

SOMMARIO

INTRODUZIONE	2
ATP-BINDING CASSETTE: STRUTTURA, FUNZIONI E GENERALITÀ	3
Struttura generale delle ABC	3
Il trasporto lipidico attraverso le membrane biologiche	5
Classificazione e localizzazione dei trasportatori ABC.....	7
Substrati coinvolti nel meccanismo di trasporto ABC mediato	9
SOTTOFAMIGLIE DEI TRASPORTATORI ABC E PRINCIPALI MALATTIE ASSOCIATE A LORO MUTAZIONI	12
Sottofamiglia A dei trasportatori ABC	14
ABCA1	14
ABCA2	21
ABCA3	24
ABCA4	24
ABCA7	25
ABCA12	26
Sottofamiglia B dei trasportatori ABC	27
<i>ABCB1</i> /MDR1	27
<i>ABCB4</i> /MDR3 e <i>ABCB11</i> /BSEP	28
Sottofamiglia C dei trasportatori ABC	29
<i>ABCC2</i> /MRP2	30
Sottofamiglia D dei trasportatori ABC	30
ABCD1.....	30
Sottofamiglia G dei trasportatori ABC	31
ABCG1	31
ABCG2	33
ABCG4	34
ABCG5 e ABCG8.....	34
CONCLUSIONI	36
BIBLIOGRAFIA	37

INTRODUZIONE

I trasportatori *ATP-binding cassette* (ABC) sono una grande superfamiglia di proteine integrali di membrana, espresse in tutti gli organismi viventi, che utilizzano l'energia ricavata dall'idrolisi di ATP per consentire il passaggio attraverso le membrane cellulari e degli organelli citosolici, di una vasta gamma di substrati.

I geni *ABC* sono essenziali per molti processi biologici. Ad oggi sono stati caratterizzati e descritti ben 48 geni *ABC* umani. Mutazioni in 24 di questi geni sono associate a malattie umane e, almeno 12 di queste, sono dovute ad una abnorme alterazione dell'omeostasi lipidica cellulare.

Molte proteine ABC sono inoltre deputate all'estrusione dalle cellule di xenobiotici e metaboliti potenzialmente citotossici. Tale meccanismo risulta amplificato in pazienti sottoposti a trattamento chemioterapico antineoplastico, in quanto le cellule tumorali sono in grado di sovraesprimere questi trasportatori per incrementare l'eliminazione del farmaco, inducendo in tal modo resistenza farmacologica. Poiché tale fenomeno coinvolge diverse categorie terapeutiche, si può parlare di multifarmaco resistenza.

In questo lavoro verranno descritti i meccanismi coinvolti nel trasporto lipidico ABC mediato, la struttura e la localizzazione cellulare e/o subcellulare di queste proteine, nonché alcuni dei tanti disordini derivati da loro mutazioni.

ATP-BINDING CASSETTE: STRUTTURA, FUNZIONI E GENERALITÀ

Le proteine ABC sono dei trasportatori transmembrana che, sfruttando l'energia ricavata dall'idrolisi dell'ATP (*trasporto attivo primario*), mediano il passaggio attraverso il doppio strato lipidico della cellula di una vasta gamma di substrati, tra cui: ioni organici, lipidi, steroli, amminoacidi, peptidi, proteine, zuccheri, farmaci e metaboliti.

Fondamentalmente possono essere classificate come esportatori o importatori, a seconda che regolino il movimento di questi substrati rispettivamente dal citosol verso l'esterno della cellula o viceversa. Gli organismi eucarioti, tra cui anche l'uomo, possiedono solo gli esportatori e sono privi di importatori. I procarioti, invece, possiedono ambedue i tipi di trasportatori, e sono di conseguenza in grado di sfruttarli per regolare il movimento dei substrati in un verso o nell'altro.

Per quanto riguarda il movimento di substrati idrofobici, come i lipidi (colesterolo, fosfolipidi, sfingolipidi, ecc.), questo avviene generalmente dal foglietto interno della membrana a quello esterno o, come spesso accade, verso un accettore esogeno¹.

Struttura generale delle ABC

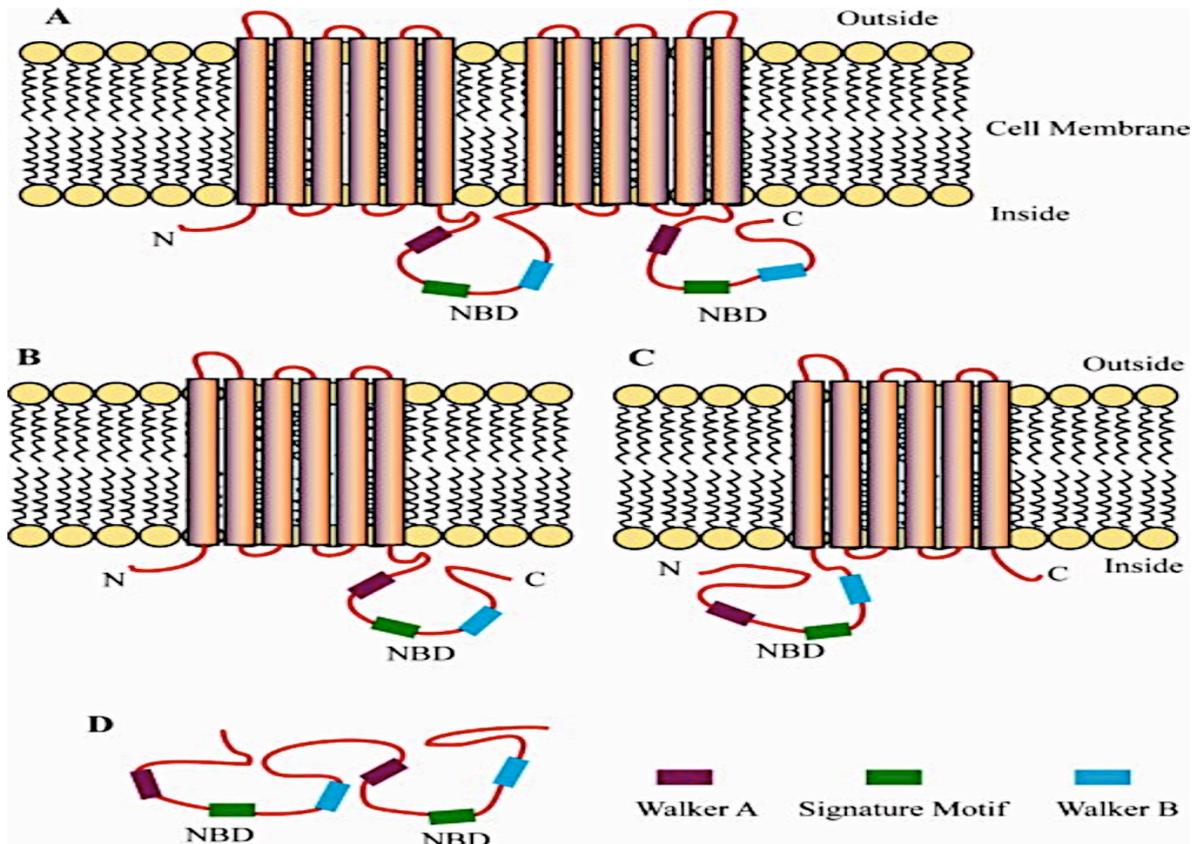
La maggior parte dei membri appartenenti alla superfamiglia dei trasportatori ABC condivide un'architettura molecolare comune, ossia:

- due domini transmembrana (TMD = *Transmembrane Domain* o MSD = *Membrane Spanning Domain*)
- due cassette leganti ATP (ABC), note anche come domini NBD (*Nucleotide Binding Domain*).

I due TMD sono costituiti da 6 α -eliche ciascuno, che, interagendo tra loro, formano un poro delimitato da 12 α -eliche, che funge da canale per il passaggio dei substrati. I TMD si ritengono pertanto responsabili della specificità di substrato veicolato da ciascun trasportatore e variano a seconda del tipo di trasportatore ABC.

I due domini citosolici leganti ATP (NBD) sono, invece, altamente conservati e forniscono l'energia necessaria al trasporto dei substrati attraverso la membrana, mediante idrolisi dell'ATP in ADP e fosfato inorganico. L'energia rilasciata dall'idrolisi dell'ATP permette

alle proteine di adottare una conformazione in grado di legare il substrato al lato citoplasmatico e di traslocarlo all'esterno della membrana a doppio strato. Per questo motivo le proteine ABC sono implicate nel trasporto attivo primario ed essendo in grado di idrolizzare ATP sono considerate delle vere e proprie ATPasi. Possono inoltre traslocare diversi substrati lipidici da un foglietto di membrana ad un altro.



IUBMB Life

Volume 65, Issue 6, pages 505-512, 23 AUG 2013 DOI: 10.1002/iub.1165

Ciascun NBD è costituito da circa 180 amminoacidi e comprende 3 domini altamente conservati: il *Walker A* (di 12 amminoacidi), il *Walker B* (di 5 amminoacidi) e il motivo firma o *C-loop*. Queste sequenze sono direttamente coinvolte nel legame e nell'idrolisi dei nucleotidi trifosfato¹. Inoltre, i domini NBD possono trovarsi all'estremità C-terminale o N-terminale.

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 ^{1,2}.

Il trasporto lipidico attraverso le membrane biologiche

I lipidi sono, per definizione, molecole idrofobiche, solubili in solventi organici e insolubili in acqua. Alcuni di essi possono diffondere passivamente attraverso la membrana plasmatica, secondo gradiente di concentrazione e molti possono addirittura abbandonare il doppio strato traslocando su specifici accettori in grado di veicolarli nell'ambiente idrofilo.

Nel sangue, nel citosol e nell'ambiente extracellulare, infatti, le molecole lipofile come gli steroli, gli esteri degli steroli, i fosfolipidi, i trigliceridi, le cere e le vitamine liposolubili, vengono veicolate da specifici trasportatori (ad esempio le proteine leganti gli acidi grassi o le apolipoproteine).

Il movimento lipidico spontaneo (*flip-flop*) attraverso le membrane non richiede dispendio di energia ed è strettamente correlato alla struttura del lipide, alla sua carica globale e all'ambiente circostante. Il flip-flop spontaneo bidirezionale dei fosfolipidi attraverso i foglietti di membrana è essenziale per lo sviluppo equilibrato sia della membrana delimitante la cellula, sia delle membrane dei compartimenti citosolici quali il Reticolo Endoplasmatico (RE) e l'apparato del Golgi ³. Al contrario, il flippaggio energia dipendente di specifici lipidi verso un foglietto di membrana piuttosto che un altro è responsabile del mantenimento dell'asimmetria di membrana.

La distribuzione asimmetrica del doppio strato lipidico nelle membrane cellulari è finemente regolata dall'attività di specifiche proteine di membrana. La sua importanza è legata a numerose funzioni cellulari, come eso/endocitosi di vescicole, processi di segnalazione cellulare, ⁴ e nella biogenesi della stessa ⁵. La curvatura della membrana è generata dal trasporto attivo flippasi-dipendente per traslocazione di lipidi da un foglietto all'altro ⁶. La perdita dell'asimmetria può determinare aggregazione piastrinica o il riconoscimento di PS da parte dei macrofagi ⁵.

I principali costituenti lipidici delle membrane cellulari eucariotiche sono: glicosfingolipidi e fosfatidilcolina (PC), localizzati prevalentemente nel foglietto esterno e

amminosfingolipidi, fosfatidilserina (PS) e fosfatidiletanolamina (PE) nel foglietto interno ⁴.

I meccanismi ipotizzati per il movimento dei lipidi attraverso le membrane biologiche sono quattro ^{7,8}:

1. diffusione passiva (*flip-flop*): i lipidi possono passare da un foglietto di membrana ad un altro senza l'ausilio di proteine o consumo di energia;
2. trasporto bidirezionale mediato da proteine di membrana che non richiede idrolisi di ATP;
3. traslocazione di specifici lipidi (ad esempio fosfolipidi) dal foglietto esterno a quello interno mediato dalle ATPasi di tipo P (o flippasi di tipo P);
4. traslocazione del colesterolo e dei fosfolipidi dal foglietto interno a quello esterno mediata dalle proteine ABC o flippasi.

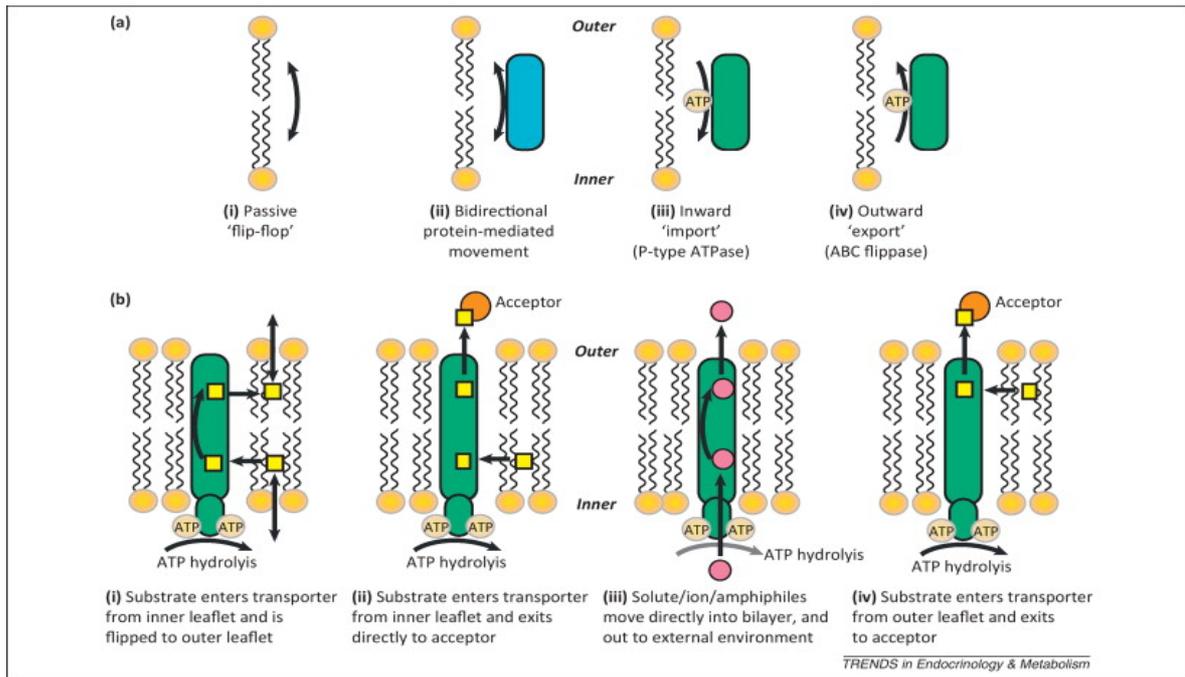
Questi ultimi 2 meccanismi regolano il trasporto unidirezionale dei lipidi ATP dipendente e quindi richiedono proteine di trasporto specializzate. A differenza delle flippasi di tipo P, che trasportano attivamente specifici lipidi secondo gradiente, i trasportatori ABC sono, invece, responsabili del movimento inverso (anche contro gradiente) degli stessi. Consentono dunque l'accumulo lipidico su un foglietto di membrana rispetto ad un altro, mantenendo così l'asimmetria lipidica della membrana stessa. Il lipide flippato può abbandonare la membrana traslocando su accettori dei lipidi presenti nell'ambiente extracellulare ¹.

Oltre che sulla membrana esterna, le proteine ABC sono distribuite anche a livello delle membrane degli organelli endocellulari.

Si suppone che, nel caso specifico dei trasportatori ABC, i meccanismi di riconoscimento e di trasporto dei substrati lipidici attraverso le membrane doppio-strato siano:

1. Il substrato viene flippato dal trasportatore dal foglietto interno a quello esterno, sempre mediante consumo di ATP. Una volta traslocato nel foglietto esterno, il lipide può eventualmente abbandonare la membrana.
2. Traslocazione ATP-dipendente di un substrato lipidico dal foglietto interno verso un accettore esogeno. I substrati lipidici, che devono essere veicolati nei liquidi extracellulari o nel sangue, essendo insolubili in ambiente acquoso (lipofili), necessitano di specifici trasportatori.

3. Le molecole anfipatiche, soluti e ioni, non potendo attraversare la membrana cellulare, vengono trasferiti direttamente, mediante le proteine ABC, dal citosol all'ambiente extracellulare.
4. Meccanismo simile al caso 2, ma in questa evenienza il substrato è trasferito dal foglietto esterno verso un accettore di lipidi esogeno.



Trends in Endocrinology and Metabolism, July 2013, Vol.24, No.7

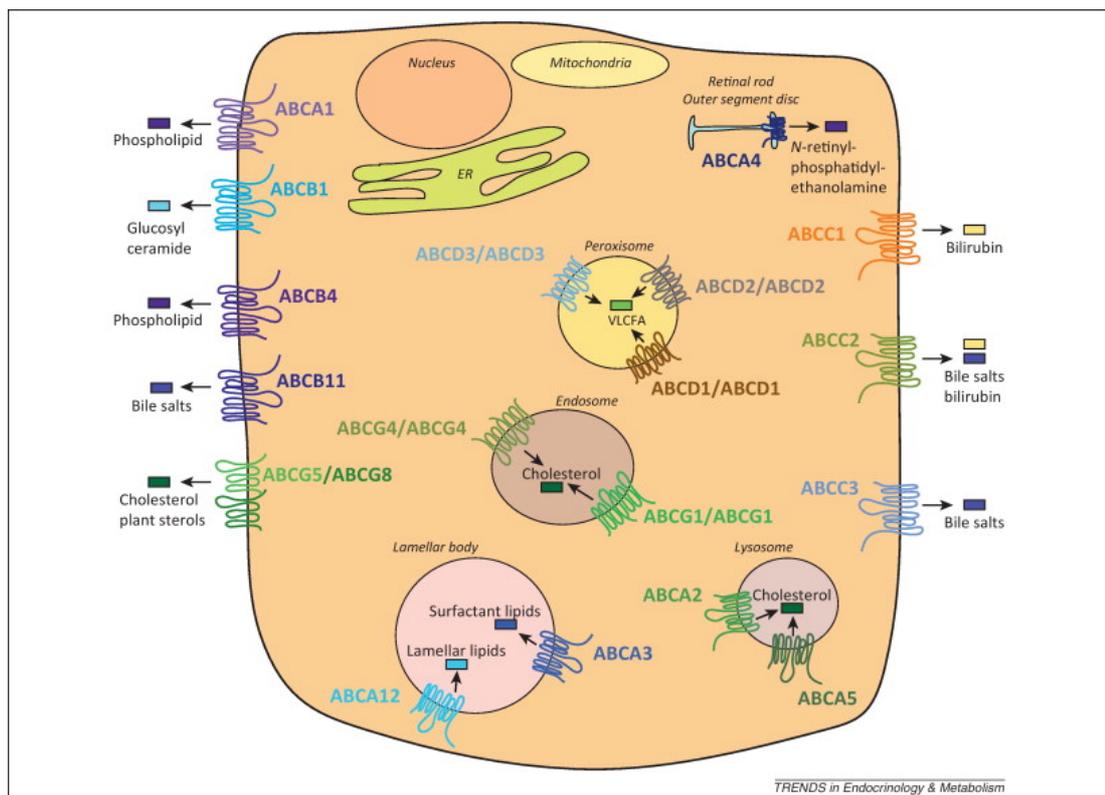
Classificazione e localizzazione dei trasportatori ABC

Sono stati individuati ben 48 geni umani codificanti per proteine ABC. Questi geni, e le proteine da essi codificate, sono stati raggruppati in 7 sottofamiglie, ciascuna designata con una lettera dell'alfabeto maiuscola (dalla A alla G). Inoltre, i membri di ciascuna sottofamiglia vengono identificati con un numero arabo (es. ABCA1, ABCC2, ABCG4,...). Nella nomenclatura comune, invece, queste 7 sottofamiglie di geni sono rispettivamente conosciute come ABC1, MDR/TAP, MRP, ALD, OABP, GCN20 e WHITE. Nei mammiferi, e quindi anche nell'uomo, i trasportatori ABC, sono distribuiti in molti organi e tessuti come ad esempio fegato, reni, intestino, testicoli, cervello, sia sulle membrane cellulari che endocellulari.

Sono localizzati a livello del doppio strato della membrana plasmatica i trasportatori ABCA1, ABCB1 (MDR1), ABCB4 (MDR2/3), ABCB11 (BSEP), ABCG5/ABCG8, ABCC1 (MRP1), ABCC2 (MRP2) e ABCC3 (MRP3). Sono invece distribuiti sulle membrane di specifici organelli citosolici: ABCD1-3 nei perossisomi⁹, ABCG1 e ABCG4 negli endosomi^{10,11}, ABCA12 e ABCA3 nei corpi lamellari^{12,13}, ABCA2 e ABCA5 nei lisosomi^{14,15}.

Alcuni trasportatori sono anche in grado di passare da un compartimento cellulare ad un altro.

La distribuzione cellulare globale di queste proteine è la prova della loro importanza, non solo nel mantenimento dell'architettura asimmetrica del doppio strato lipidico di membrana, ma anche nel corretto funzionamento degli organelli endocellulari e nell'omeostasi cellulare generale.



Substrati coinvolti nel meccanismo di trasporto ABC mediato

Il principale substrato lipidico coinvolto nei processi di trasporto/traslocazione ABC mediati è il colesterolo. La corretta omeostasi di questo sterolo è determinante per numerose funzioni biologiche.

Il colesterolo è, innanzitutto, un componente fondamentale delle membrane cellulari nei mammiferi. È coinvolto nella regolazione della permeabilità, della fluidità, dei meccanismi di segnalazione cellulare e nella funzione barriera di membrana.

L'importanza di questo sterolo, tuttavia, non è limitata esclusivamente alla membrana cellulare; il colesterolo, infatti, è il precursore biosintetico degli acidi biliari, degli ormoni steroidei e di alcune vitamine. È, inoltre, un importante costituente della guaina mielinica che ricopre e protegge i neuroni.

Il colesterolo presente nel nostro organismo è sia di origine esogena (alimentare) che endogena. A livello endogeno è, infatti, sintetizzato in tutte le cellule nucleate; tuttavia, il nostro organismo non è in grado di degradarlo.

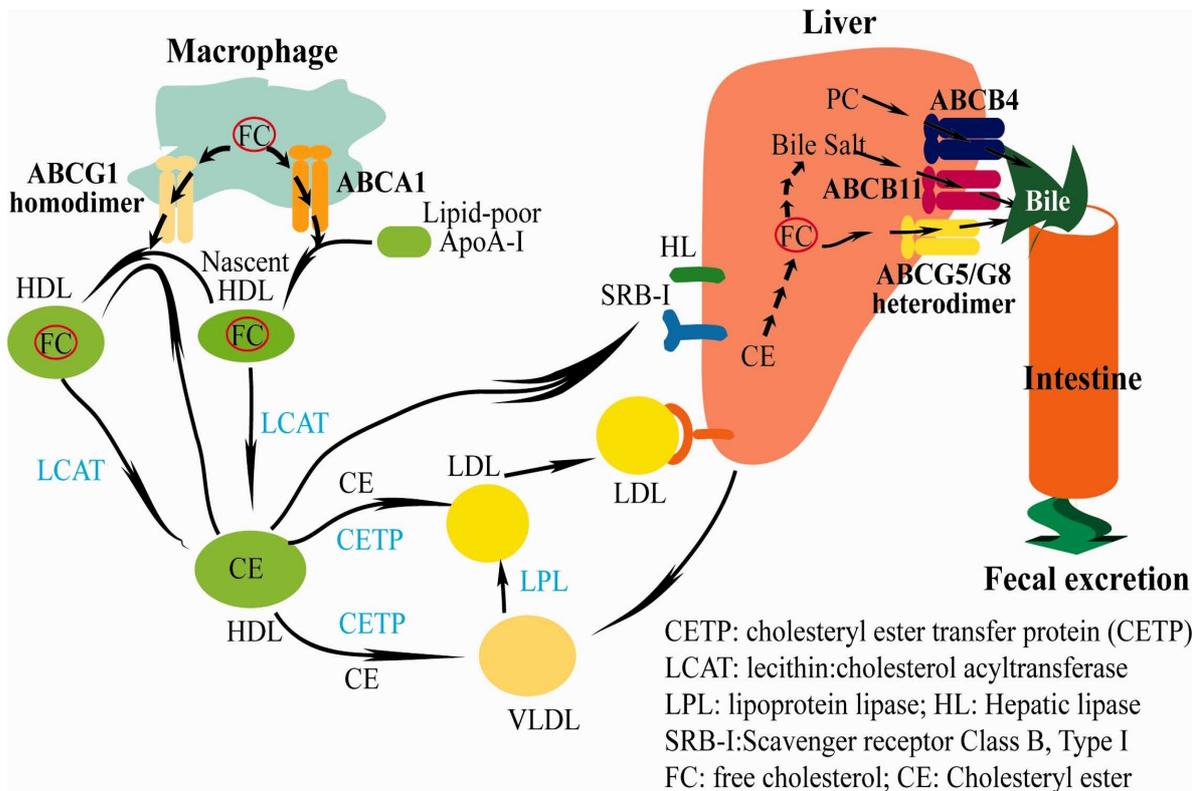
Considerati i molteplici ruoli fisiologici di questo sterolo, fenomeni di accumulo indotti da un eccessivo introito alimentare o da alterazioni a carico dei meccanismi di traslocazione/ridistribuzione cellulare/tissutale, della veicolazione a livello ematico, della funzionalità epatica e dell'escrezione biliare, sono assolutamente deleteri per l'omeostasi cellulare e generale del nostro organismo. L'eventuale colesterolo in eccesso deve, dunque, essere immagazzinato nel citosol come estere (CE) o rilasciato dalla cellula.

L'accumulo del colesterolo è, infatti, alla base di una delle più frequenti e importanti malattie della popolazione occidentale: l'Aterosclerosi. Tuttavia, tale fenomeno si ritiene un fattore predisponente anche per altre malattie come il Morbo di Tangier e l'insorgenza precoce della malattia di Alzheimer^{16,17,18,19}.

La rimozione del colesterolo tissutale in eccesso è mediata dalla cosiddetta via del trasporto inverso del colesterolo (RCT= *reverse cholesterol transport*). Diversi trasportatori ABC prendono parte attiva a questo processo, mediando la traslocazione di questo specifico substrato attraverso il doppio strato lipidico di membrana.

In sintesi, le principali fasi dell'RCT sono ^{16,20,21,22,23,24,25,26,27} .

- Il colesterolo in eccesso viene trasferito dalla cellula (per esempio dai macrofagi) verso accettori lipidici come le apolipoproteine A1 (apoA1) e le lipoproteine ad alta densità (HDL= *High Density Lipoprotein*);
- Il colesterolo libero (FC= *Free Cholesterol*) presente nelle HDL viene esterificato dall'enzima plasmatico Lecitina-Colesterolo Acil Transferasi (LCAT);
- Il Colesteril Estere (CE) così ottenuto viene trasferito dalle HDL verso le apolipoproteine B (apoB) tramite la proteina di trasferimento del CE (CETP= *Cholesteryl Ester Transfer Protein*).
- Il CE, infine, è trasportato fino al fegato dove viene convertito nuovamente in FC per la successiva escrezione biliare (il colesterolo può infatti essere escreto direttamente nella bile come FC oppure precedentemente convertito in acidi biliari).



I principali trasportatori ABC coinvolti nella via dell' RCT sono:

- ABCA1 e ABCG1, che trasferiscono FC rispettivamente verso le apoA1 povere di lipidi e le HDL;
- ABCB11 e l'eterodimero ABCG5/G8 che, invece, mediano rispettivamente l'escrezione dei sali biliari e del FC nella bile;
- ABCB4 che riversa la PC nella bile.

È stato ampiamente dimostrato che ABCA1 e ABCG1 promuovono l'RCT macrofagico in vivo ²⁸; la loro sovraregolazione sembrerebbe, infatti, ridurre il rischio di aterosclerosi.

Tuttavia, oltre ai trasportatori suddetti, anche altre proteine ABC dimostrano particolare affinità nei confronti di questo substrato e risultano coinvolti nell'eziopatogenesi di molte malattie umane, clinicamente caratterizzate da un abnorme accumulo di colesterolo cellulare.

Inoltre, numerosi altri substrati, lipidici e non, sono strettamente dipendenti dall'attività intrinseca dei trasportatori ABC sia a livello delle membrane cellulari che endocellulari. Risulta dunque chiaro che alterazioni strutturali e/o funzionali di tali proteine, sono alla base di vari disordini umani.

SOTTOFAMIGLIE DEI TRASPORTATORI ABC E PRINCIPALI MALATTIE ASSOCIATE A LORO MUTAZIONI

Quasi la metà di questi 48 trasportatori sono implicati nel trasporto ATP-dipendente di substrati lipidici dall'ambiente cellulare all'ambiente extracellulare, ma anche attraverso le membrane di molti organelli citoplasmatici, come i lisosomi, i perossisomi, gli endosomi e i corpi lamellari. I substrati lipidici principalmente coinvolti sono il colesterolo, i fosfolipidi, gli sfingolipidi, e gli steroli vegetali.

Numerose malattie umane sono state attribuite a mutazioni dei geni codificanti per questi trasportatori. Tali patologie presentano, di base, una notevole alterazione dell'omeostasi lipidica cellulare, indotta da difetti strutturali, e conseguentemente funzionali, a carico di queste proteine. Da ciò si deduce l'importanza fisiologica dei trasportatori ABC.

Tabella 1. Trasportatori ABC dei lipidi mutati nelle patologie umane.

Gene	Trasportatore	Localizzazione tissutale	Substrato	Malattia (perdita di funzione)
<i>ABCA1</i>	ABCA1	Ubiquitaria	Colesterolo, fosfolipidi	Malattia di Tangier
<i>ABCA2</i>	ABCA2	Cervello, polmoni, reni, cuore	Colesterolo	Malattia di Alzheimer
<i>ABCA3</i>	ABCA3	Polmoni	Lipidi del surfactante	Disfunzione del metabolismo del surfactante 3
<i>ABCA4</i>	ABCA4	Retina	N-retinil-fosfatidil-etanolamina	Malattia di Stargardt
<i>ABCA7</i>	ABCA7	Cervello, reni, tessuti mielolinfatici, macrofagi, polmoni	Colesterolo, PS	Malattia di Alzheimer
<i>ABCA12</i>	ABCA12	Polmoni, pelle	Lipidi	Ittiosi Arlecchino
<i>ABCB1</i>	MDR1	Diversi epiteli, BEE	Xenobiotici, Glucosilceramidi	Malattia infiammatoria intestinale, MDR
<i>ABCB4</i>	MDR3	Epatociti	Fosfatidilcolina a lunga catena	Colestasi intraepatica progressiva familiare 3 (PFIC3)
<i>ABCB11</i>	BSEP	Epatociti	Sali biliari	PFIC2
<i>ABCC2</i>	MRP2	Fegato, reni, intestino	Bilirubina, sali biliari	Sindrome di Dubin-Johnson
<i>ABCD1</i>	ALD	Diversi epiteli	Acidi grassi a catena molto lunga (VLCFA)	Adrenoleucodistrofia
<i>ABCG1</i>	ABCG1	Macrofagi, Epatociti, cellule endoteliali	Colesterolo	Aterosclerosi
<i>ABCG2</i>	ABCG2	Mitocondri	Urato, xenobiotici	Multi-farmaco resistenza
<i>ABCG4</i>	ABCG4	Retina, cervello	Colesterolo	Aterosclerosi
<i>ABCG5</i>	ABCG5	Enterociti, epatociti	Colesterolo, steroli vegetali	Sitosterolemia
<i>ABCG8</i>	ABCG8	Enterociti, epatociti	Colesterolo, steroli vegetali	Sitosterolemia

Sottofamiglia A dei trasportatori ABC

La sottofamiglia ABCA è costituita da 12 trasportatori pieni che condividono una elevata omologia nella sequenza amminoacidica e nell'organizzazione strutturale ^{29,30}. Sono organizzati in due metà differenti tra loro, ciascuna costituita da un TMD e un NBD. Un elemento peculiare di questi trasportatori è la presenza di larghi domini esocitoplasmatici glicosilati (ECD) tra il primo segmento ponte di membrana ed un *cluster* di 5 segmenti ponte in ambedue le estremità N- e C-terminale ³¹.

Mutazioni di specifici geni *ABCA* provocano gravi disordini genetici, come Aterosclerosi, Morbo di Tangier (*ABCA1*), malattia di Alzheimer (*ABCA2/7*), disfunzioni polmonari dovute a deficit di surfactante (*ABCA3*), malattia di Stargardt (*ABCA4*), e Ittiosi Arlecchino (*ABCA12*).

ABCA1

Il trasportatore lipidico ABCA1, costituito da ben 2.261 amminoacidi, è ampiamente espresso in quasi tutte le cellule e i tessuti del nostro organismo ³²; prevalentemente a livello epatico, intestinale, surrenale, polmonare, cerebrale e macrofagico. Attualmente è forse il trasportatore ABC meglio conosciuto e caratterizzato.

Questa proteina svolge un ruolo cruciale nel mantenimento dell'omeostasi del colesterolo e nella lipidazione della apoproteina A1, processo alla base della biogenesi delle lipoproteine ad alta densità (HDL), che veicolano i lipidi (soprattutto colesterolo) nel sangue dai tessuti periferici al fegato ³³. Le HDL sono costituite da una porzione proteica (prevalentemente la apoproteina A1) e una porzione lipidica (colesterolo principalmente, ma anche trigliceridi e fosfolipidi). ApoA1 è prodotta dal fegato e dall'intestino tenue e riceve il colesterolo non esterificato dai tessuti tramite trasferimento ABCA1 mediato.

Tuttavia, la funzione di ABCA1 varia a seconda del tipo di tessuto, cellula o di organello citoplasmatico in cui è espresso.

Vi è, ad esempio, una sostanziale differenza tra l'attività di ABCA1 espresso negli epatociti e l'attività dello stesso a livello extra-epatico: i trasportatori epatici intervengono nella lipidazione delle apoA1 nascenti, mentre quelli extra-epatici mediano il trasferimento del colesterolo in eccesso dalle cellule verso le HDL ²³. Topi *knockout* per *ABCA1* epatico,

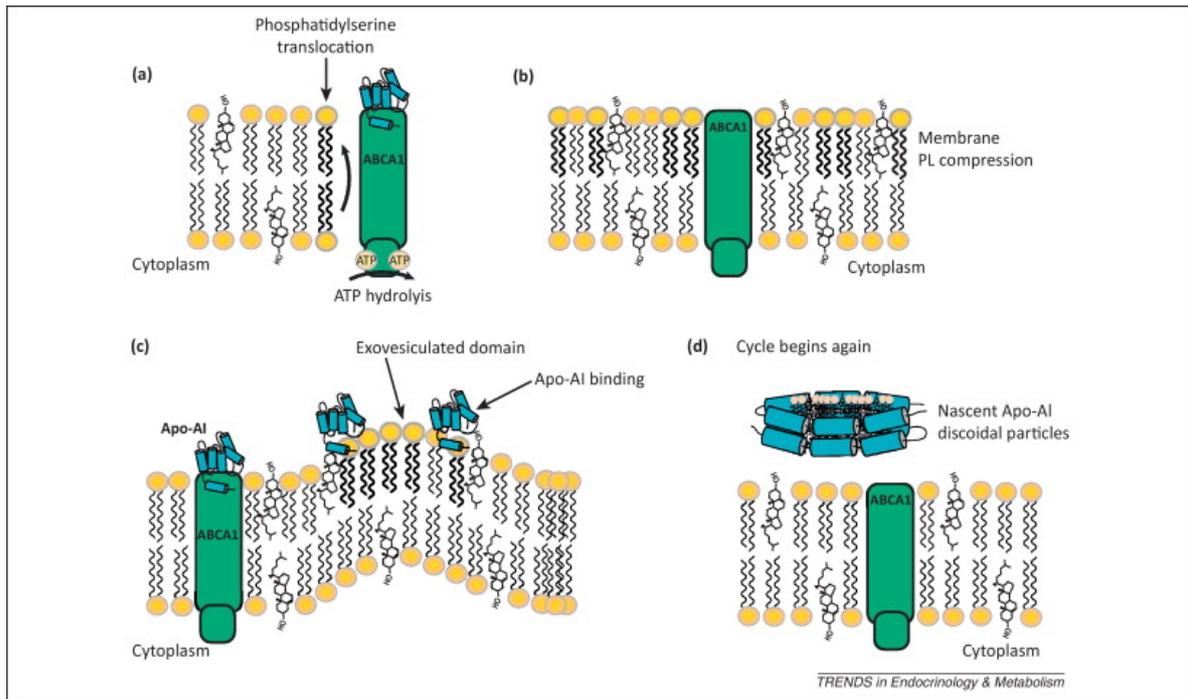
infatti, hanno dimostrato una riduzione di circa l' 80% dei livelli ematici di HDL rispetto a topi *wild type* e un aumento del catabolismo renale di apoA1 ²³.

Le ABCA1 macrofagiche, invece, sono coinvolte nella via di trasporto inverso del colesterolo (RCT), meccanismo attraverso il quale il colesterolo in eccesso viene riportato al fegato per essere successivamente eliminato come FC o sotto forma di sali biliari ³⁴.

Meccanismi proposti per l'efflusso di colesterolo e fosfolipidi e per la lipidazione di apoA1 ABCA1 mediati

- In un primo modello proposto da Vedhachalam *et al.* ³³, sfruttando l'energia derivante dall'idrolisi dell'ATP, ABCA1 consente la traslocazione della PS dal foglietto interno della membrana cellulare a quello esterno, dove si viene quindi a creare un accumulo di questo fosfolipide ^{33,35}. In tal modo si generano gradualmente delle compressioni di intensità sempre maggiore tra i lipidi circostanti, che costringono così la membrana cellulare a ripiegarsi verso l'esterno formando dei micro-domini esovesicolari. La formazione di queste curvature di membrana è dunque espressione dell'attività intrinseca di ABCA1 come trasportatore lipidico. Tale attività di trasporto è assolutamente indipendente dall'interazione tra ABCA1 e apoA1. ABCA1 è, infatti, in grado di incrementare gli addensamenti lipidici esovesicolari anche in assenza dell' accettore esogeno ³⁵. Il successivo fenomeno della solubilizzazione lipidica (caricamento) da parte di apoA1 povera di lipidi è invece favorito dall' interazione della stessa con ABCA1. Questa interazione transitoria, oltre che stabilizzare ABCA1 a livello della membrana cellulare, sembra indirizzare apoA1 verso le sporgenze esovesicolari di membrana ricche di lipidi. ApoA1 sembra avere, infatti, una elevata affinità di legame nei confronti di questi micro-domini generati dall'attività di trasporto transmembrana di ABCA1.

ApoA1, una volta arricchitasi di lipidi (colesterolo, fosfolipidi), si suppone assuma una forma discoidale atta a formare una sorta di impalcatura di protezione, in cui la porzione idrofobica di apoA1 è esposta verso il core lipidico dell'HDL nascente ³³. Quando l'eccesso lipidico dei domini esovesicolari è stato eliminato, ha inizio un nuovo ciclo.



Trends in Endocrinology and Metabolism, July 2013, Vol.24, No.7

- Nel secondo modello proposto si ipotizza il trasferimento lipidico su apoA1 mediante il fenomeno della retro-endocitosi. 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^{36,37}.

In realtà, entrambi i modelli sopra descritti sono ritenuti validi. La lipidazione di apoA1, fenomeno alla base della biogenesi delle HDL, richiede sempre e comunque la presenza del trasportatore ABCA1 funzionale. Il caricamento lipidico può quindi avvenire sia a livello della membrana cellulare che a livello dei *pools* lipidici citosolici.

Altri modelli sono stati ipotizzati per descrivere l'attività di trasporto di ABCA1, tra cui i seguenti:

- Nel modello simultaneo ABCA1 esporta contemporaneamente PC e colesterolo, i quali vengono caricati in simultanea su apoA1³⁸;

- Nel modello a 2 *steps*, invece, apoA1 viene lipidato prima con PC per formare il complesso apoA1-PC il quale, successivamente ed indipendentemente da ABCA1, viene caricato del colesterolo proveniente dalla membrana cellulare^{39,40}.

Un recente studio⁴¹ sostiene che il trasporto attivo ABCA1 mediato avvenga esclusivamente per PC, PS e SM dal foglietto interno a quello esterno della membrana, ma che ciò non sia valido per il colesterolo. Tali lipidi si accumulano nelle membrane cellulari e formano i domini esovesicolari, essenziali per il riconoscimento, il legame e il caricamento di apoA1 con i fosfolipidi ed il colesterolo. Di conseguenza viene messo in discussione il trasporto diretto del colesterolo mediato da ABCA1 come proposto invece dal modello simultaneo.

Malattie associate a mutazioni del gene ABCA1

Mutazioni a carico del gene *ABCA1* provocano una grave riduzione della biogenesi delle HDL circolanti, con conseguente accumulo di colesterolo nei tessuti e formazione di cellule schiumose ricche di lipidi carichi. Questi disordini sono alla base di gravi patologie quali l'Aterosclerosi e la Malattia di Tangier. Recenti studi hanno inoltre evidenziato una stretta correlazione tra le alterazioni geniche di ABCA1 e il Diabete Mellito di tipo 2 (DM2)⁴².

Downregulation di ABCA1 e accumulo di lipidi sierici all'interno delle VSMC mediante macropinocitosi come probabili fattori atero-protettivi

L'aterosclerosi è una patologia degenerativa multifattoriale a carico delle arterie di medio e grosso calibro, che predispone il soggetto all'insorgenza di infarto, ictus e angina pectoris. La base eziologica è da ricondursi ad un eccessivo accumulo di lipidi sierici nelle pareti dei vasi con conseguente induzione di un processo infiammatorio e rottura di tali depositi (placche o ateromi). L'attivazione piastrinica che ne deriva porta alla formazione di coaguli (trombi), i quali possono occludere il lume vasale. Alcuni trombi possono anche embolizzare ed occludere vasi lontani e/o di calibro minore.

L'ipotesi più accreditata come fenomeno alla base della formazione dell'ateroma è la teoria patogenetica della "risposta alla ritenzione"⁴³ secondo la quale l'evento

predisponente al processo aterogenico non sarebbe tanto il danno endoteliale quanto l'eccessivo accumulo lipidico a livello dell'intima arteriosa.

In tal senso, un fattore predisponente è rappresentato dall'aumento delle lipoproteine a bassa densità (LDL = *Low Density Lipoprotein*), che trasportano il colesterolo di origine alimentare verso tutti i tessuti dell'organismo. Le lipoproteine non modificate, interagendo con i proteoglicani della matrice extracellulare, vengono intrappolate all'interno dell'endotelio vascolare, dove diventano maggiormente suscettibili a fenomeni ossidativi e modificazioni enzimatiche. La formazione di questi lipidi ossidati sembrerebbe indurre l'attivazione endoteliale e la chemiotassi di cellule infiammatorie come monociti e linfociti.

I monociti/macrofagi vanno a fagocitare le lipoproteine modificate e intrappolate nell'intima, formando le cosiddette cellule schiumose (*foam cells*) che rappresentano i principali costituenti delle strie lipidiche⁴⁴. L'interazione tra macrofagi ed LDL-ox è dovuta alla presenza di recettori *scavengers* sulle membrane dei monociti, che presentano elevata selettività nei confronti di questi substrati modificati.

In realtà, anche le cellule muscolari lisce vascolari (VSMC=*Vascular Smooth Muscle Cells*) esprimono sulle proprie membrane diversi recettori specifici per l'assorbimento del colesterolo: recettore per le LDL, CD36, SR-A1, SR-A2, ed altri^{45,46,47,48}. Le VSMC, quindi, sono in grado di assimilare le LDL modificate e di formare delle cellule morfologicamente simili alle *foam cells*. Le LDL-ox sono pertanto ligandi per i recettori *scavengers* presenti sulle membrane cellulari sia dei macrofagi che delle VSMC. Maggiore sarà la formazione di queste cellule schiumose, maggiore sarà l'occlusione del vaso sanguigno interessato al fenomeno.

Queste cellule modificate hanno inoltre importanti proprietà pro-infiammatorie: inducono la produzione delle citochine pro-infiammatorie come l'interleuchina 1 β (IL-1 β), il fattore di necrosi tumorale α (TNF- α), e l'interferone γ (INF- γ). Queste citochine provocano sovraregolazione dei recettori di membrana che inducono le VSMC ad incrementare l'assorbimento delle LDL modificate e, quindi, a trasformarsi in cellule schiumose^{46,49}. In aggiunta, anche i macrofagi vengono indotti a sovraesprimere marcatori *scavengers*.

Dal punto di vista anatomico, le VSMC sono le principali costituenti del diffuso ispessimento intimale (DIT = *Diffuse Intimal Thickening*)^{50,51}, che si localizza

prevalentemente in corrispondenza delle ramificazioni e delle curvature dei vasi, sedi che risultano particolarmente predisposte allo sviluppo degli ateromi.

Gli studi eziopatogenetici condotti finora hanno ampiamente dimostrato la stretta dipendenza tra l'espressione cellulare dei recettori *scavengers* e l'accumulo endoteliale delle LDL modificate, come necessaria condizione per la formazione delle cellule schiumose pro-infiammatorie e l'avvio del fenomeno aterogenico. Tuttavia, nessuno di questi studi ha preso in considerazione l'effetto dei lipidi sierici non modificati sulla morfologia delle VSMC e sull'induzione all'aterogenesi.

A tal proposito un recente studio ⁵² ha cercato di analizzare e descrivere il comportamento delle VSMC in seguito ad esposizione alle LDL non modificate. Il risultato di tale ricerca ha condotto all'identificazione di un assorbimento dei lipidi non modificati da parte delle VSMC mediante macropinosi, fenomeno risultato strettamente correlato all'attività del trasportatore inverso del colesterolo ABCA1. I ricercatori hanno analizzato il comportamento di cellule VSMC murine (MOVAS) in seguito ad incubazione con siero di topo normocolesterolemico (C57BL/6J) o ipercolesterolemico (apoE^{-/-}). Già dopo poche ore, le VSMC hanno dimostrato marcate modificazioni morfologiche indotte dall'eccessivo accumulo di lipidi non modificati all'interno dei vacuoli cellulari. L'accumulo maggiore è risultato nelle cellule VSMC esposte al siero di topo ipercolesterolemico.

È importante notare che le VSMC arricchite di lipidi non modificati hanno dimostrato mantenere i marcatori di differenziazione cellulare e non rappresentano in alcun modo un fenotipo pro-infiammatorio (a differenza delle cellule schiumose derivate dall'accumulo di lipidi sierici modificati). L'accumulo di lipidi non modificati è, infatti, risultato indipendente dalla presenza dei recettori *scavengers* su queste linee cellulari, in quanto l'esposizione di VSMC murine ai sieri di topo sia normo che ipercolesterolemico (*wild-type* e apoE^{-/-}) non ha indotto particolari alterazioni dei livelli di espressione dei principali recettori *scavengers* dei lipidi modificati come CD36 e SR-A1.

Tuttavia, sono state rilevate notevoli alterazioni sull'attività di trasporto di ABCA1, il cui ruolo è di regolare l'efflusso del colesterolo cellulare in eccesso, indirizzandolo verso accettori extracellulari poveri di lipidi (primo tra tutti apoA1) ⁵³, impedendo così l'accumulo lipidico all'interno delle cellule.

L'esposizione delle VSMC al siero di topo ha indotto la *downregulation* di *ABCA1* in concomitanza con il fenomeno della macropinocitosi, attraverso cui è consentito l'ingresso dei lipidi non modificati all'interno delle VSMC e dei macrofagi.

La macropinocitosi è una particolare forma di pinocitosi attraverso cui la cellula assume grosse masse liquide extra-cellulari in modo non selettivo⁵⁴. Mentre l'ingresso dei lipidi modificati all'interno delle cellule VSMC e dei macrofagi è regolato dall'espressione dei recettori *scavengers*, l'assorbimento dei lipidi non modificati avviene mediante un processo simile alla macropinocitosi e in associazione con ABCA1.

Come risultato dallo studio⁵², la *downregulation* di *ABCA1* provoca una notevole riduzione dell'efflusso del colesterolo ed induce l'accumulo dei lipidi sierici non modificati all'interno delle VSMC (via macropinocitosi). Ciò suggerisce un possibile ruolo ateroprotettivo delle VSMC nel rimuovere dal compartimento extracellulare gran parte dei lipidi sierici non modificati, prima che questi subiscano la captazione da parte dei proteoglicani e le successive modificazioni ossidative ed enzimatiche alla base dell'evento flogistico aterogenico.

Diabete mellito di tipo 2 e polimorfismo del gene C69T di ABCA1

Il trasportatore ABCA1 svolge un ruolo determinante nella traslocazione del colesterolo. In particolare, media il suo trasferimento sulle HDL, le quali trasportano il colesterolo in eccesso dalla periferia al fegato ed ai tessuti steroidogenici (ghiandole surrenali, gonadi)⁵⁵. Mutazioni del gene codificante per questa proteina di trasporto transmembrana sono state dunque associate a riduzione dei livelli sierici di colesterolo associato alle HDL (HDL-C) e, di conseguenza, ad un incremento del rischio di insorgenza di aterosclerosi e malattie coronariche arteriose (CAD = *Coronary Artery Disease*).

Poiché molti pazienti con DM2 presentano bassi livelli ematici di HDL-C, si suppone che le mutazioni di *ABCA1* possano concorrere all'eziopatogenesi del DM2 e che tale alterazione possa essere coinvolta nel meccanismo dell'insulino resistenza (RI)⁵⁶. Elevati livelli ematici di colesterolo, infatti, possono indurre accumulo di questo lipide nel pancreas e ridurre la secrezione di insulina stimolata dal glucosio (GSIS = *Glucose-Stimulated Insuline Secretion*). Di conseguenza elevati livelli ematici di colesterolo aumenterebbero il rischio di tolleranza al glucosio e diabete⁵⁷.

Diverse evidenze epidemiologiche hanno confermato una maggiore predisposizione all'insorgenza di patologie coronariche in pazienti con DM2 ⁵⁸.

ABCA1 sembrerebbe regolare l'accumulo di colesterolo nelle membrane plasmatiche delle cellule β pancreatiche e quindi svolgere un ruolo determinante nella formazione di HDL-C, ma anche nello sviluppo del DM2 e nella aterosclerosi ⁵⁹.

Il DM2 è una patologia ad eziologia multifattoriale in cui gioca un ruolo determinante la componente genetica. Diversi studi epidemiologici e clinici hanno cercato di dimostrare una correlazione tra il polimorfismo del gene C69T di ABCA1 e il rischio di DM2 e CAD in diverse etnie (francesi, turchi, finlandesi). Si parla di polimorfismo genetico quando all'interno dello stesso gruppo etnico (o specie) sono presenti più alleli di uno stesso gene con una frequenza d'espressione maggiore dell'1%. Questo fenomeno è costantemente mantenuto nelle varie etnie per selezione naturale.

Uno degli studi più recenti sul ruolo delle varianti genetiche di ABCA1, correlate all'insorgenza del DM2, ha preso come modello d'indagine la popolazione saudita di Riyadh ⁴². L'indagine è stata condotta su 376 pazienti affetti da DM2 (maschio:femmina = 225:151) e su 380 individui di controllo (volontari sani). Storia familiare di DM2 è stata riscontrata in tutti i pazienti DM2 e nel 52,1 % dei volontari sani. Le indagini genetiche effettuate hanno individuato una frequenza maggiore dell'allele T e del genotipo TT nei volontari (controllo) rispetto ai pazienti DM2 (risultati analoghi sono stati ottenuti anche da altri ricercatori). L'allele T potrebbe dunque avere un effetto protettivo per l'etnia saudita di Riyadh, contrastando l'insorgenza del DM2. Tuttavia non sono state riscontrate correlazioni tra il polimorfismo di C69T di ABCA1 e i livelli di HDL-C ematici. L'unico risultato certo è il ruolo protettivo dell'allele T contro l'insorgenza del DM2.

Questi studi rimangono comunque preliminari e richiedono ulteriori riscontri con gruppi etnici più numerosi.

ABCA2

ABCA2 è una proteina di trasporto appartenente alla sottoclasse A della superfamiglia dei trasportatori *ATP-binding cassette*. Anche questo trasportatore gioca un ruolo chiave nel mantenimento dell'omeostasi dei lipidi, soprattutto nei confronti del colesterolo a livello

delle cellule nervose. Infatti, ABCA2 è altamente espresso nel cervello (neuroni e oligodendrociti) ⁶⁰ e, in basse concentrazioni, anche nei polmoni, nei reni e nel cuore. A livello subcellulare è prevalentemente localizzato nei lisosomi e nel Golgi ⁶¹.

Mutazioni del gene *ABCA2* sono alla base di gravi disordini associati al metabolismo lipidico, soprattutto a livello cerebrale. Infatti, topi carenti o totalmente privi del trasportatore ABCA2, hanno manifestato profonde alterazioni morfologiche a carico della guaina mielinica e del profilo lipidico cerebrale ^{62,63}. Inoltre, la delezione di *ABCA2* in macrofagi di topo *knockout* per il recettore delle LDL ha dimostrato una possibile correlazione tra l'attività di ABCA2 e l'insorgenza di malattie cardiovascolari, come l'aterosclerosi precoce ⁶⁴. Alterazioni di questo trasportatore sono state associate anche al Morbo di Alzheimer ^{65,66}.

Diverse evidenze sperimentali hanno confermato l'attività di ABCA2 nel promuovere l'efflusso del colesterolo dalle cellule. Infatti, il caricamento dei macrofagi con il colesterolo ha indotto un aumento dell' mRNA per ABCA2 ⁶⁷; per di più, è stato osservato che la sovraespressione di ABCA2 in cellule di neuroblastoma, causi una riduzione dei livelli cellulari di questo sterolo ⁶⁸.

Un aumento del colesterolo cellulare, indotto da mutazioni a carico del gene codificante per ABCA2, ha dimostrato promuovere il rilascio della proteina β -amiloide (A β) dalle cellule neuronali, e il suo conseguente accumulo nell'ambiente extracellulare. Tale condizione sembrerebbe predisponente per lo sviluppo della malattia di Alzheimer ⁶⁹.

Recenti studi hanno, inoltre, messo in relazione il processo di esterificazione del colesterolo di membrana con il metabolismo sfingolipidico modulato da ABCA2 ⁷⁰.

Regolazione dell'esterificazione del colesterolo di membrana mediante modulazione del metabolismo degli sfingolipidi

Un gruppo di ricercatori americani ⁷⁰ ha ipotizzato e analizzato sperimentalmente la dipendenza dell'esterificazione del colesterolo di membrana con l'attività del trasportatore ABCA2. La quantità di colesterolo di membrana disponibile per l'esterificazione sembrerebbe dipendere dall'idrolisi della sfingomielinina.

Il colesterolo nelle membrane cellulari delle cellule nervose si trova, infatti, associato alla sfingomielina (principale sfingolipide della mielina). L'idrolisi della sfingomielina ad opera dell'enzima sfingomielinasi endogena induce la formazione di ceramide e fosfocolina liberando così il colesterolo dalla membrana plasmatica; quest'ultimo, una volta trasportato nel reticolo endoplasmatico (RE), viene sottoposto ad esterificazione da parte dell'enzima acilCoA-colesterolo aciltransferasi (ACAT) ⁷¹.

In questo studio, per mobilizzare il colesterolo di membrana, è stata utilizzata sfingomielinasi esogena (batterica). Sono state messe a confronto due linee cellulari murine, caratterizzate da diversi livelli di espressione di *ABCA2*, per valutarne la maggiore o minore influenza sull'esterificazione del colesterolo di membrana: cellule di neuroblastoma di topo (N2a), che sovraesprimono *ABCA2* e cellule di topo schwannoma (D6P2T) che invece sono state indotte a ridurre l'espressione di *ABCA2* endogeno (mediante RNAi).

I molteplici esperimenti a carico di queste linee cellulari tumorali di topo hanno dimostrato, in sintesi, che nelle cellule che sovraesprimono *ABCA2* (N2a) si ha un aumento della mobilizzazione della ceramide *ABCA2* mediata, verso il foglietto esterno della membrana cellulare ⁷², che induce un incremento dell'inibizione di ACAT e quindi una riduzione del quantitativo di colesterolo esterificato (CE) a livello del RE. Sia l'attività della sfingomielinasi che l'inibizione dell'enzima ceramidasi, inducono un aumento dei livelli di ceramide nella membrana cellulare. Al contrario, le cellule D6P2T, in cui è stata ridotta l'espressione di *ABCA2* endogeno, hanno dimostrato un calo di espressione dell'enzima sfingomielina-sintasi (SMS2), enzima responsabile della sintesi della sfingomielina di membrana. La sfingomielinasi idrolizza la sfingomielina liberando il colesterolo che viene così reso disponibile per l'esterificazione da parte di ACAT nel RE.

Si deduce, quindi, che i livelli di espressione di *ABCA2* modulino l'esterificazione del colesterolo proveniente dal metabolismo degli sfingolipidi di membrana.

ABCA2 potrebbe avere un ruolo chiave nell'eziopatogenesi di molte malattie infiammatorie, neurologiche e cardiovascolari; infatti, la degradazione della sfingomielina endogena, ad opera della sfingomielinasi acida o neutra, è stata riscontrata in molte di queste patologie ⁷³.

ABCA3

ABCA3 (*ATP-binding cassette A3*) è una proteina di trasporto dei fosfolipidi, esclusivamente espressa negli pneumociti alveolari di tipo 2 e, più esattamente, a livello della membrana dei corpi lamellari (organelli cellulari responsabili dell'accumulo e della secrezione del surfactante polmonare). Il surfactante polmonare è una miscela tensioattiva a componente fosfolipoproteica, costituita cioè da colesterolo, fosfolipidi (soprattutto PS) e proteine¹³. Viene prodotto dagli pneumociti di tipo 2 ancora prima della nascita e, formando una sottilissima pellicola sulla superficie degli alveoli polmonari, ne abbassa la tensione superficiale impedendo il collasso alveolare al termine dell'espiazione.

Mutazioni nei geni che codificano per le proteine del surfactante, tra cui *ABCA3*, inducono alterazioni nella composizione del surfactante stesso inducendo insufficienza respiratoria acuta o cronica in età neonatale, pediatrica e adulta, a volte anche con esito fatale. Alterazioni in *ABCA3* possono, infatti, portare alla morte precoce del neonato, subito dopo il parto.

La stretta correlazione tra le proteine *ABCA3* e il deficit di surfactante polmonare, è stata ampiamente dimostrata da studi su base genetica condotti su un gruppo di oltre 100 pazienti affetti da carenza di surfactante polmonare e gravi difficoltà respiratorie neonatali. Questi studi hanno permesso di individuare delezioni e mutazioni *frameshift* in *ABCA3*^{13,74}.

Ulteriori indagini condotte su topi *ABCA3*^{-/-} hanno confermato l'importanza dei trasportatori *ABCA3* nello sviluppo dei corpi lamellari e nella produzione del surfactante polmonare in quanto, i modelli *knockout*, hanno manifestato uno scarso (se non del tutto assente) sviluppo dei corpi lamellari e totale assenza di surfactante alveolare⁷⁴.

ABCA4

ABCA4 è un trasportatore pieno eterodimerico costituito strutturalmente da due differenti domini TMD, da due NBD e da due larghi ECD, analogamente agli altri membri della sottofamiglia A³¹, ed è composto da ben 2.273 amminoacidi. Questo trasportatore è espresso esclusivamente a livello del segmento esterno dei fotorecettori, coni e bastoncelli, presenti nell'epitelio retinico⁷⁵. È specifico per il trasporto della PE e, più precisamente,

media il trasporto dell'N-retilidene-fosfatidil-etanolamina (NR-PE), sottoprodotto intermedio altamente tossico rilasciato durante il ciclo della fototrasduzione. L'NR-PE è un addotto fosfolipidico tutto-trans retinico che si forma nel momento in cui, per azione della luce, l'11-cis-retinale viene convertito in tutto-trans-retinale. ABCA4 regola l'espulsione di NR-PE al di fuori dei recettori retinici.

Mutazioni del gene *ABCA4* trasmesse con modalità autosomica recessiva, sono alla base di una grave degenerazione maculare ereditaria: la malattia di Stargardt ⁷⁶. La perdita dell'attività funzionale di ABCA4 induce accumulo di composti retinoidi lipofuscini potenzialmente tossici ⁷⁷, fenomeno alla base della degenerazione maculare, della perdita della visione periferica e della riduzione del tempo di adattamento al buio ⁷⁸.

La correlazione tra ABCA4 non funzionale e l'insorgenza della malattia di Stargardt è stata dimostrata da studi genetici in topi *ABCA4*^{-/-} e in individui affetti da tale patologia. In entrambi i casi si è riscontrato un accumulo dei composti tossici lipofuscini all'interno dei fotorecettori e nelle cellule dell'epitelio retinico ⁷⁹.

ABCA7

Trasportatore del colesterolo altamente espresso nel cervello (ippocampo), ma anche nei reni (corticale), nei tessuti mielolinfatici, nel polmone, nelle piastrine e nei macrofagi ⁸⁰.

Presenta oltre il 54% di omologia strutturale con ABCA1 e, come questo, si ritiene coinvolto nel trasferimento del colesterolo e dei fosfolipidi dalle cellule verso le apolipoproteine povere di lipidi (apoA1), come dimostrato in colture cellulari ^{81,82}. ABCA7, come ABCA1, è un trasportatore pieno; è inoltre costituito da 2.146 amminoacidi.

A differenza di ABCA1 però, ABCA7 non sembra svolgere un ruolo cruciale nella biogenesi delle HDL e nel meccanismo di trasporto inverso del colesterolo (RCT) a livello macrofagico. Infatti, topi *ABCA7 knockout*, non dimostrano particolari alterazioni dei livelli sierici di HDL e nè alterazioni della traslocazione del colesterolo dai macrofagi verso apoA1 ⁸³. Inoltre, topi *Ldlr*^{-/-} privi di ABCA7 non sembrano manifestare predisposizione a patologie aterosclerotiche ⁸⁴. L'importanza funzionale di questo trasportatore sembra dunque limitata al cervello, dove si ritiene essere il principale

responsabile dell'omeostasi del colesterolo. Mutazioni di *ABCA7* umano si sospettano essere associate alla malattia di Alzheimer come dimostrato da studi *genome-wide*¹⁹. Topi carenti di *ABCA7* hanno manifestato alterazioni a livello mnemonico (riconoscimento nei topi maschi e riferimento spaziale nelle femmine)⁸⁵.

Un gruppo di ricercatori⁴¹ ha dimostrato il coinvolgimento diretto di *ABCA7* e di *ABCA1* nel caricamento dei fosfolipidi su apoA1⁸². Per la prima volta è stato, infatti, confermato il ruolo chiave di *ABCA7* e *ABCA1* nel trasporto diretto di PC, PS e SM dal lato citosolico al lato esocitoplasmatico delle membrane cellulari. Questi due trasportatori, dunque, hanno dimostrato elevata specificità di substrato nel trasporto fosfolipidico di membrana. In particolare, *ABCA7* ha manifestato una notevole affinità per la PS rispetto alla PC (contrariamente ad *ABCA1* che la trasporta in verso contrario).

In accordo con un precedente studio⁸⁶ è stato dimostrato, inoltre, un effetto di riduzione dell'attività ATPasica di *ABCA7*, *ABCA1* e *ABCA4* da parte del colesterolo di circa il 30%. Tuttavia, saggi diretti sul movimento transmembrana del colesterolo sono ancora necessari per avvalorare questa ipotesi.

ABCA12

ABCA12 è un importante trasportatore di membrana coinvolto nel trasferimento dei lipidi dai granuli lamellari alla superficie apicale dei cheratinociti dello strato granuloso dell'epidermide. Alterazioni funzionali di *ABCA12* possono pertanto indurre un abnorme sviluppo di corpi lamellari nei cheratinociti che, arricchendosi di lipidi, tendono ad accumularsi nello strato corneo dell'epidermide.

Mutazioni a carico del gene *ABCA12*, codificante per questo trasportatore, sono causa dell'insorgenza della più grave variante di ittiosi congenita autosomica recessiva: l'Ittiosi Arlecchino. Tale patologia, come ampiamente dimostrato, è indotta da profonde alterazioni del trasporto lipidico *ABCA12* mediato. I neonati affetti da Ittiosi Arlecchino presentano, fin dalla nascita, gravi modificazioni dell'epidermide, che si presenta ricoperta da formazioni squamose quadrangolari che inducono la perdita dell'elasticità e della funzione di barriera cutanea⁸⁷. Tale condizione compromette fortemente non solo il movimento, ma anche la termoregolazione, oltre che espone costantemente il soggetto a gravi lesioni cutanee che comportano, di conseguenza, importanti fenomeni infettivi generalizzati.

Tutto ciò risulta chiaramente incompatibile con la vita. In questi pazienti, ABCA12 è stato localizzato nei granuli lamellari dei cheratinociti dell'epidermide superiore ⁸⁸, dove si ritiene responsabile dell'abnorme trasporto di glucosilceramide, fenomeno alla base dell'alterazione strutturale cutanea ^{88,89}.

Sottofamiglia B dei trasportatori ABC

I membri appartenenti a questa sottofamiglia sono esclusivamente espressi nei mammiferi e, la maggior parte di essi, sono responsabili della multi-farmaco resistenza in pazienti sottoposti a trattamento chemioterapico. Per questo motivo la sottofamiglia B è stata anche denominata MDR/TAP (famiglia dei trasportatori ABC della multi-farmaco resistenza).

Mutazioni dei geni *ABCB* sono associate a gravi patologie quali malattie infiammatorie intestinali e la Colestasi Intraepatica Progressiva Familiare (PFIC).

ABCB1/MDR1

MDR1 (proteina della multi-farmaco resistenza 1) o glicoproteina P1 (glicoproteina di permeabilità 1) è un trasportatore glicoproteico di membrana espresso prevalentemente negli epatociti, nelle gonadi, nei tubuli renali, negli enterociti e nelle cellule epiteliali della barriera emato-encefalica e placentare. Presenta dunque una importante funzione barriera tra questi organi e il sangue, preservandoli dall'assorbimento e dall'accumulo di sostanze potenzialmente citotossiche ⁹⁰.

MDR1, prodotto funzionale del gene *ABCB1*, è risultato sovraespresso in pazienti sottoposti a trattamento chemioterapico antineoplastico, dove si ritiene svolgere un ruolo determinante nell'estruzione dei farmaci dalle cellule bersaglio ⁹⁰.

Numerosi sono i substrati principalmente coinvolti nel meccanismo di estrusione cellulare MDR1 mediato: xenobiotici, chemioterapici (doxorubicina, etoposide, vinblastina), droghe (colchicina), bilirubina, lipidi, steroli e peptidi ⁹⁰. Questo trasportatore è dunque ritenuto essenziale nei processi di detossificazione cellulare, soprattutto in distretti estremamente sensibili, tra cui il SNC, il fegato, le gonadi e l'intestino.

La multi-farmaco resistenza, in realtà, non è altro che un fisiologico meccanismo di difesa adottato dalle cellule quando vengono costantemente esposte a sostanze potenzialmente tossiche. Al contrario, infatti, l'eccessivo accumulo di tali sostanze, indurrebbe l'organismo a fenomeni di tossicità e infiammazioni tissutali (come potrebbe accadere, ad esempio, in caso di MDR difettose).

Alterazioni a carico di *ABCB1* sono causa di malattie su base infiammatoria, prime tra tutte le malattie infiammatorie intestinali. Topi *ABCB1*^{-/-} hanno, infatti, dimostrato l'insorgenza di gravi forme infiammatorie intestinali analoghe a quelle riscontrate nell'uomo, indotte probabilmente da cambiamenti dell'ambiente microbico cecale⁹¹.

ABCB4/MDR3 E ABCB11/BSEP

La Colestasi Intraepatica Progressiva Familiare (PFIC)

La PFIC appartiene a un gruppo eterogeneo di patologie su base genetica, trasmesse con modalità autosomica recessiva, in cui si manifesta una profonda alterazione della componente biliare di origine epatocellulare. Tali disordini derivano da mutazioni di alcuni geni che codificano per proteine di trasporto, localizzate a livello epatico e coinvolte nella formazione della bile. Tra questi geni mutati troviamo:

- *ABCB11*, codificante per la proteina BSEP e inducente PFIC di tipo 2;
- *ABCB4*, codificante per la proteina MDR3 e inducente PFIC di tipo 3.

PFIC2 è caratterizzata da una ridotta secrezione dei sali biliari; PFIC3, invece, deriva da un'alterata secrezione dei fosfolipidi biliari.

ABCB4/MDR3

La glicoproteina P MDR3 è una proteina transmembrana che regola la traslocazione della PC a livello epatico. È un altro membro importante della sottofamiglia MDR/TAP e, come tale, la sua sovraespressione è coinvolta nel fenomeno della multi-farmaco resistenza in pazienti sottoposti a trattamento chemioterapico.

Mutazioni del gene *ABCB4* compromettono la secrezione dei fosfolipidi biliari e inducono colestasi intraepatica progressiva familiare di tipo 3 (PFIC3), una grave patologia su base autosomica recessiva che può manifestarsi già nella prima infanzia.

MDR3 trasporta selettivamente PC dagli epatociti verso i canalicoli biliari ⁹². All'interno dei canalicoli biliari questo fosfolipide, insieme ai sali biliari, contribuisce a solubilizzare il colesterolo e i fitosteroli evitando che un eccesso di questi possa danneggiare l'epitelio biliare. Colesterolo e fitosteroli vengono riversati nella bile mediante l'attività dei trasportatori ABCG5/ABCG8 ⁹³.

Topi *ABCB4*^{-/-} risultano incapaci di riversare i fosfolipidi nella bile, e quindi potenzialmente predisposti all'esordio della malattia. Inoltre, topi eterozigoti hanno dimostrato una riduzione del 50% del contenuto fosfolipidico biliare rispetto a topi *wild type*, ma senza manifestare evidente alterazione patologica ⁹⁴.

ABCB11/BSEP

BSEP (pompa di esporto dei sali biliari) è una proteina transmembrana appartenente al gruppo MDR/TAP della superfamiglia dei trasportatori ABC. È espressa esclusivamente a livello della membrana apicale degli epatociti dove regola l'efflusso degli acidi biliari coniugati dagli epatociti verso i canalicoli biliari ⁹³. Questo trasportatore, infatti, è il principale responsabile della formazione e del flusso della bile.

Mutazioni del gene *ABCB11* sono associate all'insorgenza di PFIC2. Inoltre, il progressivo accumulo di sali biliari, indotto da alterazioni funzionali o dalla totale assenza di BSEP si ritiene predisporre l'individuo allo sviluppo del carcinoma epatocellulare ⁹².

Sottofamiglia C dei trasportatori ABC

La sottofamiglia ABCC è costituita da 12 trasportatori pieni, specifici per il trasporto degli ioni organici, per l'escrezione delle sostanze tossiche e per la trasduzione del segnale cellulare. Nove di questi trasportatori sono proteine della multi-farmaco resistenza.

ABCC2/MRP2

Di notevole importanza è il trasportatore MRP2 (*multidrug resistance associated protein 2*), codificato dal gene *ABCC2* e specifico per il trasporto di anioni organici. Questa proteina è espressa a livello della membrana canalicolare degli epatociti, ma anche nelle cellule endoteliali del tubulo renale prossimale. Per la sua funzione, è chiamata anche trasportatore canalicolare degli anioni organici multi-specifico (cMOAT = *canalicular multi-specific organic anion transporter*).

Mutazioni del gene *ABCC2* causano la sindrome di Dubin-Johnson (SDJ), malattia rara trasmessa come carattere autosomico recessivo, caratterizzata da aumento dei livelli sierici di bilirubina coniugata indotto da difettosa secrezione dei glucuronidi coniugati alla bilirubina nella bile ⁹².

Sottofamiglia D dei trasportatori ABC

I trasportatori della sottofamiglia ABCD o ALD sono 4. Si tratta di emi-trasportatori che omo/etero-dimerizzano con altri membri della famiglia per formare una unità funzionale completa.

ABCD1, ABCD2 e ABCD3 sono localizzati nelle membrane delimitanti i perossisomi ⁹ mentre, ABCD4 è stato identificato sulle membrane lisosomiali, e risulta coinvolto nel metabolismo della vitamina B12 ⁹⁵.

ABCD1

ABCD1 funge da trasportatore degli acidi grassi a catena molto lunga (VLCFA = *Very Long Chain Fatty Acid*) ⁹. Tra le oltre 600 mutazioni di ABCD1 riportate molte sono su base familiare ⁹⁶ e vengono trasmesse prevalentemente ai figli maschi, con modalità recessiva attraverso il cromosoma X materno (*X-ALD*). Mutazioni del gene *ABCD1* sono causa di una rara malattia genetica: l'Adrenoleucodistrofia (ALD), in cui si riscontrano profonde alterazioni del trasportatore perossisomiale ABCD1 ⁹⁶. Perdita della funzionalità di ABCD1 impedisce ai VLCFA di entrare all'interno dei perossisomi per essere sottoposti a β -ossidazione e, di conseguenza, tendono ad accumularsi all'interno della cellula ⁹. I principali organi colpiti sono: la mielina del sistema nervoso centrale, la corteccia surrenale e le cellule di Leyding, che nel tempo portano a perdita delle funzioni cognitive,

visive, motorie e conducono gradualmente l'individuo ad uno stato vegetativo irreversibile. Risultati terapeutici promettenti sono stati ottenuti mediante trattamento di paziente X-ALD con cellule staminali ematopoietiche provenienti da *ABCD1 wild type*, dimostrando una notevole attenuazione della demielinizzazione cerebrale ⁹⁷. Tuttavia, sono necessari ulteriori approfondimenti per valutare se di tale terapia possano beneficiare anche altri pazienti con forme cerebrali di X-ALD. Per quanto riguarda, invece, il trattamento della disfunzione surrenalica in pazienti ALD, è risultata efficace la terapia a base di steroidi. Ad oggi, non esiste un trattamento specifico per questa rara malattia.

Sottofamiglia G dei trasportatori ABC

Questa importante sottofamiglia dei trasportatori ABC è costituita da 5 proteine coinvolte nel trasporto lipidico di membrana: ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5, ABCG8. Si tratta di emi-trasportatori che si assemblano a formare omo/etero-dimeri.

Mutazioni dei geni che codificano per questi trasportatori inducono alterazioni dell'omeostasi del colesterolo e degli steroli vegetali, condizione alla base dell'eziopatogenesi di malattie come l'aterosclerosi e la sitosterolemia.

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 ^{25,26}. 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 ^{24,25,27,98}.

Il delicato ruolo di questo trasportatore è stato ampiamente dimostrato mediante studi su modelli cellulari murini. Essendo localizzato prevalentemente a livello dei macrofagi, degli epatociti, e delle cellule endoteliali, si è potuta constatare l'alterazione dell'omeostasi lipidica a livello di questi gruppi cellulari tramite l'utilizzo di topi transgenici, *knockout* o *knockdown* per *ABCG1*.

ABCG1 è, inoltre, direttamente coinvolto nella via del trasporto inverso del colesterolo (RCT).

Recenti indagini strutturali su questo omo-dimero hanno condotto alla identificazione di 5 residui di cisteina palmitoilati, presenti nella porzione N-terminale. La rimozione della palmitoilazione del residuo di Cys 311 è risultata deleteria per l'attività intrinseca di queste proteine di trasporto nell'efflusso del colesterolo cellulare ⁹⁹.

In modelli murini *ABCG1 knockout* o *knockdown* si è riscontrato accumulo lipidico a livello dei macrofagi e degli epatociti, nonché una marcata riduzione dell'RCT macrofagico *in vivo* ²⁸. Ciò confermerebbe la sua elevata espressione nei macrofagi, oltre che la sua importanza eziologica nei fenomeni aterogenici.

Per valutare il coinvolgimento del trasportatore ABCG1 espresso a livello macrofagico nella formazione delle placche aterosclerotiche, sono stati effettuati diversi esperimenti con topi *knockout* privi del recettore delle LDL (*Ldlr*^{-/-}). Ad oggi, il ruolo preciso di questo trasportatore nello sviluppo delle placche ateromatose rimane complesso. Nel 2006 diversi ricercatori hanno singolarmente studiato questo trasportatore modificando topi *Ldlr*^{-/-} mediante trapianto di midollo osseo proveniente da topi *ABCG1 knockout*: Out *et al.* hanno osservato un moderato incremento del rischio di insorgenza di aterosclerosi ¹⁰⁰, al contrario di Baldan *et al.* ¹⁰¹ e Ranaletta *et al.* ¹⁰². Baldan ha supposto, a spiegazione del risultato ottenuto, che ci sia in topi iperlipidemici un incremento dell'espressione di *ABCG1* e dei livelli di apoE; inoltre, ha riscontrato un incremento del fenomeno apoptotico a livello dei macrofagici in topi anche apoE^{-/-}, che spiegherebbe la riduzione delle lesioni aterosclerotiche ¹⁰¹ (come confermato anche da studi più recenti condotti da Seres ¹⁰³).

ABCG1, inoltre, sembra regolare l'efflusso del colesterolo dalle cellule endoteliali verso le HDL, contrastando così, una eventuale disfunzione endoteliale; infatti questo trasportatore sembrerebbe ridurre il colesterolo dalle caveole oltre che indurre un aumento dell'attività dell'NO sintasi endoteliale (eNOS) ¹⁰⁴.

ABCG1 è altamente espresso anche a livello dei granuli secretori delle cellule β pancreatiche dimostrando un ruolo cruciale anche nella secrezione dell'insulina ¹⁰⁵.

Il contemporaneo *knockout* di *ABCG1* e *ABCA1* in topi da esperimento ha dato prova dei combinati effetti protettivi di questi trasportatori non solo sull'insorgenza dell'aterosclerosi, ma anche nello sviluppo della leucocitosi. A dimostrazione di ciò, topi carenti di entrambi i trasportatori hanno sviluppato leucocitosi, suggerendo di conseguenza

che queste proteine siano altamente espresse anche a livello delle cellule staminali ematopoietiche e nelle cellule progenitrici multi-potenti ¹⁰⁶.

Infine, la contemporanea delezione di tali trasportatori ha gravemente inficiato l'efflusso del colesterolo cellulare, predisponendo questi organismi ad aterosclerosi precoce, indotta dal rapido incremento delle cellule schiumose. Ciò dimostra il simultaneo contributo di ABCG1 e ABCA1 nell'efflusso del colesterolo cellulare.

Infatti, mentre ABCA1 media il trasferimento del colesterolo e dei fosfolipidi delle membrane cellulari verso le apoA1 povere di lipidi per formare le HDL, ABCG1 provvede alla traslocazione del colesterolo dalle membrane direttamente sulle HDL neoformate. Questo meccanismo è stato recentemente dimostrato anche *in vitro* ^{27,107}. ABCA1 trasferisce il colesterolo direttamente su accettori esocellulari; al contrario il trasferimento di colesterolo verso HDL ABCG1 mediato, non avviene tramite contatto diretto tra il trasportatore e HDL ma in due passaggi: prima ABCG1 ridistribuisce il colesterolo sul foglietto esterno della membrana plasmatica, poi avviene il caricamento su HDL ²⁵.

Il colesterolo mobilitato da ABCG1, in realtà, è di derivazione endocellulare: è stato ipotizzato che ABCG1 medi il caricamento degli steroli sulle membrane delle vescicole endocellulari e degli endosomi e che questi poi vadano a fondersi con la membrana cellulare per arricchirla in lipidi ¹⁰.

In conclusione questi studi hanno ampiamente dimostrato che i trasportatori ABCA1 e ABCG1 promuovono l'RCT macrofagico *in vivo* ²⁸. Dall'analisi complessiva dei risultati ottenuti si può affermare che la mancanza di ABCG1 è un fattore di rischio per la rottura della placca aterosclerotica; da ciò si deduce la sua importanza fisiologica su più livelli come fattore anti-aterogenico.

ABCG2

Questa proteina di trasporto non ha dimostrato particolare coinvolgimento nella traslocazione degli steroli, bensì nella multi-farmaco resistenza e nel trasporto dell'urato

¹⁰⁸.

ABCG4

ABCG4 è limitatamente espresso nella retina e nel cervello ¹⁰⁹ e presenta elevata analogia amminoacidica e tissutale con ABCG1. In entrambi i casi, il trasferimento del colesterolo avviene esclusivamente verso HDL ^{24,27}.

Diversi esperimenti sono stati condotti per comprendere il ruolo di questo trasportatore a livello cerebrale.

La delezione dei geni che codificano per ABCG1 e ABCG4 nei topi induce un aumento cerebrale di lanosterolo e di desmosterolo, ma non di colesterolo. ABCG1, infatti, regola l'efflusso di colesterolo in uscita dagli astrociti, mentre ABCG4 dai neuroni.

Quindi, il trasporto del colesterolo a livello cerebrale mediato da ABCG1/G4 dipende dal tipo di cellula ¹¹⁰.

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.

Negli epatociti regolano l'efflusso di colesterolo e degli steroli vegetali all'interno della bile; negli enterociti, invece, riducono l'assorbimento di questi lipidi provenienti dall'alimentazione ¹⁸. L'assorbimento dei grassi alimentari è limitato alla prima porzione dell'intestino (tenue).

Mutazioni dei geni codificanti per questi emi-trasportatori sono causa di una grave malattia genetica autosomica recessiva, la sitosterolemia, caratterizzata da alterazioni nell'assorbimento e nell'efflusso del colesterolo e degli steroli vegetali che tendono così ad accumularsi nei tessuti e nel sangue, inducendo il precoce sviluppo del fenomeno aterogenico ¹¹¹.

L'induzione dell'aterosclerosi coronarica precoce è un fattore che accomuna la sitosterolemia con l'ipercolesterolemia familiare (FI) ¹¹². Una importante differenza sta però nel fatto che individui affetti da sitosterolemia presentano un notevole incremento

plasmatico di steroli vegetali come il sitosterolo, il campesterolo e lo stigmasterolo, ma al contrario, i valori ematici del colesterolo non sembrano particolarmente elevati.

Ad ogni modo, è possibile sfruttare la modulazione di questo etero-dimero nel trattamento dell'FI. Uno studio, infatti, ha messo a confronto 2 gruppi di topi ipercolesterolemici *knockout* per il recettore delle LDL (*Ldlr^{-/-}*): un gruppo di controllo e un gruppo in cui è stato sovraespresso l'etero-dimero ABCG5/G8. Quest'ultimo ha dimostrato una significativa riduzione del colesterolo plasmatico e, quindi, dell'insorgenza dell'aterosclerosi. Al contrario, i topi di controllo hanno manifestato la precoce comparsa di lesioni aterosclerotiche ¹¹³.

È stato dimostrato che la mancanza dell'etero-dimero ABCG5/G8, in topi da esperimento, produca una notevole riduzione dell'efflusso del colesterolo nella bile e di conseguenza un incremento del suo livello ematico ¹¹⁴. Al contrario, topi che sovraesprimono questo etero-dimero funzionale promuovono la secrezione del colesterolo nella bile, riducendo così la frazione di colesterolo assorbita con la dieta ¹¹⁵.

Sia il colesterolo che il sitosterolo rappresentano i substrati "diretti" del trasportatore etero-dimerico ¹¹⁶. È stato inoltre suggerito che gli acidi biliari si comporterebbero come accettori degli steroli nel trasporto ABCG5/G8 mediato e che gli stessi andrebbero direttamente a stimolare l'attività ATPasica dell'etero-dimero ¹¹⁷. Le apolipoproteine, a differenza degli acidi biliari, non rappresenterebbero dei siti accettori per il colesterolo per questi trasportatori ¹¹⁸. Recenti studi ¹¹⁹ hanno inoltre dimostrato una stretta correlazione tra l'attività di questi trasportatori e il metabolismo dei trigliceridi. Topi *knockout ABCG5/G8* hanno presentato un aumento dei livelli plasmatici dei trigliceridi rispetto ai topi *wild type*, indotto da una alterazione del catabolismo e dell'escrezione epatica ed intestinale di tali substrati lipidici.

Anche per ABCG5 sono stati identificati dei siti citoplasmatici palmitoilati, la cui mutazione però, a differenza di quanto osservato per ABCG1 non sembrerebbe compromettere la funzionalità del trasportatore etero-dimerico ABCG5/G8 nell'efflusso degli steroli verso la bile. Ciò dimostrerebbe l'importanza esclusiva della porzione C-terminale dell'emi-trasportatore ABCG8 nell'attività intrinseca di trasporto lipidico nell'ambito dell'etero-dimero funzionale ABCG5/G8.

CONCLUSIONI

La superfamiglia dei trasportatori ABC umani è attivamente coinvolta nel mantenimento dell'omeostasi lipidica cellulare.

Proteine difettose sono state associate all'insorgenza di numerose malattie umane. Alla base di questi disordini è stato identificato un aberrante accumulo di composti lipidici all'interno dell'organismo. A seconda della localizzazione cellulare e/o subcellulare di tali trasportatori e del tipo di substrato da essi veicolato, si avranno disordini lipidici di varia entità e gravità, in grado di compromettere fortemente non solo la corretta funzionalità cellulare, soprattutto a livello delle membrane, ma anche l'omeostasi di un intero tessuto e dell'organismo in generale.

Il principale substrato coinvolto in questi disordini metabolici si è dimostrato essere, indubbiamente, il colesterolo. Diversi studi hanno infatti chiarito l'importanza di alcune proteine ABC (ad esempio ABCA1, ABCA2, ABCG1 e l'eterodimero ABCG5/G8) nel traffico di questo sterolo attraverso le membrane. Mutazioni a carico dei geni codificanti per queste proteine transmembrana sono state ricondotte a gravi patologie quali l'Aterosclerosi, il Morbo di Tangier e la malattia di Alzheimer.

Lo studio sul movimento del colesterolo e degli altri lipidi attraverso le membrane biologiche è in crescente evoluzione e si ritiene necessario per una maggiore comprensione dell'eziopatogenesi dei disordini associati a difetti funzionali di queste proteine.

Oltre a quelle suddette, altre importanti malattie sono state correlate a difetti nel trasporto lipidico ABC mediato, quali, ad esempio, la Sitosterolemia, la Colestasi Intraepatica Progressiva Familiare di tipo 2 e 3 e alcune malattie rare come l'Ittiosi Arlecchino e l'Adrenoleucodistrofia.

Pertanto, una maggiore comprensione del meccanismo del trasporto lipidico ABC mediato, e degli specifici substrati coinvolti, è essenziale per lo sviluppo di nuovi agenti terapeutici da impiegare nel trattamento di questi gravi disordini genetici.

Tuttavia, la nostra conoscenza a riguardo rimane ancora sommaria e incompleta. Sono dunque necessarie ulteriori ricerche per determinare le precise funzioni fisiologiche di ciascun trasportatore ABC, al fine di migliorare e accelerare lo sviluppo di nuove terapie farmacologiche atte a prevenire, trattare o curare i disordini lipidici ad essi correlati.

BIBLIOGRAFIA

1. Tarling E. J., de Aguiar Vallim T. Q., Edwards P. A., (2013) Role of ABC transporters in lipid transport and human disease. *Trends Endocrinol. Metab.* 24, 342-350.
2. Li G., Gu H. M., Zhang D. W., (2013) ATP-binding cassette transporters and cholesterol translocation. *IUBMB Life* 65, 505-512.
3. Chalal M. et al. (2012) Reconstitution of glucosylceramide flip-flop across endoplasmic reticulum: implications for mechanism of glycosphingolipid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 287, 15523–15532.
4. Van Meer G. (2011) Dynamic transbilayer lipid asymmetry. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, pii: a004671.
5. Leventis P. A., and Grinstein S. (2010) The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annu. Rev. Biophys.* 39, 407–427.
6. Muthusamy B-P. et al. (2009) Linking phospholipid flippases to vesicle-mediated protein transport. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 612–619.
7. Pohl A. et al. (2005) Function of prokaryotic and eukaryotic ABC proteins in lipid transport. *Biochim. Biophys. Acta* 1733, 29–52.
8. Nagao K. et al. (2010) Lipid outward translocation by ABC proteins. *FEBS Lett.* 584, 2717–2723.
9. Kemp S. et al. (2011) Mammalian peroxisomal ABC transporters: from endogenous substrates to pathology and clinical significance. *Br. J. Pharmacol.* 164, 1753–1766.
10. Tarling E. J. and Edwards P. A. (2011) ATP binding cassette transporter G1 (ABCG1) is an intracellular sterol transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 19719–19724.
11. Tarr P. T. and Edwards, P. A. (2008) ABCG1 and ABCG4 are coexpressed in neurons and astrocytes of the CNS and regulate cholesterol homeostasis through SREBP-2. *J. Lipid Res.* 49, 169–182.
12. Sakai K. et al. (2007) Localization of ABCA12 from Golgi apparatus to lamellar granules in human upper epidermal keratinocytes. *Exp. Dermatol.* 16, 920–926.
13. Whitsett J. A. et al. (2010) Alveolar surfactant homeostasis and the pathogenesis of pulmonary disease. *Annu. Rev. Med.* 61, 105–119.
14. Ile K.E. et al. (2004) Identification of a novel first exon of the human ABCA2

- transporter gene encoding a unique N-terminus. *Biochim. Biophys. Acta* 1678, 22–32.
15. Kubo Y. et al. (2005) ABCA5 resides in lysosomes, and ABCA5 knockout mice develop lysosomal disease-like symptoms. *Mol. Cell. Biol.* 25, 4138–4149.
 16. Brooks-Wilson A., Marcil M., Clee S. M., Zhang L. H., Roomp K., et al. (1999) Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat. Genet.* 22, 336–345.
 17. Orso E., Broccardo C., Kaminski W. E., Bottcher A., Liebisch G., et al. (2000) Transport of lipids from golgi to plasma membrane is defective in tangier disease patients and Abc1-deficient mice. *Nat. Genet.* 24, 192–196.
 18. Berge K. E., Tian H., Graf G. A., Yu L., Grishin N. V., et al. (2000) Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* 290, 1771–1775.
 19. Hollingworth P., Harold D., Sims R., Gerrish A., Lambert J. C., et al. (2011) Common variants at ABCA7, MS4A6A/ MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 43, 429–435.
 20. Rosenson R. S., Brewer H. B. Jr., Davidson W. S., Fayad Z. A., Fuster V., et al. (2012) Cholesterol efflux and athero-protection: advancing the concept of reverse cholesterol transport. *Circulation* 125, 1905–1919.
 21. McNeish J., Aiello R. J., Guyot D., Turi T., Gabel C., et al. (2000) High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 4245–4250.
 22. Singaraja R. R., Fievet C., Castro G., James E. R., Hennuyer N., et al. (2002) Increased ABCA1 activity protects against atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 110, 35–42.
 23. Singaraja R. R., Van Eck M., Bissada N., Zimetti F., Collins H. L., et al. (2006) Both hepatic and extrahepatic ABCA1 have discrete and essential functions in the maintenance of plasma high-density lipoprotein cholesterol levels in vivo. *Circulation* 114, 1301–1309.
 24. Wang N., Lan D., Chen W., Matsuura F., and Tall A. R. (2004) ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 9774–9779.
 25. Vaughan A. M., and Oram J. F. (2005) ABCG1 redistributes cell cholesterol to domains removable by high density lipoprotein but not by lipid-depleted

- apolipoproteins. *J. Biol. Chem.* 280, 30150–30157.
26. Kobayashi A., Takanezawa Y., Hirata T., Shimizu Y., Misasa K., et al. (2006) Efflux of sphingomyelin, cholesterol, and phosphatidylcholine by ABCG1. *J. Lipid Res.* 47, 1791–1802.
 27. Vaughan A. M., and Oram J. F. (2006) ABCA1 and ABCG1 or ABCG4 act sequentially to remove cellular cholesterol and generate cholesterol-rich HDL. *J. Lipid Res.* 47, 2433–2443.
 28. Wang X., Collins H. L., Ranalletta M., Fuki I. V., Billheimer J. T., et al. (2007) Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J. Clin. Invest.* 117, 2216–2224.
 29. Piehler A. P., Özcürümez M., and Kaminski W. E. (2012) A-subclass ATP-binding cassette proteins in brain lipid homeostasis and neurodegeneration. *Front. Psychiatry* 3, 17.
 30. Coleman J. A., Quazi F., and Molday R. S. (2013) Mammalian P4-ATPases and ABC transporters and their role in phospholipid transport. *Biochim. Biophys. Acta* 1831, 555–574.
 31. Bungert S., Molday L. L., and Molday R. S. (2001) Membrane topology of the ATP binding cassette transporter ABCR and its relationship to ABC1 and related ABCA transporters: identification of *N*-linked glycosylation sites. *J. Biol. Chem.* 276, 23539–23546.
 32. Oram J. F., and Vaughan A. M. (2006) ATP-binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease. *Circ. Res.* 99, 1031–1043.
 33. Vedhachalam C., et al. (2007) Mechanism of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular lipid efflux to apolipoprotein A-1 and formation of high density lipoprotein particles. *J. Biol. Chem.* 282, 25123–25130.
 34. Cuchel M., et al. (2010) Pathways by which reconstituted high-density lipoprotein mobilizes free cholesterol from whole body and from macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 526–532.
 35. Vaughan A. M., and Oram J. F. (2003) ABCA1 redistributes membrane cholesterol independent of apolipoprotein interactions. *J. Lipid Res.* 44, 1373–1380.
 36. Takahashi Y., and Smith J. D. (1999) Cholesterol efflux to apolipoprotein AI involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11358–11363.
 37. Chen W., Sun Y., Welch C., Gorelik A., Leventhal A. R., et al. (2001) Preferential

- ATP-binding cassette transporter A1-mediated cholesterol efflux from late endosomes/lysosomes. *J. Biol. Chem.* 276, 43564–43569.
38. Smith J. D., Le Goff W., Settle M., Brubaker G., Waelde C., Horwitz A., and Oda M. N. (2004) ABCA1 mediates concurrent cholesterol and phospholipid efflux to apolipoprotein A-I. *J. Lipid Res.* 45, 635– 644.
 39. Wang N., Silver D. L., Thiele C., and Tall A. R. (2001) ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) functions as a cholesterol efflux regulatory protein. *J. Biol. Chem.* 276, 23742–23747.
 40. Fielding P. E., Nagao K., Hakamata H., Chimini G., and Fielding C. J. (2000) A two-step mechanism for free cholesterol and phospholipid efflux from human vascular cells to apolipoprotein A-1. *Biochemistry* 39, 14113–14120.
 41. Quazi F., Molday R. S., (2013) Differential phospholipid substrates and directional transport by ATP-binding cassette proteins ABCA1, ABCA7, and ABCA4 and disease-causing mutants. *J. Biol. Chem.* 288, 34414-34426
 42. Alharbi K. K., Khan I. A., Al-Daghri N. M., Munshi A., Sharma V., Mohammed A. K., Wani K. A., Al-Sheikh Y. A., Al-Nbaheen M. S., Ansari M. G., Syed R., (2013) ABCA1 C69T gene polymorphism and risk of type 2 diabetes mellitus in a Saudi population. *J. Biosci.* 38, 893-897.
 43. Williams K. J., Tabas I. (1995) The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 15, 551–561.
 44. Webb N. R., Moore K. J., (2007) Macrophage-derived foam cells in atherosclerosis: lessons from murine models and implications for therapy. *Curr Drug Targets* 8, 1249–1263.
 45. Matsumoto K., Hirano K., Nozaki S., Takamoto A., Nishida M., Nakagawa Toyama Y., Janabi M. Y., Ohya T., Yamashita S., Matsuzawa Y. (2000) Expression of macrophage (Mphi) scavenger receptor, CD36, in cultured human aortic smooth muscle cells in association with expression of peroxisome proliferator activated receptor-gamma, which regulates gain of Mphi-like phenotype in vitro, and its implication in atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 1027–1032.
 46. Wagsater D., Olofsson P. S., Norgren L., Stenberg B., Sirsjo A. (2004) The chemokine and scavenger receptor CXCL16/SR-PSOX is expressed in human vascular smooth muscle cells and is induced by interferon gamma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325, 1187–1193.

47. Lim H. J., Lee S., Lee K. S., Park J. H., Jang Y., Lee E. J., Park H. Y. (2006) PPARgamma activation induces CD36 expression and stimulates foam cell like changes in rVSMCs. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 80, 165–174.
48. Ruan X. Z., Moorhead J. F., Tao J.L., Ma K. L., Wheeler D. C., Powis S. H., Varghese Z. (2006) Mechanisms of dysregulation of low-density lipoprotein receptor expression in vascular smooth muscle cells by inflammatory cytokines. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 1150–1155.
49. Li H., Freeman M. W., Libby P. (1995) Regulation of smooth muscle cell scavenger receptor expression in vivo by atherogenic diets and in vitro by cytokines. *J. Clin. Invest.* 95, 122–133.
50. Stary H. C., Blankenhorn D. H., Chandler A. B., Glagov S., Insull W. Jr., Richardson M., Rosenfeld M. E., Schaffer S. A., Schwartz C. J., Wagner W. D., et al (1992) A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb* 12, 120–134.
51. Nakashima Y., Chen Y. X., Kinukawa N., Sueishi K. (2002) Distributions of diffuse intimal thickening in human arteries: preferential expression in atherosclerosis-prone arteries from an early age. *Virchows Arch.* 441, 279–288.
52. Rivera J., Walduck A. K., Thomas S. R., Glaros E. N., Hooker E. U., Guida E., Sobey C. G., Drummond G. R., (2013) Accumulation of serum lipids by vascular smooth muscle cells involves a macropinocytosis-like uptake pathway and is associated with the downregulation of the ATP-binding cassette transporter A1. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 386, 1081-1093.
53. Yvan-Charvet L., Wang N., Tall A. R. (2010) Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30, 139–143.
54. Kerr M. C., Teasdale R. D. (2009) Defining macropinocytosis. *Traffic* 10, 364–371
55. Ergen A., Isbir S., Tekeli A., and Isbir T. (2008) Investigation of ABCA1 C69T and G-191C polymorphisms in coronary artery disease. *In Vivo* 22, 187–190.
56. Daimon M., Ji G., Saitoh T., Oizumi T., Tominaga M., Nakamura T., Ishii K., Matsuura T., et al. (2003) Large scale search of SNPs for type 2 DM susceptibility genes in a Japanese population. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302, 751–758.
57. Brunham L. R., Kruit J. K., Pape T. D., Timmins J. M., Reuwer A. Q., Vasanji Z., Marsh B. J., Rodrigues B., et al. (2007) ABCA1 influences insulin secretion,

- glucose homeostasis and response to thiazolidinedione treatment. *Nat. Med.* 13, 340–347.
58. Mooradian A. D. (2009) Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 5, 150–159.
 59. Salinas C. A., Cruz-Bautista I., Mehta R., Villarreal-Molina M. T., Perez F. J., Tusie-Luna M. T., and Canizales-Quinteros S. (2007) The ATP binding cassette transporter subfamily A member 1 (ABCA1) and type 2 diabetes: an association beyond HDL cholesterol. *Curr. Diabetes Rev.* 3, 264–267.
 60. Kim W. S., Guillemin G. J., Glaros E. N., Lim C. K., Garner B., (2006) Quantitation of ATP-binding cassette subfamily-A transporter gene expression in primary human brain cells. *Neuroreport* 17, 891–896.
 61. Vulevic B., Chen Z., Boyd J. T., Davis W. Jr., Walsh E. S., et al. (2001) Cloning and characterization of human adenosine 5' -triphosphate-binding cassette, subfamily A, transporter 2 (ABCA2). *Cancer Res.* 61, 3339–3347.
 62. Mack J. T., Beljanski V., Soulika A. M., Townsend D. M., Brown C. B., Davis W., Tew K. D., (2007) “Skittish” Abca2 knockout mice display tremor, hyperactivity, and abnormal myelin ultrastructure in the central nervous system. *Mol. Cell. Biol.* 27, 44–53.
 63. Sakai H., Tanaka Y., Tanaka M., Ban N., Yamada K., Matsumura Y., Watanabe D., Sasaki M., Kita T., Inagaki N., (2007) ABCA2 deficiency results in abnormal sphingolipid metabolism in mouse brain, *J. Biol. Chem.* 282, 19692–19699.
 64. Calpe-Berdiel L., Zhao Y., de Graauw M., Ye D., van Santbrink P.J., Mommaas A. M., Foks A., Bot M., Meurs I., Kuiper J., Mack J. T., Van Eck M., Tew K. D., van Berkel T. J., (2012) Macrophage ABCA2 deletion modulates intracellular cholesterol deposition, affects macrophage apoptosis, and decreases early atherosclerosis in LDL receptor knockout mice. *Atherosclerosis* 223, 332–341.
 65. S. Mace, E. Cousin, S. Ricard, E. Genin, E. Spanakis, C. Lafargue-Soubigou, B. Genin, R. Fournel, S. Roche, G. Haussy, F. Massey, S. Soubigou, G. Brefort, P. Benoit, A. Brice, D. Champion, M. Hollis, L. Pradier, J. Benavides, J.F. Deleuze, ABCA2 is a strong genetic risk factor for early-onset Alzheimer's disease, *Neurobiol. Dis.* 18, (2005) 119–125.
 66. V. Michaki, F. X. Guix, K. Vennekens, S. Munck, C. Dingwall, J. B. Davis, D. M. Townsend, K. D. Tew, F. Feiguin, B. De Strooper, C. G. Dotti, T. Wahle, Down-

- regulation of the ATP-binding cassette transporter 2 (*Abca2*) reduces amyloid-beta production by altering nicastrin maturation and intracellular localization, *J. Biol. Chem.* 287, (2011) 1100–1111.
67. Kaminski W. E. et al. (2001) Complete coding sequence, promoter region, and genomic structure of the human *ABCA2* gene and evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 249–258.
 68. Hozoji M. et al. (2009) Formation of two intramolecular disulfide bonds is necessary for ApoA-I-dependent cholesterol efflux mediated by *ABCA1*. *J. Biol. Chem.* 284, 11293–11300.
 69. Ubhi K., and Masliah E. (2013) Alzheimer's disease: recent advances and future perspectives. *J. Alzheimers Dis.* 33, Suppl. 1, S185–S194.
 70. Davis W. Jr., (2014) The ATP-binding cassette transporter-2 (*ABCA2*) regulates esterification of plasma membrane cholesterol by modulation of sphingolipid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1841, 168-179.
 71. Porn M. I., Slotte J. P., (1990) Reversible effects of sphingomyelin degradation on cholesterol distribution and metabolism in fibroblasts and transformed neuroblastoma cells. *Biochem. J.* 271, 121–126.
 72. Bai J., Pagano R. E., (1997) Measurement of spontaneous transfer and transbilayer movement of BODIPY-labeled lipids in lipid vesicles. *Biochemistry* 36, 8840–8848.
 73. Milhas D., Clarke C. J., Hannun Y. A., (2010) Sphingomyelin metabolism at the plasma membrane: implications for bioactive sphingolipids, *FEBS Lett.* 584, 1887–1894.
 74. Hayes D. J., et al. (2012) *ABCA3* transporter deficiency. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 186, 807.
 75. Illing M., Molday L. L., and Molday R. S. (1997) The 220-kDa rim protein of retinal rod outer segments is a member of the ABC transporter superfamily. *J. Biol. Chem.* 272, 10303–10310.
 76. Tsybovsky Y., et al. (2010) The ATP-binding cassette transporter *ABCA4*: structural and functional properties and role in retinal disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 703, 105–125.
 77. Molday R. S., Zhong M., and Quazi F. (2009) The role of the photoreceptor ABC transporter *ABCA4* in lipid transport and Stargardt macular degeneration. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 573–583.

78. Biswas-Fiss E. E., et al. (2012) Retinoid binding properties of nucleotide binding domain 1 of the Stargardt disease-associated ABC transporter, ABCA4. *J. Biol. Chem.* 287, 44097-44107.
79. Weng J., Mata N. L., Azarian S. M., Tzekov R. T., Birch D. G., and Travis G. H. (1999) Insights into the function of Rim protein in photoreceptors and etiology of Stargardt's disease from the phenotype in *abcr* knockout mice. *Cell.* 98, 13–23.
80. McNeish J., Aiello R. J., Guyot D., Turi T., Gabel C., Aldinger C., Hoppe K. L., Roach M. L., Royer L. J., de Wet J., Broccardo C., Chimini G., and Francone O. L. (2000) 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.* 97, 4245–4250.
81. Abe-Dohmae S., Ikeda Y., Matsuo M., Hayashi M., Okuhira K., et al. (2004) Human ABCA7 supports apolipoprotein-mediated release of cellular cholesterol and phospholipid to generate high density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 279, 604–611.
82. Abe-Dohmae S., Ueda K., and Yokoyama S. (2006) ABCA7, a molecule with unknown function. *FEBS Lett.* 580, 1178–1182.
83. Kim W. S., Fitzgerald M. L., Kang K., Okuhira K., Bell S. A., et al. (2005) *Abca7* null mice retain normal macrophage phosphatidylcholine and cholesterol efflux activity despite alterations in adipose mass and serum cholesterol levels. *J. Biol. Chem.* 280, 3989–3995.
84. Meurs I., Calpe-Berdiel L., Habets K. L., Zhao Y., Korporaal S. J., et al. (2012) Effects of deletion of macrophage ABCA7 on lipid metabolism and the development of atherosclerosis in the presence and absence of ABCA1. *PLoS One* 7, e30984.
85. Logge W., Cheng D., Chesworth R., Bhatia S., Garner B., et al. (2012) Role of *Abca7* in mouse behaviours relevant to neurodegenerative diseases. *PLoS One* 7, e45959.
86. Takahashi K., Kimura Y., Kioka N., Matsuo M., and Ueda K. (2006) Purification and ATPase activity of human ABCA1. *J. Biol. Chem.* 281, 10760–10768.
87. Rajpopat S. et al. (2011) Harlequin ichthyosis: a review of clinical and molecular findings in 45 cases. *Arch. Dermatol.* 147, 681–686.
88. Sakai K. et al. (2007) Localization of ABCA12 from Golgi apparatus to lamellar granules in human upper epidermal keratinocytes. *Exp. Dermatol.* 16, 920–926.

89. Scott C. A. et al. (2013) Harlequin ichthyosis: ABCA12 mutations underlie defective lipid transport, reduced protease regulation and skin-barrier dysfunction. *Cell Tissue Res.* 351, 281–288.
90. Chen K.G., and Sikic B.I. (2012) Molecular pathways: regulation and therapeutic implications of multidrug resistance. *Clin. Cancer Res.* 18, 1863–1869.
91. Nones K. et al. (2009) Multidrug resistance gene deficient (Mdr1a^{-/-}) mice have an altered caecal microbiota that precedes the onset of intestinal inflammation. *J. Appl. Microbiol.* 107, 557–566.
92. Nicolaou M., et al. (2012) Canalicular ABC transporters and liver disease. *J. Pathol.* 226, 300–315.
93. Vallim T. Q. d. A. et al. (2013) Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. *Cell Metab.* 17, 657-669.
94. Lammert F., et al. (2004) Spontaneous cholecysto- and hepatolithiasis in Mdr2^{-/-} mice: a model for low phospholipid-associated cholelithiasis. *Hepatology* 39, 117–128.
95. Coelho D., et al. (2012) Mutations in ABCD4 cause a new inborn error of vitamin B12 metabolism. *Nat. Genet.* 44, 1152–1155.
96. Kemp S., et al. (2012) X-linked adrenoleukodystrophy: Clinical, metabolic, genetic and pathophysiological aspects. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 1465–1474.
97. Cartier N., et al. (2012) Lentiviral hematopoietic cell gene therapy for X-Linked adrenoleukodystrophy. *Methods Enzymol.* 507, 187-198.
98. Gao X., Gu H., Li G., Rye K. A., and Zhang D. W. (2012) Identification of an amino acid residue in ATP-binding cassette transport G1 critical for mediating cholesterol efflux. *Biochim. Biophys. Acta* 1821, 552–559.
99. Gu H. M., Li G., Gao X., Berthiaume L. G., and Zhang D. W. (2013) Characterization of palmitoylation of ATP binding cassette transporter G1: effect on protein trafficking and function. *Biochim Biophys Acta* 1831, 1067-1078.
100. Out R., Hoekstra M., Hildebrand R. B., Kruit J. K., Meurs I., et al. (2006) Macrophage ABCG1 deletion disrupts lipid homeostasis in alveolar macrophages and moderately influences atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 2295–2300.
101. Baldan A., Pei L., Lee R., Tarr P., Tangirala R. K., et al. (2006) Impaired development of atherosclerosis in hyperlipidemic Ldlr^{-/-} and ApoE^{-/-} mice

- transplanted with *Abcg1*^{-/-} bone marrow. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 2301–2307.
102. Ranalletta M., Wang N., Han S., Yvan-Charvet L., Welch C., et al. (2006) Decreased atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice transplanted with *Abcg1*^{-/-} bone marrow. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 2308–2315.
 103. Seres L., Cserepes J., Elkind N. B., Torocsik D., Nagy L., et al. (2008) Functional ABCG1 expression induces apoptosis in macrophages and other cell types. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 2378–2387.
 104. Terasaka N., Westerterp M., Koetsveld J., Fernandez- Hernando C., Yvan-Charvet L., et al. (2010) ATP-binding cassette transporter G1 and high-density lipoprotein promote endothelial NO synthesis through a decrease in the interaction of caveolin-1 and endothelial NO synthase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 2219–2225.
 105. Sturek J. M., Castle J. D., Trace A. P., Page L. C., Castle A. M., et al. (2010) An intracellular role for ABCG1-mediated cholesterol transport in the regulated secretory pathway of mouse pancreatic beta cells. *J. Clin. Invest.* 120, 2575–2589.
 106. Yvan-Charvet L., Pagler T., Gautier E. L., Avagyan S., Siry R. L., et al. (2010) ATP-binding cassette transporters and HDL suppress hematopoietic stem cell proliferation. *Science* 328, 1689–1693.
 107. Gelissen I. C., Harris M., Rye K. A., Quinn C., Brown A. J., et al. (2006) ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 534–540.
 108. Moitra K., and Dean M. (2011) Evolution of ABC transporters by gene duplication and their role in human disease. *Biol. Chem.* 392, 29–37.
 109. Wang N., Yvan-Charvet L., Lutjohann D., Mulder M., Vanmierlo T., et al. (2008) ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cholesterol and desmosterol efflux to HDL and regulate sterol accumulation in the brain. *Faseb J.* 22, 1073–1082.
 110. Chen J., Zhang X., Kusumo H., Costa L. G., and Guizzetti M. (2012) Cholesterol efflux is differentially regulated in neurons and astrocytes: implications for brain cholesterol homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta* 1831, 263–275.
 111. Berge K. E., et al. (2000) Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* 290, 1771–1775.
 112. Fitzgerald M. L., et al. (2010) ABC transporters, atherosclerosis and inflammation.

- Atherosclerosis 211, 361–370.
113. Wilund K. R., et al. (2004) High-level expression of ABCG5 and ABCG8 attenuates diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in *Ldlr*^{-/-} mice. *J. Lipid Res.* 45, 1429–1436.
 114. Yu L., Hammer R. E., Li-Hawkins J., Von Bergmann K., Lutjohann D., et al. (2002) Disruption of *Abcg5* and *Abcg8* in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 16237–16242.
 115. Yu L., Li-Hawkins J., Hammer R. E., Berge K. E., Horton J. D., et al. (2002) Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J. Clin. Invest.* 110, 671–680.
 116. Wang J., Zhang D. W., Lei Y., Xu F., Cohen J. C., et al. (2008) Purification and reconstitution of sterol transfer by native mouse ABCG5 and ABCG8. *Biochemistry* 47, 5194–5204.
 117. Johnson B. J., Lee J. Y., Pickert A., and Urbatsch I. L. (2010) Bile acids stimulate ATP hydrolysis in the purified cholesterol transporter ABCG5/G8. *Biochemistry* 49, 3403–3411.
 118. Vrins C., Vink E., Vandenberghe K. E., Frijters R., Seppen J., et al. (2007) The sterol transporting heterodimer ABCG5/ABCG8 requires bile salts to mediate cholesterol efflux. *FEBS Lett.* 581, 4616–4620.
 119. Mendez-Gonzalez J., Julve J., Rotllan N., Llaverias G., Blanco-Vaca F., et al. (2011) ATP-binding cassette G5/G8 deficiency causes hypertriglyceridemia by affecting multiple metabolic pathways. *Biochim. Biophys. Acta* 1811, 1186–1193.