), ma anche da un'inefficiente fibrinolisi. Di conseguenza, le terapie anti-fibrotiche ad oggi considerate mirano non solo a ridurre i processi di fibrogenesi, ma anche a promuovere i processi di fibrinolisi. Pertanto, una conoscenza più approfondita a livello cellulare e molecolare dei processi coinvolti nell'insorgenza e progressione della fibrosi saranno utili per sviluppare degli approcci terapeutici che mirano a colpire in maniera specifica le cellule o le *pathways* coinvolte nell'evoluzione della fibrosi.

Tra le terapie ad oggi in corso di valutazione, diverse tendono a colpire i miofibroblasti e i loro prodotti. Come visto, i miofibroblasti originano prevalentemente da cellule HSC attivate e costituiscono i principali responsabili

della deposizione di collagene. Tuttavia, l'eliminazione totale delle HSC è correlata con necrosi e infiammazione [217]. Infatti queste cellule sono necessarie per il mantenimento dell'integrità del fegato ed, inoltre, in presenza di stimoli opportuni possono secernere proteasi che degradano la ECM con conseguente limitazione della fibrosi [218]. Pertanto le strategie terapeutiche dovrebbero mirare più ad una diminuzione della loro attivazione fibrogenica che ad una loro eliminazione. Diversi studi condotti *in vitro* su cellule e *in vivo* su roditori con molecole che bloccano l'attivazione fibrogenica delle HSC e limitano la produzione di collagene, hanno dato risultati positivi in termini di limitazione del danno. Tuttavia, tali molecole sono sprovviste di specificità nei confronti dei fibroblasti epatici e di conseguenza non possono essere impiegate nella clinica.

Diverse strategie principali per la terapia della fibrosi che colpiscono i miofibroblasti sono ad oggi in corso di valutazione preclinica. Uno degli approcci mira a colpire le *pathways* principali alla base della deposizione di ECM, come la sintesi di collagene di tipo I, o a bloccare i recettori per citochine e chemochine che sono solitamente upregolati nei processi di fibrogenesi. Ad esempio, il trattamento con anticorpi monoclonali o con molecole specifiche (es. Imanitib) per PDGFR $\beta$ , una tirosin-chinasi che si trova a monte della via fibrogenica e che è un potente mitogeno dei miofibroblasti, ritarda la progressione della fibrosi nelle prime fasi ma non nello stadio avanzato [219,220]. Un ulteriore approccio prevede invece l'utilizzo di ligandi specifici per recettori dei miofibroblasti che possono veicolare specifici composti o siRNA. Un esempio è la somministrazione di IFN utilizzando un peptide di legame specifico per PDGFR $\beta$ , o specifici inibitori

della chinasi PDGFR $\beta$  veicolati dal mannosio 6-fosfato (che lega il recettore IGFII) [221,222].

Terapie mirate si stanno sviluppando anche per colpire i monociti, che giocano un ruolo chiave nei processi infiammatori e nella fibrosi, in quanto costituiscono i precursori di fibrociti, macrofagi e cellule dendritiche. Infatti, i monociti possono orchestrare la risposta all'immunità adattativa tramite molecole pro-infiammatorie che promuovono la fibrogenesi. I monociti possono essere reclutati e attivati in seguito a stimolazione con chemochine, pertanto strategie finalizzate a regolare questo processo costituiscono un appetibile bersaglio terapeutico [223]. Ad esempio, l'inibizione farmacologica del legame di CCL2 al suo recettore CCR2 migliora la progressione della fibrosi, anche se comporta un ritardo nei processi di fibrinolisi [224].

Tra i diversi farmaci sviluppati per la terapia della fibrosi, ve ne sono alcuni che sono entrati a far parte di studi clinici, come l'anticorpo umanizzato diretto contro LOXL2 [225]. LOXL2 (*Lysyl oxidase*) è un enzima implicato nelle reazioni di *cross-linking* della matrice extracellulare che agisce contrastando i processi alla base della fibrinolisi in cui la ECM viene degradata. Pertanto, bloccare questo enzima è efficace nel contrastare l'avanzamento della fibrosi.

Infine, altre strategie terapeutiche sono indirizzate contro cellule che possono rivestire un ruolo fondamentale per bloccare l'avanzamento dei processi fibrotici. Ad esempio, farmaci indirizzati contro l'integrina  $\alpha\beta 6$  (un recettore per la fibronectina e la tenascina-C che agisce quale attivatore di TGF- $\beta 1$ ) specifica dei progenitori fibrogenici biliari, che rivestono un ruolo cardine

nella creazione di un ambiente infiammatorio che porta al reclutamento e all'attivazione delle HSC [226]. Oppure molecole anti-angiogenetiche che spengono il recettore chinasi VEGFR espresso sulla superficie delle cellule sinusoidali endoteliali (LSEC). Le LSEC attivate nei processi di fibrosi perisinusoidali contribuiscono alla deposizione di collagene e fibronectina e producono citochine infiammatorie che contribuiscono alla attivazione delle HSC. Le LSEC possono essere attivate da VEGF e angiopoietina-1, due fattori angiogenetici secreti dai miofibroblasti [227,228].

Sebbene una mole sempre più grande di nuovi farmaci anti-fibrotici mirati a colpire diversi *pathway* cellulari si stia affacciando alla validazione clinica, la loro efficacia sembra essere limitata a particolari contesti clinico-molecolari. Certamente, terapie combinate sembrano essere più promettenti, soprattutto in termini di efficacia; tuttavia, il loro utilizzo richiederebbe un approccio personalizzato alla terapia, in cui l'identificazione di marker non-invasivi e lo sviluppo di nuove tecniche per quantificare la fibrosi epatica risultano essere di fondamentale necessità.

## SCOPO DELLA TESI

La fibrosi epatica rappresenta la risposta del fegato al danno epatico cronico ed è caratterizzata dalla deposizione di proteine della matrice extracellulare con progressiva alterazione anatomica e funzionale epatica. La patogenesi della fibrosi epatica non è ancora del tutto chiarita con conseguente lacunosità di un approccio terapeutico efficace.

L'obiettivo del nostro studio è stato quello di valutare il ruolo dell'attivazione di LXR a livello intestinale nella progressione del danno epatico cronico. In particolare, poiché l'attivazione intestinale di LXR $\alpha$  è stata dimostrata incrementare il *reverse cholesterol transport* (RCT) e di conseguenza il livello delle HDL circolanti, che sono state recentemente scoperte svolgere importanti funzioni anti-infiammatorie, abbiamo voluto studiare il potenziale effetto protettivo in corso di epatopatia cronica.

I risultati qui ottenuti permettono di ipotizzare che il trattamento con farmaci agonisti del recettore nucleare LXR, che agiscono a livello intestinale e che sono stati già valutati nel trattamento dell'aterosclerosi, possano costituire un innovativo approccio terapeutico per la fibrosi epatica, per la quale non esistono al momento terapie farmacologiche efficaci.

## MATERIALI E METODI

### 3.1 Colture cellulari

Le cellule HepG2 (*human hepatocyte carcinoma*), una linea cellulare derivante da epatocarcinoma umano, sono state mantenute a 37°C in ambiente saturo al 5% di CO<sub>2</sub>, in terreno MEM/earl's salts (Life technologies, Carlsbad, CA) addizionato con 10% FBS (*Fetal bovine serum*), 100 mM Na-piruvato, 1X non essential aminoacids, 200 mM L-glutammina, 10 mg/ml gentamicina, pen-strep.

Gli studi *in vitro* sono stati messi appunto per valutare la variazione nell'espressione genica di NF-κB e MCP-1 in cellule di controllo rispetto a cellule trattate. In particolare le cellule HepG2 sono state pre-incubate con particelle di HDL e successivamente trattate con TNFα per valutare come l'incubazione con HDL potesse ridurre il danno indotto dalla citochina infiammatoria. Esperimenti pilota sono stati condotti per determinare la concentrazione di TNFα alla quale si attestavano maggiori variazioni nell'espressione di NF-κB.

Le cellule HepG2 sono state quindi piastrate in *wells* da 6 pozzetti in terreno minimo addizionato all'1% di FBS e trattate o meno con 3 diverse concentrazioni di HDL (50- 75- 100- ng/ml) per 16 ore. Al termine dell'incubazione è stato aggiunto o meno il TNFα (5 ng/ml) al terreno di coltura per altre 24 ore.

## 3.2 Animali

Topi transgenici di sesso maschile FVB/N di 8-10 settimane con attivazione costitutiva di LXR $\alpha$  (iVP16LXR $\alpha$ ) e i rispettivi controlli (iVP16), gentilmente forniti dal Prof. Moschetta (Università degli Studi di Bari), sono stati mantenuti nel nostro stabulario di allevamento per tutta la durata dell'esperimento ad una temperatura di 20°C-24°C con un ciclo luce/buio di 12h/12h (acqua e dieta chow standard *ad libitum*).

Gli animali iVP16 presentano il dominio di transattivazione della sequenza codificante del *Herpes Simplex Virus* (VP16) clonata a valle del promotore della Villina. Ciò permette un'espressione specifica a livello intestinale di VP16. VP16 è un potente attivatore trascrizionale che quando espresso come proteina chimerica, come nel caso degli animali iVP16LXR $\alpha$ , comporta un'induzione costitutiva dei geni target di LXR $\alpha$ . Infine, poiché gli animali presentano la sequenza codificante per VP16hLXR $\alpha$  clonata a valle del promotore della Villina, LXR $\alpha$  risulta espresso e costitutivamente attivo a livello intestinale.

Gli animali iVP16 (n=9) e iVP16LXR $\alpha$  (n=6) sono stati trattati due volte a settimana con iniezioni intraperitoneali di *Carbon Tetrachloride* (CCL<sub>4</sub>, 1  $\mu$ l/g di peso) per tutta la durata dell'esperimento (2 mesi). Alla fine del trattamento gli animali sono stati anestetizzati e sacrificati seguendo le linee guida istituzionali. Per ciascun animale sono stati raccolti campioni di plasma, fegato e intestino.



### 3.3 Genotipizzazione dei modelli murini

Prima dell'inizio del trattamento, gli animali utilizzati in esperimento sono stati genotipizzati. Il DNA genomico è stato isolato dalla coda del topo mediante *DirectPCR lysis Reagent Tail* (Viagen Biotech Inc, Stati Uniti, LA), seguendo il protocollo fornito dalla casa produttrice, e quindi amplificato utilizzando i sets di primers mostrati in Tabella 1.

Gene	Primer senso (5'→3')	Primer antisense (5'→3')
VP16	GGACGAGCTCCACTTAGACGG	AGCTCCCACCGTACTCGTCAA
VP16-LXR $\alpha$	GGCGCTCTGGATATGGCCGACTTC	GATCTGGTGCCATGGGCCAAG

Tabella 1. Lista dei primers utilizzati per la per la genotipizzazione dei topi iVP16 e iVP16LXR $\alpha$ .

### 3.3 Estrazione dell'RNA, retrotrascrizione e Real Time qPCR

L'RNA totale è stato estratto dai campioni di fegato e intestino mediante il TRizol<sup>®</sup> *reagent* (Life Technologies Corporation, Woburn, MA) secondo le modalità indicate dalla ditta fornitrice. Brevemente, circa 50-100mg di tessuto sono stati omogeneizzati in 1mL di TRizol<sup>®</sup>. Successivamente è stato aggiunto il Cloroformio e, previa centrifugazione, è stata recuperata la fase acquosa contenente RNA da ciascun campione. L'RNA è stato quindi precipitato in 2-Propanolo 100% e quindi reidratato in etanolo 75%. Infine, l'RNA è stato risospeso in acqua RNase-free.

La concentrazione dell'RNA estratto, unitamente alla sua purezza, è stata valutata tramite analisi al Nanodrop. Successivamente, 1µg di RNA di ciascun campione è stato retrotrascritto in cDNA mediante trascrittasi inversa Multiscribe e utilizzo di Random Primers (Abcam, Cambridge, UK). Infine, 50ng di cDNA ottenuto sono stati utilizzati per le analisi di Real Time qPCR.

I primers utilizzati per la Real Time qPCR sono stati disegnati con il software Oligo 6 con riferimento alle sequenze di mRNA ricavate da Gene Bank; la specificità dei primers è stata confermata tramite BLAST *analysis*. La lista dei primers utilizzati è inserita in tabella 2.

L'analisi di Real Time qPCR è stata eseguita usando Rotor-Gene 6000 (Corbett Research) con il fluoroforo SYBR® Green (Life technologies, Woburn, MA).

I dati ottenuti sono stati analizzati tramite il software Gene Expression Macro Genex (BioRad, Milano, Italia), utilizzando un algoritmo di comparazione quantitativa. Quale gene di riferimento per la normalizzazione è stato usato peptidilprolil isomerasi B (*Cyclophilin B*).

<b>Gene</b>	<b>Primer senso (5'→3')</b>	<b>Primer antisenso (5'→3')</b>
ABCG5	TCAATGAGTTTTACGGCCTGAA	GCACATCGGGTGATTTAGCA
ABCG8	AATGTCATCCTGGATGTCGTCTC	CCAGCTCATAGTACAGCATTG ACC
IL-6	ACCAGAGGAAATTTCAATAGGC	TGATGCACTGCAGAAAACA
TNF $\alpha$	AGGGTCTGGGCCATAGAACT	CCACCACGCTTTCTGTCTAC
Nf-kB	CACAGGACGAGAACGGAGAC	GAGCGTGATAAATGACGTGG
TGF $\beta$	CAACCCAGGTCCTTCTCTAAA	GGAGAGCCCTGGATACCAAC
$\alpha$ SMA	G TTCAGTGGTGCCTCTGTCA	ACTGGGACGACATGGAAAAG
Collagen- $\alpha$ 1	TAGGCCATTGTGTATGCAGC	ACATGTTCTAGCTTTGTGGACC
SREBP-1c	TGGTTGTTGATGAGCTGGAG	GGCTCTGGAACAGACACTGG
FAS	CAAGGAGCAAGGTGTAAC	TTCAATATACTCAAGCGACTC
ABCA1	AGTGATAATCAAAGTCAAAGGCACAC	AGCAACTGGCACTAGTAACTCTG
APOA1	TCACCCACACCCTT CAGGATGAAA	ACACATAGTCTCTGCCGCTGTCTT
CYP7A1	AGCAACTAAACAACCTGCCAGTACTA	GTCCGGATATTCAAGGATGCA
HMGCoA reduttasi	CTTGTGGAATGCCTTGTGATTG	AGCCGAAGCAGCACATGAT
SREBP2	GCGTTCTGGAGACCATGGA	ACAAAGTTGCTCTGAAAACAAATCA
ACAT2	GAACGCATCAGGAATGAA	CAGGAGACTATTCTTGCTAA
MTTP	CACTCAGGCAATTCGAGACA	TATCGCTTTCTGGCTGAGGT
vCAM-1	TGCCGAGCTAAATTACACATTG	CCTTGTGGAGGGATGTACAGA
MCP-1	AGCTGTAGTTTTTGTACCAAGC	GTGCTGAAGACCTTAGGGCA
NLRP3 (topo e ratto)	AAGTAAGGCCGGAATTCACC	AAAATGCCTTGGGAGACTCA
IL-4R	TCTGCATCCCGTTGTTTGC	GCACCTGTGCATCCTGAATG
CD11b	GACTCAGTGAGCCCCATCAT	AGATCGTCTTGGCAGATGCT
ARG1	AACACTCCCCTGACAACCAG	CCAGCAGGTAGCTGAAGGTC

**Tabella 2. Lista dei primers utilizzati per la Real Time qPCR**

### 3.4 Analisi del profilo lipidico e lipoproteico: plasma e fegato

I trigliceridi nel plasma e nel fegato sono stati valutati mediante determinazione colorimetrica utilizzando il *Triglyceride quantification Kit* (Abcam, Cambridge, UK), seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice. I campioni di siero sono stati testati direttamente; per i campioni di fegato invece, 100 mg di tessuto sono stati omogenizzati in 5% (v/v) di Nonidet-P40 (NP-40) in H<sub>2</sub>O, incubati a 85°C per 5' e quindi raffreddati a temperatura ambiente. I campioni così ottenuti sono stati centrifugati per 2' al fine di rimuovere tracce di materiale insolubile. Il surnatante è stato quindi utilizzato per la quantificazione. Brevemente, i trigliceridi sono stati convertiti in acidi grassi liberi e glicerolo in seguito ad incubazione con lipasi. Il glicerolo è quindi ossidato per formare un prodotto che, reagendo con la *probe* presente nel kit, genera un composto colorato misurabile con lo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 570nm.

Il colesterolo epatico totale è stato dosato usando il kit *Cholesterol Fast* (Diacron Labs, Grosseto, Italia). Per ciascun campione, 10 mg di fegato sono stati omogenizzati con 200 µl di Cloroformio:Isopropanolo:NP-40 (7:11:0,1). Il prodotto ottenuto è stato centrifugato a 15.000xg. Il surnatante è stato recuperato e trasferito in un nuovo tubo, dove è stato fatto evaporare a 50°C per rimuovere il cloroformio. Il prodotto ottenuto è stato quindi sottoposto ad una serie di reazioni enzimatiche che hanno permesso di ottenere un composto colorato la cui intensità è proporzionale alla concentrazione di colesterolo totale presente nel campione. La lettura è stata effettuata allo spettrofotometro (OD=505nm).

I livelli di colesterolo nelle lipoproteine circolanti HDL, LDL e VLDL sono stati determinati nei campioni di plasma utilizzando l'*HDL and LDL/VLDL Cholesterol Assay kit* (Abcam, Cambridge, UK). Per separare le HDL dalla frazione LDL/VLDL, 100µl di Precipitation Buffer (2X) fornito dalla ditta produttrice, sono stati aggiunti a 100µl di campione da testare. Dopo la centrifugazione a 2000xg per 10', il surnatante è stato trasferito in un nuovo tubo per isolare quindi la frazione HDL. Il precipitato, contenente invece le frazioni LDL/VLDL, è stato risospeso in 200 µl di PBS (1X). La concentrazione del colesterolo è stata quindi determinata in seguito a reazione della colesterolo ossidasi che, riconoscendo il colesterolo libero, produce un componente in grado di reagire con la probe fornita nel kit e dare un segnale colorimetrico rivelato allo spettrofotometro (OD 570nm)

### **3.5 Western Blot**

L'estrazione delle proteine totali è stata condotta omogenizzando il tessuto epatico in 1 ml di *RIPA Lysis buffer* (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX,USA). La concentrazione delle proteine è stata determinata allo spettrofotometro (lunghezza d'onda di 595 nm) con il metodo di Bradford (BioRad Laboratories, Hercules CA, USA). Il lisato proteico è stato separato mediante corsa elettroforetica SDS-PAGE (Sodio Dodecilsolfato-poliacrilammide Gel Elettroforesi) L'assemblaggio del gel di corsa è stato effettuato preparando il *running gel* e lo *stacking gel* come indicato in Tabella 3:

10% Running gel	5% Stacking gel
H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
30% acrylamide solution	30% acrylamide solution
1,5 M Tris HCl (pH 8.8)	1,5 M Tris HCl (pH 6.8)
10% SDS	10% SDS
10% ammonium persulfate	10% ammonium persulfate
TEMED	TEMED

**Tabella 3. Western Blot: preparazione dei gel di corsa.**

Dopo la preparazione, il gel è stato posto all'interno della camera elettroforetica e completamente coperto con il *Running buffer* (25mM Tris-HCl, 192mM Glicine, 0,1% SDS [w/v] pH 8.3). Il *Loading buffer* 6X (0,25M Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 50% glicerolo, 0,5M DTT) è stato aggiunto a ciascun lisato proteico (60g) e la miscela ottenuta è stata denaturata per 5' a 95°C. Il *ladder marker* è stato caricato per valutare il peso molecolare di ciascun campione. La corsa elettroforetica è stata condotta a 100 mV per 2 ore. Al termine della corsa le proteine sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa attraverso un iBlot™ *Dry Blotting System* (Invitrogen, Life Technologies) ad un voltaggio di 20V per 10'. Per accertare il corretto trasferimento, la membrana è stata colorata con il colorante Rosso Ponceau, che si lega alle proteine in modo aspecifico.

La membrana ottenuta è stata incubata in tampone di saturazione composto da 10mM Tris-HCl, (pH 7,6), 150mM NaCl e 0,05% v/v Tween-20 (TBS-T) e bloccata per 1 h a temperatura ambiente in latte scremato 5% (w/v) di TBS-

T. Quindi, la membrana è stata incubata con l'anticorpo primario anti-pSTAT6 (sc-11762, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) O.N a 4°C. Il legame dell'anticorpo primario alla proteina di interesse è stato evidenziato incubando la membrana con uno specifico anticorpo secondario (diluizione 1:2000) coniugato con la perossidasi (HRP) (sc-2004, Santa Cruz Biotechnology). L'HRP in presenza dell'*ECL mix (Western Blotting detection reagents, GE healthcare)*, costituita da due reagenti in ratio 40:1, catalizza l'ossidazione del substrato chemiluminescente. La chemiluminescenza sviluppata è stata poi evidenziata utilizzando lo strumento Chemidoc (Biorad, Milano, Italia). L'anticorpo primario anti- $\beta$ Actina (Sigma-Aldrich, Saint Louise, MO) è stato utilizzato per il controllo dell'*equal loading* e per la normalizzazione dei risultati.

### **3.6 Analisi istologica e immunoistochimica**

I campioni epatici prelevati dai topi iVP16 e iVP16LXRa sono stati fissati in formalina tamponata 10% per 12-24h, disidratati e inclusi in paraffina. Le sezioni istologiche dello spessore di 5 $\mu$ m sono state colorate con Ematossilina-Eosina e con il Sirius Red (acido picrico saturato contenente 0,1% Direct red 80 e 0,1% di Fast Green FCF), per quantificare la deposizione di collagene come precedentemente descritto [229].

L'analisi immunoistochimica è stata effettuata sulle sezioni istologiche per rilevare le proteine F4-80 (marker specifico dei macrofagi) e *Alpha-Smooth Muscle* ( $\alpha$ SMA) (marker di attivazione delle HSC) [230].

I vetrini sono stati incubati con siero non immune della stessa specie dell'animale da cui si è ottenuto l'anticorpo secondario, allo scopo di occupare i siti antigenici non desiderati ai quali si potrebbe legare l'anticorpo primario in maniera aspecifica; le sezioni epatiche sono state quindi pretrattate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% per inibire le perossidasi endogene. I campioni sono stati quindi incubati con gli anticorpi primari specifici per 60' a temperatura ambiente e successivamente lavati in PBS 1X pH 7. Il legame antigene-anticorpo è stato evidenziato incubando i vetrini con un anticorpo secondario coniugato con HRP. Le proteine di interesse sono state poi rilevate aggiungendo alle sezioni un substrato cromogeno, la diamminobenzidina (DAB) (incubazione per 5-20'). La contro colorazione è stata effettuata con Ematossilina di Mayer per 5'. I preparati istologici sono stati osservati al microscopio ottico (200X).

### **3.7 Quantificazione del contenuto epatico di idrossiprolina**

Il contenuto epatico di collagene è stato valutato dosando l'idrossiprolina come precedentemente descritto [229]. I campioni di fegato sono stati omogenizzati, precipitati con acido tricloroacetico (TCA) e incubati per 24 h a 110°C in 6N di HCl; successivamente sono stati neutralizzati con 10N NaOH, ossidati con cloramina-T e incubati con la soluzione di Erlich a 65°C per 20'. La lettura dell'assorbanza è stata effettuata a 560nm.



### **3.8 Analisi statistica**

I risultati mostrati in seguito sono espressi come media  $\pm$  SEM. Il T test di Student per campioni indipendenti è stato utilizzato per determinare la significatività statistica. Valori di  $p$  inferiori a 0.05 sono stati considerati statisticamente significativi. Il confronto tra gruppi multipli è stato valutato utilizzando l'analisi della varianza seguita dal Tukey test (ANOVA). Valori di  $p$  inferiori a 0.05 sono stati considerati statisticamente significativi.

## RISULTATI

### 4.1 Attivazione selettiva di LXR nell'intestino

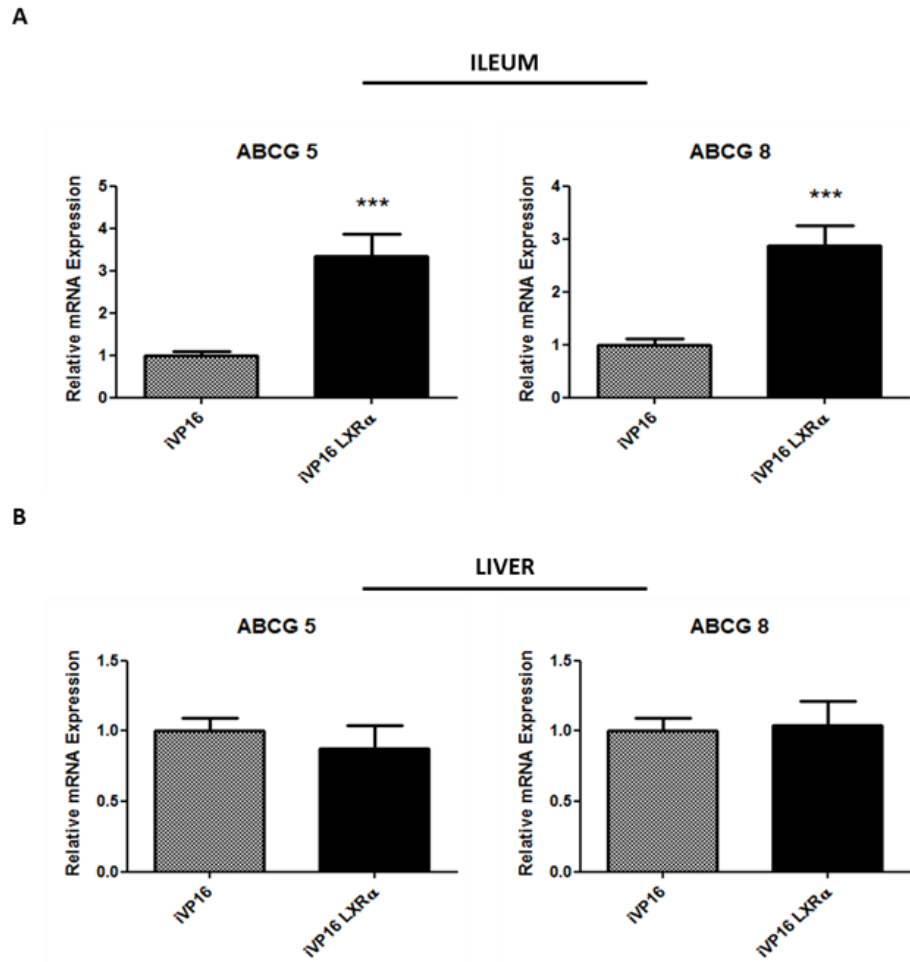
La valutazione del ruolo dell'attivazione intestinale di LXR nell'omeostasi del colesterolo e un suo potenziale effetto nella progressione del danno epatico è stata possibile utilizzando il modello murino iVP16LXR $\alpha$  (descritto nella sezione dei materiali e metodi). In tale modello, LXR $\alpha$  e la proteina attivatrice VP16, derivata dall'*Herpes Simplex Virus*, sono espresse specificatamente nell'epitelio intestinale sotto il promotore della villina; ciò consente un'attivazione costitutiva di tale recettore nucleare a livello intestinale, mantenendo al tempo stesso un'espressione "fisiologica" negli altri organi e tessuti [231]. Come gruppo di controllo è stato invece utilizzato il modello murino iVP16, in cui solo la proteina strutturale VP16 è posta sotto il controllo della villina, consentendo un'espressione tessuto specifica.

I topi iVP16LXR $\alpha$  e i rispettivi controlli iVP16 sono stati sottoposti a iniezioni intraperitoneali di Tetracloruro di Carbonio (CCl<sub>4</sub>), un noto agente citotossico che rappresenta il modello più utilizzato in letteratura per simulare un danno epatico cronico ad impronta fibrotica.

Al fine di comprendere se il modello animale fosse funzionalmente attivo, abbiamo testato l'attivazione di LXR $\alpha$  valutando l'espressione dei suoi geni target a livello intestinale. Nello specifico, è stata determinata l'espressione dell'RNA

messaggero dei trasportatori ABCG5 e ABCG8, che sono responsabili dell'eliminazione del colesterolo nel lume intestinale. Come atteso, l'espressione intestinale di entrambi i trasportatori risultava significativamente aumentata solo nei topi iVP16LXR $\alpha$  (Figura 16A).

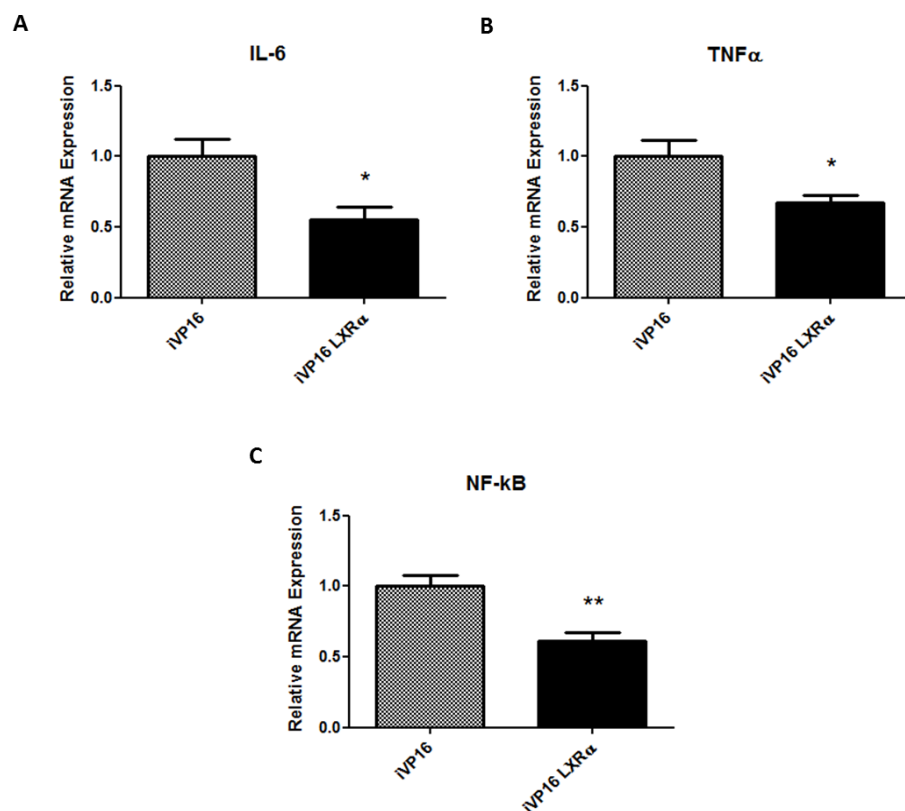
Successivamente, per dimostrare che l'attivazione di LXR $\alpha$  fosse tessuto-specifica a livello intestinale, abbiamo valutato l'espressione degli stessi trasportatori a livello epatico (Figura 16B), dove questi svolgono il ruolo di mediare la secrezione del colesterolo all'interno dei canalicoli biliari, favorendone pertanto l'eliminazione. Nessuna differenza di espressione è stata osservata tra i due genotipi nel fegato confermando pertanto la specifica attivazione di LXR $\alpha$  esclusivamente a livello intestinale.



**Figura 16. Espressione genica di ABCG5 e ABCG8 nell'ileo e nel fegato dei modelli murini.** L'espressione dei geni ABCG5 e ABCG8 è stata determinata tramite RT-qPCR, in campioni di ileo (A) e fegato (B) prelevati da topi iVP16 e iVP16LXR $\alpha$ . Il calibratore endogeno per il calcolo dei livelli di espressione è CyclophilinB. I dati sono espressi come media $\pm$ SEM.. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$

## 4.2 L'attivazione intestinale di LXR $\alpha$ riduce l'infiammazione epatica

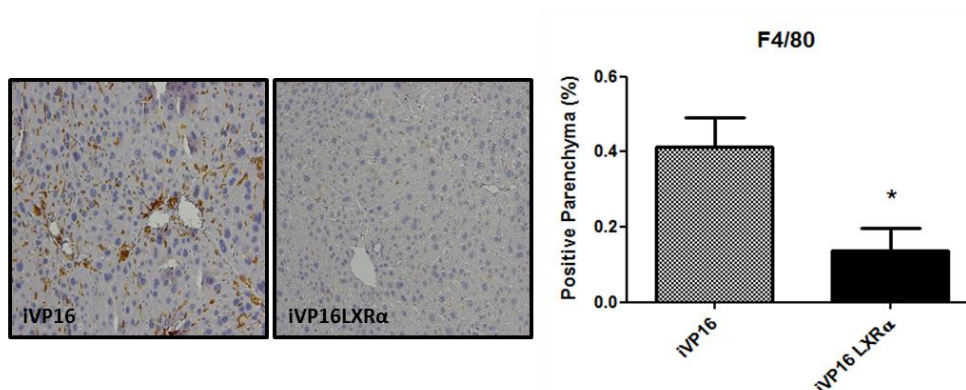
Per valutare se l'attivazione intestinale di LXR $\alpha$  potesse svolgere un'azione di protezione nello sviluppo del danno epatico, abbiamo valutato il grado di infiammazione epatica tramite la misurazione dell'espressione genica di citochine pro-infiammatorie quali IL-6, TNF $\alpha$  e NF-Kb. Come mostrato nelle figure 17A-C i topi iVP16LXR $\alpha$  sottoposti al trattamento con CCl $_4$  mostravano una significativa riduzione dei livelli di mRNA delle citochine IL-6, TNF $\alpha$  e NF-Kb rispetto ai relativi controlli VP16.



**Figure 17A-C: Espressione genica dei markers dell'infiammazione epatica.** L'espressione dei geni IL-6(A), TNF $\alpha$  (B) e Nf-Kb (C) è stata determinata tramite RT-qPCR in campioni fegato prelevati da topi iVP16 e iVP16LXR $\alpha$ . Il calibratore endogeno per il calcolo dei livelli di espressione è CyclophilinB. I dati sono espressi come media $\pm$ SEM. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

È noto in letteratura che il processo infiammatorio epatico, che costituisce il primo “step” nello sviluppo del danno cronico, avviene in risposta ad un danno a carico di tutte le popolazioni cellulari epatiche. In seguito a ciò, gli epatociti, le cellule stellate e i macrofagi residenti secernono citochine pro-infiammatorie che inducono e perpetuano il danno al fegato. Tra queste popolazioni, le cellule che influiscono in misura maggiore sono costituite dalle cellule di Kupffer, ossia i macrofagi residenti del fegato. Abbiamo pertanto misurato, tramite immunohistochimica, l’espressione di F4/80, uno specifico marker di infiltrazione macrofagica. Anche in questo caso abbiamo riscontrato un miglioramento del quadro infiammatorio epatico nei topi iVP16LXR $\alpha$  rispetto ai controlli. Infatti, la quantità di parenchima positivo per il marker F4/80 risultava significativamente inferiore negli animali iVP16LXR $\alpha$  rispetto ai controlli (Figura 17D); ciò indica un minore infiltrato macrofagico nel fegato dei topi con attivazione costitutiva intestinale di LXR $\alpha$ , ulteriore prova di uno stato infiammatorio meno marcato.

D



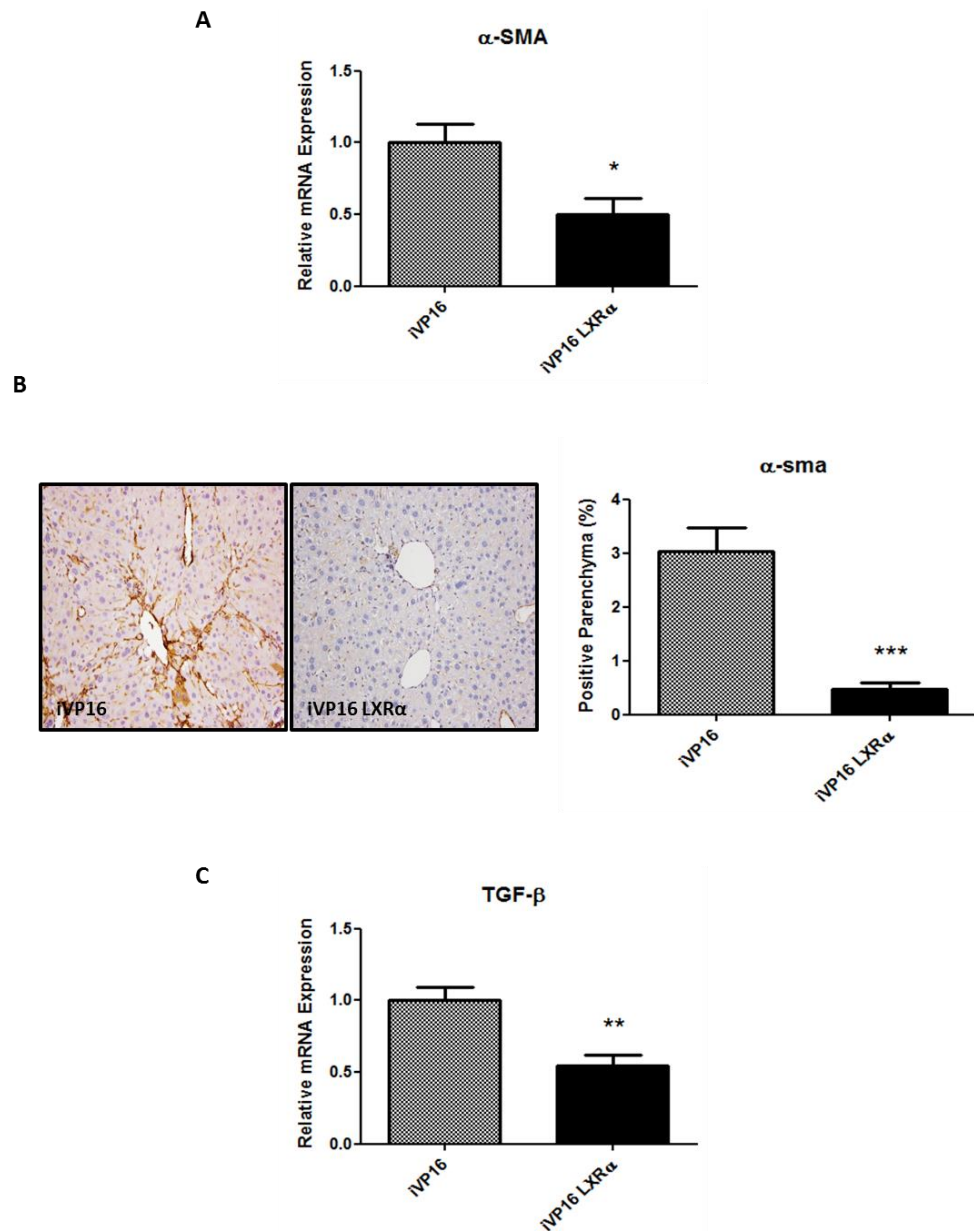
**Figura 17D. L’attivazione intestinale di LXR $\alpha$  riduce l’infiammazione epatica.** La percentuale di parenchima epatico positivo per F4/80, markers di infiltrazione macrofagica nei topi IVP16 e IVP16LXR $\alpha$  è stata valutata in immunohistochimica. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ .

### 4.3 L'attivazione intestinale di LXR $\alpha$ riduce l'attivazione delle HSC

L'infiammazione cronica si associa ad una progressiva deposizione di fibre collagene che in ultimo conduce allo sviluppo di cirrosi epatica, che costituisce una fase irreversibile della malattia. Al fine di valutare se l'attivazione di LXR $\alpha$  a livello intestinale fosse in grado non solo di agire sul processo infiammatorio ma anche sulla riduzione della fibrogenesi epatica, abbiamo studiato il grado di attivazione delle cellule stellate epatiche (HSC), ossia le cellule deputate alla sintesi e deposizione di collagene. In corso di danno epatico, le cellule stellate attivate subiscono un processo di trasformazione in cellule miofibroblastiche ed iniziano a secernere citochine implicate nella regolazione paracrina ed autocrina dei processi infiammatori, fibrogenetici e di riparazione al danno tissutale. Per dimostrare l'attivazione delle HSC abbiamo misurato l'espressione genica di  $\alpha$ -SMA (isoforma  $\alpha$  del *Smooth Muscle Actin*), noto marker di attivazione miofibroblastica, osservando che i topi iVP16LXR $\alpha$  presentavano una minore espressione di tale gene (Figura 18A). Tali dati sono stati poi corroborati dall'analisi morfometrica condotta tramite immunistochemica per  $\alpha$ -SMA che ha mostrato una significativa riduzione di tale marker anche a livello proteico (Figura 18B).

Le HSC attivate, come sopra descritto, secernono citochine come il *Transforming Growth Factor* (TGF- $\beta$ ), una delle principali citochine coinvolte nella riparazione del danno. Come si evince dalla figura 18C, i topi iVP16LXR $\alpha$

trattati con CCl<sub>4</sub> mostravano una significativa riduzione dell'espressione genica di TGF- $\beta$  rispetto ai controlli VP16.

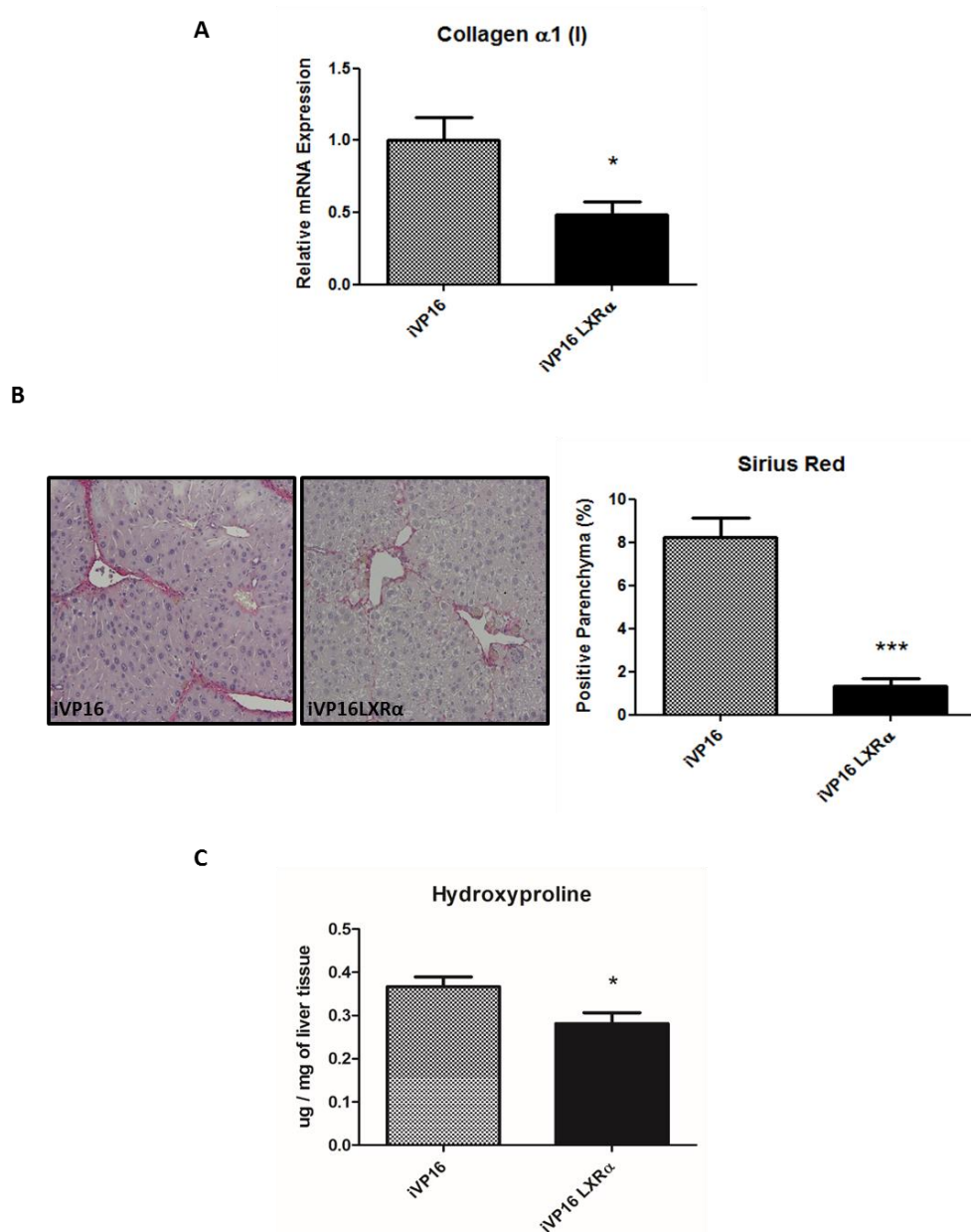


**Figura 18. L'attivazione intestinale di LXR $\alpha$  riduce l'attivazione delle HSC.** L'espressione genica  $\alpha$ -SMA (A), marker di attivazione dei miofibroblasti, e di TGF- $\beta$  (C), citochina secreta in risposta al danno, è stata valutata mediante RT-qPCR rispetto ad un gene di controllo in campioni fegato prelevati da topi iVP16 e iVP16LXR $\alpha$ . La percentuale del parenchima epatico positivo per  $\alpha$ -SMA è stata valutata in immunohistochimica (B). Il calibratore endogeno per il calcolo dei livelli di espressione è la *CyclophilinB*. I dati sono espressi come media $\pm$ SEM. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .



#### **4.4 L'attivazione intestinale di LXR $\alpha$ riduce la fibrosi epatica**

L'attivazione delle cellule stellate epatiche induce la deposizione di fibre collagene nel fegato. Al fine di confermare che la minore attivazione delle HSC osservata nei topi con attivazione intestinale di LXR fosse associata ad un reale minore sviluppo di fibrosi epatica, abbiamo misurato sia la sintesi cellulare di collagene che la sua deposizione a livello epatico. I topi iVP16LXR $\alpha$  presentano una diminuita produzione di collagene rispetto ai iVP16, come indicato dalla ridotta espressione del collagene 1 $\alpha$  valutata mediante qPCR (Figura 19A). Ciò comporta una ridotta deposizione di collagene, valutata sia mediante istochimica per il Sirius Red (Figura 19B) che tramite il dosaggio dell'idrossiprolina (Figura 19C). In conclusione, i topi iVP16LXR $\alpha$  presentavano un danno epatico significativamente minore in termini di fibrosi, che suggerisce come l'attivazione intestinale di LXR $\alpha$  eserciti un effetto protettivo a livello del parenchima epatico.



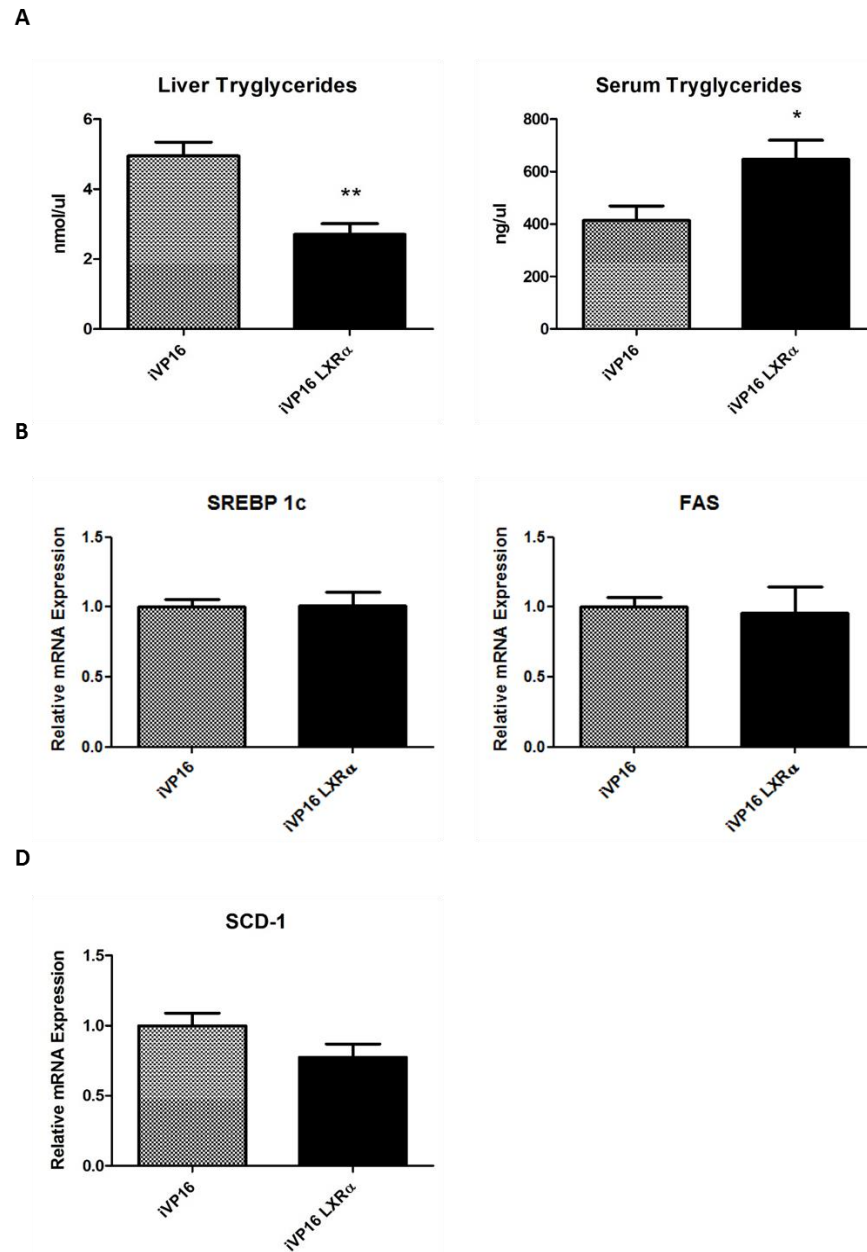
**Figura 19. L'attivazione intestinale di LXR $\alpha$  riduce la fibrosi epatica.** L'espressione genica del Collagene-1 $\alpha$ (A), è stata valutata mediante RT-qPCR rispetto ad un gene di controllo in campioni di fegato prelevati da topi iVP16 e iVP16LXR $\alpha$ . L'aumento della deposizione del collagene a livello epatico è stata valutata con la colorazione istochimica Sirius Red (B) e attraverso il dosaggio dell'idrossiprolina (C). Il calibratore endogeno per il calcolo dei livelli di espressione è la CyclophilinB. I dati sono espressi come media $\pm$ SEM. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

## 4.5 L'attivazione intestinale di LXR $\alpha$ non induce steatosi epatica

La maggiore controindicazione all'utilizzo di farmaci agonisti di LXR è costituita dal fatto che tale recettore nucleare è un potente attivatore della *de novo* lipogenesi a livello epatico che nel lungo periodo provoca steatosi epatica [90]. L'accumulo di lipidi può infatti causare lipotossicità, un fattore promuovente il danno tossico che, unitamente allo stress ossidativo da esso causato, può portare ad infiammazione cronica e progressiva deposizione di fibre collagene a livello epatico [116,232].

Per poter confermare che l'attivazione intestinale di LXR $\alpha$  non comporti accumulo di trigliceridi nel fegato, abbiamo misurato il contenuto di trigliceridi (TG) epatici e sierici (Figura 20A) e valutato l'espressione di quei geni coinvolti direttamente nella lipogenesi. Il contenuto epatico di TG è significativamente ridotto nei topi iVP16LXR $\alpha$  trattati con CCl<sub>4</sub> rispetto ai controlli; tuttavia, si può notare un leggero aumento dei TG circolanti nel siero, probabile sintomo di un aumentato efflusso. Successivamente, abbiamo misurato l'espressione genica di tre dei geni target specifici di LXR coinvolti nella lipogenesi, quali SREBP1c, FASN e SCD-1 (Figura 20 B-D). SREBP1c è il più importante fattore trascrizionale promotore della lipogenesi nonché induttore del *Fatty Acid Synthase* (FASN) e del *Stearoyl-CoA desaturasi-1* (SCD-1), responsabili a loro volta della sintesi degli acidi grassi. L'espressione di tutti e tre i *markers* di lipogenesi sono risultati inalterati sia negli animali transgenici che nei controlli indicando che l'induzione

tessuto specifica di LXR $\alpha$  intestinale non è associata all'accumulo di lipidi nel fegato.



**Figura 20. L'attivazione intestinale di LXR $\alpha$  non induce steatosi epatica.** La concentrazione dei trigliceridi epatici e sierici (A) è stata determinata in topi iVP16LXR $\alpha$  e nei rispettivi controlli iVP16. L'espressione dei geni SREBP-1C (B), FAS (C) e SCD-1(D) coinvolti nelle *pathway* attivate durante la lipogenesi, è stata valutata mediante RT-qPCR in campioni di fegato prelevati da topi iVP16 e iVP16LXR $\alpha$ . Il calibratore endogeno per il calcolo dei livelli di espressione è la *CyclophilinB*. I dati sono espressi come media $\pm$ SEM. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

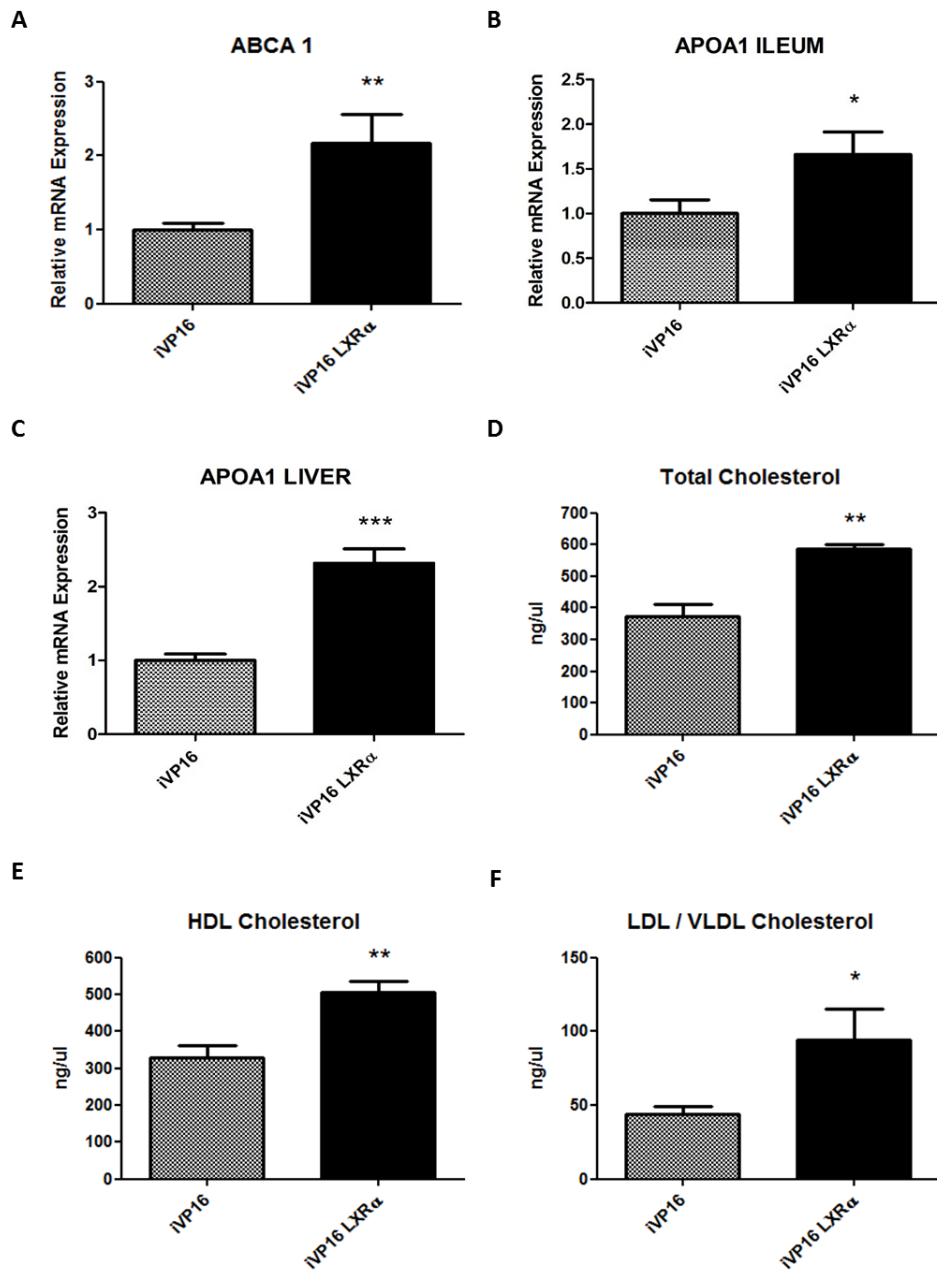
## 4.6 L'attivazione intestinale di LXR $\alpha$ induce il "reverse cholesterol transport" e aumenta la concentrazione di HDL

A causa dell'effetto collaterale di LXR nell'attivazione della lipogenesi epatica, nel corso degli anni si sono valutate strategie alternative, prevalentemente nell'ambito dell'aterosclerosi, mirate ad ovviare questo problema. Una di queste è rappresentata dall'attivazione selettiva di LXR $\alpha$  nell'intestino che, oltre a ridurre l'assorbimento di colesterolo intestinale, è stata dimostrata incrementare il trasporto inverso del colesterolo (RCT) *in vivo* e ridurre pertanto la concentrazione di colesterolo plasmatico. Ciò comporta una diminuita incidenza di malattie correlate all'aterosclerosi in assenza di effetti collaterali legati all'attivazione di LXR $\alpha$  a livello degli epatociti [231]. Il ruolo delle HDL è stato recentemente rivalutato: mentre fino a pochi anni fa si attribuiva ad esse la sola funzione di eliminare il colesterolo plasmatico in eccesso, si è osservato che queste lipoproteine possiedono altre importanti funzioni a livello di diverse popolazioni cellulari quali un potente effetto anti-infiammatorio, anti-ossidante ed anti-infettivo [233].

Pertanto, poiché abbiamo già mostrato nel nostro modello sperimentale come l'attivazione intestinale di LXR $\alpha$  non causi ipertrigliceridemia né induzione della lipogenesi, abbiamo valutato l'attivazione del RCT. Il principale responsabile del trasporto inverso del colesterolo dai tessuti periferici alle pre- $\beta$ -HDL è ABCA1, un trasportatore di membrana la cui espressione è regolata da LXR. Come si vede dalla figura 21A, l'espressione di ABCA1 nei iVP16LXR $\alpha$  risulta notevolmente indotta. Inoltre l'apolipoproteina A1 (APOA1), che costituisce la principale

componente proteica delle HDL, risulta anch'essa overespressa tanto nell'ileo (Figura 21B) quanto a livello epatico (Figura 21C).

Successivamente abbiamo misurato i livelli di colesterolo nel siero al fine di valutare l'effetto dell'attivazione intestinale di LXR sull'omeostasi del colesterolo. Il colesterolo sierico era aumentato nei topi iVP16LXR $\alpha$  rispetto ai controlli e tale aumento dipendeva fondamentalmente dalla maggiore quota delle HDL circolanti (Figura 21D-F).



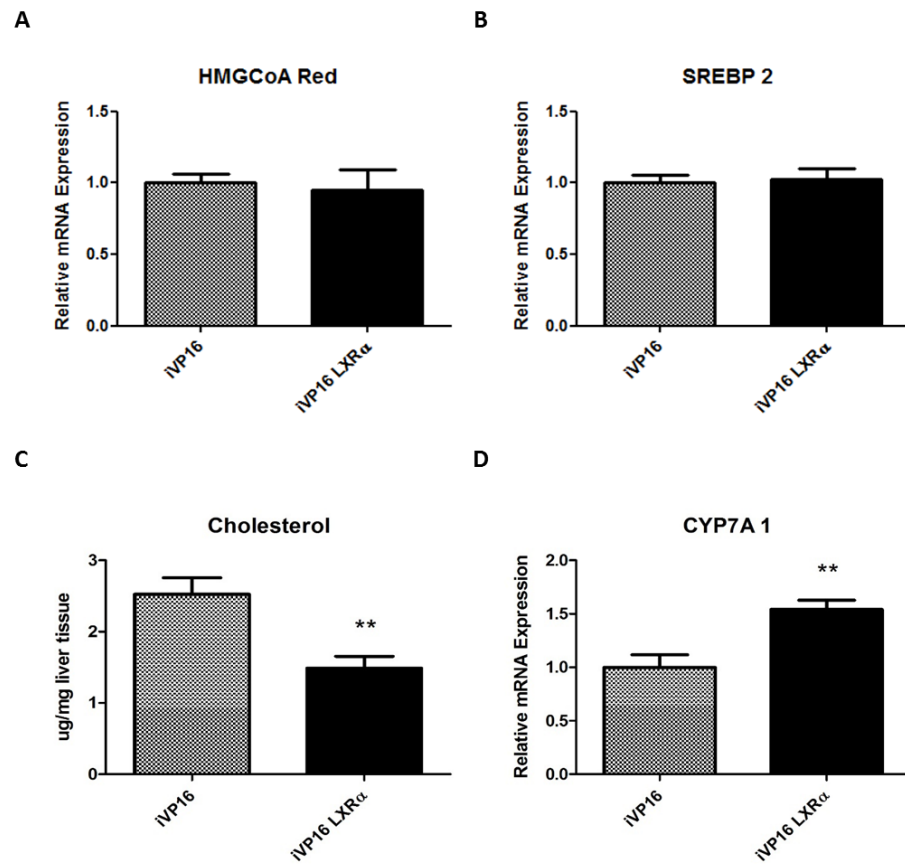
**Figura 21.** L'attivazione intestinale di LXR $\alpha$  induce il "reverse cholesterol transport" e aumenta la concentrazione di HDL. L'espressione dei geni ABCA1 nel fegato (A) ed APOA1, nell'ileo (B) e nel fegato (C), è stata valutata mediante RT-qPCR. La concentrazione del colesterolo totale (D) del colesterolo HDL (E) e di quello contenuto all'interno delle particelle lipidiche LDL/VLDL (F) è stata determinata in campioni di siero prelevati dai topi iVP16LXR $\alpha$  e i rispettivi controlli. Il calibratore endogeno per il calcolo dei livelli di espressione è la *CyclophilinB*. I dati sono espressi come media $\pm$ SEM. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

#### **4.7 L'attivazione intestinale di LXR $\alpha$ non induce la *de novo* sintesi del colesterolo**

L'aumento del colesterolo sierico osservato, ascrivibile principalmente all'aumento della quantità di HDL circolanti, non corrisponde ad un aumento nella sintesi *de novo* del colesterolo epatico. Difatti, la misurazione dell'espressione genica di SREBP2 e HMG-CoARed, due enzimi chiave coinvolti in questo processo, è risultata inalterata nei due modelli murini (Figura 22A-B).

Pertanto, al fine di comprendere come l'attivazione intestinale di LXR $\alpha$  possa influire sul contenuto di grassi, abbiamo valutato il contenuto di colesterolo nel fegato. A livello epatico, abbiamo già evidenziato come la componente di trigliceridi fosse minore nei iVP16LXR $\alpha$  (Figura 20A) ed abbiamo osservato lo stesso andamento anche per il contenuto di colesterolo (Figura 22C). Nell'insieme quindi, questi dati dimostrano come il colesterolo non sia sintetizzato *de novo*, ma piuttosto vada incontro a processi finalizzati alla sua eliminazione dal fegato, attraverso il lume intestinale e poi, nelle feci. Ciò suggerisce che parte del colesterolo possa essere escreto direttamente nella bile, parte sia trasformato in acidi biliari, come confermato dal leggero aumento della sintesi di CYP7A1 (Figura 22D), un enzima chiave per la conversione del colesterolo in acidi biliari, e parte venga recuperato dalle HDL a livello dei tessuti periferici.





**Figura 22.** L'attivazione intestinale di LXR $\alpha$  non induce la *de novo* sintesi del colesterolo. L'espressione dei geni HMGCoA (A) SREBP2 (B), CYP7A1 (D) è stata valutata mediante RT-qPCR) in campioni di fegato prelevati dai topi iVP16LXR $\alpha$  rispetto al gruppo di controllo. La concentrazione del colesterolo totale (C) è stata determinata a livello epatico, da campioni prelevati dai modelli murini VP16 e VP16LXR $\alpha$ . Il calibratore endogeno per il calcolo dei livelli di espressione è la *CyclophilinB*. I dati sono espressi come media $\pm$ SEM. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

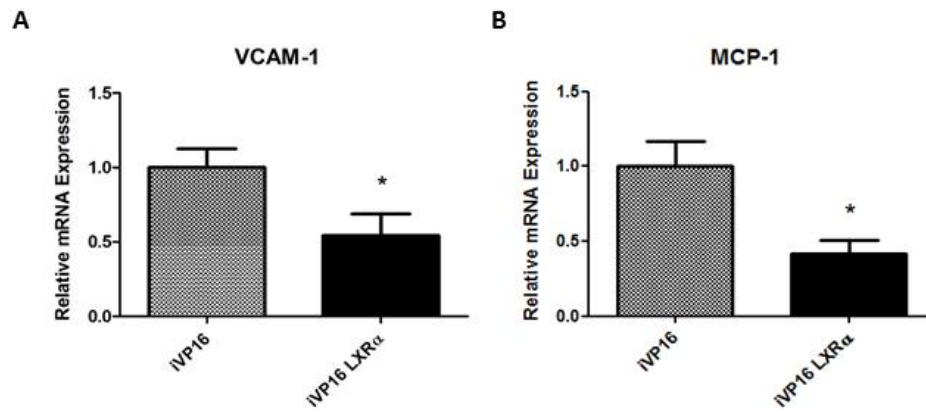
#### **4.8 Le HDL contribuiscono alla riduzione del danno infiammatorio endoteliale**

È stato visto che l'attivazione intestinale di LXR $\alpha$  comporta un aumento dei livelli sierici di HDL circolanti. Il ruolo delle HDL è stato ampiamente esaminato in letteratura e sono ormai note le loro proprietà anti-infiammatorie, anti-ossidanti ed anti-infettive. Le HDL sono infatti coinvolte nella modulazione della risposta cellulare a segnali infiammatori; ad esempio, una riduzione delle concentrazioni del colesterolo di membrana è in grado di regolare le vie di segnalazione associate ai differenti complessi recettoriali presenti nei *lipid rafts*, tra cui diversi recettori delle citochine [234]. Inoltre, le HDL svolgono un ruolo chiave nelle fasi iniziali dei processi aterosclerotici, promuovendo la riduzione dell'infiammazione e dei processi di iniziazione dell'attivazione endoteliale. Infatti, le disfunzioni a carico dell'endotelio causano un aumento della permeabilità vascolare con conseguente progressivo reclutamento di monociti all'interno dell'intima, dovuto all'interazione di specifiche integrine e molecole di adesione endoteliali. Questo comporta non solo la progressione del danno ma anche una maggiore attivazione dei monociti che, una volta differenziati in macrofagi, amplificano gli effetti pro-infiammatori interagendo con citochine prodotte in maniera specifica durante queste fasi.

Le HDL possono intervenire nel corso di questi processi con lo scopo di regolare l'infiammazione; infatti possono sopprimere direttamente l'espressione delle integrine tramite l'inibizione della *sphingosine kinase*, un enzima chiave della via con cui TNF $\alpha$  stimola l'espressione delle molecole di adesione endoteliali

[235-237]. Inoltre, le HDL possono inibire l'adesione dei monociti al tessuto endoteliale e la loro infiltrazione nell'intima, prevenendo in questo modo la modificazione pro-aterogena indotta dalle LDL ossidate [238] e bloccando l'attivazione dei monociti a seguito dell'interazione con i linfociti T [239].

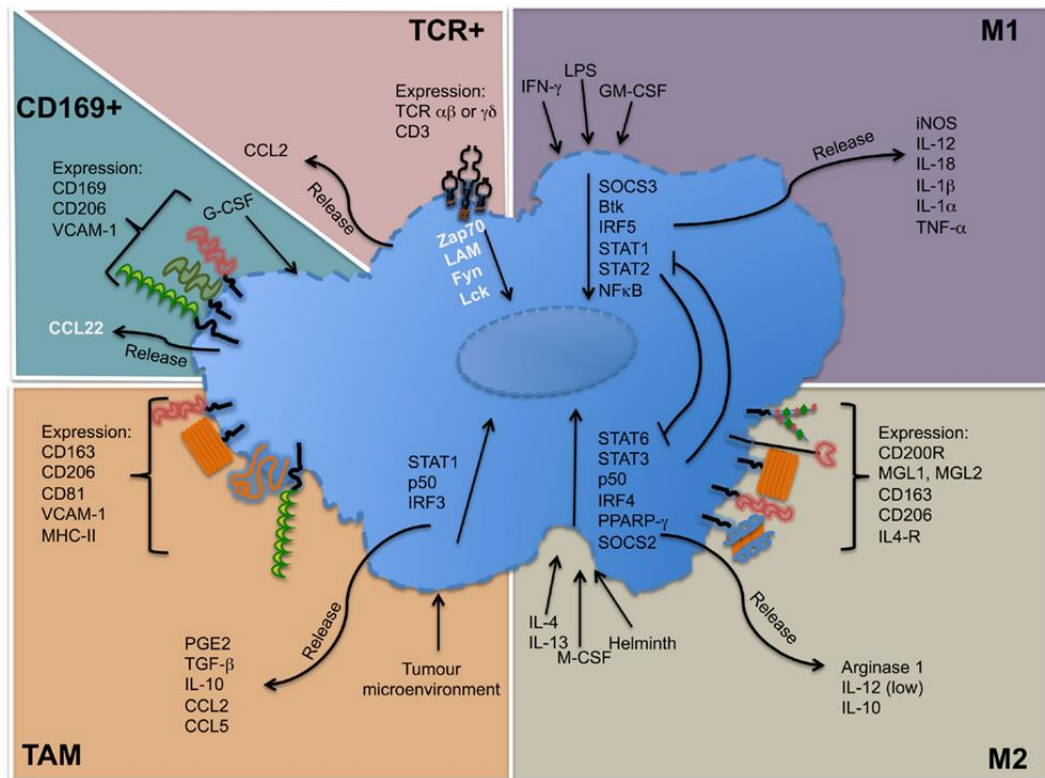
Al fine di valutare se l'aumento delle HDL circolanti riscontrato nei nostri animali transgenici fosse correlato ad una diminuzione del danno infiammatorio endoteliale, abbiamo valutato i livelli delle principali molecole coinvolte nello sviluppo e progressione del danno. Nel fegato degli animali sottoposti a trattamento con CCl<sub>4</sub> l'espressione delle integrine e delle chemochine alla base dei processi pro-infiammatori è ridotta nei topi con attivazione intestinale di LXR $\alpha$  rispetto ai controlli (Figura 23A-B). Nello specifico, si assiste ad una diminuzione dei livelli VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*), responsabile del processo di riconoscimento leucocitario e dei linfociti T che rappresenta il primo step che porta all'invasione del tessuto sub-endoteliale, e di MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein 1*), che partecipa invece al successivo reclutamento dei monociti e all'indirizzamento di questi verso i siti infiammatori per la maturazione in macrofagi. Pertanto, l'attivazione intestinale di LXR $\alpha$  svolge un ruolo positivo nel limitare il danno infiammatorio a carico dell'endotelio.



**Figura 23. Le HDL contribuiscono alla riduzione del danno infiammatorio endoteliale.** L'espressione dei geni VCAM-1 (A) e MCP-1 (B) è stata valutata mediante RT-qPCR in campioni di fegato prelevati dai topi iVP16LXR $\alpha$  rispetto al gruppo di controllo. Il calibratore endogeno per il calcolo dei livelli di espressione è la CyclophilinB. I dati sono espressi come media $\pm$ SEM. \* $P < 0.05$

## 4.9 Le HDL contribuiscono alla riduzione del danno mediata dai macrofagi

Come precedentemente accennato, durante le prime fasi dei processi aterogenici, l'attivazione endoteliale richiama nell'intima dei vasi sanguigni un gran numero di monociti che vanno incontro a processi di maturazione in macrofagi; questi sono basilari per la progressione e/o regressione aterosclerotica e il loro stato infiammatorio influenza enormemente il decorso della malattia [240]. Si pensa che le HDL siano in grado di smorzare la risposta macrofagica in risposta a stimoli pro-infiammatori; questa caratteristica è spesso stata attribuita alla capacità di promuovere l'efflusso di colesterolo che porterebbe alla riorganizzazione di micro domini presenti sulla membrana plasmatica [241,242]. Recenti studi hanno evidenziato un'altra potenziale proprietà anti-infiammatoria delle HDL: esse infatti giocano un ruolo chiave nella promozione della polarizzazione dei macrofagi da uno stato pro-infiammatorio (M1) ad uno anti-infiammatorio (M2). In particolare esperimenti *in vitro* condotti su macrofagi derivati da midollo osseo hanno evidenziato come le HDL siano in grado di indurre due dei maggiori marker dello stato M2, quali l'Arginasi-1 e FIZZ1, in un meccanismo che coinvolge la fosforilazione di STAT6 (*Signal transducer and activator of transcription 6*) [243]. Nella figura 24 si possono vedere i diversi stati di attivazione dei macrofagi e le pathway comunemente implicate nella risposta macrofagica.



**Figura 24. Molecole associate con i vari tipi di macrofagi.** I macrofagi M1, che portano all'attivazione della via classica dell'infiammazione, rispondono a stimoli come LPS, IFN- $\gamma$  e producono citochine pro-infiammatorie. I macrofagi M2, che portano alla risposta alternativa, rispondono a stimoli quali IL-4 e IL-13 e producono citochine anti-infiammatorie. I TAM (Macrofagi associati al tumore) secernono citochine come TGF- $\beta$  o IL-10. I macrofagi CD169+ sono coinvolti in processi di immuno-tolleranza ed eritropoesi. I TCR+, invece, costituiscono una nuova popolazione macrofagica che gioca un ruolo chiave nella risposta infiammatoria e nelle malattie infettive. (Immagine tratta da "Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169+ and TCR+ Macrophages" [244])

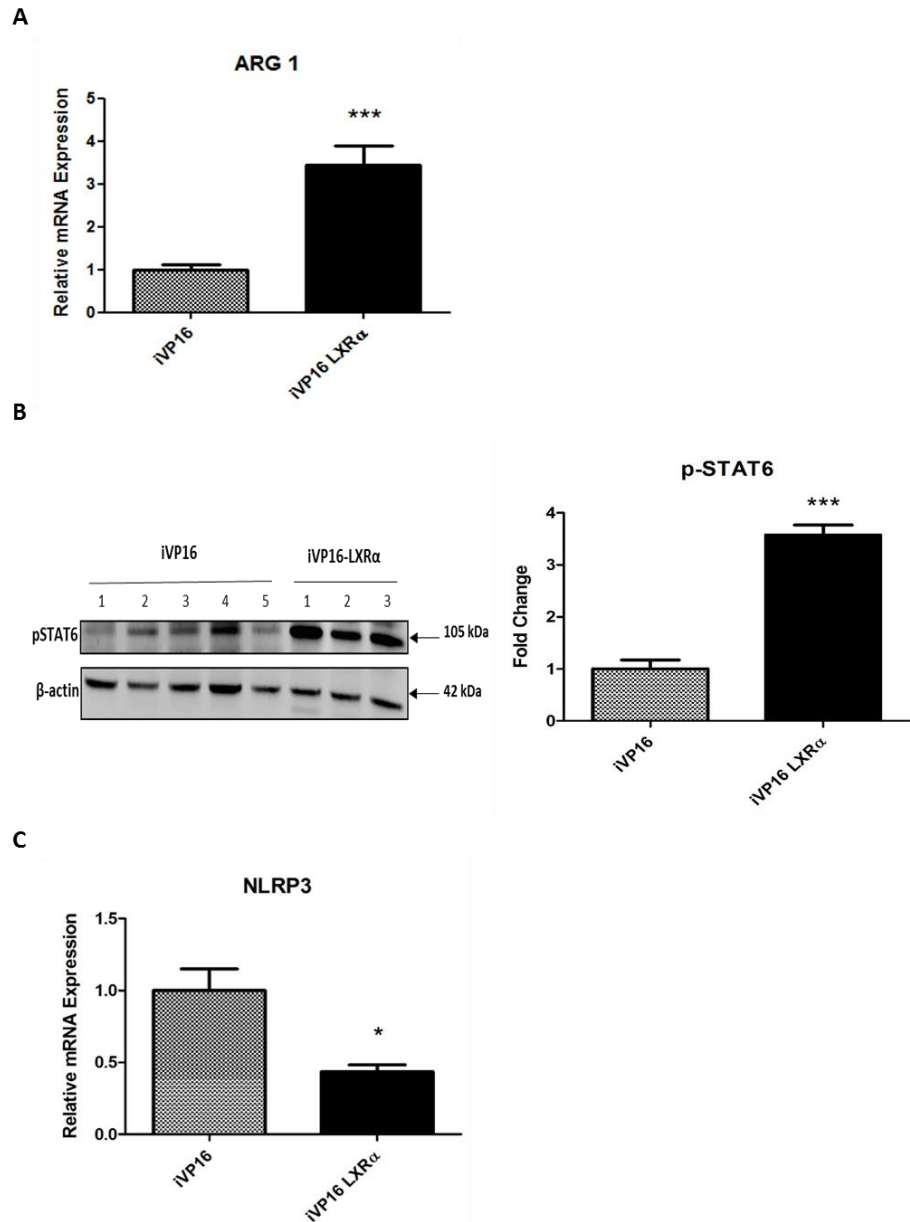
Pertanto, al fine di valutare il meccanismo alla base della riduzione del danno epatico osservato nel nostro modello, abbiamo ipotizzato che le HDL possano svolgere un ruolo fondamentale nell'attenuare l'infiammazione mediata dai macrofagi e, conseguentemente, lo sviluppo di fibrosi epatica. Abbiamo valutato l'espressione di Arginasi-1 (ARG-1), un enzima chiave che regola la trasformazione dell'arginina in citrullina, riconosciuto quale marker macrofagico di fase M2 che condivide lo stesso substrato di iNOS (che rappresenta invece un marker macrofagico M1). La misurazione dell'espressione epatica di tale gene ci

ha rivelato una significativa up-regolazione nei iVP16LXR $\alpha$  rispetto ai controlli (Figura 25A).

Al fine di confermare che la fosforilazione di STAT6 è il meccanismo mediante il quale le HDL modulano l'espressione di Arg-1, ne abbiamo valutato la sua attivazione mediante Western Blot. Dalla figura 25B si può vedere come nei topi iVP16LXR $\alpha$  la fosforilazione di STAT6 sia notevolmente indotta rispetto ai controlli.

Un'ulteriore considerazione, non ancora ben approfondita, riguarda il ruolo dell'inflammosoma (complesso multiproteico appartenente al sistema dell'immunità innata) a livello macrofagico. È noto che l'inflammosoma possa essere attivato dai cristalli del colesterolo, presenti nelle Foam Cells tipiche delle placche aterosclerotiche [245]. Considerato il noto ruolo di LXR nel regolare gli efflussi di colesterolo è lecito ipotizzare un suo coinvolgimento nel ridurre la formazione di cristalli di colesterolo. Tale ipotesi è corroborata dal fatto che nel nostro modello transgenico NLRP3 (*NLR Family Pyrin Domain Containing 3*), uno dei principali esponenti dell'inflammosoma, presenta una minore espressione rispetto ai controlli (Figura 25C).

Complessivamente questi dati dimostrano come il ruolo delle HDL sui macrofagi sia determinante per la riduzione dello sviluppo e progressione del danno e come queste possano direzionare l'infiammazione verso uno stato risolutivo.



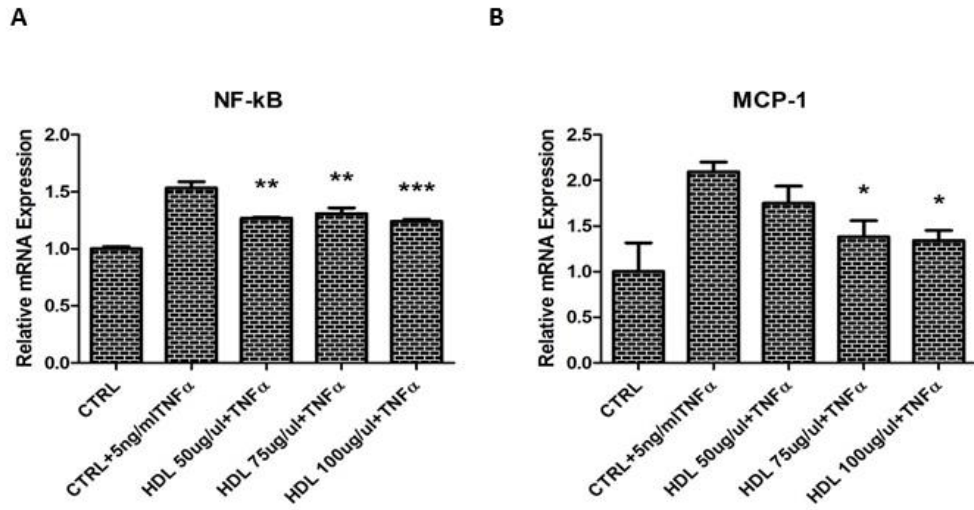
**Figura 25. Le HDL contribuiscono alla riduzione del danno mediata dai macrofagi.** L'espressione dei geni ARG-1 (A), e NLRP3 (C) è stata valutata mediante RT-qPCR in campioni di fegato prelevati dai topi iVP16LXR $\alpha$  rispetto al gruppo di controllo. La valutazione dell'attivazione di STAT6 (B) è avvenuta mediante Western Blot e successiva quantizzazione dei livelli di fosforilazione. Il calibratore endogeno per il calcolo dei livelli di espressione è la *CyclophilinB*. I dati sono espressi come media $\pm$ SEM. \*\*\* $P < 0.001$  \* $P < 0.05$



#### **4.10 Il pretrattamento con HDL riduce l'infiammazione *in vitro* a seguito di uno stimolo pro-infiammatorio**

Abbiamo osservato come nel nostro modello *in vivo* di danno epatico, l'attivazione intestinale di LXR $\alpha$  eserciti un effetto protettivo nei confronti del fegato per lo più ascrivibile all'aumento di HDL circolanti e al ruolo anti-infiammatorio che le contraddistingue. Poiché le HDL esercitano il proprio effetto protettivo a diversi livelli e su diverse popolazioni cellulari, abbiamo cercato di riprodurre anche *in vitro* quanto osservato *in vivo*, al fine di valutare come reagissero gli epatociti in condizioni di aumentata concentrazione di HDL.

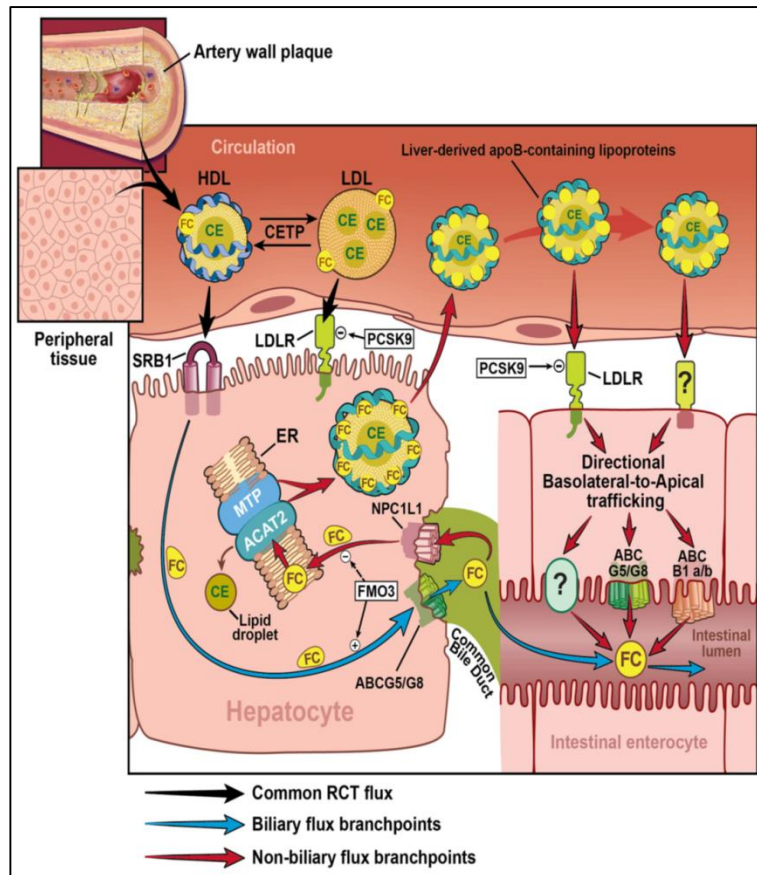
Cellule di epatocarcinoma umano HepG2 sono state pretrattate per 16 ore con diverse concentrazioni di HDL, a seguito delle quali è stato aggiunto uno stimolo pro-infiammatorio con TNF $\alpha$  (5ng/ml) per 24 ore. Siamo andati a valutare quindi l'espressione genica di due marker cardine dell'infiammazione quali NF- $\kappa$ B e MCP-1. Entrambi i geni risultavano significativamente meno espressi in seguito al pretrattamento con le HDL, con un andamento inversamente proporzionale alla concentrazione di HDL utilizzata (Figura 26A-B).



**Figura 25. Il pretrattamento con HDL riduce l'inflammatione in vitro a seguito di uno stimolo pro-infiammatorio.** Espressione genica di NF-kB (A) e MCP-1 (B) in HepG2 trattate con diversi stimoli. Il calibratore endogeno per il calcolo dei livelli di espressione è la *CyclophilinB*. I dati sono espressi come media $\pm$ SEM. \*\*\* $P$ <0.001; \*\* $P$ <0.01; \* $P$ < 0.05

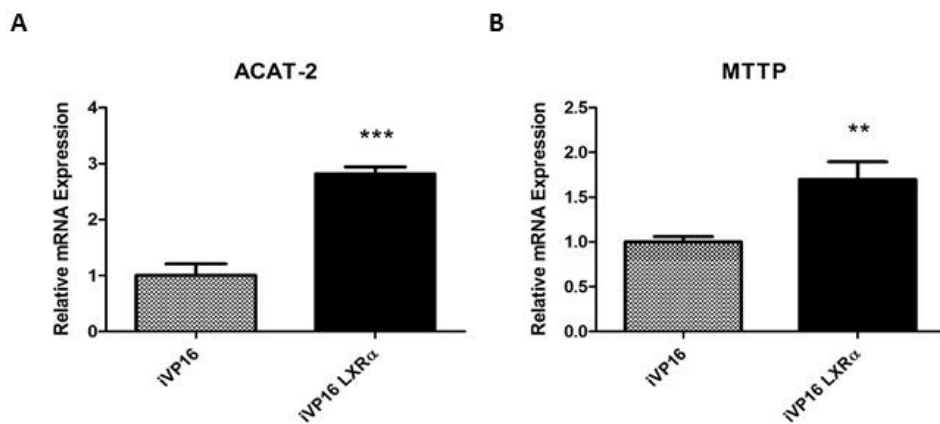
## 4.11 Integrazione del flusso biliare e non biliare per il RCT

Il modello principalmente accreditato per il RCT è quello della via biliare. Questo consiste nel recupero del colesterolo dai tessuti periferici mediato dai macrofagi, che viene quindi trasportato al fegato via HDL, per poi essere successivamente trasportato nel lume intestinale dove è eliminato attraverso la bile. Tuttavia nell'ultimo decennio, molti studi hanno dimostrato come il RCT possa anche procedere attraverso una *pathway* non biliare, nota come *Trans-Intestinal Cholesterol Excretion* (TICE), la quale coinvolge la secrezione diretta di lipoproteine plasmatiche ricche in colesterolo direttamente nell'intestino tenue [37,43,246]. Sebbene i meccanismi che regolano la via classica biliare siano stati ben definiti, poche sono le informazioni sui meccanismi esistenti per la via non biliare della TICE [247]. La figura 26 presenta un nuovo modello integrato di RCT, che comprende non solo la via classica biliare, ma anche quella non biliare; come si può osservare, è il fegato a determinare il destino del flusso di colesterolo, ossia se esso debba essere secreto attraverso la bile e/o attraverso lipoproteine (VLDL/LDL in formazione) per il riassorbimento a livello intestinale direttamente dal flusso sanguigno. In condizioni fisiologiche predomina la normale via biliare [247,248], mentre in condizioni fisiopatologiche, dove il normale flusso di colesterolo biliare è compromesso, la TICE sembra costituire la via più dinamica e facilmente stimolabile [35,249].



**Figura 26. Modello integrato di RCT, comprendente la via “classica” biliare e quella non biliare.** Le HDL circolanti rimuovono il colesterolo dai tessuti periferici e dalle *foam cells* presenti a livello della placca aterosclerotica. Una volta formatesi le HDL mature (arricchite di colesterolo libero ed esterificato) vengono metabolizzate a livello epatico attraverso la via SR-B1 dipendente. Una considerevole quota del colesterolo esterificato presente nelle HDL può essere trasferita alle lipoproteine contenenti APOB via CETP. Le frecce in nero mostrano la via comune dell’RCT che include il trasporto del colesterolo al fegato dove può andare incontro a due destini: verso la via biliare o verso la via meno conosciuta, quella non biliare. Come evidenziato dalle frecce blu, una notevole porzione del pool di colesterolo derivante dalle HDL, può essere secreto nella bile attraverso l’azione di due trasportatori ATP-binding cassette G5 e G8. Una volta che il colesterolo viene riversato nella bile, in parte viene trasportato nel lume intestinale attraverso i dotti biliari e successivamente eliminata con le feci. A livello degli enterociti, il colesterolo viene assorbito mediante l’attivazione del *pathway* NPC1L1 dove sia il colesterolo assunto con la dieta che quello derivato dalla bile, viene trasportato a livello del reticolo endoteliale dove viene impacchettato a formare chilomicroni, riversati poi nel sistema linfatico. La via alternativa evidenziata in rosso, è rappresentata dal *pathway* TICE attraverso il quale il fegato può eliminare l’eccesso di colesterolo. Le lipoproteine ricche in APOB sono internalizzate a livello epatico grazie al recettore per le LDL (LDLR). Una volta giunte all’interno del fegato, le lipoproteine sono trasportate attraverso il compartimento endosomiale e lisosomiale per poi essere rilasciate dalla membrana apicale attraverso i trasportatori ABCG5/ABCG8 e altri trasportatori. Una parte del colesterolo viene eliminato attraverso le feci (Immagine tratta da “A new model of reverse cholesterol transport: entICEing strategies to stimulate intestinal cholesterol excretion” [37]).

Nel nostro modello genetico di attivazione costituzionale di LXR $\alpha$  a livello intestinale, in condizione di danno epatico indotto dal CCl $_4$ , abbiamo osservato un aumento dell'espressione epatica di due geni coinvolti nella TICE, quali ACAT-2 (*Acyl-CoA AcetylTransferase 2*) e MTTP (o MTP, *Microsomal Triglyceride Transfer Protein*) (Figura 27A-B). ACAT-2 è un enzima citoplasmatico che catalizza la trasformazione del colesterolo libero (FC) in estere del colesterolo (CE), una forma apolare che viene normalmente accumulata in particelle lipidiche che, in presenza di MTTP è incorporato assieme ai trigliceridi nelle lipoproteine plasmatiche in formazione contenenti l'apolipoproteina B (APOB) quali VLDL e LDL.



**Figura 27. Integrazione del flusso biliare e non biliare per il RCT.** Espressione genica di ACAT-2 (A) e MTTP (B) in campioni di fegato prelevati da topi iVP16 e iVP16LXR $\alpha$ . Il calibratore endogeno per il calcolo dei livelli di espressione è la CyclophilinB. \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$

## DISCUSSIONE

La fibrosi epatica rappresenta la risposta del fegato al danno epatico cronico ed è caratterizzata dalla deposizione di proteine della matrice extracellulare con progressiva alterazione anatomica e funzionale del fegato [196]. L'assenza di una conoscenza chiara e delineata in merito alla patogenesi della fibrosi epatica si traduce in una assenza di terapie mirate ed efficaci.

I *liver X receptors* (LXR  $\alpha/\beta$ ) sono importanti regolatori del metabolismo lipidico. A differenza di LXR $\beta$  che si trova espresso in modo ubiquitario, LXR $\alpha$  è espresso ad alti livelli nel fegato, nell'intestino, nel tessuto adiposo e nei macrofagi [250]. LXR è riconosciuto come il principale regolatore dell'omeostasi del colesterolo. Infatti, l'accumulo dei prodotti del colesterolo induce una risposta complessa che, attraverso l'espressione dei geni *target* di LXR, regola la sintesi di colesterolo epatico, la sua escrezione dal fegato e dell'intestino unitamente all'assorbimento intestinale e all'incremento del *reverse cholesterol transport* (RCT) [82]. Inoltre LXR, come altri membri della famiglia dei recettori nucleari, possiede importanti effetti anti-infiammatori, di regolazione dell'omeostasi glucidica ed addirittura anti-proliferativi [82,251]. Tuttavia, l'utilizzo di agonisti di LXR a scopo terapeutico è controindicato dalla presenza di effetti collaterali importanti quali l'ipertrigliceridemia e la steatosi epatica, dovute principalmente all'attivazione della isoforma LXR $\alpha$  a livello degli epatociti e al conseguente aumento della lipogenesi epatica [116].

Pertanto nel corso degli anni si sono valutate delle strategie alternative, prevalentemente nell'ambito dell'aterosclerosi, che portassero ad una attivazione tessuto specifica di LXR che non coinvolgesse il fegato, al fine di limitare gli effetti collaterali. Una di queste strategie è rappresentata dall'attivazione selettiva di LXR $\alpha$  nell'intestino. Tale attivazione non solo riduce l'assorbimento di colesterolo, ma anche incrementa l'RCT *in vivo* (aumentata sintesi intestinale di lipoproteine ad alto peso molecolare, HDL) con il conseguente decremento della concentrazione di colesterolo plasmatico; a ciò corrisponde una riduzione dell'incidenza di malattie correlate all'aterosclerosi in cui gli effetti collaterali legati all'attivazione di LXR $\alpha$  a livello degli epatociti sono assenti [146].

L'obiettivo di questo progetto è stato quello di elucidare i meccanismi che portano alla progressione del danno epatico valutando in particolare la capacità di una selettiva attivazione intestinale di LXR $\alpha$  nella riduzione del danno epatico cronico sia in termini di infiammazione che di fibrosi. I dati ottenuti pongono le basi per l'identificazione di nuovi farmaci ad azione intestinale che vadano ad attivare LXR $\alpha$  da utilizzare nel trattamento della NASH, per la quale non esistono ad oggi terapie farmacologiche efficaci.

Lo studio ci ha permesso di osservare come in seguito al trattamento con il CCL<sub>4</sub>, l'espressione genica dei *markers* di infiammazione quali IL-6, TNF $\alpha$ , TGF- $\beta$  e NF-kB risultasse ridotta nel modello murino iVP16LXR $\alpha$  in confronto ai topi di controllo VP16. Alla diminuita infiammazione è possibile ricollegare non solo minore infiltrato macrofagico, come indicato dalla valutazione del marcatore

F4/80, ma anche ad una minore attivazione delle HSC, come testimoniato dai ridotti livelli di  $\alpha$ SMA. La ridotta attivazione di HSC corrisponde poi alla diminuita deposizione di collagene  $\alpha$ 1 osservata, che si traduce in una complessiva attenuazione del danno fibrotico.

Il miglioramento del quadro epatico nel modello con attivazione intestinale di LXR $\alpha$ , sia dal punto di vista infiammatorio che di fibrosi, correla con un minor contenuto in grassi epatico, non solo in termini di trigliceridi ma anche di colesterolo. Ciononostante la *de novo* lipogenesi e la *de novo* sintesi del colesterolo risultano essere invariate. Questi dati confermano l'assenza degli effetti collaterali dell'attivazione epatica di LXR $\alpha$ , quali ipertrigliceridemia e steatosi epatica, che ad oggi sconsigliavano un utilizzo clinico dei suoi agonisti ad ampio spettro.

In parallelo abbiamo dimostrato come la sola attivazione intestinale di LXR $\alpha$  fosse in grado di stimolare l'RCT. I trasportatori più importanti in questo processo sono ABCG5 e ABCG8, responsabili dell'efflusso del colesterolo nel lume intestinale, e ABCA1, responsabile dell'inglobamento del colesterolo nelle particelle di pre  $\beta$ -HDL. L'espressione di questi trasportatori risulta up-regolata nei iVP16LXR $\alpha$  rispetto ai controlli. Inoltre, anche la principale componente delle HDL, l'apolipoproteina A1, presenta una maggiore espressione sia a livello epatico che intestinale. La valutazione del profilo lipoproteico del siero ha poi confermato un aumento netto della concentrazione di HDL circolanti.

Se fino a pochi anni fa si attribuiva alle HDL il semplice ruolo di eliminare il colesterolo plasmatico in eccesso, recentemente sono emerse altre funzioni di



queste lipoproteine, tra cui l'azione anti-infiammatoria, anti-ossidante e anti-infettiva [233]. Tali azioni possono esplicarsi a diversi livelli nel danno epatico. A livello endoteliale, abbiamo osservato una riduzione della produzione delle molecole di adesione quali VCAM-1 e della chemochina MCP-1, responsabili del richiamo dei monociti nell'intima dei vasi; ciò è associato alla diminuzione dei processi infiammatori fondamentali per l'attivazione della risposta macrofagica correlata al danno epatico. Anche a livello degli epatociti le HDL svolgono un ruolo chiave nel bloccare i processi infiammatori. Infatti è emerso che il trattamento con HDL in cellule stimulate con TNF $\alpha$  comporta una riduzione dei principali *markers* di infiammazione, quali NF-kB e MCP-1, non osservata nelle cellule in cui le HDL non erano state addizionate al mezzo di coltura. Come visto anche in letteratura, l'aumento delle HDL risulta in una diminuzione dell'"attivazione" della componente macrofagica. Le HDL, infatti, esercitano il proprio effetto stimolando un fenotipo macrofagico anti-infiammatorio di tipo M2, in un meccanismo che coinvolge la fosforilazione di STAT6 e l'aumento dell'Arginasi-1, che si osserva anche nei risultati da noi ottenuti.

Complessivamente questi dati dimostrano come l'attivazione intestinale di LXR $\alpha$  determini un aumento dell'RCT e, di conseguenza, delle HDL, le quali promuovono processi anti-infiammatori che risultano in una marcata riduzione del fenotipo fibrotico. Al tempo stesso, la selettività dell'attivazione a livello intestinale non comporta l'insorgenza di steatosi epatica, una delle principali controindicazioni per l'utilizzo degli agonisti di LXR a scopo terapeutico.

Tuttavia, altre valutazioni si rendono necessarie al fine di fornire un quadro più completo del ruolo dell'attivazione intestinale di LXR nelle epatopatie. Ad esempio, è già stato programmato un esperimento che, utilizzando il medesimo modello murino, prevede la somministrazione di una dieta *methionine-choline deficient* (MCD), modello di NASH che costituisce il miglior modo per valutare nel topo un quadro clinico sufficientemente equiparabile all'uomo [252]. Le cause che inducono la progressione dalla steatosi semplice alla NASH non sono state a tutt'oggi completamente chiarite. Tuttavia, è noto che alcuni fattori associati all'accumulo di acidi grassi siano i principali responsabili della lipotossicità e dello stress ossidativo che portano ad infiammazione cronica associata ad una progressiva deposizione di fibre collagene a livello epatico [232]. Pertanto, l'aumento delle HDL circolanti unitamente alla riduzione dei livelli di colesterolo e lipidi a livello epatico osservate nel nostro modello sperimentale, potrebbero supportare un ruolo chiave per LXR nella progressione della NASH, offrendo dei buoni presupposti per lo sviluppo di farmaci specifici in cui l'attivazione intestinale di LXR svolga un ruolo chiave nel bloccare o rallentare l'insorgenza della NASH.

Negli ultimi anni, è emerso che la flora batterica intestinale svolge un ruolo fondamentale nella progressione del danno epatico associato alla NASH. I soggetti affetti da NASH presentano infatti un'aumentata traslocazione batterica, associata ad elevati livelli ematici di lipolisaccaride (LPS); a questo consegue l'aumento dell'infiammazione epatica dovuta all'attivazione dei recettori *Toll-like receptors* (TLRs) a cui si può ricollegare la progressione del danno fibrotico [253].

Inoltre, ulteriori studi hanno osservato come la traslocazione batterica durante la NASH induca un incremento della steatosi epatica, dell'insulino-resistenza, dell'infiammazione e della fibrosi, favorendo così lo sviluppo e la progressione del danno epatico [256]. È stato recentemente dimostrato che le HDL sono in grado di ridurre l'infiammazione, agendo sui meccanismi coinvolti nello sviluppo e progressione del danno epatico cronico in corso di NASH [256], quali l'inibizione del *pathway* del *Toll-like receptor-4* (TRL-4) [254] e la neutralizzazione dei livelli di LPS circolanti [255]. Tali osservazioni offrono ulteriori spunti nella valutazione dei meccanismi alla base dell'effetto protettivo osservato nel nostro modello sperimentale. Tra le diverse ipotesi sollevate per la diminuita infiammazione epatica osservata in seguito all'attivazione intestinale di LXR $\alpha$  ci sono pertanto sia una diminuita traslocazione batterica intestinale ma soprattutto un già descritto aumento delle HDL circolanti.

Una nota a parte merita anche il ruolo di LXR nella *Trans-Intestinal Cholesterol Excretion* (TICE). Nell'ultimo decennio, molti studi hanno dimostrato come il RCT possa anche procedere attraverso una *pathway* non biliare, nota come TICE, la quale coinvolge la secrezione diretta di lipoproteine plasmatiche ricche in colesterolo direttamente nell'intestino tenue [37,43,246]. Sebbene i meccanismi che regolano la via classica biliare siano stati ben definiti, poche sono le informazioni sui meccanismi esistenti per la via non biliare della TICE [247]. Diversi lavori hanno evidenziato che l'attivazione di LXR incrementa la TICE in diversi modelli murini [42,247,248] e anche noi abbiamo dimostrato come due dei geni coinvolti nella TICE, quali ACAT-2 e MTTP, risultino over espressi nei

iVP16LXR $\alpha$ . Possiamo così ipotizzare che il lieve aumento di VLDL/LDL circolanti osservato fosse dovuto a questo meccanismo di riciclo del colesterolo, che viene successivamente riassorbito a livello intestinale da vari trasportatori e indirizzato nel lume intestinale per l'eliminazione fecale. Molteplici lavori volti alla scoperta dei meccanismi che coinvolgono la TICE hanno infatti evidenziato come per questa via non biliare sia fondamentale la presenza dei due trasportatori del colesterolo ABCG5 e ABCG8 [42,257] che nel nostro modello risultano overespressi. In ogni caso, anche questa strada necessita di ulteriori approfondimenti attraverso la caratterizzazione dei meccanismi coinvolti, ancora poco noti.

In conclusione, i risultati ottenuti nel presente studio spalancano le porte ad un possibile sviluppo di una terapia farmacologica basata su agonisti di LXR ad azione specifica intestinale per il trattamento della NASH, per la quale non esistono al momento terapie farmacologiche efficaci. Tuttavia, questo studio apre anche le porte a nuove ipotesi che dovranno poi essere ulteriormente approfondite, quali il coinvolgimento di LXR nella TICE e di come questa via possa giocare un ruolo chiave nella riduzione del danno epatico.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 2002;109(9):1125-31.
- [2] Sato R. Sterol metabolism and SREBP activation. *Arch Biochem Biophys* 2010;501(2):177-81.
- [3] Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, Brown MS. Protein sensors for membrane sterols. *Cell* 2006;124(1):35-46.
- [4] Radhakrishnan A, Ikeda Y, Kwon HJ *et al.* Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: oxysterols block transport by binding to Insig. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(16):6511-8.
- [5] Engelking LJ, Liang G, Hammer RE *et al.* Schoenheimer effect explained--feedback regulation of cholesterol synthesis in mice mediated by Insig proteins. *J Clin Invest* 2005;115(9):2489-98.
- [6] Heino S, Lusa S, Somerharju P *et al.* Dissecting the role of the golgi complex and lipid rafts in biosynthetic transport of cholesterol to the cell surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(15):8375-80.
- [7] Lusa S, Heino S, Ikonen E. Differential mobilization of newly synthesized cholesterol and biosynthetic sterol precursors from cells. *J Biol Chem* 2003;278(22):19844-51.
- [8] Glomset JA. The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res* 1968;9(2):155-67.
- [9] Groen AK, Oude Elferink RP, Verkade HJ *et al.* The ins and outs of reverse cholesterol transport. *Ann Med* 2004;36(2):135-45.
- [10] Maxfield FR, Mondal M. Sterol and lipid trafficking in mammalian cells. *Biochem Soc Trans* 2006;34(Pt 3):335-9.
- [11] Dyer DH, Lovell S, Thoden JB *et al.* The structural determination of an insect sterol carrier protein-2 with a ligand-bound C16 fatty acid at 1.35-Å resolution. *J Biol Chem* 2003;278(40):39085-91.
- [12] Hynynen R, Laitinen S, Kakela R *et al.* Overexpression of OSBP-related protein 2 (ORP2) induces changes in cellular cholesterol metabolism and enhances endocytosis. *Biochem J* 2005;390(Pt 1):273-83.

- [13] Smart EJ, Ying Y, Donzell WC *et al.* A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem* 1996;271(46):29427-35.
- [14] Garcia-Calvo M, Lisnock J, Bull HG *et al.* The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(23):8132-7.
- [15] Altmann SW, Davis HR, Jr., Zhu LJ *et al.* Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 2004;303(5661):1201-4.
- [16] Bietrix F, Yan D, Nauze M *et al.* Accelerated lipid absorption in mice overexpressing intestinal SR-BI. *J Biol Chem* 2006;281(11):7214-9.
- [17] Nauli AM, Nassir F, Zheng S *et al.* CD36 is important for chylomicron formation and secretion and may mediate cholesterol uptake in the proximal intestine. *Gastroenterology* 2006;131(4):1197-207.
- [18] Klein RL, Rudel LL. Cholesterol absorption and transport in thoracic duct lymph lipoproteins of nonhuman primates. Effect of dietary cholesterol level. *J Lipid Res* 1983;24(4):343-56.
- [19] Hussain MM, Iqbal J, Anwar K *et al.* Microsomal triglyceride transfer protein: a multifunctional protein. *Front Biosci* 2003;8:s500-s506.
- [20] Stillemark-Billton P, Beck C, Boren J *et al.* Relation of the size and intracellular sorting of apoB to the formation of VLDL 1 and VLDL 2. *J Lipid Res* 2005;46(1):104-14.
- [21] Jakobsson T, Treuter E, Gustafsson JA *et al.* Liver X receptor biology and pharmacology: new pathways, challenges and opportunities. *Trends Pharmacol Sci* 2012;33(7):394-404.
- [22] Lawn RM, Wade DP, Garvin MR *et al.* The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J Clin Invest* 1999;104(8):R25-R31.
- [23] Timmins JM, Lee JY, Boudyguina E *et al.* Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I. *J Clin Invest* 2005;115(5):1333-42.
- [24] Vedhachalam C, Duong PT, Nickel M *et al.* Mechanism of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular lipid efflux to apolipoprotein A-I and formation of high density lipoprotein particles. *J Biol Chem* 2007;282(34):25123-30.
- [25] Calabresi L, Favari E, Moleri E *et al.* Functional LCAT is not required for macrophage cholesterol efflux to human serum. *Atherosclerosis* 2009;204(1):141-6.
- [26] Barter PJ, Hopkins GJ, Calvert GD. Pathways for the incorporation of esterified cholesterol into very low density and low density lipoproteins in plasma incubated in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1982;713(1):136-48.

- [27] Jiang X, Francone OL, Bruce C *et al.* Increased prebeta-high density lipoprotein, apolipoprotein AI, and phospholipid in mice expressing the human phospholipid transfer protein and human apolipoprotein AI transgenes. *J Clin Invest* 1996;98(10):2373-80.
- [28] Eckel RH. Lipoprotein lipase. A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *N Engl J Med* 1989;320(16):1060-8.
- [29] Tietge UJ, Maugeais C, Lund-Katz S *et al.* Human secretory phospholipase A2 mediates decreased plasma levels of HDL cholesterol and apoA-I in response to inflammation in human apoA-I transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22(7):1213-8.
- [30] Rigotti A, Trigatti BL, Penman M *et al.* A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(23):12610-5.
- [31] Ueda Y, Royer L, Gong E *et al.* Lower plasma levels and accelerated clearance of high density lipoprotein (HDL) and non-HDL cholesterol in scavenger receptor class B type I transgenic mice. *J Biol Chem* 1999;274(11):7165-71.
- [32] Hammad SM, Barth JL, Knaak C *et al.* Megalin acts in concert with cubilin to mediate endocytosis of high density lipoproteins. *J Biol Chem* 2000;275(16):12003-8.
- [33] Garcia A, Barbaras R, Collet X *et al.* High-density lipoprotein 3 receptor-dependent endocytosis pathway in a human hepatoma cell line (HepG2). *Biochemistry* 1996;35(40):13064-71.
- [34] Mardones P, Quinones V, Amigo L *et al.* Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice. *J Lipid Res* 2001;42(2):170-80.
- [35] Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J *et al.* Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(25):16237-42.
- [36] Yu L, Li-Hawkins J, Hammer RE *et al.* Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J Clin Invest* 2002;110(5):671-80.
- [37] Temel RE, Brown JM. A new model of reverse cholesterol transport: enTICEing strategies to stimulate intestinal cholesterol excretion. *Trends Pharmacol Sci* 2015;36(7):440-51.
- [38] Schwarz M, Russell DW, Dietschy JM *et al.* Marked reduction in bile acid synthesis in cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase-deficient mice does not lead to diminished tissue cholesterol turnover or to hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 1998;39(9):1833-43.

- [39] Jolley CD, Woollett LA, Turley SD *et al.* Centripetal cholesterol flux to the liver is dictated by events in the peripheral organs and not by the plasma high density lipoprotein or apolipoprotein A-I concentration. *J Lipid Res* 1998;39(11):2143-9.
- [40] Kruit JK, Plosch T, Havinga R *et al.* Increased fecal neutral sterol loss upon liver X receptor activation is independent of biliary sterol secretion in mice. *Gastroenterology* 2005;128(1):147-56.
- [41] van der Velde AE, Vrans CL, van den Oever K *et al.* Direct intestinal cholesterol secretion contributes significantly to total fecal neutral sterol excretion in mice. *Gastroenterology* 2007;133(3):967-75.
- [42] van der Veen JN, van Dijk TH, Vrans CL *et al.* Activation of the liver X receptor stimulates trans-intestinal excretion of plasma cholesterol. *J Biol Chem* 2009;284(29):19211-9.
- [43] Temel RE, Sawyer JK, Yu L *et al.* Biliary sterol secretion is not required for macrophage reverse cholesterol transport. *Cell Metab* 2010;12(1):96-102.
- [44] Temel RE, Brown JM. A new framework for reverse cholesterol transport: non-biliary contributions to reverse cholesterol transport. *World J Gastroenterol* 2010;16(47):5946-52.
- [45] Oram JF, Vaughan AM. ATP-Binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease. *Circ Res* 2006;99(10):1031-43.
- [46] Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM *et al.* Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet* 1999;22(4):336-45.
- [47] Rust S, Rosier M, Funke H *et al.* Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet* 1999;22(4):352-5.
- [48] Oram JF, Vaughan AM. ABCA1-mediated transport of cellular cholesterol and phospholipids to HDL apolipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 2000;11(3):253-60.
- [49] Venkateswaran A, Laffitte BA, Joseph SB *et al.* Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(22):12097-102.
- [50] Oram JF, Lawn RM, Garvin MR *et al.* ABCA1 is the cAMP-inducible apolipoprotein receptor that mediates cholesterol secretion from macrophages. *J Biol Chem* 2000;275(44):34508-11.
- [51] See RH, Caday-Malcolm RA, Singaraja RR *et al.* Protein kinase A site-specific phosphorylation regulates ATP-binding cassette A1 (ABCA1)-mediated phospholipid efflux. *J Biol Chem* 2002;277(44):41835-42.
- [52] Wang Y, Oram JF. Unsaturated fatty acids inhibit cholesterol efflux from macrophages by increasing degradation of ATP-binding cassette transporter A1. *J Biol Chem* 2002;277(7):5692-7.



- [53] Najafi-Shoushtari SH, Kristo F, Li Y *et al.* MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. *Science* 2010;328(5985):1566-9.
- [54] Timmins JM, Lee JY, Boudyguina E *et al.* Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I. *J Clin Invest* 2005;115(5):1333-42.
- [55] Joyce CW, Amar MJ, Lambert G *et al.* The ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) modulates the development of aortic atherosclerosis in C57BL/6 and apoE-knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(1):407-12.
- [56] Brunham LR, Singaraja RR, Duong M *et al.* Tissue-specific roles of ABCA1 influence susceptibility to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29(4):548-54.
- [57] Joyce CW, Wagner EM, Basso F *et al.* ABCA1 overexpression in the liver of LDLr-KO mice leads to accumulation of pro-atherogenic lipoproteins and enhanced atherosclerosis. *J Biol Chem* 2006;281(44):33053-65.
- [58] Brunham LR, Kruit JK, Iqbal J *et al.* Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J Clin Invest* 2006;116(4):1052-62.
- [59] McNeish J, Aiello RJ, Guyot D *et al.* High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(8):4245-50.
- [60] Kennedy MA, Barrera GC, Nakamura K *et al.* ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab* 2005;1(2):121-31.
- [61] Gelissen IC, Harris M, Rye KA *et al.* ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(3):534-40.
- [62] Baldan A, Tarr P, Lee R *et al.* ATP-binding cassette transporter G1 and lipid homeostasis. *Curr Opin Lipidol* 2006;17(3):227-32.
- [63] Out R, Hoekstra M, Hildebrand RB *et al.* Macrophage ABCG1 deletion disrupts lipid homeostasis in alveolar macrophages and moderately influences atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(10):2295-300.
- [64] Ranalletta M, Wang N, Han S *et al.* Decreased atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice transplanted with Abcg1<sup>-/-</sup> bone marrow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(10):2308-15.
- [65] Baldan A, Pei L, Lee R *et al.* Impaired development of atherosclerosis in hyperlipidemic Ldlr<sup>-/-</sup> and ApoE<sup>-/-</sup> mice transplanted with Abcg1<sup>-/-</sup> bone marrow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(10):2301-7.
- [66] Wojcik AJ, Skafien MD, Srinivasan S *et al.* A critical role for ABCG1 in macrophage inflammation and lung homeostasis. *J Immunol* 2008;180(6):4273-82.

- [67] Bensinger SJ, Bradley MN, Joseph SB *et al.* LXR signaling couples sterol metabolism to proliferation in the acquired immune response. *Cell* 2008;134(1):97-111.
- [68] Graf GA, Yu L, Li WP *et al.* ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion. *J Biol Chem* 2003;278(48):48275-82.
- [69] Mangelsdorf DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 1995;83(6):841-50.
- [70] Sonoda J, Pei L, Evans RM. Nuclear receptors: decoding metabolic disease. *FEBS Lett* 2008;582(1):2-9.
- [71] Mangelsdorf DJ, Ong ES, Dyck JA *et al.* Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 1990;345(6272):224-9.
- [72] Heyman RA, Mangelsdorf DJ, Dyck JA *et al.* 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 1992;68(2):397-406.
- [73] Lanz RB, McKenna NJ, Onate SA *et al.* A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex. *Cell* 1999;97(1):17-27.
- [74] Bourguet W, Ruff M, Chambon P *et al.* Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha. *Nature* 1995;375(6530):377-82.
- [75] Pratt WB. The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 1993;268(29):21455-8.
- [76] Nagy L, Kao HY, Chakravarti D *et al.* Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* 1997;89(3):373-80.
- [77] Darimont BD, Wagner RL, Apriletti JW *et al.* Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes Dev* 1998;12(21):3343-56.
- [78] Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S *et al.* A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 1997;387(6634):733-6.
- [79] Willy PJ, Mangelsdorf DJ. Unique requirements for retinoid-dependent transcriptional activation by the orphan receptor LXR. *Genes Dev* 1997;11(3):289-98.
- [80] Joseph SB, Tontonoz P. LXRs: new therapeutic targets in atherosclerosis? *Curr Opin Pharmacol* 2003;3(2):192-7.
- [81] Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA *et al.* Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med* 2003;9(2):213-9.
- [82] Baranowski M. Biological role of liver X receptors. *J Physiol Pharmacol* 2008;59 Suppl 7:31-55.

- [83] Hong C, Tontonoz P. Liver X receptors in lipid metabolism: opportunities for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2014;13(6):433-44.
- [84] Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA *et al.* Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 2000;289(5484):1524-9.
- [85] Repa JJ, Berge KE, Pomajzl C *et al.* Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem* 2002;277(21):18793-800.
- [86] Duval C, Touche V, Tailleux A *et al.* Niemann-Pick C1 like 1 gene expression is down-regulated by LXR activators in the intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;340(4):1259-63.
- [87] Yu XH, Qian K, Jiang N *et al.* ABCG5/ABCG8 in cholesterol excretion and atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 2014;428:82-8.
- [88] Zelcer N, Hong C, Boyadjian R *et al.* LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science* 2009;325(5936):100-4.
- [89] Peet DJ, Turley SD, Ma W *et al.* Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 1998;93(5):693-704.
- [90] Repa JJ, Liang G, Ou J *et al.* Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev* 2000;14(22):2819-30.
- [91] Joseph SB, Laffitte BA, Patel PH *et al.* Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J Biol Chem* 2002;277(13):11019-25.
- [92] Wang Y, Kurdi-Haidar B, Oram JF. LXR-mediated activation of macrophage stearyl-CoA desaturase generates unsaturated fatty acids that destabilize ABCA1. *J Lipid Res* 2004;45(5):972-80.
- [93] Talukdar S, Hillgartner FB. The mechanism mediating the activation of acetyl-coenzyme A carboxylase-alpha gene transcription by the liver X receptor agonist T0-901317. *J Lipid Res* 2006;47(11):2451-61.
- [94] Laffitte BA, Chao LC, Li J *et al.* Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(9):5419-24.
- [95] Dalen KT, Ulven SM, Bamberg K *et al.* Expression of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 in adipocytes is dependent on liver X receptor alpha. *J Biol Chem* 2003;278(48):48283-91.

- [96] Joseph SB, Bradley MN, Castrillo A *et al.* LXR-dependent gene expression is important for macrophage survival and the innate immune response. *Cell* 2004;119(2):299-309.
- [97] Lo Sasso G, Celli N, Caboni M *et al.* Down-regulation of the LXR transcriptome provides the requisite cholesterol levels to proliferating hepatocytes. *Hepatology* 2010;51(4):1334-44.
- [98] Lo Sasso G, Bovenga F, Murzilli S *et al.* Liver X receptors inhibit proliferation of human colorectal cancer cells and growth of intestinal tumors in mice. *Gastroenterology* 2013;144(7):1497-507, 1507.
- [99] Chen M, Beaven S, Tontonoz P. Identification and characterization of two alternatively spliced transcript variants of human liver X receptor alpha. *J Lipid Res* 2005;46(12):2570-9.
- [100] Alberti S, Steffensen KR, Gustafsson JA. Structural characterisation of the mouse nuclear oxysterol receptor genes LXRalpha and LXRbeta. *Gene* 2000;243(1-2):93-103.
- [101] Hashimoto K, Ishida E, Matsumoto S *et al.* A liver X receptor (LXR)-beta alternative splicing variant (LXRBSV) acts as an RNA co-activator of LXR-beta. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;390(4):1260-5.
- [102] Apfel R, Benbrook D, Lernhardt E *et al.* A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily. *Mol Cell Biol* 1994;14(10):7025-35.
- [103] Hashimoto K, Ishida E, Miura A *et al.* A liver X receptor (LXR)-beta alternative splicing variant (LXRBSV) is preferentially expressed in the pituitary. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;394(3):548-52.
- [104] Laffitte BA, Joseph SB, Walczak R *et al.* Autoregulation of the human liver X receptor alpha promoter. *Mol Cell Biol* 2001;21(22):7558-68.
- [105] Li Y, Bolten C, Bhat BG *et al.* Induction of human liver X receptor alpha gene expression via an autoregulatory loop mechanism. *Mol Endocrinol* 2002;16(3):506-14.
- [106] Ulven SM, Dalen KT, Gustafsson JA *et al.* Tissue-specific autoregulation of the LXRalpha gene facilitates induction of apoE in mouse adipose tissue. *J Lipid Res* 2004;45(11):2052-62.
- [107] Tobin KA, Steiniger HH, Alberti S *et al.* Cross-talk between fatty acid and cholesterol metabolism mediated by liver X receptor-alpha. *Mol Endocrinol* 2000;14(5):741-52.
- [108] Chinetti G, Lestavel S, Bocher V *et al.* PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med* 2001;7(1):53-8.

- [109] Tobin KA, Ulven SM, Schuster GU *et al.* Liver X receptors as insulin-mediating factors in fatty acid and cholesterol biosynthesis. *J Biol Chem* 2002;277(12):10691-7.
- [110] Chen M, Bradley MN, Beaven SW *et al.* Phosphorylation of the liver X receptors. *FEBS Lett* 2006;580(20):4835-41.
- [111] Yamamoto T, Shimano H, Inoue N *et al.* Protein kinase A suppresses sterol regulatory element-binding protein-1C expression via phosphorylation of liver X receptor in the liver. *J Biol Chem* 2007;282(16):11687-95.
- [112] Foretz M, Guichard C, Ferre P *et al.* Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(22):12737-42.
- [113] Anthonisen EH, Berven L, Holm S *et al.* Nuclear receptor liver X receptor is O-GlcNAc-modified in response to glucose. *J Biol Chem* 2010;285(3):1607-15.
- [114] Li X, Zhang S, Blander G *et al.* SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. *Mol Cell* 2007;28(1):91-106.
- [115] Janowski BA, Willy PJ, Devi TR *et al.* An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 1996;383(6602):728-31.
- [116] Schultz JR, Tu H, Luk A *et al.* Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev* 2000;14(22):2831-8.
- [117] Collins JL, Fivush AM, Watson MA *et al.* Identification of a nonsteroidal liver X receptor agonist through parallel array synthesis of tertiary amines. *J Med Chem* 2002;45(10):1963-6.
- [118] Shenoy SD, Spencer TA, Mercer-Haines NA *et al.* CYP3A induction by liver x receptor ligands in primary cultured rat and mouse hepatocytes is mediated by the pregnane X receptor. *Drug Metab Dispos* 2004;32(1):66-71.
- [119] Houck KA, Borchert KM, Hepler CD *et al.* T0901317 is a dual LXR/FXR agonist. *Mol Genet Metab* 2004;83(1-2):184-7.
- [120] Naik PP, Ghadge MS, Raste AS. Lipid profile in leukemia and Hodgkin's disease. *Indian J Clin Biochem* 2006;21(2):100-2.
- [121] Kratzer A, Buchebner M, Pfeifer T *et al.* Synthetic LXR agonist attenuates plaque formation in apoE<sup>-/-</sup> mice without inducing liver steatosis and hypertriglyceridemia. *J Lipid Res* 2009;50(2):312-26.
- [122] Yasuda T, Grillot D, Billheimer JT *et al.* Tissue-specific liver X receptor activation promotes macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30(4):781-6.
- [123] Hu B, Bernotas R, Unwalla R *et al.* Quinoline-3-carboxamide containing sulfones as liver X receptor (LXR) agonists with binding selectivity for LXRbeta and low blood-brain penetration. *Bioorg Med Chem Lett* 2010;20(2):689-93.

- [124] Hu B, Unwalla RJ, Goljer I *et al.* Identification of phenylsulfone-substituted quinoxaline (WYE-672) as a tissue selective liver X-receptor (LXR) agonist. *J Med Chem* 2010;53(8):3296-304.
- [125] Bramlett KS, Houck KA, Borchert KM *et al.* A natural product ligand of the oxysterol receptor, liver X receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;307(1):291-6.
- [126] Tamehiro N, Sato Y, Suzuki T *et al.* Riccardin C: a natural product that functions as a liver X receptor (LXR)alpha agonist and an LXRbeta antagonist. *FEBS Lett* 2005;579(24):5299-304.
- [127] Huang TH, Razmovski-Naumovski V, Salam NK *et al.* A novel LXR-alpha activator identified from the natural product *Gynostemma pentaphyllum*. *Biochem Pharmacol* 2005;70(9):1298-308.
- [128] Kaneko E, Matsuda M, Yamada Y *et al.* Induction of intestinal ATP-binding cassette transporters by a phytosterol-derived liver X receptor agonist. *J Biol Chem* 2003;278(38):36091-8.
- [129] Gan X, Kaplan R, Menke JG *et al.* Dual mechanisms of ABCA1 regulation by geranylgeranyl pyrophosphate. *J Biol Chem* 2001;276(52):48702-8.
- [130] Hannah VC, Ou J, Luong A *et al.* Unsaturated fatty acids down-regulate srebp isoforms 1a and 1c by two mechanisms in HEK-293 cells. *J Biol Chem* 2001;276(6):4365-72.
- [131] Mater MK, Thelen AP, Pan DA *et al.* Sterol response element-binding protein 1c (SREBP1c) is involved in the polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic S14 gene transcription. *J Biol Chem* 1999;274(46):32725-32.
- [132] Xu J, Teran-Garcia M, Park JH *et al.* Polyunsaturated fatty acids suppress hepatic sterol regulatory element-binding protein-1 expression by accelerating transcript decay. *J Biol Chem* 2001;276(13):9800-7.
- [133] Yoshikawa T, Shimano H, Yahagi N *et al.* Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements. *J Biol Chem* 2002;277(3):1705-11.
- [134] Ou J, Tu H, Shan B *et al.* Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(11):6027-32.
- [135] Song C, Hiipakka RA, Liao S. Auto-oxidized cholesterol sulfates are antagonistic ligands of liver X receptors: implications for the development and treatment of atherosclerosis. *Steroids* 2001;66(6):473-9.
- [136] Tamasawa N, Tamasawa A, Takebe K. Higher levels of plasma cholesterol sulfate in patients with liver cirrhosis and hypercholesterolemia. *Lipids* 1993;28(9):833-6.

- [137] Calkin AC, Tontonoz P. Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13(4):213-24.
- [138] Verreault M, Senekeo-Effenberger K, Trottier J *et al.* The liver X-receptor alpha controls hepatic expression of the human bile acid-glucuronidating UGT1A3 enzyme in human cells and transgenic mice. *Hepatology* 2006;44(2):368-78.
- [139] Alberti S, Schuster G, Parini P *et al.* Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXRbeta-deficient mice. *J Clin Invest* 2001;107(5):565-73.
- [140] Berge KE, Tian H, Graf GA *et al.* Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* 2000;290(5497):1771-5.
- [141] Lee MH, Lu K, Hazard S *et al.* Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nat Genet* 2001;27(1):79-83.
- [142] Zhang Y, Repa JJ, Gauthier K *et al.* Regulation of lipoprotein lipase by the oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *J Biol Chem* 2001;276(46):43018-24.
- [143] Collet X, Tall AR, Serajuddin H *et al.* Remodeling of HDL by CETP in vivo and by CETP and hepatic lipase in vitro results in enhanced uptake of HDL CE by cells expressing scavenger receptor B-I. *J Lipid Res* 1999;40(7):1185-93.
- [144] Jaari S, van Dijk KW, Olkkonen VM *et al.* Dynamic changes in mouse lipoproteins induced by transiently expressed human phospholipid transfer protein (PLTP): importance of PLTP in prebeta-HDL generation. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2001;128(4):781-92.
- [145] Petruzzelli M, Groen AK, van Erpecum KJ *et al.* Micellar lipid composition profoundly affects LXR-dependent cholesterol transport across CaCo2 cells. *FEBS Lett* 2009;583(8):1274-80.
- [146] Lo SG, Murzilli S, Salvatore L *et al.* Intestinal specific LXR activation stimulates reverse cholesterol transport and protects from atherosclerosis. *Cell Metab* 2010;12(2):187-93.
- [147] Tangirala RK, Bischoff ED, Joseph SB *et al.* Identification of macrophage liver X receptors as inhibitors of atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(18):11896-901.
- [148] Sabol SL, Brewer HB, Jr., Santamarina-Fojo S. The human ABCG1 gene: identification of LXR response elements that modulate expression in macrophages and liver. *J Lipid Res* 2005;46(10):2151-67.
- [149] Hummasti S, Laffitte BA, Watson MA *et al.* Liver X receptors are regulators of adipocyte gene expression but not differentiation: identification of apoD as a direct target. *J Lipid Res* 2004;45(4):616-25.

- [150] Laffitte BA, Repa JJ, Joseph SB *et al.* LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(2):507-12.
- [151] Jakel H, Nowak M, Moitrot E *et al.* The liver X receptor ligand T0901317 down-regulates APOA5 gene expression through activation of SREBP-1c. *J Biol Chem* 2004;279(44):45462-9.
- [152] Mak PA, Kast-Woelbern HR, Anisfeld AM *et al.* Identification of PLTP as an LXR target gene and apoE as an FXR target gene reveals overlapping targets for the two nuclear receptors. *J Lipid Res* 2002;43(12):2037-41.
- [153] Plump AS, Smith JD, Hayek T *et al.* Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 1992;71(2):343-53.
- [154] Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA *et al.* Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 1992;258(5081):468-71.
- [155] Malerod L, Juvet LK, Hanssen-Bauer A *et al.* Oxysterol-activated LXRalpha/RXR induces hSR-BI-promoter activity in hepatoma cells and preadipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;299(5):916-23.
- [156] Levin N, Bischoff ED, Daige CL *et al.* Macrophage liver X receptor is required for antiatherogenic activity of LXR agonists. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(1):135-42.
- [157] Stienstra R, van Diepen JA, Tack CJ *et al.* Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(37):15324-9.
- [158] Ronda N, Favari E, Borghi MO *et al.* Impaired serum cholesterol efflux capacity in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2014;73(3):609-15.
- [159] Zhu X, Owen JS, Wilson MD *et al.* Macrophage ABCA1 reduces MyD88-dependent Toll-like receptor trafficking to lipid rafts by reduction of lipid raft cholesterol. *J Lipid Res* 2010;51(11):3196-206.
- [160] Duewell P, Kono H, Rayner KJ *et al.* NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 2010;464(7293):1357-61.
- [161] Castrillo A, Joseph SB, Vaidya SA *et al.* Crosstalk between LXR and toll-like receptor signaling mediates bacterial and viral antagonism of cholesterol metabolism. *Mol Cell* 2003;12(4):805-16.
- [162] Feingold KR, Grunfeld C. The acute phase response inhibits reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* 2010;51(4):682-4.
- [163] Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 2001;104(4):503-16.



- [164] Ghisletti S, Huang W, Jepsen K *et al.* Cooperative NCoR/SMRT interactions establish a corepressor-based strategy for integration of inflammatory and anti-inflammatory signaling pathways. *Genes Dev* 2009;23(6):681-93.
- [165] Yoshikawa T, Shimano H, Amemiya-Kudo M *et al.* Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter. *Mol Cell Biol* 2001;21(9):2991-3000.
- [166] Grefhorst A, Elzinga BM, Voshol PJ *et al.* Stimulation of lipogenesis by pharmacological activation of the liver X receptor leads to production of large, triglyceride-rich very low density lipoprotein particles. *J Biol Chem* 2002;277(37):34182-90.
- [167] Kaplan R, Zhang T, Hernandez M *et al.* Regulation of the angiopoietin-like protein 3 gene by LXR. *J Lipid Res* 2003;44(1):136-43.
- [168] Cha JY, Repa JJ. The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J Biol Chem* 2007;282(1):743-51.
- [169] Kalaany NY, Gauthier KC, Zavacki AM *et al.* LXRs regulate the balance between fat storage and oxidation. *Cell Metab* 2005;1(4):231-44.
- [170] Stulnig TM, Oppermann U, Steffensen KR *et al.* Liver X receptors downregulate 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression and activity. *Diabetes* 2002;51(8):2426-33.
- [171] Grempler R, Gunther S, Steffensen KR *et al.* Evidence for an indirect transcriptional regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by liver X receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338(2):981-6.
- [172] Puigserver P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev* 2003;24(1):78-90.
- [173] Commerford SR, Vargas L, Dorfman SE *et al.* Dissection of the insulin-sensitizing effect of liver X receptor ligands. *Mol Endocrinol* 2007;21(12):3002-12.
- [174] Chakravarty K, Hanson RW. Insulin regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase-c gene transcription: the role of sterol regulatory element-binding protein 1c. *Nutr Rev* 2007;65(6 Pt 2):S47-S56.
- [175] Liu Y, Yan C, Wang Y *et al.* Liver X receptor agonist T0901317 inhibition of glucocorticoid receptor expression in hepatocytes may contribute to the amelioration of diabetic syndrome in db/db mice. *Endocrinology* 2006;147(11):5061-8.
- [176] Kase ET, Wensaas AJ, Aas V *et al.* Skeletal muscle lipid accumulation in type 2 diabetes may involve the liver X receptor pathway. *Diabetes* 2005;54(4):1108-15.

- [177] Zitzer H, Wente W, Brenner MB *et al.* Sterol regulatory element-binding protein 1 mediates liver X receptor-beta-induced increases in insulin secretion and insulin messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 2006;147(8):3898-905.
- [178] Efanov AM, Sewing S, Bokvist K *et al.* Liver X receptor activation stimulates insulin secretion via modulation of glucose and lipid metabolism in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 2004;53 Suppl 3:S75-S78.
- [179] Gerin I, Dolinsky VW, Shackman JG *et al.* LXRBeta is required for adipocyte growth, glucose homeostasis, and beta cell function. *J Biol Chem* 2005;280(24):23024-31.
- [180] Choe SS, Choi AH, Lee JW *et al.* Chronic activation of liver X receptor induces beta-cell apoptosis through hyperactivation of lipogenesis: liver X receptor-mediated lipotoxicity in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 2007;56(6):1534-43.
- [181] Serfaty L, Lemoine M. Definition and natural history of metabolic steatosis: clinical aspects of NAFLD, NASH and cirrhosis. *Diabetes Metab* 2008;34(6 Pt 2):634-7.
- [182] Petta S, Muratore C, Craxi A. Non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis: the present and the future. *Dig Liver Dis* 2009;41(9):615-25.
- [183] Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* 2011;332(6037):1519-23.
- [184] Vuppalanchi R, Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: Selected practical issues in their evaluation and management. *Hepatology* 2009;49(1):306-17.
- [185] Sookoian S, Pirola CJ. Non-alcoholic fatty liver disease is strongly associated with carotid atherosclerosis: a systematic review. *J Hepatol* 2008;49(4):600-7.
- [186] Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998;114(4):842-5.
- [187] Leclercq IA, Farrell GC, Field J *et al.* CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest* 2000;105(8):1067-75.
- [188] Uchida K, Shiraishi M, Naito Y *et al.* Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production. *J Biol Chem* 1999;274(4):2234-42.
- [189] Svegliati-Baroni G, Saccomanno S, van GH *et al.* Involvement of reactive oxygen species and nitric oxide radicals in activation and proliferation of rat hepatic stellate cells. *Liver* 2001;21(1):1-12.
- [190] Svegliati-Baroni G., D'Ambrosio L, Ferretti G *et al.* Fibrogenic effect of oxidative stress on rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1998;27(3):720-6.

- [191] Feldstein AE, Canbay A, Angulo P *et al.* Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2003;125(2):437-43.
- [192] Musso G, Gambino R, Biroli G *et al.* Hypoadiponectinemia predicts the severity of hepatic fibrosis and pancreatic Beta-cell dysfunction in nondiabetic nonobese patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2005;100(11):2438-46.
- [193] Hui JM, Hodge A, Farrell GC *et al.* Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? *Hepatology* 2004;40(1):46-54.
- [194] Hirosumi J, Tuncman G, Chang L *et al.* A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 2002;420(6913):333-6.
- [195] Cai D, Yuan M, Frantz DF *et al.* Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* 2005;11(2):183-90.
- [196] Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005;115(2):209-18.
- [197] Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP *et al.* Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat Rev Immunol* 2014;14(3):181-94.
- [198] Casini A, Ceni E, Salzano R *et al.* Neutrophil-derived superoxide anion induces lipid peroxidation and stimulates collagen synthesis in human hepatic stellate cells: role of nitric oxide. *Hepatology* 1997;25(2):361-7.
- [199] Vinas O, Bataller R, Sancho-Bru P *et al.* Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation. *Hepatology* 2003;38(4):919-29.
- [200] Bataller R, Schwabe RF, Choi YH *et al.* NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest* 2003;112(9):1383-94.
- [201] Nieto N, Friedman SL, Cederbaum AI. Cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species mediate paracrine stimulation of collagen I protein synthesis by hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2002;277(12):9853-64.
- [202] Li G, Scull C, Ozcan L *et al.* NADPH oxidase links endoplasmic reticulum stress, oxidative stress, and PKR activation to induce apoptosis. *J Cell Biol* 2010;191(6):1113-25.
- [203] Takehara T, Tatsumi T, Suzuki T *et al.* Hepatocyte-specific disruption of Bcl-xL leads to continuous hepatocyte apoptosis and liver fibrotic responses. *Gastroenterology* 2004;127(4):1189-97.
- [204] Canbay A, Higuchi H, Bronk SF *et al.* Fas enhances fibrogenesis in the bile duct ligated mouse: a link between apoptosis and fibrosis. *Gastroenterology* 2002;123(4):1323-30.

- [205] Safadi R, Ohta M, Alvarez CE *et al.* Immune stimulation of hepatic fibrogenesis by CD8 cells and attenuation by transgenic interleukin-10 from hepatocytes. *Gastroenterology* 2004;127(3):870-82.
- [206] Kamada Y, Tamura S, Kiso S *et al.* Enhanced carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice lacking adiponectin. *Gastroenterology* 2003;125(6):1796-807.
- [207] Ueberham E, Low R, Ueberham U *et al.* Conditional tetracycline-regulated expression of TGF-beta1 in liver of transgenic mice leads to reversible intermediary fibrosis. *Hepatology* 2003;37(5):1067-78.
- [208] Oben JA, Roskams T, Yang S *et al.* Hepatic fibrogenesis requires sympathetic neurotransmitters. *Gut* 2004;53(3):438-45.
- [209] Horowitz JC, Rogers DS, Sharma V *et al.* Combinatorial activation of FAK and AKT by transforming growth factor-beta1 confers an anoikis-resistant phenotype to myofibroblasts. *Cell Signal* 2007;19(4):761-71.
- [210] Bonner JC. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15(4):255-73.
- [211] Oakley F, Teoh V, Ching AS *et al.* Angiotensin II activates I kappaB kinase phosphorylation of RelA at Ser 536 to promote myofibroblast survival and liver fibrosis. *Gastroenterology* 2009;136(7):2334-44.
- [212] Jonsson JR, Clouston AD, Ando Y *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the progression of rat hepatic fibrosis. *Gastroenterology* 2001;121(1):148-55.
- [213] Bataller R, Sancho-Bru P, Gines P *et al.* Activated human hepatic stellate cells express the renin-angiotensin system and synthesize angiotensin II. *Gastroenterology* 2003;125(1):117-25.
- [214] Ikejima K, Takei Y, Honda H *et al.* Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat. *Gastroenterology* 2002;122(5):1399-410.
- [215] Seki E, Brenner DA. Recent advancement of molecular mechanisms of liver fibrosis. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2015;22(7):512-8.
- [216] Seki E, De MS, Osterreicher CH *et al.* TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med* 2007;13(11):1324-32.
- [217] Puche JE, Lee YA, Jiao J *et al.* A novel murine model to deplete hepatic stellate cells uncovers their role in amplifying liver damage in mice. *Hepatology* 2013;57(1):339-50.
- [218] Wells RG. The role of matrix stiffness in hepatic stellate cell activation and liver fibrosis. *J Clin Gastroenterol* 2005;39(4 Suppl 2):S158-S161.

- [219] Neef M, Ledermann M, Saegesser H *et al.* Oral imatinib treatment reduces early fibrogenesis but does not prevent progression in the long term. *J Hepatol* 2006;44(1):167-75.
- [220] Ogawa S, Ochi T, Shimada H *et al.* Anti-PDGF-B monoclonal antibody reduces liver fibrosis development. *Hepatol Res* 2010;40(11):1128-41.
- [221] Gonzalo T, Beljaars L, van de Bovenkamp M *et al.* Local inhibition of liver fibrosis by specific delivery of a platelet-derived growth factor kinase inhibitor to hepatic stellate cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;321(3):856-65.
- [222] Bansal R, Prakash J, Post E *et al.* Novel engineered targeted interferon-gamma blocks hepatic fibrogenesis in mice. *Hepatology* 2011;54(2):586-96.
- [223] Karlmark KR, Weiskirchen R, Zimmermann HW *et al.* Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1+ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. *Hepatology* 2009;50(1):261-74.
- [224] Baeck C, Wehr A, Karlmark KR *et al.* Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury. *Gut* 2012;61(3):416-26.
- [225] Barry-Hamilton V, Spangler R, Marshall D *et al.* Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment. *Nat Med* 2010;16(9):1009-17.
- [226] Patsenker E, Popov Y, Stickel F *et al.* Inhibition of integrin  $\alpha$ v $\beta$ 6 on cholangiocytes blocks transforming growth factor- $\beta$  activation and retards biliary fibrosis progression. *Gastroenterology* 2008;135(2):660-70.
- [227] Thabut D, Routray C, Lomberk G *et al.* Complementary vascular and matrix regulatory pathways underlie the beneficial mechanism of action of sorafenib in liver fibrosis. *Hepatology* 2011;54(2):573-85.
- [228] Tugues S, Fernandez-Varo G, Munoz-Luque J *et al.* Antiangiogenic treatment with sunitinib ameliorates inflammatory infiltrate, fibrosis, and portal pressure in cirrhotic rats. *Hepatology* 2007;46(6):1919-26.
- [229] De Minicis S, Rychlicki C, Agostinelli L *et al.* Semaphorin 7A contributes to TGF- $\beta$ -mediated liver fibrogenesis. *Am J Pathol* 2013;183(3):820-30.
- [230] Svegliati-Baroni G, D'Ambrosio L, Curto P *et al.* Interferon gamma decreases hepatic stellate cell activation and extracellular matrix deposition in rat liver fibrosis. *Hepatology* 1996;23(5):1189-99.
- [231] Lo Sasso G., Murzilli S, Salvatore L *et al.* Intestinal specific LXR activation stimulates reverse cholesterol transport and protects from atherosclerosis. *Cell Metab* 2010;12(2):187-93.
- [232] Marra F, Gastaldelli A, Svegliati BG *et al.* Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis. *Trends Mol Med* 2008;14(2):72-81.

- [233] Barter PJ, Nicholls S, Rye KA *et al.* Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res* 2004;95(8):764-72.
- [234] Norata GD, Pirillo A, Ammirati E *et al.* Emerging role of high density lipoproteins as a player in the immune system. *Atherosclerosis* 2012;220(1):11-21.
- [235] Norata GD, Catapano AL. Molecular mechanisms responsible for the antiinflammatory and protective effect of HDL on the endothelium. *Vasc Health Risk Manag* 2005;1(2):119-29.
- [236] Calabresi L, Gomaraschi M, Franceschini G. Endothelial protection by high-density lipoproteins: from bench to bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(10):1724-31.
- [237] Xia P, Vadas MA, Rye KA *et al.* High density lipoproteins (HDL) interrupt the sphingosine kinase signaling pathway. A possible mechanism for protection against atherosclerosis by HDL. *J Biol Chem* 1999;274(46):33143-7.
- [238] Barter PJ, Baker PW, Rye KA. Effect of high-density lipoproteins on the expression of adhesion molecules in endothelial cells. *Curr Opin Lipidol* 2002;13(3):285-8.
- [239] Okajima F, Sato K, Kimura T. Anti-atherogenic actions of high-density lipoprotein through sphingosine 1-phosphate receptors and scavenger receptor class B type I. *Endocr J* 2009;56(3):317-34.
- [240] Vaisar T, Pennathur S, Green PS *et al.* Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. *J Clin Invest* 2007;117(3):746-56.
- [241] Murphy AJ, Woollard KJ, Hoang A *et al.* High-density lipoprotein reduces the human monocyte inflammatory response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28(11):2071-7.
- [242] Yvan-Charvet L, Welch C, Pagler TA *et al.* Increased inflammatory gene expression in ABC transporter-deficient macrophages: free cholesterol accumulation, increased signaling via toll-like receptors, and neutrophil infiltration of atherosclerotic lesions. *Circulation* 2008;118(18):1837-47.
- [243] Sanson M, Distel E, Fisher EA. HDL induces the expression of the M2 macrophage markers arginase 1 and Fizz-1 in a STAT6-dependent process. *PLoS One* 2013;8(8):e74676.
- [244] Chavez-Galan L, Olleros ML, Vesin D *et al.* Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169(+) and TCR(+) Macrophages. *Front Immunol* 2015;6:263.
- [245] Ioannou GN, Van Rooyen DM, Savard C *et al.* Cholesterol-lowering drugs cause dissolution of cholesterol crystals and disperse Kupffer cell crown-like structures during resolution of NASH. *J Lipid Res* 2015;56(2):277-85.

- [246] Le May C., Berger JM, Lespine A *et al.* Transintestinal cholesterol excretion is an active metabolic process modulated by PCSK9 and statin involving ABCB1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33(7):1484-93.
- [247] Temel RE, Brown JM. Biliary and nonbiliary contributions to reverse cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol* 2012;23(2):85-90.
- [248] Kruit JK, Groen AK, Van Berkel TJ *et al.* Emerging roles of the intestine in control of cholesterol metabolism. *World J Gastroenterol* 2006;12(40):6429-39.
- [249] CHENG SH, STANLEY MM. Secretion of cholesterol by intestinal mucosa in patients with complete common bile duct obstruction. *Proc Soc Exp Biol Med* 1959;101(2):223-5.
- [250] Zhao C, Dahlman-Wright K. Liver X receptor in cholesterol metabolism. *J Endocrinol* 2010;204(3):233-40.
- [251] Lin CY, Gustafsson JA. Targeting liver X receptors in cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2015;15(4):216-24.
- [252] Takahashi Y, Soejima Y, Fukusato T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 2012;18(19):2300-8.
- [253] De MS, Day C, Svegliati-Baroni G. From NAFLD to NASH and HCC: pathogenetic mechanisms and therapeutic insights. *Curr Pharm Des* 2013;19(29):5239-49.
- [254] De ND, Labzin LI, Kono H *et al.* High-density lipoprotein mediates anti-inflammatory reprogramming of macrophages via the transcriptional regulator ATF3. *Nat Immunol* 2014;15(2):152-60.
- [255] Galbois A, Thabut D, Tazi KA *et al.* Ex vivo effects of high-density lipoprotein exposure on the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in patients with severe cirrhosis. *Hepatology* 2009;49(1):175-84.
- [256] Soares JB, Pimentel-Nunes P, Roncon-Albuquerque R *et al.* The role of lipopolysaccharide/toll-like receptor 4 signaling in chronic liver diseases. *Hepatol Int* 2010;4(4):659-72.
- [257] Yu L, York J, Von BK *et al.* Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8. *J Biol Chem* 2003;278(18):15565-70.