



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di Ricerca in Farmacologia e Tossicologia Sperimentali

XX ciclo

---

**APPROCCI FARMACOLOGICI  
PER LA MODULAZIONE  
DEL  
TRASPORTO INVERSO DEL COLESTEROLO**

Tesi di Dottorato di:  
FRANCESCO POTI'

Coordinatore:

Chiar.ma Prof.ssa MARIANNINA IMPICCIATORE

Tutore:

Chiar.mo Prof. FRANCO BERNINI

Triennio Accademico 2005-2007

# INDICE

<b><i>Introduzione</i></b>	5
<b><u>Premessa</u></b>	6
<i>Aterosclerosi e malattie cardiovascolari: aspetti epidemiologici e socio-economici</i>	
<b><u>Basi patologiche dell'aterosclerosi</u></b>	8
<i>Aspetti generali</i>	8
<i>Aspetti storici</i>	16
<i>Aterosclerosi malattia multifattoriale: infiammazione, dislipidemia</i>	18
<u>Aterosclerosi ed infiammazione</u>	18
<u>Lipidi e dislipidemia</u>	20
<i>Metabolismo lipoproteico in vivo: una panoramica</i>	24
<u>Via esogena</u>	25
<u>Via endogena</u>	26
<u>HDL e trasporto inverso del colesterolo</u>	28
<b><u>Trasporto inverso del colesterolo</u></b>	37
<i>Efflusso di colesterolo</i>	39
<u>Diffusione acquosa</u>	39
<u>SR-BI</u>	40
<u>ABC-trasportatori: ABCA1</u>	42
<u>Altri ABC-trasportatori (1): ABCG1</u>	54
<u>Altri ABC-trasportatori (2): ABCG5/G8</u>	56
<i>Le altre tappe del trasporto inverso del colesterolo</i>	59
<b><u>Modulazione del trasporto inverso del colesterolo</u></b>	61
<i>Le statine</i>	63
<u>Chimica e farmacocinetica</u>	64
<u>Farmacodinamica e studi clinici</u>	65

<u>Effetti pleiotropici</u>	67
<u>Effetti collaterali ed interazioni</u>	70
<u>Statine ed efflusso cellulare di colesterolo</u>	71
<b><i>Il sistema LXR</i></b>	72
<u>Attivazione del recettore</u>	73
<u>Metabolismo del colesterolo e delle lipoproteine</u>	75
<u>Lipogenesi</u>	76
<u>LXR ed aterosclerosi</u>	76
<u>Aspetti terapeutici degli agonisti LXR</u>	77
<b><i>Scopo della ricerca</i></b>	81
<b><i>Materiali e metodi</i></b>	86
<b><u>Manipolazione delle colture cellulari</u></b>	86
<i>Caratteri generali</i>	86
<i>Reagenti</i>	86
<b><u>Sub-coltivazione e semina di linee cellulari</u></b>	89
<b><u>Valutazione dell'efflusso di colesterolo dalla cellula</u></b>	90
<b><u>Valutazione dell'efflusso di fosfolipidi dalla cellula</u></b>	91
<b><u>Western Blotting</u></b>	91
<b><u>Real Time RT-PCR</u></b>	92
<b><u>Analisi statistica</u></b>	92
<b><u>Valutazione del trasporto inverso del colesterolo <i>in vivo</i></u></b>	92
<i>Allestimento di colture in sospensione di macrofagi J774</i>	92
<i>Quantificazione dell'RCT in vivo</i>	93
<i>Estrazione del colesterolo e degli acidi biliari fecali</i>	93
<i>Estrazione dei tessuti e degli organi</i>	94
<i>Analisi del profilo lipidico del plasma</i>	94

<i>Elettroforesi bidimensionale (“2D gel electrophoresis”)</i>	94
<b><i>Risultati</i></b>	96
<i>Modulazione della funzionalità della proteina ABCA1 da parte delle statine nei macrofagi</i>	98
<i>Modulazione del RCT attraverso la stimolazione farmacologica del sistema LXR/RXR</i>	107
<b><i>Discussione</i></b>	115
<b><i>Bibliografia</i></b>	122

# *Introduzione*

## Premessa

### *Aterosclerosi e malattie cardiovascolari: aspetti epidemiologici e socio-economici*

L'aterosclerosi è una condizione patologica complessa, alla base di molti eventi avversi del sistema cardiovascolare, come la malattia arteriosa coronaria (CAD, *coronary artery disease*), l'ictus e la malattia arteriosa periferica. In quanto tale, l'aterosclerosi è la causa principale di morbilità e mortalità nel mondo Occidentale odierno. Tuttavia, molti studi epidemiologici indicano che la prevalenza della malattia aterosclerotica è in crescita in ogni parte del mondo, probabilmente a causa della sempre più frequente adozione di stili di vita occidentali in tutti i continenti (Lopez AD and Murray CC, 1998; Bonow RO, et al., 2002).

Tenendo conto di parametri quali numerosità, età, provenienza, sesso della popolazione considerata, periodo di tempo dell'osservazione, ecc., gli studi riguardanti la salute pubblica valutano: *fattori di rischio* per determinate patologie; *mortalità* totale o selezionata per singoli parametri; indici di diminuzione della qualità della vita, più propriamente correlati allo stato cronico ed endemico delle malattie, quali ad esempio il *DALY* (\**Disability Adjusted Life Years*) (tabelle 1 e 2).

#### \*DISABILITY ADJUSTED LIFE YEARS

Il "Disability Adjusted Life Year" o DALY è un indice epidemiologico che completa la valutazione degli anni di vita potenzialmente persi a causa di morte prematura (*Potential Years of Life Lost*, PYLL) con la valutazione degli anni di vita trascorsi in stato di malattia ed invalidità (*disability*) (1), combinando queste informazioni in un unico dato. Un DALY può essere pensato come un anno di vita "perso" perché trascorso in uno stato di malattia grave, invalidante o letale. Il DALY è l'indice maggiormente utilizzato nella descrizione del "peso" di una malattia (*burden of disease*), una misura che indica quanto una malattia può incidere nel ridurre l'aspettativa di vita.

I DALYs, per una malattia o per una determinata condizione fisiopatologica in una popolazione, sono calcolati come la somma degli anni di vita persi a causa di morte prematura (*Years of Life Lost*, YLL) con gli anni di vita persi a causa di malattia debilitante (*Years Lost due to Disability*, YLD):  
DALY = YLL + YLD

L'indice YLL corrisponde al numero di morti moltiplicato per l'aspettativa di vita dell'età in cui si verifica la morte. La formula base per calcolare l'YLL per una data causa, età e sesso è la seguente:

$$YLL = N \times L \quad \text{dove:} \quad N = \text{numero di morti} \quad L = \text{aspettativa di vita (in anni) all'età della morte}$$

Per stimare l'YLD per una particolare causa in un particolare periodo di tempo, il numero di nuovi casi (casi incidenti) verificatisi in un periodo è moltiplicato per la durata media della malattia e per un fattore ponderale che riflette la gravità della malattia in una scala da 0 (in salute) a 1 (morte). La formula base che riassume il calcolo dell'YLD è la seguente:

$$YLD = I \times DW \times L \quad \text{dove:} \quad \begin{array}{lll} I = \text{numero di} & DW = \text{fattore} & L = \text{durata media della} \\ \text{casi incidenti} & \text{ponderale} & \text{malattia (in anni) fino alla} \\ & \text{(disability weight)} & \text{remissione o alla morte} \end{array}$$

Il progetto dell'Organizzazione Mondiale per la Sanità (*World Health Organization, WHO*) denominato *Global Burden of Disease Study*, per costruire i DALYs, ha utilizzato valori di aspettativa di vita e fattore ponderale identici per ogni sottogruppo di popolazione (2).

Una correzione comune introdotta nel calcolo è quella di ridurre lievemente il fattore ponderale quando i DALY si riferiscono alle fasce d'età infantili o senili, sottraendo il 3% al valore finale.

*Bibliografia:*

1. Murray CJL, Salomon JA, Mathers CD, Lopez AD (eds.) (2002). Summary measures of population health: concepts, ethics, measurement and applications. WHO, Geneva. Available at <http://www.who.int/pub/smph/en/index.html>
2. Murray CJL, Lopez AD (1996). The Global Burden of Disease. Cambridge: Harvard University Press."



World Health Organization, Department of Measurement and Health Information

In base a questa distinzione, nel caso delle malattie cardiovascolari e della distribuzione dei relativi fattori di rischio si possono ottenere ed osservare dei risultati interessanti. I dati che seguono sono stati redatti dal *WHO Global Burden of Disease Program*, la sezione dell'Organizzazione Mondiale per la Sanità che si occupa di "fotografare" periodicamente la situazione sanitaria globale. Attraverso tali studi (Mathers CD, Ezzati M, Lopez AD, 2007; Bonow RO, et al., 2002) è possibile conoscere l'impatto e la frequenza di molte patologie e fattori di rischio sull'intera popolazione mondiale, o su fasce di tale popolazione stratificate, ad esempio, per provenienza geografica. E' possibile, perciò, tracciare approssimativamente un profilo che metta in luce la prevalenza delle malattie cardiovascolari sia guardando alla popolazione mondiale in generale sia confrontando la situazione dei Paesi industrializzati con quella dei Paesi meno industrializzati. Tra queste due aree geografiche, è possibile, inoltre, apprezzare le differenze che esistono in termini mortalità totale o DALYs e correlarle al tipo di patologia (tabelle 1 e 2; figure 1-4).

**Tabella 1:** the 20 Leading Causes of Deaths and Burden of Disease for the World, 2002

Leading Causes of Death				Leading Causes of Burden of Disease			
Rank	Cause	Deaths (millions)	Percent of total deaths	Rank	Cause	DALYs (millions)	Percent of total DALYs
1	Ischemic heart disease	7.21	12.6%	1	Perinatal conditions	97	6.5%
2	Cerebrovascular disease	5.51	9.7%	2	Lower respiratory infections	91	6.1%
3	Lower respiratory infections	3.88	6.8%	3	HIV/AIDS	84	5.7%
4	HIV/AIDS	2.78	4.9%	4	Unipolar depressive disorders	67	4.5%
5	Chronic obstructive pulmonary disease	2.75	4.8%	5	Diarrheal diseases	62	4.2%
6	Perinatal conditions	2.46	4.3%	6	Ischemic heart disease	59	3.9%
7	Diarrheal diseases	1.80	3.2%	7	Cerebrovascular disease	49	3.3%
8	Tuberculosis	1.57	2.7%	8	Malaria	46	3.1%
9	Malaria	1.27	2.2%	9	Road traffic injuries	39	2.6%
10	Trachea, bronchus, lung cancers	1.24	2.2%	10	Tuberculosis	35	2.3%
11	Road traffic injuries	1.19	2.1%	11	Chronic obstructive pulmonary disease	28	1.9%
12	Diabetes mellitus	0.99	1.7%	12	Congenital anomalies	27	1.8%
13	Hypertensive heart disease	0.91	1.6%	13	Hearing loss, adult onset	26	1.7%
14	Self-inflicted injuries	0.87	1.5%	14	Cataracts	25	1.7%
15	Stomach cancer	0.85	1.5%	15	Measles	21	1.4%
16	Cirrhosis of the liver	0.79	1.4%	16	Violence	21	1.4%
17	Nephritis and nephrosis	0.68	1.2%	17	Self-inflicted injuries	21	1.4%
18	Colon and rectum cancers	0.62	1.1%	18	Alcohol use disorders	20	1.4%
19	Liver cancer	0.62	1.1%	19	Protein-energy malnutrition	17	1.1%
20	Measles	0.61	1.1%	20	Falls	16	1.1%

Source: World Health Organization [29]  
doi:10.1371/journal.pntd.0000114.t002

**Tabella 2:** the 20 Leading Risk Factor for Deaths and Burden of Disease, World 2002

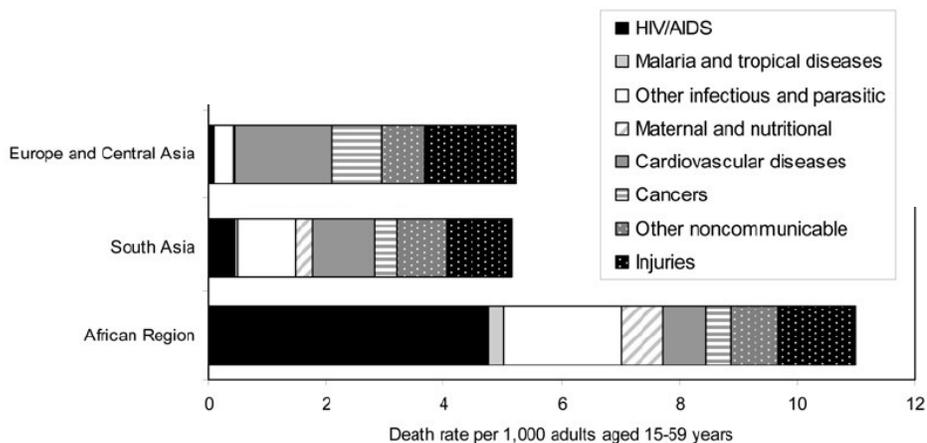
Attributable Mortality				Attributable Burden of Disease			
Rank	Risk Factor	Deaths (million)	Percent of Total Deaths	Rank	Risk Factor	DALYs (Millions)	Percent of Total DALYs
1	High blood pressure	7.1	12.8	1	Childhood and maternal underweight	137.4	9.4
2	Smoking and oral tobacco use	4.9	8.6	2	Unsafe sex	91.9	6.3
3	High cholesterol	4.4	7.9	3	High blood pressure	64.3	4.4
4	Childhood and maternal underweight	3.7	6.7	4	Smoking and oral tobacco use	59.1	4.1
5	Unsafe sex	2.9	5.2	5	Alcohol use	58.3	4.0
6	Low fruit and vegetable intake	2.7	4.9	6	Unsafe water, sanitation, and hygiene	54.2	3.7
7	Overweight and obesity (high BMI)	2.6	4.6	7	High cholesterol	40.4	2.8
8	Physical inactivity	1.9	3.4	8	Indoor smoke from household use of solid fuels	38.5	2.6
9	Alcohol use	1.8	3.2	9	Iron deficiency	35.1	2.4
10	Unsafe water, sanitation, and hygiene	1.7	3.1	10	Overweight and obesity (high BMI)	33.4	2.3
11	Indoor smoke from household use of solid fuels	1.6	2.9	11	Zinc deficiency	28.0	1.9
12	Iron deficiency	0.8	1.5	12	Low fruit and vegetable intake	26.7	1.8
13	Urban air pollution	0.8	1.4	13	Vitamin A deficiency	26.6	1.8
14	Zinc deficiency	0.8	1.4	14	Selected occupational risks <sup>a</sup>	21.9	1.5
15	Vitamin A deficiency	0.8	1.4	15	Physical inactivity	19.1	1.3
16	Selected occupational risks <sup>a</sup>	0.8	1.4	16	Lead exposure	12.9	0.9
17	Contaminated injections in health care settings	0.5	0.9	17	Illicit drugs use	11.5	0.8
18	Lead exposure	0.2	0.4	18	Contaminated injections in health care settings	10.5	0.7
19	Illicit drugs use	0.2	0.4	19	Non-use and use of ineffective methods of contraception	8.8	0.6
20	Global climate change	0.2	0.3	20	Child sexual abuse	8.2	0.6

<sup>a</sup>Includes occupational risk factors for injuries, occupational carcinogens and airborne particulates, ergonomic stressors and occupational noise.  
Source: World Health Organization, Comparative Risk Assessment Project [32]  
doi:10.1371/journal.pntd.0000114.t004

Quello che si ottiene può essere sintetizzato come segue:

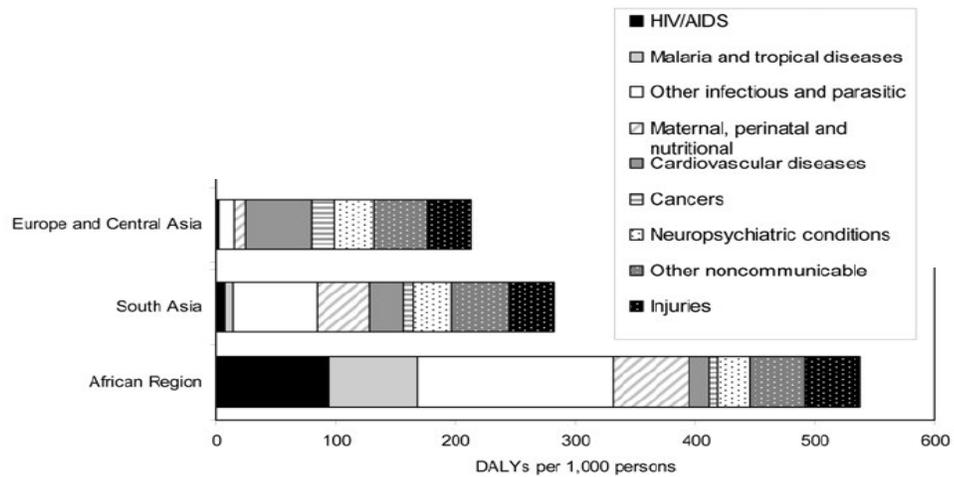
- le malattie cardiovascolari rappresentano la prima causa di mortalità nel mondo intero (tab. 1);
- i fattori di rischio più correlati alla mortalità sono fattori di rischio cardiovascolare, come ipertensione, fumo ed ipercolesterolemia (tab. 2);
- tuttavia, se si considera la variabile “peso della malattia”, calcolata in DALYs, il numero più alto di persone con aspettativa di vita ridotta o marcata da sofferenza e malattie, correla con altre emergenze sanitarie, come la mancanza di cibo, la malnutrizione (specialmente materno-infantile), le malattie infettive (tab. 1 e 2, colonne di destra);

Nonostante nei Paesi meno industrializzati la prevalenza delle malattie cardiovascolari sia un fenomeno sempre più importante in termini numerici, in regioni molto povere, come l’Africa sub-sahariana ed alcune regioni dell’Asia, le principali emergenze sanitarie sono attribuibili ad HIV/AIDS, malaria ed altre malattie tropicali, malattie infettive da parassiti e carenze nutrizionali (fig. 1 e 2) (Mathers CD, Ezzati M, Lopez AD, 2007; Bonow RO, et al., 2002). Tali condizioni, di importanza ridotta nel mondo occidentale, rendono conto, se considerate tutte insieme, di una mortalità e di una disabilità di gran lunga superiore, numericamente, a quella registrata per altre patologie o per altre zone geografiche dell’intero pianeta. Infatti, l’Africa sub-sahariana ed il sud dell’Asia sono regioni ad alta densità di popolazione e ciò incide sul confronto numerico sia per quanto riguarda la mortalità totale che per il peso della malattia (tabelle 1 e 2, colonne di destra; fig. 1 e 2) (Mathers CD, Ezzati M, Lopez AD, 2007).



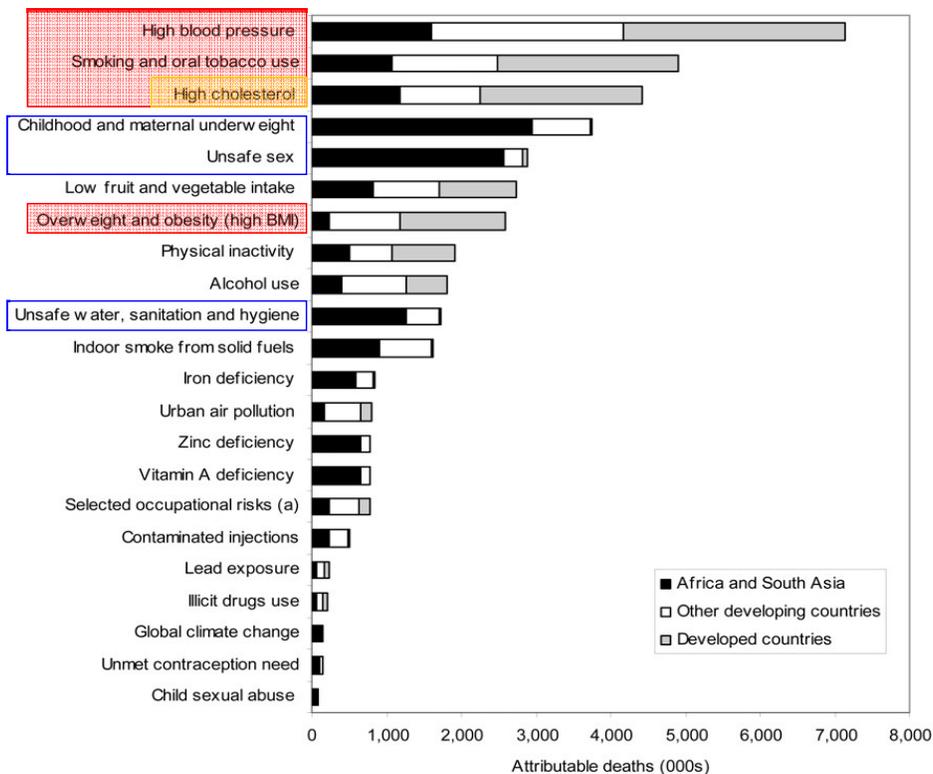
**Figura 1:** death rates by broad cause group and region, adults aged 15-59, 2002.

doi:10.1371/journal.pntd.0000114.g002

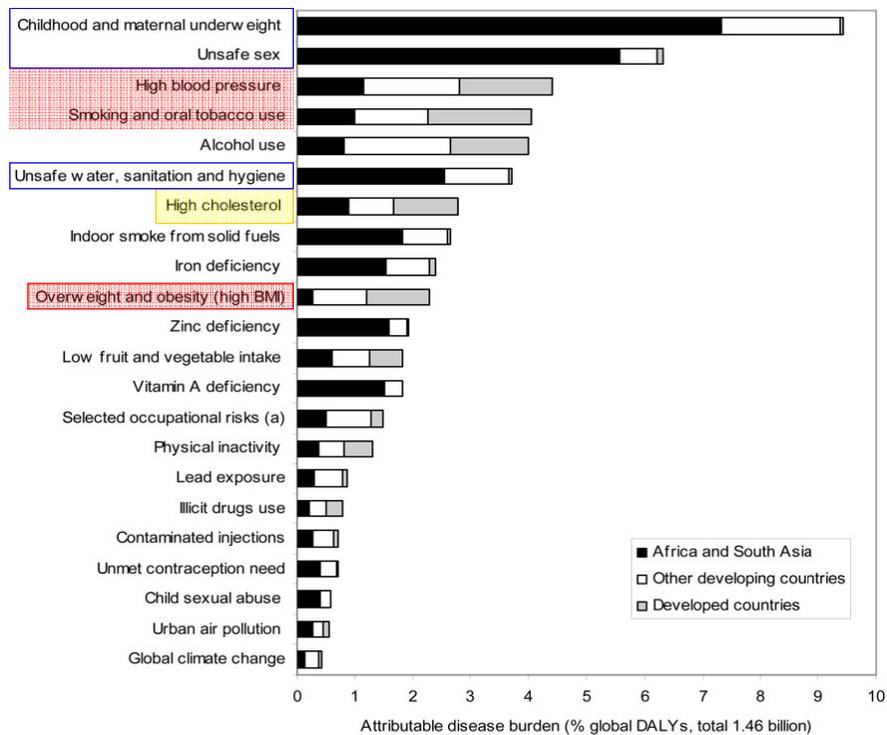


**Figura 2:** the burden of disease, by broad cause group and region, 2002.  
 Doi:10.1371/journal.pntd.0000114.g003

Le figure 3 e 4 sintetizzano i dati cui si è fatto riferimento finora. In particolare, la figura 3 riporta la mortalità attribuibile selezionata per fattore di rischio ed area geografica; la figura 4 riporta il “peso della malattia” (*burden of disease*), sempre per aree geografiche e fattori di rischio selezionati (Mathers CD, Ezzati M, Lopez AD, 2007).



**Figura 3:** attributable mortality, by selected major risk factors and region, 2000.  
 doi:10.1371/journal.pntd.0000114.g004



**Figura 4:** the burden of disease, by selected major risk factors and region, 2000.  
doi:10.1371/journal.pntd.0000114.g005

Queste motivazioni giustificano l'intenso lavoro di ricerca, clinica e di base, svolto dalla comunità scientifica internazionale nel campo delle patologie cardiovascolari e, di conseguenza, anche l'impiego di ingenti risorse economiche capaci di sostenere tale lavoro.

Ciò che accade nelle regioni più povere del mondo, tuttavia, non può essere trascurato. Malattie, in Occidente sconosciute o già ampiamente debellate, sono responsabili della maggioranza delle morti e delle "disabilità" nei Paesi dell'Africa sub-sahariana e del sud dell'Asia; tali condizioni, se considerate globalmente, hanno un peso enorme (fig. 3 e 4, barre nere), e prendono le proporzioni di una vera e propria emergenza sanitaria. A questo si aggiungono anche alcuni aspetti paradossali: fattori di rischio cardiovascolare come sovrappeso ed obesità, ad altissima prevalenza nel mondo occidentale, sono pressoché sconosciuti in tutta la parte povera del mondo, che tende a fare i conti con situazioni di carenza alimentare e problemi nutrizionali associati; malattie infettive, ad alta prevalenza nelle regioni povere, ricevono scarsissima attenzione dalla comunità scientifica internazionale, che devia il flusso di risorse verso una ricerca orientata da

ragioni economiche di mercato, rendendo sempre più ristretto ed obsoleto il campo delle terapie disponibili (Mathers CD, Ezzati M, Lopez AD, 2007) (fonti varie: Medici Senza Frontiere (MSF), “Campagna per l’accesso ai farmaci essenziali”, <http://www.medicisenzafrontiere.it>, vari documenti; “Drugs for Neglected Disease program” (DNDi), <http://www.dndi.org>, vari documenti). Queste realtà sono un problema etico che dovrebbe interrogare ogni ricercatore impegnato nel campo delle scienze bio-mediche.

## **Basi patologiche dell'aterosclerosi**

### ***Aspetti generali***

La prima lesione visibile nello sviluppo dell'aterosclerosi è la cosiddetta stria lipidica (*fatty streak*). Tale formazione appare come un'area ispessita della tonaca intima del vaso arterioso (*intimal thickening*), popolata da linfociti, cellule muscolari lisce, ma soprattutto particolari macrofagi denominati cellule schiumose (*foam cells*). Queste ultime, devono il nome all'aspetto del loro citoplasma, disseminato di goccioline lipidiche, conseguenza di un accumulo continuo, non sottoposto a feedback negativo, di lipidi, tra cui soprattutto esteri del colesterolo (Ross R, 1999). La stria lipidica può, poi, progredire verso lesioni di maggiore gravità, assumendo fenotipi propri della placca ateromastica. L'*American Heart Association (AHA) Committee on Vascular Lesions* ha fornito una classificazione delle lesioni aterosclerotiche nell'uomo: combinando caratteristiche istologiche e manifestazioni cliniche, sono stati proposti sei stadi di progressione delle lesioni, dal tipo I al tipo VI (fig. 5). Le lesioni I-III sono precursori silenti delle lesioni avanzate (IV-VI) da cui originano gli eventi clinici (Stary HC, et al., 1995). Nelle prime tre decadi di vita la composizione delle lesioni è prevalentemente lipidica; dopo questo periodo la composizione diviene imprevedibile. La formazione di lesioni dell'intima dell'aorta e delle arterie coronarie, tipicamente, subisce una accelerazione a 25-30 anni per gli uomini e 40-45 anni per le donne.

- Precursori silenti (I, II e III)

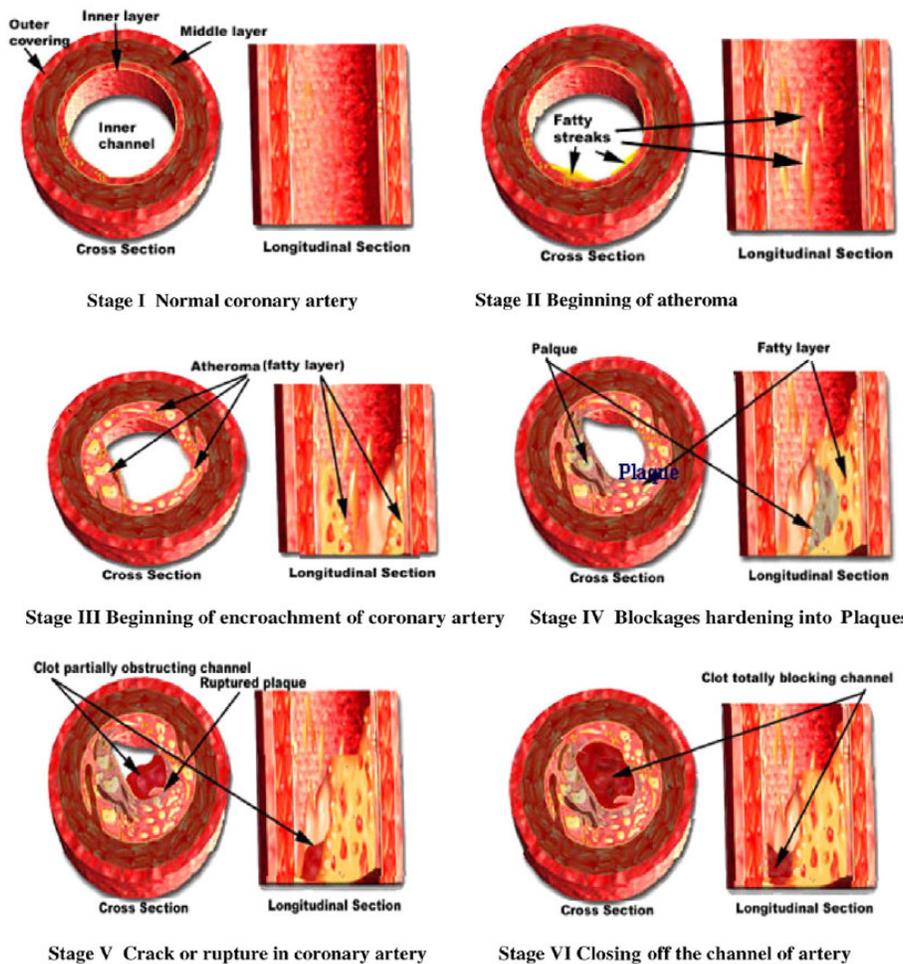
L'accumulo di lipidi nell'intima promuove reazioni cellulari specifiche ed è l'evento fondamentale nell'iniziazione delle lesioni. Man mano che l'accumulo di lipidi procede le dimensioni e la complessità delle lesioni aumentano. Ogni stadio di progressione può stabilizzarsi temporaneamente o permanentemente, richiedendo o meno stimoli addizionali per progredire.

- Lesioni avanzate (IV, V e VI)

Le lesioni avanzate generalmente contengono depositi extracellulari di lipidi tali da influenzare la struttura dell'intima e, negli stadi avanzati, anche la media e l'avventizia. Sono legate all'insorgenza di eventi ischemici.

Possono o meno essere causa di assottigliamento del lume arterioso e talvolta non sono visibili tramite angiografia. Comunque l'assenza di restringimento del

lume non preclude la significatività clinica in quanto le complicazioni possono svilupparsi improvvisamente.



**Figura 5:** rappresentazione dei possibili stadi di progressione dell'aterosclerosi (da: Jain KS et al., 2007)

Tale classificazione non dovrebbe essere intesa come un *pattern* ordinato e lineare di progressione (Virmani R, 2000.). Le placche si sviluppano in seguito all'accumulo di lipoproteine a bassa densità (LDL) nello spazio sub-endoteliale del vaso arterioso, seguito da diapedesi dei leucociti, formazione delle *foam cells*, proliferazione delle cellule muscolari lisce e produzione di tessuto connettivo (Khalil MF, Wagner WD and Goldberg IJ, 2004). Un'attenta analisi della composizione della placca ha rivelato la presenza di numerosi prodotti derivanti dall'ossidazione delle proteine e dei lipidi, evidenziando la presenza di stress ossidativo locale. Tra i prodotti dell'ossidazione si trovano amminoacidi (ossidati ad opera di  $O_2$ ,  $Cl$  e  $NO_2^-$ ), idroperossidi lipidici

(LOOH), aldeidi a corta catena, fosfolipidi (PL) ossidati, F2 $\alpha$ -isoprostani, derivati ossidati del colesterolo ed altri ossisteroli (Heinecke JW, 1998).

Le LDL, la cui parte proteica è rappresentata principalmente dall'apolipoproteina B-100 (apoB), rappresentano la fonte principale di colesterolo non solo per i tessuti periferici ma anche per la parete arteriosa (Lusis AJ, 2000); infatti, le interazioni ioniche tra i domini carichi positivamente dell'apoB con le proteine cariche negativamente della matrice extracellulare, includendo proteoglicani, collagene e fibronectina, porta ad una ritenzione intimale delle proteine che contengono apoB (Khalil MF, Wagner WD and Goldberg IJ, 2004). La ritenzione preferenziale delle LDL nella parete arteriosa fa di queste lipoproteine il principale substrato dei processi ossidativi messi in atto dalle cellule del vaso. L'ossidazione delle LDL in vivo può avvenire attraverso diversi sistemi enzimatici, come NAD(P)H ossidasi, xantina ossidasi, mieloperossidasi, ossido nitrico sintasi (NOS), lipossigenasi ed il sistema della catena di trasporto degli elettroni mitocondriale (Madamanchi NR, et al., 2005; Mueller CF, et al., 2005). Le specie ossidanti maggiormente coinvolte nella formazione in vivo delle LDL ossidate (oxLDL) sono quelle dell'ossigeno, del cloro e dell'azoto, più i radicali liberi derivati dalla perossidazione lipidica. In pieno accordo con il ruolo dello stress ossidativo e delle modificazioni ossidative a carico delle LDL nell'aterosclerosi, vi sono anche dei riscontri biologici sistemici: nel plasma, è possibile riscontrare livelli variabili di oxLDL e, nelle urine, livelli variabili di F2 $\alpha$ -isoprostani, attualmente uno dei marker più indicativi di stress ossidativo nell'uomo (Morrow JD, 2005). Entrambi questi fattori costituiscono un fattore di rischio forte ed indipendente per la malattia cardiaca e coronarica (CHD) (Schwedhelm E, et al., 2004; Meisinger C, et al., 2005).

Le oxLDL esercitano la loro azione aterogena in molti modi: attraverso uptake ed accumulo nei macrofagi, attraverso attività proinfiammatoria, immunogenica, apoptotica e citotossica (Chisolm GM and Steinberg D, 2000). A differenza delle LDL native, internalizzate attraverso il recettore per le LDL (LDL-R) secondo la via metabolica cellulare descritta da Goldstein e Brown (Brown MS, Goldstein JL, 1986), le oxLDL sono internalizzate dai macrofagi attraverso la via dei recettori "scavenger", particolari recettori non sottoposti a down-regulation da eccesso di ligando (feedback negativo), portando alla formazione delle *foam cells* cariche di colesterolo, che, come abbiamo visto, sono una componente caratteristica della placca aterosclerotica. Le oxLDL,

inoltre, esercitano attività proinfiammatoria attirando i monociti circolanti, inducendo l'espressione delle molecole d'adesione sulle cellule endoteliali, promuovendo la differenziazione dei monociti in macrofagi, inducendo la produzione ed il rilascio di citochine e chemochine proinfiammatorie dai macrofagi, ed inibendo la mobilità migratoria dei macrofagi, che restano, così, intrappolati nella placca (Chisolm GM and Steinberg D, 2000; Lusis AJ, 2000).

Nonostante l'ischemia sia una delle conseguenze avverse più frequenti dell'aterosclerosi, il restringimento progressivo del lume vasale, causato dall'aumento di dimensioni della placca, sembra non essere l'evento determinante per l'esito ischemico. In un suo lavoro, divenuto di riferimento in questo campo, Seymour Glagov ha dimostrato che la parete arteriosa può rimodellarsi in risposta alla crescita della placca, incrementando il suo diametro esterno per accomodare la placca in espansione senza provocare alcun restringimento del lume vasale (Glagov S, et al., 1987). Ciò che risulta maggiormente implicato nella genesi di eventi ischemici sembra essere l'indebolimento del cappuccio fibroso che riveste la placca: l'erosione di tale rivestimento, infatti, può portare a parziale o completa rottura della placca stessa, determinando immediata attivazione della cascata della coagulazione e formazione di trombi sanguigni. La trombosi rappresenta l'ultimo stadio nell'avanzamento della malattia ed è responsabile degli eventi avversi, osservabili clinicamente, a carico dei distretti coronarico, cerebrovascolare e vascolare periferico (Libby P, 2001).

### ***Aspetti storici***

Nonostante l'aterosclerosi stia raggiungendo, ai nostri giorni, le proporzioni di un epidemia, essa non è una patologia specifica dei tempi moderni. Attraverso alcuni studi, è stato possibile affermare che tale patologia era presente già nell'antichità. Tracce di degenerazione aterosclerotica sono state rinvenute nell'arteria succlavia sinistra di una mummia egizia, nel 1911 (Ruffer M, 1911), evidenza confermata, poi, nel 1962 attraverso tecniche istologiche più moderne (Sandison A, 1962). Secondo lo storico J. O. Leibowitz (Leibowitz J, 1970), il primo a presentare una descrizione anatomo-patologica dettagliata di un danno della parete arteriosa fu il chirurgo e anatomista italiano Antonio Scarpa (1752-1832). Nella sua monografia del 1804 sugli aneurismi, Scarpa si opponeva al punto di vista di allora, secondo cui, la rottura di un aneurisma fosse dovuta ad una semplice dilatazione dell'aorta, enfatizzando che “...specialmente il rivestimento

*interno è soggetto, tramite cause interne e lente, ad una disorganizzazione ulcerata e steatomatosa, così come a rigidità e fragilità grossolana e squamosa*". Veniva così introdotto il concetto dell'esistenza di un disordine metabolico alla base dell'aterosclerosi (Leibowitz J, 1970).

Il termine *ateroma*, che in greco significa "pappa, poltiglia", fu proposto per la prima volta da Albrecht von Haller nel 1755 per designare il processo degenerativo osservato nella tonaca intima delle arterie. Il chirurgo londinese Joseph Hodgson (1788-1869) pubblicò nel 1815 il suo *Treatise on the Diseases of Arteries and Veins*, nel quale affermava che la causa principale dei processi ateromatosi fosse l'infiammazione. Di lì a poco, la maggior parte dei patologi del XIX secolo, come Carl Rokitanski (1804-1878), abbandonarono l'ipotesi dell'infiammazione quale principale fattore eziologico e cominciarono a considerare l'aterosclerosi come un processo degenerativo, caratterizzato da proliferazione intimale di tessuto connettivo e calcificazioni, meglio descritto dal termine "arteriosclerosi", proposto nel 1833 dal patologo francese Jean Lobstein (1777-1835). Tuttavia, il patologo tedesco Rudolf Virchow (1821-1902), caposcuola della Patologia di allora, specialista dei processi trombotici, considerava l'ateroma il risultato di un'infiammazione cronica dell'intima vasale, chiamandola "endoarterite cronica deformante". Dal suo punto di vista, l'accumulo di lipidi era solo una manifestazione tardiva dell'ateroma (Virchow R, 1856). Fu il patologo di Lipsia Marchand, nel 1904, il primo ad utilizzare il termine *aterosclerosi* nel significato che tuttora gli si attribuisce.

Fino agli inizi del XX secolo, le teorie sulla patogenesi dell'aterosclerosi restavano puramente descrittive ed erano basate sull'osservazione anatomica delle affezioni patologiche.

Una prima rivoluzione in senso meccanicistico iniziò nel 1908, quando lo scienziato russo Alexander Ignatowsky dimostrò che l'aterosclerosi poteva essere indotta sperimentalmente nei conigli nutrendoli con una dieta a base di latte e rosso d'uovo (Ignatowski A, 1908). Poco tempo dopo, nel 1913, N. Anitschkov e S. Chalатов riprodussero l'esperimento aggiungendo del colesterolo puro al cibo per conigli (Anitschkow N and Chalатов S, 1913). Questi risultati diedero una grande spinta in avanti per la formulazione dell'ipotesi o teoria lipidica dell'aterosclerosi, che avrebbe predominato, come unico rationale alla base del processo aterosclerotico, per gran parte

del secolo scorso. Un importante passo successivo avvenne solo negli anni '70, quando Brown e Goldstein dimostrarono che il recettore da loro scoperto, il recettore per le LDL (LDL-R), una proteina cellulare di membrana capace di legare e rimuovere dal torrente circolatorio le LDL (Brown MS and Goldstein JL, 1986), non era coinvolto nella formazione delle foam cells. Essi ipotizzarono che, a giocare un ruolo in tale processo, fosse un altro recettore macrofagico capace di riconoscere le LDL acetilate (Goldstein JL, et al., 1979). Successivamente, durante gli anni '80, da Daniel Steinberg ed il suo gruppo venne messo in luce il ruolo chiave delle LDL ossidate (oxLDL) nella patogenesi dell'aterosclerosi (Steinberg D, et al., 1989); inoltre, fu identificato un numero di recettori detti *scavenger*, cioè "spazzini", capaci di mediare l'uptake proprio delle oxLDL (Li AC and Glass CK, 2002). In più, il modello del coniglio di Watanabe con iperlipidemia ereditabile (*WHHL*, *Watanabe heritable hyperlipidemic, rabbit*), introdotto nel 1980 (Watanabe Y, 1980), fu molto utile nel chiarire ulteriormente il ruolo delle oxLDL nell'aterogenesi.

Una seconda rivoluzione avvenne agli inizi degli anni '90, quando furono disponibili i primi modelli murini di aterosclerosi ottenuti attraverso tecniche di ricombinazione omologa, cioè i topi knockout per il gene dell'apolipoproteina E (ApoE) e per il gene dell'LDL-R (Ishibashi S, et al., 1993; Ishibashi S, et al., 1994; Plump AS, et al., 1992; Zhang H, et al., 1992). Questi animali presentavano varie lesioni arteriose che progredivano dallo stato di strie lipidiche ricche in foam cells fino allo stadio di placche fibro-proliferative con core lipidico/necrotico, caratteristica tipica delle lesioni nell'uomo (Ishibashi S, et al., JCI 1994; Nakashima Y, et al., 1994; Reddick RL, et al., 1994).

La possibilità di abolire o far sovraesprimere un singolo gene d'interesse, in tali modelli murini, ha aperto una nuova era della ricerca sull'aterosclerosi a livello meccanicistico.

### ***Aterosclerosi malattia multifattoriale: infiammazione, dislipidemia***

#### **Aterosclerosi ed infiammazione**

L'idea che alla base dell'aterogenesi vi fosse un processo infiammatorio maturò seriamente a metà degli anni '70, quando Russel Ross, formulando l'ipotesi della "risposta al danno" ("*response to injury*"), postulò che le lesioni aterosclerotiche potessero derivare da un danno focale all'endotelio arterioso, seguito da adesione ed aggregazione piastrinica (Ross R and Glomset JA, 1976). Il processo continuava con

l'innesco della proliferazione delle cellule muscolari lisce (SMC, *smooth muscle cells*), sotto lo stimolo del fattore di crescita secreto dalle piastrine (PDGF, *platelet derived growth factor*). Le SMC, infatti, erano considerate il vero promotore dell'aterosclerosi e si pensava che la loro proliferazione spinta e incontrollata fosse la causa dell'occlusione dei vasi arteriosi. Tuttavia, più di recente, è stato stabilito che la proliferazione delle SMC nella placca è di entità piuttosto modesta e potrebbe anche esercitare un ruolo protettivo contribuendo alla stabilizzazione della placca (Davies MJ, 1996; Weissberg PL, et al., 1996). In più, è stato appurato che, durante lo sviluppo dell'aterosclerosi, l'endotelio resta morfologicamente integro, sebbene risulti attivato e direttamente coinvolto nella risposta immuno-infiammatoria. Poole e Florey (Poole JC and Florey HW, 1958) furono i primi ad osservare che l'inizio di una dieta ipercolesterolemizzante, nei conigli, causava l'adesione dei monociti circolanti all'endotelio e la successiva migrazione degli stessi attraverso il monostrato endoteliale intatto. Michael Gimbrone fu il primo a proporre il concetto di *disfunzione endoteliale*, evidenziando come l'endotelio sano esercitasse un ruolo fortemente protettivo nei confronti dell'aterosclerosi, a differenza dell'endotelio danneggiato, che trovandosi in uno stato "attivato", favoriva la progressione della malattia (Gimbrone MA Jr and Buchanan MR, 1982). Nel 1986, Ross rivisitò le sue posizioni precedenti, affermando che il "primum movens" dell'aterosclerosi era, in qualche modo, il danno endoteliale ("*subtle endothelial injury*") (Ross R, 1986), e pubblicò, nel 1999 sul *New England Journal of Medicine*, la famosa review "*Atherosclerosis: a chronic inflammatory disease*" (Ross R, 1999).

L'assunto che l'aterosclerosi, di fatto, sia una malattia infiammatoria cronica, che inizia con l'adesione di monociti e linfociti alle cellule endoteliali (EC) attivate, è ora ampiamente accettato ed avvalorato da osservazioni cliniche e sperimentali (Binder CJ et al., 2002; Glass CK and Witztum JL, 2001; Hansson GK, 2005; Libby P, 2002; Lusis AJ, 2000). L'idea che la proliferazione delle SMC fosse il fattore determinante l'aterogenesi fu abbandonata quando Göran Hansson ed il suo gruppo, attraverso l'utilizzo di moderne tecniche di immunistochemical, identificò precisamente le componenti cellulari delle placche aterosclerotiche umane (Jonasson L, et al., 1986). Le loro osservazioni permettevano di stabilire che le foam cells ritrovate nelle strie lipidiche derivavano effettivamente dai macrofagi; che il core lipidico/necrotico era ricoperto da un tessuto fibroso composto principalmente da SMC positive per l' $\alpha$ -actina e che questa struttura

dava origine alla placca fibrosa; inoltre, che un gran numero di linfociti T, circa il 20% di tutte le cellule presenti, era presente intorno alla placca e nel cappuccio fibroso. Tutto ciò evidenziava il ruolo dell'immunità nell'aterosclerosi (Hansson GK, et al., 2002).

L'infiammazione, "complesso set di interazioni tra fattori solubili e cellule che può svilupparsi in ogni tessuto in risposta ad un insulto traumatico, infettivo, post-ischemico, tossico od autoimmune" (Nathan C, 2002), sembra essere coinvolta in tutti gli stadi dell'aterogenesi. E' implicata nella formazione delle strie lipidiche, quando l'endotelio è attivato ed esprime chemochine, come MCP-1 (*Monocyte Chemotactic Protein-1*) ed interleuchina-8 (IL-8), molecole d'adesione, come ICAM-1 (*InterCellular Adhesion Molecule-1*), VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*), E- e P-selectina, capaci di guidare il reclutamento e l'infiltrazione dei monociti e dei linfociti nello spazio sub-endoteliale (Hansson GK, 2005). L'infiammazione, inoltre, agisce nel momento in cui insorgono gli eventi vascolari avversi, quando le cellule all'interno della placca secernono enzimi proteolitici, le *proteasi della matrice*, che, degradando le proteine della matrice extracellulare, rendono più fragile il cappuccio fibroso, portando alla rottura della placca ed alla formazione del trombo (Libby P and Theroux P, 2005). Nelle varie tappe dell'aterogenesi troviamo cellule vascolari (cellule endoteliali e SMC), monociti/macrofagi, linfociti (T, B, NKT), cellule dendritiche e mast-cellule. Tali tipi cellulari secernono o sono stimolati da fattori solubili quali peptici, glicoproteine, proteasi ed un vasto set di citochine.

#### Lipidi e dislipidemia

Sebbene l'infiammazione permetta di spiegare i meccanismi attraverso cui la malattia aterosclerotica si instaura e progredisce, determinando rapporti causali tra cellule ed elementi solubili presenti nell'ambiente vascolare tissutale, sarebbe impensabile "ridurre" il problema dell'aterogenesi ad una questione meramente infiammatoria. Infatti, per quanto convincente dal punto di vista meccanicistico, tale approccio limita le valutazioni al danno focale vascolare prescindendo dai disordini metabolici sistemici che possono causarlo. Abbiamo visto come, fin dagli inizi (Ignatowski A, 1908; Anitschkow N and Chalatov S, 1913; Watanabe Y, 1980), il problema dell'aterosclerosi fosse stato correlato ai lipidi ed alla loro abbondante presenza nelle lesioni ateromatose (caratteristica descritta nel dettaglio nella sezione "*Aspetti generali*" di questo capitolo), tanto da arrivare a formulare una "teoria lipidica" che spiegasse l'insorgenza della

malattia. A supporto di ciò, modelli sperimentali di aterosclerosi potevano essere ottenuti attraverso tecniche capaci di modificare e alterare la concentrazione lipidica, ad esempio, nel plasma di animali (somministrando diete ad alto contenuto di colesterolo e trigliceridi, o modificando geni coinvolti nel metabolismo lipidico)(Anitschkow N and Chalatorov S, 1913; Watanabe Y, 1980; Ishibashi S, et al., 1994; Plump AS, et al., 1992).

Formalmente, le *dislipidemie* possono essere definite come alterazioni del metabolismo lipidico che si manifestano con un aumento (iperlipoproteinemia) o una riduzione (ipolipoproteinemia) della concentrazione delle lipoproteine plasmatiche e/o con una loro alterazione qualitativa (Fellin R, Vigna GB, 2004). Dal punto di vista clinico, l'importanza della correlazione tra elevati livelli di lipidi nel plasma ed aumento dell'infiltrazione lipidica nella parete arteriosa è stata ampiamente descritta in una lunga serie di studi.

Elevati livelli plasmatici di colesterolo rappresentano uno dei principali fattori di rischio per CHD. Studi clinici ed epidemiologici hanno dimostrato che livelli plasmatici, anche relativamente ridotti, di colesterolo totale (TC) e di colesterolo legato alle lipoproteine a bassa densità (LDL-C) sono correlati linearmente con il rischio di CHD (Castelli WP, et al., 1992). Nei soggetti con iperlipidemia, la diminuzione dei lipidi plasmatici determina una riduzione lineare del rischio di CHD, e non sembra esistere un valore soglia al di sotto del quale non si possa ottenere un ulteriore beneficio. Le evidenze suggeriscono che la riduzione o la presenza di ridotti livelli di colesterolo non sono dannosi per la salute. Esempio limite a tal proposito, possono essere i livelli plasmatici di colesterolo nei neonati a fronte dei livelli in un adulto normolipidemico (in media TC=180-200mg/dl): alla nascita, infatti, i livelli di TC sono compresi tra 50 e 100 mg/dl (in media 60 mg/dl); circa la metà di questo valore è rappresentato da LDL-C (in media 30 mg/dl) e l'altra metà da colesterolo legato alle lipoproteine ad alta densità (HDL-C) (Innis SM, Hamilton JJ, 1992; Kallio MJT, et al., 1997).

Le prime evidenze della correlazione tra elevati livelli di lipidi nel plasma, in particolare colesterolo, e rischio cardiovascolare sono emerse dai risultati del famoso studio a lungo termine, condotto su oltre 5.000 abitanti di *Framingham* nel Massachusetts, USA. Questo studio ha dimostrato che ogni incremento dell'1% di TC è associato con un aumento di incidenza di CHD del 2-3% (Castelli WP, et al., 1992).

Ulteriori evidenze circa la correlazione tra elevati livelli di colesterolo e CHD sono state fornite dal *Multiple Risk Factor Interventional Trial (MRFIT)*. In questo studio i rischi associati con i diversi livelli di colesterolo serico sono stati determinati da un'analisi della mortalità a 6 anni su 361.662 uomini, tra 35 e 57 anni di età. E' stata dimostrata una correlazione tra TC e rischio di CHD, e questa correlazione era maggiore in presenza di livelli di TC > 181 mg/dL. Secondo gli Autori, questi dati consigliavano una riduzione dell'assunzione di grassi con la dieta nella popolazione in generale e un trattamento intensivo dei pazienti a rischio (Martin MJ, et al., 1986; LaRosa JC, et al., 1990).

Circa dieci anni dopo il *MRFIT*, ulteriori conferme della correlazione tra colesterolo e CHD sono pervenute dalla pubblicazione dei dati inerenti un follow up di 25 anni dello studio *Seven Countries* (Verschuren WM, et al., 1995). Questo trial ha studiato la relazione tra TC serico e mortalità a lungo termine da CHD in 12.467 uomini, tra 40 e 59 anni di età, in cinque paesi europei, negli USA e in Giappone.

Mediante un'approssimazione lineare, lo studio ha dimostrato che un incremento di TC di 20 mg/dL corrispondeva ad un aumento del 12% del rischio di mortalità cardiovascolare. In tutti i paesi il colesterolo era correlato in maniera lineare alla mortalità da CHD e l'aumento dell'incidenza di mortalità da CHD era identico per i medesimi incrementi di colesterolo. La minor incidenza di mortalità cardiovascolare si osservava in Giappone e nei paesi dell'Europa meridionale, la cui popolazione presentava i quartili minori di TC basale (125-150 mg/dL) (Verschuren WM, et al., 1995).

Nello studio di popolazione *Prospective Cardiovascular Münster (PROCAM)* (Assmann G, et al., 1998), i fattori di rischio cardiovascolare sono stati analizzati in 4501 uomini asintomatici, tra 40-65 anni di età, sottoposti ad un follow up di 8 anni. Mentre altri studi epidemiologici hanno valutato gli effetti del TC sull'incidenza degli eventi coronarici, lo studio *PROCAM* ha incluso una valutazione degli effetti dei livelli di LDL-C sul rischio di CHD. Dopo 8 anni di follow up, gli autori hanno osservato una relazione lineare tra l'incidenza di eventi coronarici e i terzili di LDL-C.

Accanto agli elevati valori di LDL-C, vi sono altri fattori, associati a dislipidemia, che contribuiscono all'aumento del rischio per CHD. Tra questi, grande importanza è ora riconosciuta ai bassi livelli di HDL-C (Gotto AM Jr and Brinton EA, 2004). Vi sono molti studi che evidenziano come tra livelli plasmatici di HDL ed insorgenza di CHD vi sia una relazione stretta e consistente. Lo studio di *Framingham*, ad esempio, ha mostrato

come i soggetti con i valori di HDL più elevati esibiscono il rischio più basso di sviluppare malattia arteriosa e coronarica (CAD) (Castelli WP, et al., 1986). Inoltre, sempre lo stesso studio ha evidenziato l'esistenza di una relazione inversa tra HDL-C ed incidenza di CAD; da successivi follow up, è poi emerso che ogni incremento di HDL-C dell'1% poteva essere associato ad una riduzione del 2% del rischio di sviluppare CAD (Castelli WP, et al., 1992).

Altri studi, come l'*US Physicians' Health Study*, gli studi *PROCAM*, *Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC)* e lo stesso *Framingham*, hanno mostrato che basse concentrazioni di HDL nel siero (<40 mg/dl in entrambi i sessi, o <40 mg/dl negli uomini e <50 mg/dl nelle donne; \*per convertire in mmol/L, moltiplicare per 0,0259) (Chapman MJ, et al., 2004) costituiscono un fattore di rischio indipendente per CHD, sia in soggetti diabetici che non-diabetici (Maron DJ, 2000; Sharrett AR, et al., 2001; Gotto AM Jr and Brinton EA, 2004).

Studi prospettici hanno rivelato che il rischio d'insorgenza di CHD s'innalza del 3% nelle donne e del 2% negli uomini per ogni calo di 1 mg/dl di HDL-C (Wilson PW, 1990). Al contrario, alte concentrazioni di HDL (>60 mg/dl), oltre a predisporre ad un minor rischio di eventi cardiovascolari avversi, sono tipicamente associate a longevità (Barter P, 2004).

La prevalenza di bassi livelli di HDL può variare tra il 20%, nella popolazione generale, ed il 60%, in pazienti con CHD (Franceschini G, 2001). Bassi livelli di HDL, inoltre, non sono solo associati con un aumento dell'incidenza di CHD, ma anche con un maggiore rischio di sviluppare aterosclerosi carotidea, morte per stroke ischemico ed un quadro di progressione aterosclerotica particolarmente aggressivo, definito angiograficamente malattia arteriosa coronaria (CAD) (Maron DJ, 2000; Gotto AM Jr and Brinton EA, 2004).

Infine, è importante notare ciò che è emerso dal recente studio *Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL) trial*: nella coorte di pazienti con sindrome coronarica acuta trattati con atorvastatina, un farmaco ipolipemizzante della classe delle statine, il fattore più predittivo, nei confronti dell'insorgenza di eventi cardiovascolari avversi, è risultato proprio il livello plasmatico di HDL-C e non, invece, il livello di LDL-C (Olsson AG, et al., 2005).

E', perciò, importante delineare le caratteristiche e le funzioni delle lipoproteine ed, in particolar modo, delle HDL, per comprendere il loro ruolo nel metabolismo lipidico ed

individuare i processi biologici che possono costituire un possibile bersaglio d'intervento terapeutico.

### ***Metabolismo lipoproteico in vivo: una panoramica***

I principali lipidi del plasma sono colesterolo, trigliceridi e fosfolipidi. In minor concentrazione si ritrovano altre sostanze lipofile come vitamine liposolubili ed ormoni. Tutti questi composti sono compartimentalizzati e resi solubili tramite la loro associazione con le apolipoproteine, andando a costituire complessi macromolecolari, le lipoproteine (DA Playford, GF Watts, 1997; Goodman and Gilman, 1996). Gli organi deputati alla sintesi e all'assemblaggio di tali complessi sono principalmente fegato e intestino.

Le lipoproteine sono particelle globulari di elevata massa costituite da un nucleo centrale apolare, ricco essenzialmente di trigliceridi ed esteri del colesterolo, e da un involucro esterno polare, formato da fosfolipidi, proteine e piccole quantità di colesterolo libero. Le lipoproteine differiscono tra loro per densità, composizione lipidica e natura della porzione apolipoproteica: in particolare, è importante notare che le apolipoproteine determinano il destino metabolico delle particelle lipoproteiche agendo da elementi strutturali, cofattori per enzimi e ligandi per l'interazione con recettori. In base alla loro differente densità, le lipoproteine possono essere separate tramite ultracentrifugazione in:

- chilomicroni e residui
- lipoproteine a densità molto bassa (*very low density lipoproteins*, VLDL)
- lipoproteine a densità intermedia (*intermediate density lipoproteins*, IDL)
- lipoproteine a bassa densità (*low density lipoproteins*, LDL)
- lipoproteine ad alta densità (*high density lipoproteins*, HDL).

Il destino dei lipidi nel plasma segue tre vie principali: la prima, detta anche via esogena, rende conto del metabolismo dei lipidi introdotti con la dieta ed è legata all'azione dei chilomicroni; la seconda, o via endogena, ha inizio con la secrezione di VLDL da parte del fegato; la terza, definita anche trasporto inverso del colesterolo, catalizza il ritorno del colesterolo al fegato ed ha le HDL come attori principali. Sia la via esogena che quella endogena contribuiscono ai livelli di lipidi circolanti (Norata GD, AL Catapano, 2004).

### Via esogena

Dopo l'assorbimento dal tratto gastroenterico, il colesterolo ed i trigliceridi provenienti dalla dieta sono associati ad una serie di apolipoproteine (A-I, A-II, B-48, C-I, C-II, C-III, E) a formare i chilomicroni, le più grandi tra le lipoproteine. I chilomicroni sono sintetizzati nelle cellule epiteliali dell'intestino tenue e vengono rilasciati nella circolazione sanguigna attraverso le vie linfatiche. Nell'endotelio vascolare, la lipasi-lipoproteica (LPL), attivata dall'apoC-II associata ai chilomicroni, idrolizza e libera i trigliceridi che serviranno come substrato energetico per i tessuti periferici. L'apoE presente sulla superficie dei chilomicroni favorisce l'ancoraggio agli eparansolfato-proteoglicani (HSPG) della membrana cellulare rendendo accessibili i chilomicroni all'azione della LPL. L'apoC-I e l'apoC-III hanno un'azione inibitoria sui processi lipolitici in quanto facilitano la dissociazione dell'apoE dalle lipoproteine, oltre ad essere in grado di mascherare i siti di legame per la LPL ed ad inibire l'azione dell'apoC-II. Dopo che i triacilgliceroli del nucleo apolare sono stati rimossi, la particella si stacca dall'endotelio capillare e rientra in circolo dove scambia attivamente apoproteine con altre lipoproteine del plasma. Si forma così una nuova lipoproteina detta chilomicrone residuo, arricchita in esteri del colesterolo ed apoproteine B-48 ed E. I chilomicroni residui sono raccolti dal fegato in un processo di endocitosi mediata da recettori: il legame tra apoproteine E e recettori specifici sulla superficie degli epatociti promuove la captazione della particella che viene poi degradata nei lisosomi (DA Playford, GF Watts, 1997; Goodman and Gilman, 1996); più del 50% dei chilomicroni residui vengono captati dal fegato attraverso l'interazione con il recettore specifico per le LDL (LDL-R). Esiste, tuttavia, un'altra via attraverso la quale i chilomicroni residui vengono captati dal fegato, infatti, i soggetti affetti da ipercolesterolemia familiare, privi della funzionalità di LDL-R, hanno una normale captazione dei chilomicroni residui. Recenti evidenze sperimentali, ottenute tramite studi di microscopia elettronica, indicano che le particelle residue, dopo aver attraversato le fenestrate dei sinusoidi epatici ed esser penetrate nello spazio di Disse, interagiscono tramite apoE con i proteoglicani presenti sulla superficie dei microvilli degli epatociti; tale interazione accresce l'affinità per il legame con un altro recettore della famiglia dei LDL, l'LRP, responsabile dell'endocitosi (Havel RJ, Hamilton RL, 2004). La funzione dei chilomicroni è quindi quella di trasferire i triacilgliceroli alimentari ai tessuti per il mantenimento dei depositi o per

le loro necessità energetiche. Inoltre, trasportano il colesterolo alimentare al fegato che lo immette nella bile in forma imm modificata o dopo conversione ad acidi biliari e lo distribuisce ai tessuti extraepatici come costituente di altre lipoproteine.

#### Via endogena

La via endogena ha inizio con la secrezione di VLDL da parte del fegato ed è sempre attiva, anche se la maggior attività si ha nella fase post-prandiale (le VLDL rappresentano l'80% delle particelle circolanti in questa fase).

Lipidi di nuova sintesi sono aggiunti alle particelle residue andando a costituire le VLDL, ricche in trigliceridi, le quali verranno poi rilasciate nella circolazione sistemica. L'assemblaggio delle VLDL ha inizio ad opera della proteina di trasferimento microsomiale (MTP) che trasporta i lipidi verso l'apolipoproteina B-100, in corso di sintesi. In funzione dell'ulteriore associazione con lipidi, che avviene in un secondo tempo, si generano VLDL di diverse dimensioni, dalle VLDL<sub>1</sub> ricche in trigliceridi, a quelle più piccole e dense, ricche in colesterolo estere, dette VLDL<sub>3</sub> (Olofsson S-O, Borèn J, 2005). La maggior parte dei trigliceridi delle VLDL è idrolizzata dalla LPL al fine di fornire substrati utilizzabili come fonte di energia nell'intervallo tra i pasti, formando così ulteriori particelle residue, le IDL. Alcune di queste sono captate dal recettore per le LDL nel fegato, e altre sono trasformate in LDL dalla lipasi epatica (HL). In questo rimaneggiamento vengono rimossi i trigliceridi del nucleo centrale, sostituiti con esteri del colesterolo, e tutte le apoproteine tranne l'apolipoproteina B-100. La particella LDL, prevalentemente ricca in colesterolo, è captata dal recettore specifico per LDL (LDL-R), una proteina di 160kDa espressa in tutte le cellule dei mammiferi, capace di riconoscere come ligandi sia l'apoB-100 che l'apoE, e metabolizzata sia nel fegato che nei tessuti periferici. Le particelle legate sono internalizzate per endocitosi ed internalizzate nei lisosomi, dove una esterasi lisosomiale, la lipasi acida, idrolizza gli esteri del colesterolo rendendo tale lipide disponibile per una serie di reazioni, quali la formazione di membrane, la sintesi di ormoni steroidei, la riesterificazione da parte dell'enzima citoplasmatico acil-CoA-colesterolo acil transferasi (ACAT). Prima di interagire con i recettori cellulari, le LDL possono subire modificazioni legate principalmente all'attività della proteina di trasferimento degli esteri del colesterolo (CETP), che media il trasferimento di trigliceridi e colesterolo estere tra lipoproteine. In particolare, i trigliceridi delle VLDL sono trasferiti alle LDL ed alle HDL in cambio di esteri del

colesterolo. Questi scambi diminuiscono il contenuto di colesterolo estere delle LDL e aumentano il contenuto di trigliceridi, rendendo queste particelle più suscettibili all'azione lipolitica (a carico dei trigliceridi) da parte della HL. Il risultato finale è la formazione di *LDL piccole e dense* (dovuto ad una riduzione del rapporto lipidi/proteine), ritenute più aterogene delle LDL normali (Olofsson S-O, Borèn J, 2005).

L'influsso cellulare di colesterolo attraverso la via del LDL-R porta a tre eventi distinti, ma concomitanti: una diminuzione della sintesi di colesterolo e di LDL-R ed un aumento della sintesi di colesterolo estere. Questi effetti di feedback negativo sono controllati da un fattore di trascrizione, la *sterol regulatory element-binding protein* (SREBP), che può modulare la trascrizione di geni coinvolti nella biosintesi degli steroli, come l'idrossi-metil-glutaril coenzima A sintasi (HMGCoA-sintasi), l'idrossi-metil-glutaril coenzima A reductasi (HMGCoA-reductasi), l'LDL-R ed altri enzimi coinvolti nel metabolismo degli acidi grassi (Brown MS and JL Goldstein, 1999). Le SREBP (-1a, -1c e -2) appartengono alla superfamiglia dei fattori di trascrizione caratterizzata dal motivo strutturale *helix-loop-helix/leucine zipper* e sono sintetizzate come precursori inattivi nel reticolo endoplasmatico, dove restano ancorate grazie a domini proteici transmembrana (Philippe Costet, et al., 2006). L'accumulo di colesterolo diminuisce il rilascio proteolitico di SREBP dal precursore legato alla membrana. Viceversa, in presenza di richiesta di colesterolo da parte della cellula, il precursore di SREBP (sia -1 che -2) viene tagliato in due regioni dalle proteasi S1P e S2P, permettendo il rilascio del fattore di trascrizione solubile, la porzione N-terminale, che si sposta nel nucleo stimolando la trascrizione dei geni bersaglio (Brown MS and JL Goldstein, 1999). SREBP-1a e SREBP-1c derivano da un gene diverso da quello da cui deriva SREBP-2 e danno origine a due diverse specie di mRNA. Tra le isoforme -1a ed -1c, SREBP-1c è quella più rappresentata nel fegato e sembra la più rilevante fisiologicamente (Shimomura I, et al., 1997). SREBP-2 attiva in via preferenziale i geni coinvolti nella biosintesi del colesterolo, mentre le isoforme SREBP-1c e -1a attivano geni coinvolti nella biosintesi degli acidi grassi o nel metabolismo dei carboidrati, tra cui l'acido grasso sintetasi, l'acetil-CoA carbossilasi e la glucochinasi (Foretz M, et al., 1999; Joseph SB, et al., 2002; Shimano H, et al., 1997).

### HDL e trasporto inverso del colesterolo

Il colesterolo non può essere catabolizzato per via enzimatica nell'uomo se non in minima parte ed è eliminato per via epatica. Esiste, pertanto, un trasporto centripeto che riporta il colesterolo al fegato per le vie metaboliche finali. Nell'ambito di questo processo, è di particolare interesse il ruolo delle HDL, dato che tali lipoproteine hanno dimostrato di possedere importanti azioni protettive nei confronti del rischio cardiovascolare (Wang M, Briggs MR, 2004). Le HDL potrebbero attenuare o rallentare la formazione delle lesioni aterosclerotiche mediando l'efflusso di colesterolo e fosfolipidi dalle cellule dei tessuti periferici e favorendo il trasporto di tali composti al fegato. In questo processo, noto come trasporto inverso del colesterolo (RCT), rivestono un ruolo chiave vari organi ed importanti molecole, fondamentali nel metabolismo delle HDL (Wang M, Briggs MR, 2004). Le HDL sono le più piccole e le più dense lipoproteine del plasma. Nella loro forma matura, si presentano come particelle sferiche con un nucleo interno idrofobico, costituito principalmente da colesterolo e solo in piccola parte da trigliceridi, circondato da un monostrato molecolare superficiale che include fosfolipidi, colesterolo libero e apoproteine. Le HDL umane contengono due principali apolipoproteine: l'apoA-I e l'apoA-II, in percentuale rispettivamente del 70% e del 20%. In percentuale molto ridotta rientrano nella composizione delle HDL anche altre apoproteine come l'apoA-IV, le apoC, apoD, apoE ed apoJ (Barter PJ, 2002). Nel loro percorso all'interno dell'organismo le HDL subiscono un continuo rimodellamento da parte di fattori plasmatici e cellulari, e ciò giustifica l'eterogeneità della frazione di HDL che si riscontra nel plasma umano (Rye K-A, Clay MA, Barter PJ, 1999) (fig. 6; fig. 11). Infatti, a seconda del criterio di separazione e di identificazione usato, si possono distinguere: particelle discoidali o sferiche, utilizzando il microscopio elettronico; due principali frazioni, HDL<sub>2</sub> (1,063<densità<1,125 g/ml) e HDL<sub>3</sub> (1,125<densità<1,21 g/ml) quando separate, in base alla densità, tramite ultracentrifugazione; cinque sottopopolazioni differenti di HDL (in ordine dimensionale decrescente HDL<sub>2b</sub>, HDL<sub>2a</sub>, HDL<sub>3a</sub>, HDL<sub>3b</sub> e HDL<sub>3c</sub>), tramite elettroforesi su gel di poliacrilamide in condizioni non denaturanti; A-I HDL e A-II/A-II HDL, sulla base della composizione apolipoproteica; popolazioni di HDL a diverso grado di migrazione, utilizzando l'elettroforesi su gel di agarosio. Quest'ultima tecnica, in particolare, consente di identificare particelle con migrazione alfa ( $\alpha$ ), la popolazione più rappresentata nel plasma, particelle con

migrazione pre-beta (pre- $\beta$ ), di forma discoidale, costituite da una o due molecole di apoA-I complessate con fosfolipidi e piccole quantità di colesterolo non esterificato, e particelle gamma-migranti ( $\gamma$ ), contenenti apoE, ma non apoA-I (Barter PJ, 2002).

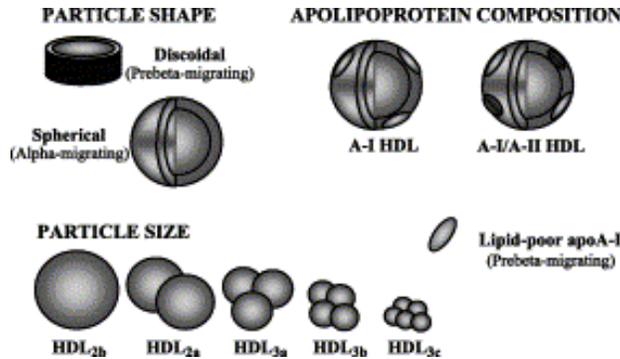


Figura 6: popolazioni di HDL (da: Barter PJ, et al., 2002).

Il metabolismo delle HDL, che consiste in arricchimento, deplezione o scambio di lipidi e apoproteine, coinvolge almeno dieci proteine diverse, tutte con una funzione specifica: apoA-I, ABCA1, LCAT, SR-BI, CETP, PLTP, LPL, HL, EL e cubulina (Barter PJ, 2002; Wang M, Briggs MR, 2004).

L'apolipoproteina A-I è necessaria per la biosintesi ed il metabolismo delle HDL: infatti, la delezione completa del gene codificante per apoA-I, nell'uomo, si manifesta con livelli plasmatici di colesterolo HDL molto bassi e con insorgenza prematura di malattia coronarica (Leiter LA, et al., 1994).

L'*ATP-Binding Cassette Transporter A-1* (ABCA1) è una proteina trasportatrice di membrana che media l'efflusso di fosfolipidi e colesterolo in maniera unidirezionale verso specifici accettori extracellulari poveri di lipidi, come apoA-I (Yancey PG, et al., 2003). Questo processo ha come conseguenza la formazione delle HDL discoidali contenenti apoA-I (Barter PJ, et al., 2002). Una deficienza genetica di ABCA1 è alla base della malattia di Tangier, un raro disordine caratterizzato da accumulo di colesterolo nel sistema reticolo-endoteliale e livelli plasmatici di HDL marcatamente ridotti (Hobbs HH, Rader DJ, 1999).

L'enzima *Lecithin:cholesterol acyltransferase* (LCAT) è una glicoproteina plasmatica che catalizza il trasferimento di un gruppo acile dalla fosfatidilcolina al colesterolo generando colesterolo-estere e lisofosfatidil-colina. Questa reazione avviene principalmente sulla superficie della particella HDL ed è responsabile della formazione

della quasi totalità del colesterolo-estere che circola nel plasma (Glomset JA, 1968). La deficienza genetica dell'enzima LCAT è associata a livelli plasmatici di colesterolo-HDL ed apoA-I particolarmente ridotti. Paradossalmente, tale condizione non si traduce in un rischio di aterosclerosi superiore alla norma (Kuivenhoven JA, et al., 1997).

Il recettore "scavenger" di classe B e tipo I (SR-BI) è una proteina di membrana che media selettivamente l'uptake del colesterolo-HDL da parte del fegato ed è importante nella regolazione del trasporto inverso del colesterolo (Rigotti A, et al., 1997). Inoltre, SR-BI espresso dai macrofagi può contribuire all'efflusso di colesterolo da tali cellule (Yancey PG, et al., 2000).

La *Cholesteryl-Ester Transfer Protein* (CETP) è una glicoproteina idrofobica di origine epatica che circola nel plasma legata principalmente alle HDL. Essa promuove la redistribuzione degli esteri del colesterolo, dei trigliceridi e, in misura minore, dei fosfolipidi tra le lipoproteine plasmatiche. La CETP preleva lipidi da alcune particelle lipoproteiche e li deposita in altre lipoproteine, in un processo che si risolve in un equilibramento dei lipidi tra le varie frazioni lipoproteiche. Il risultato netto dell'azione della CETP è un trasferimento di massa: esteri del colesterolo vengono trasferiti dalle HDL a lipoproteine contenenti apoB come le VLDL, ricche in trigliceridi, che vengono trasferiti, in senso inverso, da tali lipoproteine verso HDL e LDL (Barter PJ, et al., 2002; Rader DJ, 2003). La deficienza di CETP è associata a manifestazioni quali iperalfalipoproteinemia, elevati livelli plasmatici di HDL sferiche di grosse dimensioni, e cambiamenti nella composizione delle HDL e LDL (Inazu A, et al., 1994). Ad esempio, in pazienti con deficienza di CETP, si ritrovano incrementati livelli di HDL ricche in apoE (Yamashita S, et al., 1990) o presenza di LDL più piccole e con minore affinità per i siti recettoriali (Sakai N, et al., 1995). Tali dati sono supportati anche dai risultati di esperimenti condotti in vivo su animali normo- ed iper-colesterolemici: il trattamento di questi animali con anticorpi neutralizzanti l'azione della CETP provocava una diminuzione dei livelli di LDL e VLDL ed un incremento nei livelli di HDL ricche in apoE (Evans GF, Bensch WR, 1994). Questi dati accrescono la possibilità che l'inibizione dell'attività della CETP possa essere uno degli approcci per aumentare la quota di colesterolo HDL (Wang M, Briggs MR, 2004).

La *Phospholipid Transfer Protein* (PLTP) è un'altra glicoproteina del plasma, prodotta da un gene della stessa famiglia dei geni della CETP. La PLTP promuove il

trasferimento di fosfolipidi tra HDL ed altre lipoproteine. Di particolare importanza è il ruolo della PLTP nel rilascio di fosfolipidi dai chilomicroni alle HDL (Qin S, et al., 2000; Rader DJ, 2003).

La lipasi-lipoproteica (LPL) è una glicoproteina sintetizzata negli adipociti, nelle cellule muscolari lisce e nei miociti cardiaci. Essa viene secreta, trasportata e ancorata sulla superficie luminale dell'endotelio vascolare tramite il legame agli eparan-solfato-proteoglicani (HSPG) (Camps L, et al., 1990). Un saggio in vitro ha stabilito che la LPL è principalmente una trigliceride-lipasi, distinguendola da altre proteine che invece presentano una maggiore attività fosfolipasica (McCoy M, et al., 2002). La LPL catalizza l'idrolisi dei trigliceridi e del colesterolo presenti nei chilomicroni e nelle VLDL. L'idrolisi riduce la dimensione di queste particelle liberando anche componenti di superficie come fosfolipidi ed apoproteine, che possono essere acquisiti dalle HDL (Goldberg IJ, 1996; Barter PJ, et al., 2002). E' da notare che la deficienza di LPL, sia negli animali che nell'uomo, è associata a severa ipertrigliceridemia e livelli molto bassi di HDL (Santamarina-Fojo S, 1992).

La lipasi epatica (HL) e la lipasi endoteliale (EL) sono proteine prodotte dalla stessa famiglia di geni della LPL (Bensadoun A, Berryman DE, 1996; Jaye M, et al., 1999). La HL, legata alla superficie degli epatociti e delle cellule endoteliali epatiche, idrolizza i trigliceridi e i fosfolipidi delle HDL<sub>2</sub> di grosse dimensioni, oltre che delle VLDL residue (IDL) e delle LDL (Sanan DA, et al., 1997; Connelly PW, 1999). Tale processo promuove il rimodellamento delle grosse HDL<sub>2</sub> nelle più piccole e più dense HDL<sub>3</sub> (Connelly PW, 1999). Nell'uomo, il deficit genetico di HL è associato a livelli di colesterolo HDL lievemente aumentati e ad una maggiore presenza delle HDL di maggiori dimensioni (Hegele R, et al., 1993). Al contrario, topi e conigli transgenici che sovraesprimono HL presentano livelli di colesterolo-HDL diminuiti e particelle di dimensioni inferiori (Yancey PG, et al., 2004; Barbagallo CM, et al., 1999; Yancey PG, et al., 2004). E' stato riportato che la regressione dell'aterosclerosi coronarica ottenuta con un'intensiva terapia ipolipemizzante si è dimostrata concomitante ad una ridotta attività di HL (Guendouzi K, et al., 1998).

La EL, pur essendo attiva come trigliceride-lipasi, ha una preponderante attività fosfolipasica (Rader DJ, Jaye M, 2000). Studi comparativi tra le attività di EL, LPL e HL hanno rivelato che EL idrolizza preferenzialmente i lipidi delle HDL, risultando più

efficace in tale compito della LPL, che risulta più attiva verso lipoproteine contenenti apoB (Rader DJ, Jaye M, 2000). E' da notare che EL viene sovraespressa nelle cellule endoteliali in risposta a citochine quali IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , così come in risposta allo stress di taglio subito dai vasi, tutti fattori implicati nella patogenesi dell'aterosclerosi e dell'instabilità di placca (Wang M, Briggs MR, 2004). Il preciso ruolo di queste tre lipasi nel trasporto inverso del colesterolo resta tuttavia da chiarire (Rader DJ, 2003).

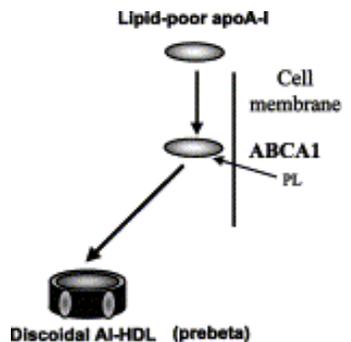
La cubulina è un recettore endocitotico espresso principalmente nel tubulo contorto prossimale del rene e coinvolto nel catabolismo delle HDL e nella clearance della apoA-I (Birn H, et al., 1997; Moestrup SK, et al., 1998). Identificata inizialmente come recettore per l'endocitosi del complesso fattore intrinseco-vitamina B12, la cubulina media anche l'endocitosi delle HDL. Tra le lipoproteine presenti nelle HDL, l'apo A-I risulta essere il ligando più affine per la cubulina, come dimostrato da saggi di cromatografia per affinità con cubulina immobilizzata (Kozyraki R, et al., 1999). L'affinità dell'apoA-I per la cubulina correla con l'*uptake* renale dell'apo A-I. Inoltre, la perdita urinaria di apo A-I è associata con alcuni noti casi di deficit funzionale della cubulina (Kozyraki R, et al., 1999). Parecchi studi hanno dimostrato che i livelli circolanti di apo A-I e di HDL dipendono anche dalla velocità del loro catabolismo renale (Braschi S, et al., 2000).

La regolazione del metabolismo e del traffico delle HDL coinvolge ulteriori eventi che ne promuovono l'assemblaggio ed il rimodellamento nello spazio extracellulare (Barter PJ, et al., 2002), quali: l'interscambio dell'apoA-I tra particelle pre- $\beta$ -migranti, povere di lipidi, e particelle  $\alpha$ -migranti, arricchite in lipidi; l'incorporazione dell'apoA-II nelle HDL contenenti apoA-I per formare particelle costituite da entrambe le apoproteine (Barter PJ, et al., 2002).

L'apoA-I compie un vero e proprio ciclo, che inizia con la formazione di particelle di apoA-I povere in lipidi e coinvolge la genesi di pre- $\beta$ -HDL e l'evoluzione di queste in  $\alpha$ -HDL. Il ciclo si conclude poi con il rimodellamento delle  $\alpha$ -HDL mature e la rigenerazione delle molecole di apoA-I iniziali (Barter PJ, et al., 2002).

Le particelle di apoA-I acquisiscono rapidamente fosfolipidi dalla membrana cellulare in un processo promosso da ABCA1 (Lawn RM, et al., 1999; Bodzioch M, et al., 1999; Brooks-Wilson A, et al., 1999; Orsò E, et al., 2000) (fig. 7). Questo evento ha come risultato la formazione delle HDL pre- $\beta$ -migranti, particelle discoidali molto efficaci nel

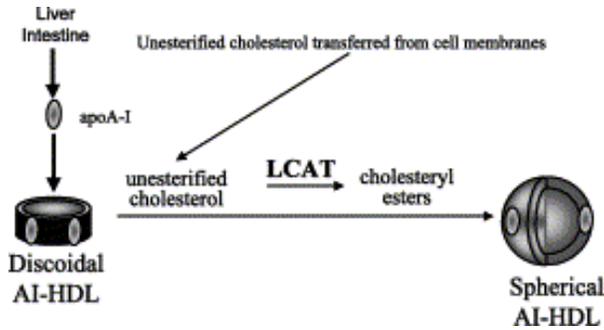
promuovere, a loro volta, l'efflusso cellulare di colesterolo libero attraverso ABCA1 (Favari E, et al., 2004).



**Figura 7:** formazione delle particelle A-I HDL discoidali (da: Barter PJ, et al., 2002).

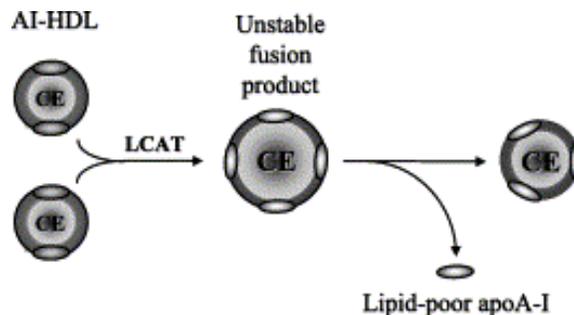
Vi sono dati a sostegno dell'importanza delle particelle pre- $\beta$  nella stimolazione di questo tipo d'efflusso. Infatti, studi in vitro dimostrano che la deplezione della frazione lipoproteica pre- $\beta$ , ottenuta incubando HDL<sub>3</sub> con chimasi umana, è in grado di inibire selettivamente l'efflusso di colesterolo ABCA1-mediato (Favari E, et al., 2004). Le HDL<sub>3</sub>, come è stato detto nella sezione introduttiva di questo lavoro di tesi, rappresentano la frazione più piccola e più densa delle lipoproteine plasmatiche (Barter PJ, et al., 2002). L'analisi tramite elettroforesi su gel di agarosio ha dimostrato che le HDL<sub>3</sub> contengono specie molecolari sia  $\alpha$ - che pre- $\beta$ -migranti, con un contenuto in pre- $\beta$  di circa il 6%. Il trattamento con chimasi causa la deplezione completa della sottopopolazione di pre- $\beta$ -HDL dopo solo due ore di incubazione, senza avere alcuna influenza sulle  $\alpha$ -HDL. La chimasi è una proteasi neutra secreta da mast-cellule attivate. Quando questa secrezione avviene nell'intima vasale, può verificarsi un'estesa degradazione di pre- $\beta$ -HDL, particelle di cui questo compartimento è molto ricco. Tali eventi, perciò, potrebbero ridurre l'abilità del fluido intimale di rimuovere l'eccesso di colesterolo cellulare attraverso ABCA1, contribuendo alla formazione di "foam-cells" nelle aree della parete vasale a più alto rischio di aterosclerosi (Favari E, et al., 2004).

Il passo successivo alla formazione delle pre- $\beta$ -HDL prevede l'interazione di queste particelle con l'enzima plasmatico LCAT, che catalizza l'esterificazione del colesterolo generando un gradiente favorevole ad un continuo efflusso di colesterolo libero dalla superficie cellulare alle lipoproteine (Barter PJ, et al., 2002) (fig. 8).



**Figura 8:** ruolo di LCAT nella formazione di HDL sferiche  $\alpha$ -migranti (da: Barter PJ, et al., 2002).

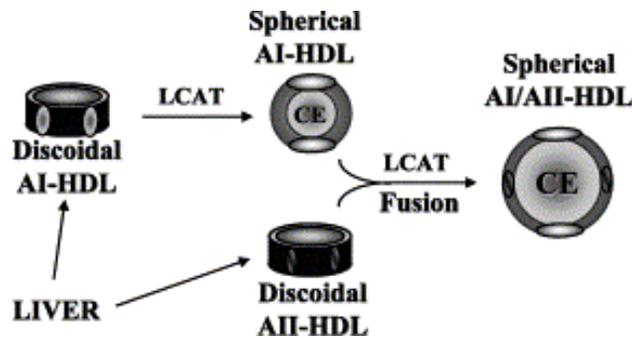
Gli esteri del colesterolo che si formano a seguito dell'attività dell'LCAT sono idrofobici e non possono essere accomodati all'interfaccia acquosa della superficie lipoproteica. Essi, perciò, migrano all'interno della particella formando un "core" idrofobico, in un processo che converte le pre- $\beta$ -HDL discoidali nelle piccole HDL sferiche  $\alpha$ -migranti (Rye K-A, et al., 1999). In superficie, invece, queste piccole sfere (diametro 7,8-8,2 nm) consistono di un monostrato molecolare, costituito da due molecole di apoA-I, fosfolipidi e colesterolo libero. Successivamente, sia LCAT che PLTP partecipano al rimodellamento delle piccole HDL sferiche  $\alpha$ -migranti promuovendo la fusione di tali particelle in particelle più grandi, contenenti tre o quattro molecole di apoA-I (Barter PJ, et al., 2002). Sembra che i prodotti della fusione costituiti da quattro molecole di apolipoproteina siano instabili a meno che una molecola di apoA-I non venga espulsa generando una particella con tre apolipoproteine, più stabile (Barter PJ, et al., 2002) (fig. 9).



**Figura 9:** fusione delle A-I HDL mediata da LCAT (da: Barter PJ, et al., 2002).

Le HDL sferiche  $\alpha$ -migranti così generate subiscono un ulteriore rimodellamento ad opera degli enzimi CETP, HL e PLTP, che si risolve in una riduzione dimensionale delle particelle e nella liberazione di un'altra molecola di apoA-I povera di lipidi (Clay MA, et al., 1992), chiudendo il ciclo dell'apoA-I.

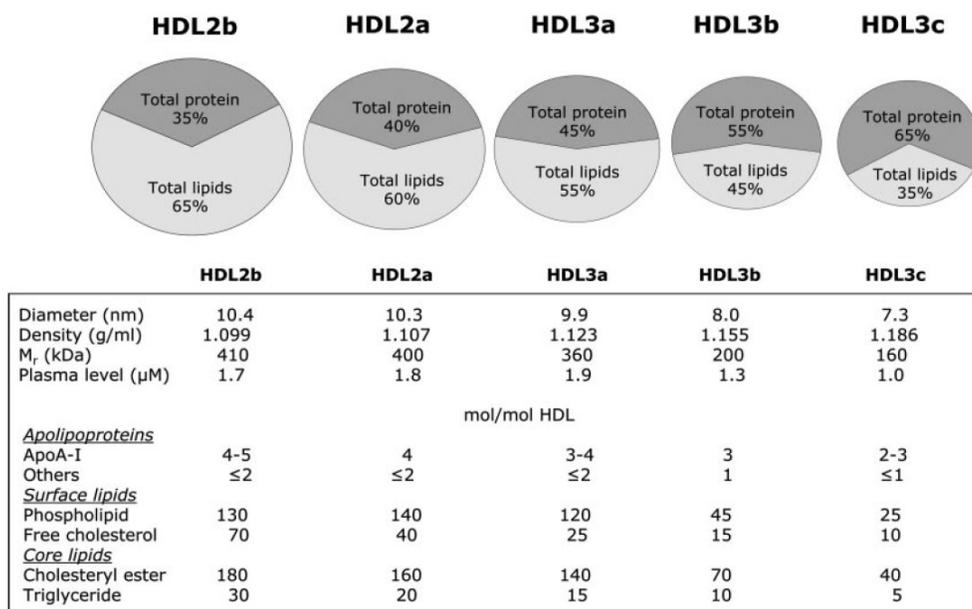
Circa la metà dell'apoA-I presente nelle HDL umane si trova in particelle che contengono anche apoA-II (Barter PJ, et al., 2002). E' probabile che apoA-I e apoA-II entrino nel plasma separatamente e siano assemblate in AI/AII-HDL all'interno del plasma stesso. Come per apoA-I, apoA-II è sintetizzata nel fegato ed è secreta sottoforma di molecola povera di lipidi. Nello spazio extracellulare, questa proteina idrofobica acquisisce fosfolipidi dalla membrana delle cellule, probabilmente tramite un processo ABCA1-mediato (Barter PJ, et al., 2002). Si forma così un complesso apoA-II/fosfolipidi, che funziona da accettore di colesterolo e genera le AII-HDL discoidali. A differenza di quanto avviene per le AI-HDL, le AII-HDL discoidali non sono substrato dell'LCAT (Jonas A, 1986) e non sono convertite in particelle sferiche. La presenza dell'apoA-II nelle particelle sferiche AI/AII-HDL è, probabilmente, il risultato della fusione tra AII-HDL discoidali e AI-HDL, un processo in cui LCAT presenta comunque un importante ruolo catalitico (Clay MA, et al., 2000) (fig. 10).



**Figura 10:** meccanismo di incorporazione dell'apoA-II nelle A-I HDL (da: Barter PJ, et al., 2002).

Anomalie genetiche che si ripercuotono sull'assemblaggio e rimodellamento delle HDL includono mutazioni nei geni che codificano per ABCA1, LCAT, CETP, LPL ed HL. Una varietà di stati dislipidemicici caratterizzati da bassi livelli di colesterolo-HDL risulta essere ricollegabile a qualcuno di questi difetti genetici (Barter PJ, et al., 2002).

La figura 11 riassume le caratteristiche biochimiche e chimico-fisiche della popolazione eterogenea delle HDL (Kontush A and Chapman MJ, 2006).



**Figura 11:** composizione e caratteristiche chimico-fisiche delle HDL in soggetti normolipidemic  
(da: Kontush A and Chapman MJ, 2006)

## **Trasporto inverso del colesterolo**

La gran parte delle cellule animali, tranne epatociti e cellule steroideogeniche, non è in grado di catabolizzare il colesterolo. Pertanto, il colesterolo in eccesso deve essere rimosso e trasportato al fegato o ai tessuti steroideogenici, dove viene convertito rispettivamente in sali biliari o in ormoni steroidei. Le HDL svolgono un ruolo centrale in questo processo, denominato da Glomset, nel 1967, “trasporto inverso del colesterolo” (RCT) (Owen JS and Mulcahy JV, 2002).

Il colesterolo è un componente essenziale delle membrane eucariotiche ed un precursore nella sintesi degli acidi biliari e degli ormoni steroidei. Esso riduce la fluidità della membrana contrastando l'azione degli acidi grassi insaturi presenti nei fosfolipidi. Il colesterolo è abbondante nella membrana plasmatica ed in quella dell'apparato del Golgi (Lange Y, 1991), specialmente nelle “lipid rafts”, cioè quelle aree della membrana plasmatica ricche di proteine che partecipano a vie di trasduzione del segnale (Simons K and Ehehalt R, 2002). Quasi tutte le cellule animali sintetizzano colesterolo. Come per gli acidi grassi, esso è sintetizzato a partire dall'acetil-coenzima A (acetil-CoA), ma a differenza dei primi, non può essere ossidato completamente a CO<sub>2</sub>. In aggiunta a quello sintetizzato *de novo* al loro interno, le cellule acquisiscono colesterolo anche dalle lipoproteine circolanti. Quando il colesterolo cellulare è in eccesso, tanto da superare la possibilità di associazione con i fosfolipidi nelle membrane o l'esterificazione e lo stoccaggio in goccioline lipidiche, diviene citotossico. Sono stati proposti diversi meccanismi per spiegare tale citotossicità (Tabas I, 2002), tra cui la formazione di cristalli di colesterolo, di ossisteroli tossici e la disorganizzazione dei domini di membrana cruciali per il funzionamento di particolari enzimi e molecole segnale. In tali condizioni, inoltre, vengono danneggiati e bloccati i sistemi di efflusso attraverso cui il colesterolo può essere espulso dalla cellula (Feng B and Tabas I, 2002).

Gli effetti della citotossicità da colesterolo sono stati studiati trattando macrofagi in coltura con inibitori dell'ACAT, l'enzima responsabile dell'esterificazione intracellulare del colesterolo, in condizioni sperimentali che consentivano l'acquisizione di lipoproteine cariche di colesterolo attraverso la via del recettore “scavenger”, non sottoposto a down-regulation. In questa maniera, il colesterolo libero, accumulato in eccesso, generava un'attivazione delle vie apoptotiche estrinseca e mitocondriale (Yao PM and Tabas I 2001; Yao PM and Tabas I, 2000). L'apoptosi indotta da colesterolo segue

l'attivazione della cosiddetta "unfolded protein response" (UPR) (Feng B, et al. 2003): quando le cellule non permettono un ripiegamento ("folding") corretto delle proteine nel reticolo endoplasmatico (ER), viene attivata una via che inizia con l'arresto della traslazione proteica e la sintesi di alcune proteine dette *chaperonine* (Schroder M and Kaufman RJ, 2005); questa risposta d'adattamento, tuttavia, fallisce e la cellula "si suicida" innescando l'apoptosi. E' stato suggerito che il colesterolo possa giocare un ruolo nell'attivazione della UPR favorendo lo svuotamento dei depositi di calcio del ER; determinati livelli calcio, infatti, sono essenziali per un "folding" corretto delle proteine nel ER (Blacklow SC and Kim PS, 1996).

Le cellule hanno sviluppato dei meccanismi per "sentire" e contrastare l'accumulo di steroli. Indicazioni a riguardo sono state ottenute da studi sulla regolazione a feedback della sintesi del colesterolo. In presenza di alti livelli intracellulari di colesterolo ed altri steroli (ad esempio, lanosterolo ed ossisteroli), alcune proteine dell'ER regolano la biosintesi del colesterolo promuovendo la degradazione ubiquitina-dipendente della HMG-CoA reduttasi, inibendo il trasporto dall'ER al Golgi dei fattori di trascrizione SREBP e riducendo l'uptake attraverso il recettore per LDL (Goldstein JL et al., 2006). Inoltre, le cellule possono "sentire" i livelli di colesterolo attraverso alcuni recettori nucleari/fattori di trascrizione, come l'eterodimero "liver X receptor/retinoid X receptor" (LXR/RXR) (Kalaany NY and Mangelsdorf DJ, 2006). LXR, esistente in due principali isoforme LXR $\alpha$  e/o LXR $\beta$ , può attivare la trascrizione di vari trasportatori di colesterolo della classe ABC ("ATP-binding cassette transporters"), di geni coinvolti nella sintesi e nella circolazione enteroepatica degli acidi biliari e di geni coinvolti nel metabolismo dei trigliceridi. LXR è attivato, a sua volta, da metaboliti idrossilati del colesterolo, da intermedi della via biosintetica del colesterolo e, debolmente, dal colesterolo stesso (Janowski BA et al., 1999; Yang C et al., 2006; Wong J et al., 2006). Probabilmente, per la cellula, gli steroli idrossilati fungono da segnale di pericolo, capace di indicare l'aumento della quota di colesterolo non esterificato tossico; in tali condizioni, viene stimolata l'attivazione delle vie LXR-dipendenti (Attie AD, 2007). L'attivazione del recettore LXR è stata proposta quale potenziale strategia terapeutica per incrementare i livelli di HDL e contrastare l'aterosclerosi (Joseph SB and Tontonoz P, 2003). Purtroppo, tale strategia provoca, in vivo, un aumento dei trigliceridi plasmatici a causa dell'induzione del fattore SREBP-1c, che controlla l'espressione di geni coinvolti

nella lipogenesi (Schultz JR et al., 2000). Alcuni studi recenti sugli agonisti del recettore LXR, hanno indicato che potrebbe essere possibile separare gli effetti avversi (aumento dei trigliceridi) da quelli terapeutici (aumento delle HDL) indirizzando specificamente a livello intestinale l'azione agonista (Burnham LR et al., 2006), o utilizzando agonisti selettivi per l'isoforma  $\beta$ , non implicata nella lipogenesi (Geyereggera R, et al., 2005; Bradley MN, et al., 2007).

Nell'uomo, approssimativamente, i due terzi del colesterolo sono trasportati dalle LDL, il 20% dalle HDL e la parte rimanente dalle VLDL. Abbiamo visto come il rischio di insorgenza di malattie cardiovascolari sia correlato positivamente con i livelli plasmatici di LDL e negativamente con quelli di HDL. Le LDL contribuiscono al contenuto intracellulare di colesterolo attraverso la loro endocitosi mediata da recettore; al contrario, le HDL agiscono come accettori di colesterolo e promuovono l'efflusso di colesterolo dalle cellule. La capacità delle HDL di rilasciare colesterolo al fegato, dove esso può essere secreto nella bile e poi escreto nelle feci, completa la via metabolica del trasporto inverso del colesterolo.

La prima tappa di questa importante via metabolica è rappresentata dall'efflusso cellulare di colesterolo.

### ***Efflusso di colesterolo***

L'efflusso di colesterolo può essere definito come il trasferimento di molecole di colesterolo libero (FC) dalla cellula ad un accettore extracellulare (Johnson WJ, Rothblat GH, et al., 1991). Sono stati riconosciuti tre meccanismi per l'efflusso di FC: la diffusione acquosa, la diffusione facilitata, mediata da SR-BI, ed un trasporto attivo unidirezionale, mediato dai trasportatori della classe ABC, tra cui ABCA1 (Yancey PG, et al., 2003).

#### Diffusione acquosa

La diffusione acquosa è possibile grazie al fatto che le molecole di colesterolo sono sufficientemente solubili in acqua da essere trasferite dalla membrana ad un accettore extracellulare. Questo processo coinvolge il desorbimento delle molecole di colesterolo dall'interfaccia lipide-acqua della membrana. Successivamente, tali molecole diffondono attraverso la fase acquosa e vengono adsorbite da un accettore (Phillips MC, et al., 1998). Lo strato acquoso stagnante che circonda le cellule crea una significativa barriera alla diffusione (Phillips MC, et al., 1987). Il trasferimento netto di colesterolo tra

cellule e accettori come le HDL è favorito dai processi che elevano il rapporto colesterolo libero/fosfolipidi nel donatore, le membrane cellulari, e riducono tale rapporto nell'accettore, le particelle lipoproteiche (Johnson WJ, Rothblat GH, et al., 1991). Fattori che riducono la densità del doppio strato lipidico tendono ad incrementare la velocità di trasferimento del colesterolo. Esempi di tali fattori sono l'alta curvatura superficiale della membrana cellulare, l'insaturazione delle catene aciliche dei fosfolipidi e un basso rapporto sfingomielina/fosfatidilcolina (Phillips MC, et al., 1987; Lund-Katz S, et al., 1988). L'efflusso per diffusione acquosa risulta essere lento e non saturabile e, sebbene la perdita di colesterolo dalla membrana plasmatica possa essere compensata dall'idrolisi di colesterolo estere intracellulare a FC, si tratta di un meccanismo poco efficiente nell'esaurire le scorte intracellulari di colesterolo estere (Rothblat GH, et al., 1999). Il movimento di colesterolo è, in questo caso, bidirezionale ed è guidato dal gradiente di concentrazione tra cellule e lipoproteine. Per creare e mantenere tale gradiente è necessaria l'esterificazione extracellulare del colesterolo da parte dell'enzima plasmatico LCAT (Yokoyama S., 2000). Tutti i tipi di cellule sono in grado di svolgere questo processo, ma ci può essere una certa variabilità dovuta alle diverse proprietà della membrana plasmatica e alla sua diversa organizzazione lipidica (Yokoyama S., 2000). La velocità dell'efflusso cellulare di colesterolo tramite diffusione acquosa dipende fortemente dalla struttura della particella che funge da accettore (Rothblat GH, et al., 1999). La dimensione della particella è importante perché influenza la collisione con le molecole di colesterolo presenti nella fase acquosa. Le particelle di dimensioni maggiori sono accettori inefficaci (Phillips MC, et al., 1998). E' probabile che la stessa albumina del siero, agendo da "navetta", sia coinvolta nel trasferimento di colesterolo dalle cellule alle lipoproteine (Zhao YY, Marcel Y, 1996).

### SR-BI

Il processo di diffusione acquosa può essere facilitato da proteine di membrana, come SR-BI (Yancey PG, et al., 2003). Lo "scavenger receptor class B type I" (SR-BI) è stato identificato dal gruppo di Krieger e collaboratori come un recettore per AcLDL, OxLDL e LDL native (Krieger M, Herz J, 1994; Acton S, et al., 1994). Solo più tardi è stato riconosciuto anche come recettore capace di legare le HDL con alta affinità, mediando l'uptake selettivo del colesterolo estere presente nelle HDL senza che tali lipoproteine subiscano degradazione (Acton S, et al., 1996; Murao K, et al., 1997). Inoltre, SR-BI è stato

riconosciuto capace di mediare anche l'efflusso di colesterolo libero ad accettori ricchi in fosfolipidi quali le HDL (Ji Y, et al., 1997).

I recettori "scavenger" sono proteine di membrana localizzate sulla superficie della cellula. Tali recettori legano lipoproteine modificate chimicamente, come LDL acetilate (AcLDL) o LDL ossidate (OxLDL) (Krieger M, 1997). Prima della clonazione e dell'identificazione di SR-BI, i recettori "scavenger" rappresentavano una ristretta famiglia di proteine, praticamente costituita dal recettore CD36 e da due recettori macrofagici strettamente correlati: gli "scavenger receptors class A", "type I" e "type II" (SR-AI/AII) (Krieger M, Herz J, 1994).

SR-BI mostra una forte omologia di sequenza con CD36 e con altre proteine della stessa famiglia (Krieger M, 1999; Williams DL, et al., 1999). E' una glicoproteina di 509 aminoacidi e 82kDa ed ha una struttura a ferro di cavallo, con un ampio loop extracellulare ancorato alla membrana plasmatica attraverso i domini transmembrana ammino- e carbossi-terminali, ed una corta estensione intracellulare (Acton S, et al., 1994).

SR-BI è una proteina di membrana espressa principalmente nel fegato, nella corteccia surrenale, nelle gonadi e nei monociti, a livello di invaginazioni della membrana plasmatica prive di clatrina, dette caveolae (Owen JS, et al., 2002). L'espressione di SR-BI è regolata fisiologicamente tramite vari meccanismi. Un incremento dell'espressione di SR-BI avviene nella differenziazione dei monociti e nei macrofagi presenti a livello delle lesioni aterosclerotiche (Chinetti G, et al., 2000). L'espressione di SR-BI è indotta anche da agonisti per i recettori PPAR $\alpha$  e PPAR $\gamma$ , dato riscontrato sia in cellule in coltura che in animali trattati (Chinetti G, et al., 2000). Da uno splicing-alternativo dell'mRNA per SR-BI si ottiene una proteina, detta SR-BII o SR-BI.2, che ha un dominio citoplasmatico carbossi-terminale completamente diverso. SR-BII media sia l'uptake selettivo del colesterolo derivante dalle HDL che l'efflusso di colesterolo HDL-dipendente, ma con una efficacia nettamente inferiore, suggerendo l'importanza del dominio citoplasmatico carbossi-terminale per la corretta funzionalità di SR-BI (Webb NR, et al., 1998).

SR-BI media selettivamente l'interazione con le HDL nelle cellule dei tessuti sopra descritti e l'efflusso cellulare di colesterolo verso accettori quali le HDL mature (Ji Y, et al., 1997; Gu X, et al., 2000). Il flusso mediato da SR-BI risulta essere bidirezionale e, come per il meccanismo della diffusione acquosa, il trasferimento di colesterolo libero (FC)

attraverso SR-BI dipende dalla direzione del gradiente di concentrazione (Yancey PG, et al., 2003). Recenti studi hanno evidenziato che bloccando il legame delle HDL a SR-BI con anticorpi specifici si osserva una notevole inibizione dell'efflusso di colesterolo, suggerendo che il legame delle HDL sia necessario per l'efflusso SR-BI-mediato (Gu X, et al., 2000). Un requisito essenziale per l'attività di SR-BI è la presenza di fosfolipidi nell'acettore: infatti, non si osserva alcun efflusso verso apolipoproteine prive di lipidi. A supporto di tale affermazione vi sono dati sperimentali che indicano che l'arricchimento delle HDL o del siero con fosfolipidi incrementa l'efflusso SR-BI-mediato, mentre la deplezione di fosfolipidi delle HDL tramite trattamento con fosfolipasi A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) diminuisce l'entità di tale efflusso (Yancey PG, et al., 2000; Jian B, et al., 1997). L'efflusso SR-BI-mediato è influenzato anche dalla natura dei fosfolipidi. Infatti, l'incremento dell'efflusso che si osserva arricchendo le HDL con sfingomieline è molto minore rispetto all'incremento ottenuto arricchendo tali lipoproteine con fosfatidilcolina (Yancey PG, et al., 2000). I dettagli del meccanismo attraverso cui SR-BI facilita il flusso bidirezionale di FC restano ancora da chiarire (Yancey PG, et al., 2003).

#### ABC-trasportatori: ABCA1

La maggior parte delle informazioni che si hanno circa l'efflusso ABCA1-mediato sono nate da osservazioni sperimentali su cellule provenienti da individui affetti da malattia di Tangier, la cui origine è attribuibile a mutazioni della proteina ABCA1 (Lawn RM, et al., 1999; Bodzioch M, et al., 1999; Brooks-Wilson A, et al., 1999). In questi studi, il rilascio di FC e fosfolipidi verso apolipoproteine povere di lipidi da parte di macrofagi e fibroblasti arricchiti in colesterolo era assente, mentre l'efflusso verso HDL mature risultava essere normale (Francis GA, et al., 1995; Remaley AT, et al., 1997). Si è ipotizzato, quindi, che ABCA1 potesse mediare l'efflusso di colesterolo libero e fosfolipidi dalle cellule e, in particolare, l'arricchimento in lipidi delle particelle apoA-I, contribuendo alla formazione delle HDL nascenti (Yancey PG, et al., 2003).

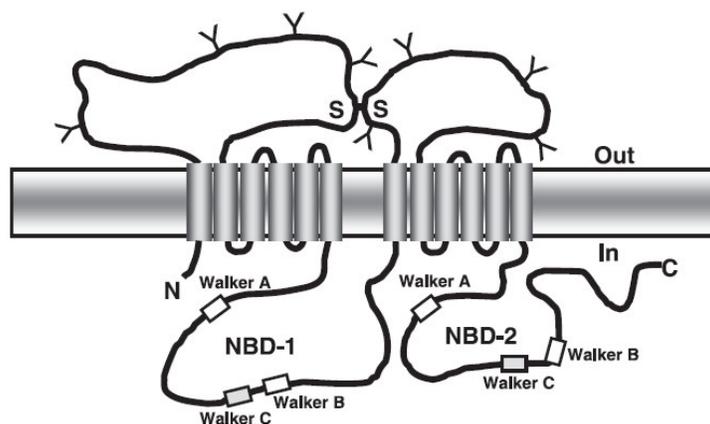
Contrariamente ai precedenti meccanismi della diffusione acquosa e dell'efflusso SR-BI-mediato, il movimento di FC prodotto da ABCA1 utilizza energia proveniente dall'idrolisi dell'ATP, è unidirezionale e dà origine sempre ad un efflusso netto di FC dalla cellula (Yancey PG, et al., 2003).

I trasportatori della classe ABC, presenti in ogni derivazione filogenetica, sono la più vasta famiglia di trasportatori di membrana (Dean M, Hamon Y, and Chimini G., 2001). Essi

sono raggruppati in sette sottoclassi nominate in ordine crescente da ABCA fino ad ABCG. Dei 49 ABC-trasportatori individuati nell'uomo, 13 fanno parte della sottoclasse ABCA (Dean M, Hamon Y, and Chimini G., 2001). Mutazioni nei geni che codificano per ABC sono causa di diverse malattie, tra cui fibrosi cistica, degenerazione maculare di Startgardt e disturbi del metabolismo lipidico e lipoproteico. Tutti i membri della famiglia ABC sono proteine integrali di membrana e utilizzano ATP come fonte di energia per trasportare metaboliti attraverso le membrane. Strutturalmente, essi possono essere suddivisi in due gruppi: 1) i trasportatori "interi", come ABCA1 e/o ABCA7, che hanno due unità strutturali simili legate covalentemente e mediano il trasporto di fosfolipidi e colesterolo a particelle prive o povere di lipidi; 2) gli "emi"-trasportatori, caratterizzati da una singola unità strutturale formante sia omodimeri, come ABCG1 e ABCG4, che mediano il trasporto di colesterolo cellulare verso particelle lipidate, sia eterodimeri, come ABCG5/G8, che limita l'assorbimento intestinale e promuove l'escrezione biliare degli steroli (Dean M, Hamon Y, and Chimini G, 2001; Oram JF and Vaughan AM, 2006).

ABCA1 è stato caratterizzato in modo più esteso rispetto agli altri trasportatori. Numerosi studi su colture cellulari, deficienze di HDL nell'uomo e modelli animali hanno dimostrato che ABCA1 è tra i maggiori determinanti dei livelli plasmatici di HDL ed un potente fattore atero-protettivo (Aiello RJ, Brees D, and Francone OL, 2003; Joyce C, et al., 2003; Oram JF, 2003; Singaraja RR, 2003).

ABCA1 è una proteina integrale di membrana costituita da 2261 aminoacidi ed è formata da due unità funzionali simili, unite in successione, ciascuna composta da un dominio transmembrana (TMD) ed un dominio legante nucleotidi (NBD). Il dominio transmembrana è a sua volta costituito da sei  $\alpha$ -eliche e contiene il sito di legame per il substrato (fig. 12). L'NBD contiene due motivi peptidici altamente conservati, detti Walker A e Walker B, presenti in molte proteine che utilizzano ATP, ed un dominio specifico degli ABC-trasportatori, detto Walker C (Dean M, Hamon Y, and Chimini G., 2001). La proteina, inoltre, presenta un terminale amminico orientato verso il citosol e due grandi "loops" extracellulari altamente glicosilati e uniti tra loro dal legame disolfuro di due o più cisteine (Bungert S, et al., 2001; Dean M, Hamon Y, and Chimini G., 2001).

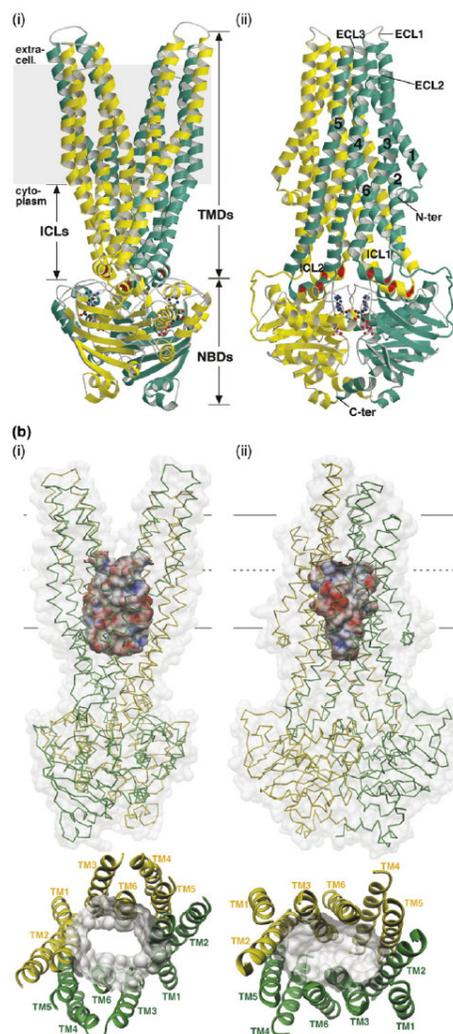


**Figura 12:** modello topologico di ABCA1 (da: Oram JF and Heinecke, 2005)

ABCA1 media il trasporto, dall'interno all'esterno della membrana cellulare, di colesterolo, fosfolipidi ed altre molecole lipofile, come  $\alpha$ -tocoferolo (Oram JF, Vaughan AM, and Stocker R, 2001), apoE (Von Eckardstein A, et al., 2001) ed interleuchina-1 $\beta$  (Hamon Y, et al., 1997; Zhou X, et al., 2002). Differentemente a quanto accade nell'efflusso mediato da SR-BI, gli accettori di colesterolo preferiti da ABCA1 sono le apolipoproteine povere di lipidi (Dean M, et al., 2001). Tutte le apoproteine scambiabili, come apoA-I, apoA-II, apoA-IV, apoE ed apoC, possono funzionare da accettori di fosfolipidi e colesterolo per ABCA1 (Remaley AT, et al., 2001).

Sono stati proposti diversi modelli per spiegare come le proteine ABC, e quindi, per analogia, ABCA1, trasportano lipidi anfipatici al di fuori della cellula (van Meer G et al., 2006). Un modello suggerisce che il trasportatore formi un canale acquoso per il passaggio dei substrati; tuttavia, tale meccanismo risulta improbabile perché termodinamicamente sfavorevole, in particolare nel caso dei fosfolipidi (van Meer G et al., 2006). Uno dei modelli più accreditati, prevede che il trasportatore formi un canale nella membrana e funzioni come una "flippasi", assumendo ciclicamente due diverse conformazioni: la prima consente di legare il substrato dal lato interno o citoplasmatico della membrana, mentre la seconda permette il rilascio del substrato nel lato esterno, rendendolo accessibile agli accettori della fase fluida (apolipoproteine e lipoproteine) (van Meer G et al., 2006). E' stata proposta, inoltre, una variazione del modello "flippasi": condividendo lo stesso meccanismo nel trasferimento del substrato al lato esterno della membrana, essa prevede che il rilascio del substrato dalla membrana sia mediato dall'interazione del trasportatore con un accettore (van Meer G et al., 2006).

Di recente, è stato cristallizzato un ABC-trasportatore batterico del tipo “intero”, simile ad ABCA1, detto Sav1866 (Dawson RJP and Locher KP, 2006) (fig. 13). La struttura cristallina, analizzata ai raggi-X, mostra la presenza di un’intima interazione tra le eliche transmembrana e la formazione di una cavità, protetta dall’interazione con il lato interno della membrana, ma accessibile dal lato esterno (Dawson RJP and Locher KP. 2006). La cavità è limitata da residui amminoacidici polari e, perciò, si è ipotizzato che il passaggio del substrato avvenga tramite un meccanismo “ad estrusione”. L’idrolisi dell’ATP permette alla proteina di adottare una conformazione capace di legare il substrato sul lato citoplasmatico della membrana. Questo avviene tramite cambiamenti



strutturali trasmessi attraverso i “loops” intracellulari che connettono le eliche transmembrana (Dawson RJP and Locher KP. 2006). Molte delle mutazioni di ABCA1 osservate nell’uomo sono localizzate proprio a livello dei “loops” di connessione, che interagiscono strettamente con i NBD (Brunham LR et al., Ann Rev Nutr 2006). Infatti, la delezione della fenilalanina in posizione 508 (Phe508) nel gene *ABCA7* (anche conosciuto come *CFTR*), associata alla maggioranza dei casi di fibrosi cistica, si trova proprio all’interfaccia tra un loop intracellulare ed il primo NBD. I due domini transmembrana sono adiacenti l’un l’altro e formano la cavità circolare che è esposta verso il lato esterno della membrana e che rappresenta il canale per il passaggio dei substrati. E’ probabile che entrambi i domini NBD siano responsabili del legame con l’ATP.

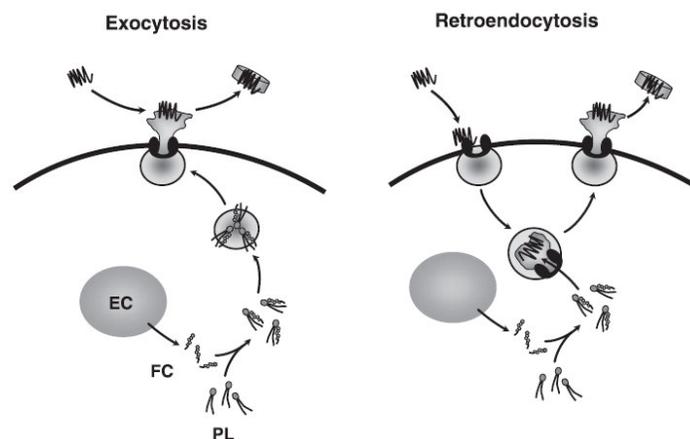
**Figura 13:** struttura tridimensionale del trasportatore ABC Sac1866 (da: Dawson RJP, Locher KP, 2006).

Sembra probabile che ABCA1 sia localizzata in domini di membrana specifici per la secrezione di lipidi. Tali regioni sono sensibili all'accumulo di colesterolo ad altri composti lipofili. Il colesterolo libero che può accumularsi nella membrana, può, alternativamente, dirigersi verso i compartimenti intracellulari dove diviene substrato dell'enzima esterificante ACAT (Mendez AJ, et al., 1994; Yamauchi Y, et al., 2004). In base a tali ipotesi, quindi, ABCA1 rimuove il colesterolo che altrimenti si accumulerebbe nel citosol sottoforma di goccioline lipidiche. Quando nei macrofagi carichi di steroli, l'esterificazione del colesterolo viene bloccata, anche intenzionalmente, ad esempio, attraverso inibitori dell'ACAT, il colesterolo libero che si accumula è il substrato preferenziale di ABCA1 (Kellner-Weibel G, Luke SJ, and Rothblat GH, 2003).

Tali studi suggeriscono un modello per il funzionamento della via di ABCA1: il colesterolo ed i fosfolipidi in eccesso si accumulano in alcuni domini specifici dal lato citosolico della membrana plasmatica o di membrane vescicolari intracellulari; i lipidi, in quella posizione, non sono accessibili alle apolipoproteine e, perciò, per essere rimossi devono essere traslocati da ABCA1 verso la superficie cellulare o nel lume delle vescicole (JF Oram and JW Heinecke, 2005). I domini lipidici possono assemblarsi in prossimità di molecole di ABCA1, oppure la stessa proteina ABCA1 potrebbe migrare verso tali domini dopo la loro formazione.

Le proprietà dei domini ricchi in colesterolo, con i quali ABCA1 risulta associata, sono ancora sconosciute (Mendez AJ, et al., 2001). Nonostante ABCA1 si possa trovare anche nelle "lipid-rafts" (Drobnik W, et al., 2002), la localizzazione più frequente sembra essere in strutture diverse sia dalle stesse "lipid-rafts" che dalle caveolae (Mendez AJ, et al., 2001). Sono stati proposti due modelli per spiegare la localizzazione di ABCA1 nei domini lipidici specifici delle membrane (fig. 14). Il modello della "esocitosi" prevede che il colesterolo in eccesso all'interno della cellula venga "impaccato" in delle vescicole di trasporto capaci, poi, di traslocare nelle porzioni di membrana contenenti ABCA1 (Oram JF and Lawn RM., 2001). A supporto di questo modello, vi sono dei risultati che dimostrano che l'induzione di ABCA1, anche in assenza di apolipoproteine, incrementa la comparsa di colesterolo a livello della superficie cellulare (Vaughan AM and Oram JF., 2003). L'altro modello, detto della "retroendocitosi", suggerisce che, dall'interazione tra ABCA1 ed apolipoproteine, si formino delle vescicole contenenti sia trasportatore che apoproteina. Successivamente, in sequenza, tali vescicole subirebbero: endocitosi verso

depositi intracellulari di colesterolo e fosfolipidi; arricchimento in lipidi del lume vescicolare attraverso l'azione di ABCA1; esocitosi e rilascio dei substrati all'esterno della cellula (Santamarina-Fojo S, et al. 2001; Takahashi Y and Smith JD, 1999). A supporto di tale meccanismo, evidenze sperimentali indicano che ABCA1 può trasferirsi rapidamente ed in modo ciclico dalla membrana plasmatica ai compartimenti endosomiale/endosomiale tardivo e viceversa (Neufeld EB, et al. 2001; Neufeld EB, et al. 2004). Tali compartimenti, inoltre, sono direttamente responsabili dell'accumulo di colesterolo in cellule dotate di una proteina ABCA1 non funzionale (Neufeld EB, et al. 2001; Neufeld EB, et al. 2004). Inoltre, è stato dimostrato che le vescicole intracellulari contenenti ABCA1 contengono anche apolipoproteine (Neufeld EB, et al. 2001; Neufeld EB, et al. 2004). Non è chiaro, tuttavia, quale dei due modelli sia il predominante in rapporto all'efflusso ABCA1-mediato.



**Figura 14:** modelli per la secrezione di lipidi ABCA1-mediata  
(da: Oram JF and Heinecke, 2005).

Studi effettuati attraverso la tecnologia del “cross-linking” hanno dimostrato che ABCA1 può legare varie apolipoproteine, tra cui apoA-I, in particolare, ed apoA-II, apoC-I, C-II e C-III (Chroni A, et al., 2004; Fitzgerald ML, et al., 2004). Tale legame è sensibile alle variazioni di temperatura ed è facilmente reversibile (Chroni A, et al., 2004; Fitzgerald ML, et al., 2004).

Tutti gli studi effettuati finora, hanno evidenziato che la capacità di legare l'apoproteina e l'attività di trasporto lipidico di ABCA1 sono in stretto rapporto tra loro; infatti, quasi tutte le mutazioni missenso a carico del gene *ABCA1* che riducono o aboliscono

l'efflusso lipidico sono anche in grado di abolire il legame delle apolipoproteine al trasportatore (Fitzgerald ML, et al., 2002). Solo in un caso si è osservato un comportamento diverso: la mutazione di sostituzione W509S è in grado di ridurre drasticamente l'efflusso di lipidi apolipoproteina-mediato senza influenzare il legame delle stesse apolipoproteine al trasportatore (Fitzgerald ML, et al., 2002). Questi risultati implicano che il legame dell'apolipoproteina ad ABCA1 è un fattore essenziale, ma non sufficiente per l'attivazione dell'efflusso lipidico (Oram JF and Heinecke JW, 2005).

Le più comuni apolipoproteine contengono motivi ripetuti di 11-22 amminoacidi formanti  $\alpha$ -eliche anfipatiche (Segrest JP, et al., 1992). In questo tipo di eliche, gli amminoacidi carichi sono allineati dalla parte opposta rispetto ai residui idrofobici, lungo l'asse longitudinale. Le eliche anfipatiche riscontrate nelle HDL sono suddivise in due classi: le eliche di classe A, più comuni, che tendono a raggruppare gli amminoacidi carichi positivamente alle due estremità della regione polare ed i residui carichi negativamente al centro della regione polare; le eliche di classe Y, che hanno una distribuzione degli amminoacidi simile, tranne che per una carica positiva che interrompe il raggruppamento di cariche negative della regione polare. Inoltre, le eliche di tipo Y hanno una maggiore affinità per i lipidi rispetto a quelle di tipo A (Segrest JP, et al., 1992). Grazie alla particolare distribuzione di carica, le apolipoproteine possono interagire con superfici lipofile, ma anche muoversi e scambiare lipidi liberamente in un ambiente acquoso (Oram JF and Heinecke JW, 2005).

La presenza di  $\alpha$ -eliche anfipatiche nell'accettore sembra essere un requisito essenziale perché si possa verificare un efflusso di lipidi ad apolipoproteina attraverso ABCA1. L'apoA-I, il principale substrato proteico di ABCA1, contiene otto domini da 22 amminoacidi e due domini da 11 amminoacidi, tutti di eliche anfipatiche. Attraverso studi con peptidi sintetici corrispondenti a ciascuna  $\alpha$ -elica, è stato dimostrato che l'elica 1 e l'elica 10 hanno una grande affinità di legame per i fosfolipidi (Gillotte KL, et al., 1999; Vedhachalam C, et al., 2004); tuttavia, esse possono mediare l'efflusso ABCA1 solo se legate covalentemente all'elica 9 e non singolarmente (Natarajan P, et al., 2004). Tale legame produce una linea di residui amminoacidici acidi lungo la faccia polare delle eliche, suggerendo che questo, per l'apoA-I, possa essere un determinante strutturale significativo per la promozione dell'efflusso ABCA1-mediato (Natarajan P, et al., 2004). A sostegno di ciò, alcuni studi, hanno mostrato che mutanti tronchi dell'apoA-I nella

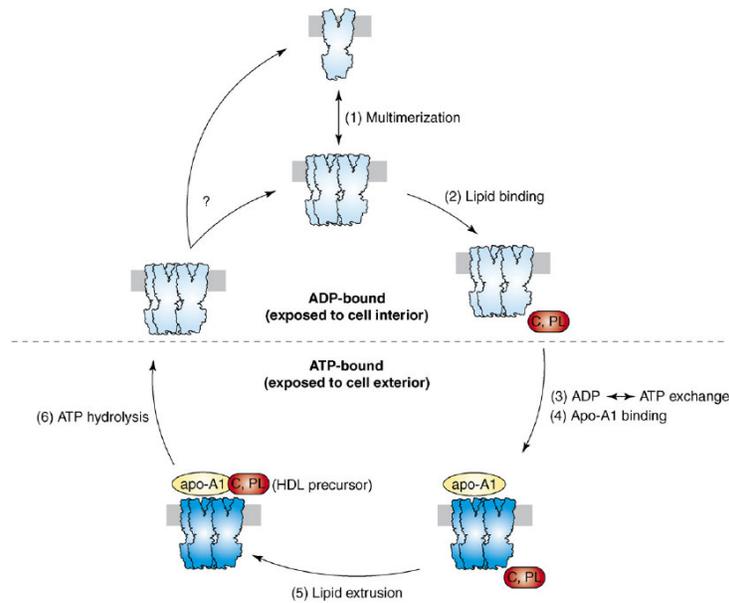
porzione carbossi-terminale, privi dell'elica 10, non erano in grado di rimuovere colesterolo cellulare attraverso ABCA1 (Panagotopoulos SE, et al., 2002).

Il legame dell'apoA-I ha un effetto importante anche sulla stabilità della proteina ABCA1. In seguito al legame dell'apolipoproteina, il rapido turn over ( $t_{1/2} \approx 1-2$  ore) di ABCA1 viene drasticamente rallentato (Arakawa R and Yokoyama S., 2002; Wang N, et al., 2003). Sono stati proposti due meccanismi per spiegare tale azione: il primo prevede che l'interazione con apoA-I interferisca con la fosforilazione del motivo *PEST*, un tetrapeptide che avvia le proteine alla degradazione, riducendo la proteolisi di ABCA1 mediata dalla calpaina (Wang N, et al., 2003); il secondo, suggerisce che la rimozione della sfingomieline dalla membrana da parte delle apolipoproteine attivi la fosfatidilcolina fosfolipasi C, la quale dà l'avvio alla fosforilazione di un sito capace di stabilizzare la proteina ABCA1 (Yamauchi Y, et al., 2003). Resta da chiarire, tuttavia, se uno dei due meccanismi sia prevalente o se entrambi agiscano di concerto nel processo di stabilizzazione.

Evidenze sperimentali indicano che, sia nelle membrane intracellulari che nella membrana plasmatica, le molecole di ABCA1 si associano per formare oligomeri, in particolare, unità tetrameriche (Denis M, et al., 2004). ApoA-I può legarsi alle forme oligomeriche di ABCA1, ma non è in grado di interagire con la forma monomerica (Denis M, et al., 2004). Dati recenti suggeriscono che ABCA1, dopo aver legato i substrati lipidici, cambia conformazione grazie ad interazioni tra i "loops" intracellulari, interagisce con l'apoA-I e scambia ADP con ATP. Successivamente, in un processo dipendente dall'idrolisi di ATP, ABCA1 rilascia il substrato e ritorna nella conformazione capace di legare nuovamente dei substrati dal lato interno della membrana (Denis M, et al., 2004) (fig.15).

Non è chiaro se ABCA1 medi contemporaneamente il trasporto attivo sia del colesterolo che dei fosfolipidi, o se il trasporto di questi due substrati sia disaccoppiato. Numerose evidenze sperimentali suggeriscono che il trasporto avvenga in modo separato. In uno studio, ad esempio, un inibitore della proteina chinasi A (PKA) era in grado di bloccare l'efflusso di colesterolo ABCA1-mediato, ma non quello di fosfolipidi (Kiss RS, et al., 2005). Allo stesso modo, in un altro lavoro, l'incubazione delle cellule con ciclodestrina, un accettore molto efficace nel rimuovere il colesterolo di membrana, aboliva l'efflusso di colesterolo, ma non quello di fosfolipidi (Wang N, et al., 2001); in più,

tale studio dimostrava che ABCA1 non era in grado di legare un analogo foto-attivabile del colesterolo (Wang N, et al., 2001).



**Figura 15:** modello proposto per un ciclo di trasporto di ABCA1 (da: Attie AD, 2007)

Tuttavia, in studi in cui veniva stimolata l'espressione di ABCA1, si è osservato un incremento significativo del contenuto di colesterolo in membrana disponibile per l'efflusso ABCA1-mediato (Vaughan AM and Oram JF, 2003). Uno studio effettuato su cellule RAW264.7, una linea cellulare di macrofagi murini, ha evidenziato come l'efflusso di colesterolo e fosfolipidi possa essere un processo unico e legato a fenomeni di endocitosi dell'accettore (Smith JD, et al., 2004). A differenza dello studio di Wang N, et al. (Wang N, et al., 2001), lo studio di Smith JD et al., mostrava che, nei macrofagi sovraespressanti ABCA1, l'incubazione con ciclodestrina era efficace nel ridurre sia l'efflusso di colesterolo che di fosfolipidi (Smith JD, et al., 2004).

Un'ipotesi plausibile potrebbe prevedere l'interazione di ABCA1 con entrambi i substrati lipidici; il trasporto attivo, tuttavia, coinvolgerebbe soprattutto i fosfolipidi (Attie AD, 2007).

I livelli e l'attività della proteina ABCA1 sono strettamente regolati da processi trascrizionali e post-trascrizionali; tali processi giocano un ruolo importante nel metabolismo lipoproteico e nell'aterogenesi (Oram JF and Heinecke JW, 2005).

Come atteso per un trasportatore che media la secrezione del colesterolo cellulare in eccesso, la trascrizione del gene *ABCA1* può essere indotta caricando le cellule con colesterolo (Langmann T, et al., 1999; Lawn RM, et al., 1999). Ciò, come abbiamo visto (cfr. pag. 34), avviene esclusivamente attraverso l'attivazione delle vie LXR $\alpha/\beta$ - ed RXR-dipendenti. LXR e RXR formano eterodimeri obbligati che preferenzialmente si legano ad elementi di risposta all'interno del promotore del gene per *ABCA1* o del primo introne (Schwartz K, et al., 2000; Costet P, et al., 2000). I recettori LXR e RXR legano e sono attivati rispettivamente dagli ossisteroli e dall'acido 9-*cis*-retinoico (Repa JJ, Mangelsdorf DJ, 1999). Per indurre l'espressione del gene, questi ligandi possono attivare la trascrizione sia separatamente che in modo combinato. In quest'ultimo caso, si ha un effetto sinergico notevole (Schwartz K, et al., 2000; Costet P, et al., 2000). Il colesterolo intracellulare in eccesso viene convertito in ossisteroli principalmente da enzimi della serie citocromo P450, presenti soprattutto a livello epatico, dove svolgono un ruolo chiave nel metabolismo degli acidi biliari (Janowski BA, et al., 1999). Uno di questi enzimi, detto 27-idrossilasi (Cyp27), è ampiamente distribuito in vari tessuti e tipi cellulari, inclusi i macrofagi; ciò suggerisce che il prodotto della sua reazione enzimatica, il 27-idrossi-colesterolo, potrebbe essere il ligando preferenziale di LXR nei macrofagi e nelle altre cellule periferiche (Fu X, et al., 2001). Al contrario, il 22-idrossicolesterolo, il 24-idrossicolesterolo e il 24,25-epossicolesterolo potrebbero essere ligandi di LXR fisiologicamente presenti nel fegato (Janowski BA, et al., 1999).

Nei macrofagi murini, ma non in quelli umani, l'espressione di *ABCA1* può essere indotta da analoghi dell'AMP-ciclico (cAMP), quali l'8-cloro-fenil-tio-cAMP (cpt-cAMP) (Wang N, et al., 2000). L'elemento maggiormente implicato in questa risposta è una sequenza bersaglio per la proteina legante l'elemento di risposta al cAMP ("cAMP responsive-element-binding protein", *CREB*), localizzato nell'introne 2 del gene *ABCA1* (Le Goff W, et al., 2006). Il gene *ABCA1* umano non risponde allo stimolo del cAMP perché l'introne 2 risulta disorganizzato dall'inserzione di un'ulteriore sequenza lunga otto paia-basi (Le Goff W, et al., 2006). Accanto all'attivazione trascrizionale, il cAMP contribuisce a stabilizzare la proteina *ABCA1* promuovendone la fosforilazione PKA-dipendente (See RH, et al., 2002).

Gli acidi grassi polinsaturi (*PUFA*) agiscono da antagonisti del legame degli ossisteroli all'elemento di risposta nel gene *LXR $\alpha$*  (Ou J, et al., 2001), interferendo potenzialmente

con l'induzione di ABCA1 mediata dagli steroli (Uehara Y, et al., 2002). Tali acidi grassi, inoltre, agiscono a livello post-trascrizionale accelerando la degradazione di ABCA1 e sopprimendo l'efflusso di colesterolo e fosfolipidi ad apoA-I (Wang Y and Oram JF, 2002).

Il geranyl-geranyl-pirofosfato (*GGPP*), un prodotto della via metabolica del mevalonato, responsabile della isoprenilazione delle proteine, è in grado di sopprimere la sintesi di ABCA1 indotta da LXR attraverso due meccanismi: agendo da antagonista dell'interazione tra LXR ed un suo coattivatore nucleare, detto SRC-1 e/o attivando la cascata della proteina Rho legante il GTP (Gan X, et al., 2001). Quest'ultimo meccanismo potrebbe causare un'alterazione del traffico di steroli intracellulari, riducendo la disponibilità di tali substrati per il legame con LXR (Gan X, et al., 2001).

Il recettore nucleare "peroxisome-proliferator activator  $\gamma$ " (PPAR $\gamma$ ) attiva parecchi geni coinvolti nei movimenti di colesterolo, compreso quello per un recettore "scavenger" (CD36), che promuove l'acquisizione di lipoproteine ossidate, e quello per ABCA1. L'attivazione dell'espressione di ABCA1 mediata da PPAR $\gamma$  è però conseguente all'induzione di LXR $\alpha$  (Chinetti G, et al., 2001). PPAR $\delta$  è un altro membro di questa famiglia di recettori nucleari che si è dimostrato in grado di aumentare i livelli di mRNA per ABCA1 indipendentemente da LXR $\alpha$ , in cellule in coltura (Oliver WR, et al., 2001).

Il recettore per gli ormoni tiroidei può influenzare l'espressione di ABCA1 sopprimendo la trascrizione del gene; ciò avviene tramite la formazione di un complesso con RXR, capace di competere col dimero LXR/RXR per il legame agli elementi di risposta (Huuskonen J, et al., 2004).

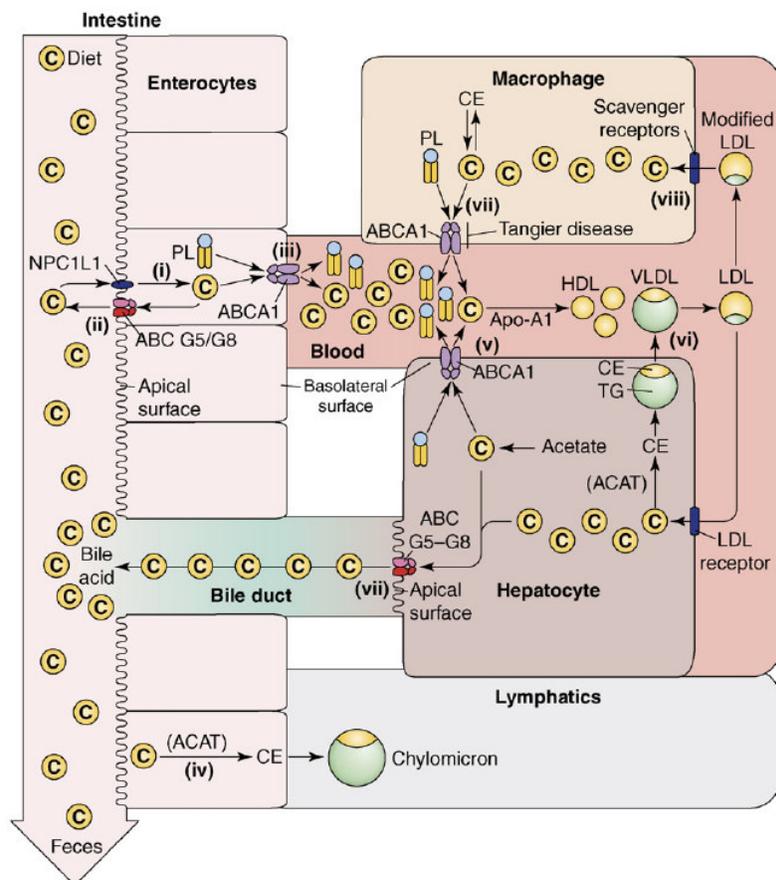
L'ABCA1 è sottoposta, invece, a "down-regulation" da parte dell'interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), il quale contemporaneamente aumenta l'attività e l'espressione dell'ACAT, favorendo così la trasformazione dei macrofagi in "foam cells" e promuovendo la progressione della lesione aterosclerotica (Panousis CG, Zuckerman SH, 2000).

La proteina ABCA1 viene espressa in numerosi organi. Nell'uomo, il suo mRNA è stato ritrovato soprattutto nel fegato, nei polmoni, nella placenta, nelle ghiandole surrenali, nell'intestino tenue e nei tessuti fetali (Von Eckardstein A, et al., 2001; Langmann T, et al., 1999). Tuttavia, a causa dell'intensa regolazione post-trascrizionale, i livelli di mRNA potrebbero non riflettere con esattezza i livelli di espressione della proteina ABCA1 e la conseguente attività in vivo (Oram JF and Vaughan AM, 2006). Studi basati su culture

cellulari suggeriscono che i tessuti ricchi in macrofagi dovrebbero presentare livelli relativamente alti di espressione di ABCA1. Infatti, in qualità di cellule “scavenger”, i macrofagi ingeriscono lipoproteine modificate e membrane di cellule danneggiate, accumulando grosse quantità di colesterolo ed ossisteroli, che sono proprio forti induttori di ABCA1 (Oram JF and Vaughan AM, 2006). Alti livelli della proteina ABCA1 possono essere ritrovati anche nel fegato di topi nutriti con una dieta ad alto contenuto di colesterolo (Wellington CL, et al., 2002).

Modelli animali esprimenti un deficit di ABCA1 hanno permesso di quantificare il contributo relativo di fegato ed intestino alla formazione delle HDL. Attraverso la tecnologia Cre-LoxP (Zheng B, et al., 1999; Yuejin Yu and Bradley A, 2001), è stato possibile ottenere topi con un deficit di ABCA1 mirato ed esclusivo a carico del fegato e/o dell'intestino (Timmins JM, et al., 2005; Brunham LR et al., JCI 2006). In questi animali, i livelli di HDL erano ridotti dell'80% quando la delezione del gene *ABCA1* interessava il fegato (Timmins JM, et al., 2005) e del 25% quando la delezione interessava l'intestino (Brunham LR et al., JCI 2006), enfatizzando il ruolo di questi due organi nella biogenesi delle HDL. Anche altri tessuti possono contribuire significativamente al carico di colesterolo e fosfolipidi delle HDL. Tale contributo, tuttavia, risulta insufficiente a sostenere la stabilità delle HDL quando la funzionalità di ABCA1 a livello epatico o intestinale è ridotta o assente (Singaraja RR et al., 2006).

Riassumendo, in breve, si potrebbe tracciare il seguente modello: fegato ed intestino sono essenziali per la produzione delle HDL sia perché sintetizzano, verosimilmente, tutta l'apoA-I circolante, sia perché, principalmente attraverso l'efflusso ABCA1-mediato, donano all'apoA-I le quantità di colesterolo e fosfolipidi necessarie a prevenirne la rapida degradazione, formando particelle HDL; le HDL formate possono poi acquisire, nella circolazione sanguigna, ulteriori quantità di lipidi da tessuti diversi tramite meccanismi dipendenti o meno da ABCA1 (Attie AD, 2007).



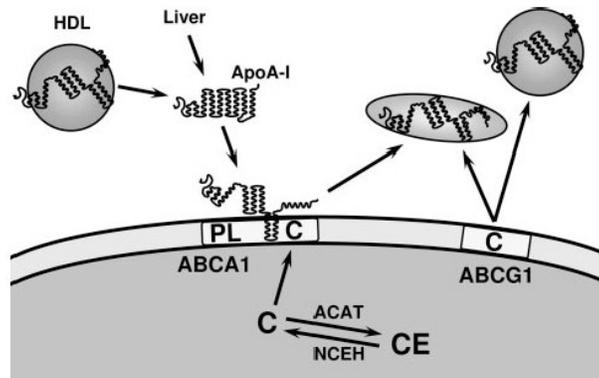
**Figura 16:** trasporto di colesterolo e fosfolipidi nell'intestino, nel fegato e nei macrofagi (da: Attie AD, 2007).

### Altri ABC-trasportatori (1): ABCG1

ABCG1 appartiene alla famiglia degli ABCG emi-trasportatori e si pensa possa agire come omodimero nei macrofagi umani e murini (Oram JF and Vaughan AM, 2006). Infatti, come ABCA1, ABCG1 è espresso nei macrofagi carichi di colesterolo, suggerendo che esso possa contribuire a liberare queste cellule dall'eccesso di steroli (Vaughan AM, Oram JF, 2005). ABCG1, nelle cellule, è espresso sia in superficie che nei compartimenti intracellulari e promuove l'efflusso di colesterolo verso HDL ed altre lipoproteine, ma non verso particelle di apoA-I prive di lipidi (Kennedy MA, et al., 2005; Vaughan AM, Oram JF, 2005; Wang N, et al., 2004; Wang N, et al., 2006). Il legame diretto con le apolipoproteine sembra non essere un requisito essenziale per l'efflusso di lipidi mediato da ABCG1 (Wang N, et al., 2004) ed è probabile che il trasportatore, sulla superficie cellulare, formi dei domini lipidici che permettano al colesterolo di diffondere nel fluido circostante ed

essere captato da particelle lipoproteiche (Oram JF and Vaughan AM, 2006). Contrariamente ad ABCA1, che trasporta una varietà di substrati lipidici, ABCG1 è un trasportatore specifico per il colesterolo (Vaughan AM, Oram JF, 2005; Wang N, et al., 2004). Ciò può essere dovuto alla presenza di fosfolipidi nell'accettore che interagisce con ABCG1; tali condizioni, infatti, favoriscono il trasporto esclusivo del colesterolo (Oram JF and Vaughan AM, 2006). Tuttavia, evidenze sperimentali indicano che ABCG1 è in grado di promuovere anche l'efflusso di fosfolipidi, in particolare di sfingomieline (Kobayashi A, et al., 2006).

ABCA1 ed ABCG1 potrebbero agire in modo sinergico nel rimuovere colesterolo dalle cellule (Gelissen IC, et al., 2006). Il modello proposto prevede che ABCA1 medi la conversione delle particelle di apoA-I prive o povere di lipidi ad HDL nascenti; tali particelle, poi, continuerebbero ad arricchirsi in colesterolo attraverso il trasporto lipidico ABCG1-mediato (Gelissen IC, et al., 2006; Oram JF and Vaughan AM, 2006).



**Figura 17:** modello per il trasporto di lipidi ABCA1- e ABCG1-mediato  
(da: Oram JF and Vaughan AM, 2006)

Come atteso, anche l'espressione di ABCG1 è regolata dal sistema LXR/RXR e la conversione del colesterolo in eccesso in ossisteroli stimola l'espressione sia di ABCA1 che di ABCG1 nei macrofagi (Baldan A, et al., 2006). Inoltre, in queste cellule, gli agonisti del recettore LXR stimolano il movimento di ABCG1 dai compartimenti intracellulari alla membrana plasmatica, favorendo l'incremento dell'efflusso di colesterolo alle HDL (Wang N, et al., 2006).

In vivo, ABCG1 è espresso nel cervello, sia nella materia bianca che nella materia grigia (Tachikawa M, et al., 2005), nel timo, nei polmoni, nelle ghiandole surrenali e nella milza (Savary S, et al., 1996; Croop JM, et al., 1997). Nella astroglia cerebellare, insieme di

cellule della linea monocito/macrofagica, l'espressione di ABCG1 risulta essere meglio correlata con il rilascio di colesterolo rispetto all'espressione di ABCA1, suggerendo che il primo trasportatore sia quello principalmente coinvolto nel trasporto lipidico a livello cerebrale (Karten B, et al., 2006).

Fino ad oggi, non sono state riscontrate variazioni genetiche a carico di ABCG1 correlabili a malattie ereditarie (Oram JF and Vaughan AM, 2006). Resta da chiarire se questo trasportatore abbia un ruolo protettivo nell'uomo nei confronti delle malattie cardiovascolari.

#### Altri ABC-trasportatori (2): ABCG5/G8

ABCG5 ed ABCG8 sono emi-trasportatori che acquisiscono capacità funzionali solo dopo essersi associati in eterodimeri (Graf GA, et al., 2002; Graf GA, et al., 2003; Graf GA, et al., 2004). In colture cellulari di epatociti, la coespressione di entrambi i trasportatori causa una traslocazione dell'eterodimero funzionale neoformato, dal reticolo endoplasmatico alla membrana dei canalicoli biliari, sul lato apicale della superficie cellulare (Graf GA, et al., 2002-2004). Si assume, perciò, che ABCG5 e ABCG8 formino un eterodimero obbligato (ABCG5/G8), il quale, una volta stabilitosi in membrana, può trasportare substrati sterolici all'esterno della cellula (Oram JF and Vaughan AM, 2006). Studi di malattie umane e modelli animali hanno evidenziato che ABCG5/G8 svolge un'importante funzione regolatoria dei meccanismi di assorbimento e secrezione di steroli vegetali nel corpo umano (Berge KE, et al., 2000). ABCG5/G8 è espresso sulla membrana apicale degli enterociti, verso il lume intestinale, e sulla membrana apicale degli epatociti, verso il canalicolo biliare (Berge KE, et al., 2000; Graf GA, et al., 2002-2004). Sembra probabile che la proteina funzioni da "flippasi" trasportando steroli dal lato interno a quello esterno delle membrane, quindi in maniera simile agli altri ABC-trasportatori (Kosters A, et al., 2006).

Pazienti portatori di mutazioni a carico del gene *ABCG5* o *ABCG8* accumulano, nel plasma, steroli vegetali o provenienti da crostacei (Berge KE, et al., 2000). Ciò suggerisce che i due emi-trasportatori siano specifici per substrati diversi dal colesterolo, nonostante vi sia l'evidenza della secrezione epatobiliare di colesterolo mediata da ABCG5/G8 (Langheim S, et al., 2005). Gli steroli vegetali che più comunemente subiscono trasporto sono sitosterolo, campesterolo, stigmasterolo ed avenasterolo; in più, rientrano tra i substrati anche altri composti della classe degli stanoli, come campestanolo e

sitostanolo (Salen G, et al., 1992; Salen G, et al., 2002). Gli steroli vegetali differiscono dal colesterolo per l'addizione di gruppi metile, etile o per un doppio legame in posizione 24 sulla catena laterale acilica; gli stanoli, invece, differiscono per la saturazione del doppio legame in posizione  $\Delta 5$  (Oram JF and Vaughan AM, 2006).

ABCG5/G8 trasferisce steroli nel lume intestinale e, perciò, si è ipotizzato che complessi molecolari di fosfolipidi ed acidi biliari possano fungere da accettori per il trasportatore (Oram JF and Vaughan AM, 2006). Resta da chiarire se il trasporto riguardi o meno anche gli stessi fosfolipidi.

ABCG5 e ABCG8, come i precedenti membri della famiglia degli ABC-trasportatori, sono indotti dai recettori nucleari LXR/RXR (Repa JJ, et al., 2002). Nel topo, la somministrazione di una dieta ad alto contenuto di colesterolo, o di una dieta a cui è stato aggiunto un agonista LXR, è in grado di incrementare l'espressione di entrambi gli emi-trasportatori a livello epatico ed intestinale (Berge KE, et al., 2000; Lee MH, et al., 2001). L'attivazione di LXR, inoltre, è associata con un incremento della secrezione biliare di colesterolo, con una diminuzione dell'assorbimento di colesterolo e con un aumento dell'escrezione fecale di steroli neutri (Yu L, et al., 2003), tutti processi in cui ABCG5/G8 potrebbe giocare un ruolo importante.

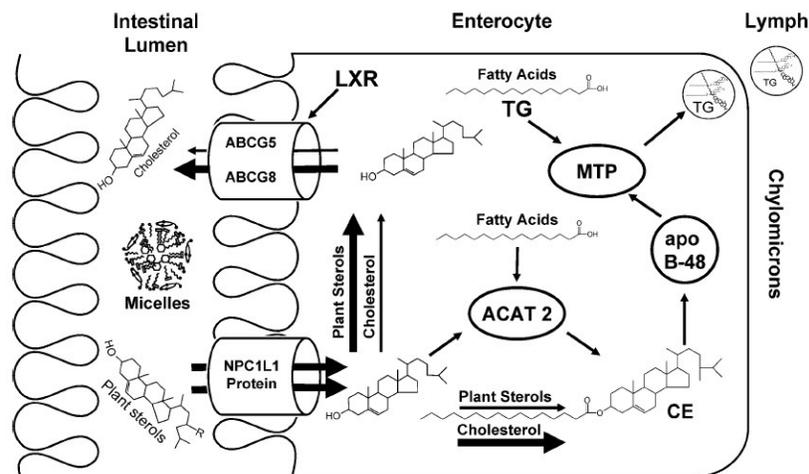
La dieta occidentale, in media, permette l'assunzione giornaliera di 250-500 mg di colesterolo e 200-400 mg di altri steroli, perlopiù vegetali; il 50-60% del colesterolo è assorbito nell'intestino, a differenza degli steroli vegetali, assorbiti solo in minima percentuale (1-5%) (Salen G, et al., 1992; Salen G, et al., 2002). L'assorbimento intestinale degli steroli è mediato dalla proteina "Niemann-Pick C1 like 1" (NPC1L1), espressa a livello delle membrane dall'orletto a spazzola degli enterociti (Altmann SW, et al., 2004). Si pensa che una parte degli steroli vegetali entri nella circolazione sanguigna attraverso NPC1L1 e venga poi secreta nuovamente nel lume intestinale da ABCG5/G8 (Oram JF and Vaughan AM, 2006) (fig. 16 e 18).

A livello degli epatociti, ABCG5/G8 può mediare la secrezione biliare di steroli attraverso un meccanismo che sembra coinvolgere anche la proteina MDR2 (ABCB4), un altro ABC-trasportatore (Langheim S, et al., 2005; Smit JJ, et al., 1993). La diminuzione dell'assorbimento intestinale di steroli vegetali osservata in topi sovraespressanti ABCG5/G8 potrebbe essere dovuta principalmente ad un aumento della secrezione biliare di colesterolo (Langheim S, et al., 2005). Una volta nell'intestino, infatti, il

colesterolo biliare potrebbe competere per l'uptake di altri steroli, riducendone l'assorbimento (Langheim S, et al., 2005). Anche nell'uomo, il sistema ABCG5/G8 epatico gioca un ruolo primario nel controllo dell'assorbimento intestinale degli steroli (Miettinen TA, et al., 2006). Tale affermazione è supportata da un'importante evidenza sperimentale: in un paziente portatore di un deficit genetico di ABCG5/G8, il trapianto di fegato ripristinava i normali valori plasmatici di steroli vegetali, nonostante la totale assenza del trasportatore a livello intestinale (Miettinen TA, et al., 2006).

Tali risultati suggeriscono che la secrezione intestinale di steroli ABCG5/G8-mediata abbia un'importanza minore rispetto alla funzione che il trasportatore esercita a livello epatico (Oram JF and Vaughan AM, 2006).

Mutazioni a carico del gene *ABCG5* o *ABCG8* sono alla base di uno stato patologico chiamato *sitosterolemia* (Hubacek JA, et al., 2001; Berge KE, et al., 2000). La malattia è caratterizzata da elevati livelli plasmatici di steroli vegetali e da un incremento moderato della colesterolemia, entrambi dovuti a fenomeni di iper-assorbimento intestinale e ridotta escrezione biliare (Salen G, et al., 1992; Salen G, et al., 2002). A causa del profilo lipidico anomalo, i pazienti affetti da sitosterolemia sviluppano xantomi tuberosi e malattia cardiovascolare prematura (Salen G, et al., 1992; Miettinen TA, et al., 1980). La somministrazione di ezetimibe, un farmaco capace di inibire l'assorbimento intestinale degli steroli mediato da NPC1L1, previene l'accumulo di steroli vegetali nei pazienti sitosterolemici (Salen G, et al., 2004) e nei topi privi di ABCG5/G8 (Yu L, et al., 2005), dimostrando l'importanza della proteina NPC1L1 per l'uptake intestinale del colesterolo e degli altri steroli.



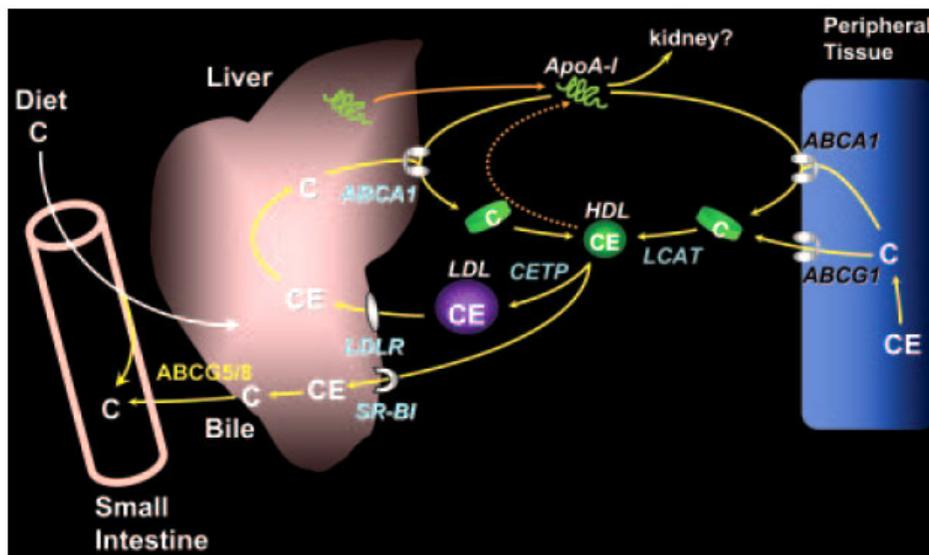
**Figura 18:** meccanismi coinvolti nel trasporto intestinale degli steroli (da: von Bergmann K, et al., 2005)

### ***Le altre tappe del trasporto inverso del colesterolo***

Una volta che il colesterolo libero cellulare è stato incorporato generando piccole particelle pre- $\beta$ , ha luogo una complessa serie di trasformazioni metaboliche che coinvolgono diversi enzimi e fattori plasmatici e che portano alla formazione di grandi particelle, dette  $\alpha$ -HDL o HDL mature (fig. 19). La seconda tappa del RCT consiste nell'esterificazione del colesterolo da parte dell'enzima plasmatico lecitina-colesterolo aciltransferasi (LCAT) (Franceschini G, et al., 1991). Il colesterolo estere (CE) così sintetizzato si distribuisce all'interno della particella lipoproteica che da discoidale diviene sferica (Attie AD, et al., 2001). Questa reazione è necessaria per mantenere un gradiente di colesterolo libero tra le cellule e le HDL, indispensabile perché si abbia un flusso continuo di colesterolo dalle cellule al plasma (Franceschini G, et al., 1991). Inoltre, la stabilità delle HDL dipende in qualche modo dall'azione di LCAT e dal contenuto di CE: le pre- $\beta$ -HDL sono infatti rapidamente degradate se questa reazione non ha luogo. Stati patologici caratterizzati da un'insufficiente attività dell'LCAT manifestano carenza di HDL e accumulo di colesterolo in alcuni organi (Yokoyama S, 2000).

Il CE delle  $\alpha$ -HDL può essere trasferito alle lipoproteine contenenti apoB (VLDL, IDL, LDL) grazie all'enzima "cholesteril ester transfer protein" (CETP), il quale catalizza lo scambio di quantità equimolari di CE e trigliceridi tra le HDL e le VLDL (Franceschini G, et al., 1991). Le lipoproteine a bassissima densità possono poi cedere il CE al fegato in seguito all'interazione con il recettore per le LDL. Sembra che la maggior parte del CE delle HDL sia rilasciato agli epatociti attraverso questo meccanismo indiretto. Tuttavia ne esistono altri, attivi soprattutto in specie animali che non esprimono CETP, ad esempio i topi. Quando le HDL accumulano CE, si arricchiscono in apoE e si possono legare a recettori epatici che riconoscono questa apolipoproteina, come il recettore per le LDL. Inoltre si pensa che le HDL possano rilasciare il CE direttamente agli epatociti e alle cellule steroidegeniche (Franceschini G, et al., 1991). Infatti, è dimostrato che il recettore SR-BI, espresso a questo livello, sia in grado di mediare l'uptake selettivo del CE dalle HDL e dalle LDL senza che avvenga l'endocitosi delle particelle (Von Eckardstein A, et al., 2001). Il meccanismo mediante cui avviene la dissociazione dei lipidi e delle proteine e l'incorporazione del CE nella membrana plasmatica non è stato ancora chiarito. Un evento necessario ma non sufficiente sembra sia rappresentato dal legame delle HDL al recettore (Von Eckardstein A, et al., 2001). E' stato supposto che SR-BI agisca

da trasportatore di lipidi, per esempio formando un canale idrofobico attraverso cui il CE possa diffondere dalle HDL alla membrana plasmatica (Von Eckardstein A, et al., 2001). E' anche possibile che questa reazione dipenda da cofattori quali la lipasi epatica (HL), quella endoteliale (EL) e la lipasi-lipoproteica (LPL), che idrolizzano i fosfolipidi sulla superficie delle lipoproteine, facilitando la rimozione del CE sia da parte di SR-BI che da parte di CETP (Von Eckardstein A, et al., 2001). La presenza di SR-BI è particolarmente rilevante a livello delle caveolae della membrana cellulare e si ritiene che indirizzi il CE internalizzato a compartimenti diversi da quelli endosomiali e lisosomiali (Von Eckardstein A, et al., 2001). A supporto di questa teoria vi sono studi che dimostrano che la maggior fonte di colesterolo per la produzione di acidi biliari siano le HDL e non le LDL (Schwartz C, et al., 1978) e che la sovraespressione di SR-BI nei topi aumenti il trasporto del colesterolo dalle HDL alla bile (Ji Y, et al., 1999). L' "up-regulation" di SR-BI a livello epatico può risultare antiaterogena, aumentando il catabolismo dei lipidi delle HDL e delle lipoproteine aterogene (Von Eckardstein A, et al., 2001). Tuttavia, SR-BI media anche l'efflusso di colesterolo dalle cellule, quindi la direzione del movimento di tale lipide può dipendere dall'attività relativa degli enzimi extracellulari deputati al suo trasporto, quali LCAT, CETP e "phospholipid transfer protein" (PLTP) e degli enzimi intracellulari che lo metabolizzano (Von Eckardstein A, et al., 2001; Rothblat GH, et al., 2002).



**Figura 19:** illustrazione schematica del processo del RCT e principali enzimi coinvolti (da: Oram JF and Vaughan AM, 2006).

## **Modulazione del trasporto inverso del colesterolo**

Il trasporto inverso del colesterolo è il principale processo metabolico attraverso cui l'organismo può eliminare il colesterolo in eccesso. Gran parte degli sforzi messi in atto dalla ricerca in campo cardiovascolare sono orientati allo studio ed alla valutazione di strategie capaci di modulare in modo favorevole tale processo. Potenziare l'RCT potrebbe essere la via più efficace per ridurre in modo significativo l'accumulo di colesterolo nei tessuti periferici e, quindi, il rischio di sviluppare eventi cardiovascolari avversi su base aterosclerotica.

Come abbiamo visto, le HDL rappresentano un po' il "cuore" di tutto l'RCT (Sviridov D, Nestel P, 2002). Numerosi studi (Maron DJ, 2000; Sharrett AR, et al., 2001; Barter P, 2004; Gotto AM Jr and Brinton EA, 2004; Chapman MJ, et al., 2004; Olsson AG, et al., 2005) hanno evidenziato come i livelli plasmatici di HDL siano inversamente correlati con l'insorgenza di malattie cardiovascolari (cfr. anche pag. 18-19).

Si ritiene che le HDL esplicino la loro azione protettiva principalmente attraverso l'RCT (Lewis G, Rader D, 2005). Accanto a questo meccanismo primario, se ne aggiungono altri, non dipendenti dal trasporto di colesterolo (Kontush A, Chapman MJ, 2006). Tra essi, possiamo annoverare l'azione antiossidante (riduzione dell'ossidazione a carico delle LDL), l'azione anti-infiammatoria, l'azione antitrombotica/pro-fibrinolitica (riduzione dell'aggregazione piastrinica) e l'azione vasoprotettiva (promozione della sintesi di ossido nitrico ed aumento della vasodilatazione; inibizione della chemotassi leucocitaria tramite riduzione dell'espressione di molecole d'adesione, quali VCAM-1 e ICAM-1) (Kontush A, Chapman MJ, 2006). Tali effetti sono mediati da componenti, intrinseci o accessori, associati alle HDL, quali apoA-I, paraoxonasi, "platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH)" ed altri enzimi antiossidanti (Kontush A, Chapman MJ, 2006).

Molte delle strategie messe in atto per stimolare l'RCT prevedono interventi capaci di influenzare i livelli plasmatici di HDL e/o la loro composizione (Singh IM, et al., 2007; Davidson MH, Toth PP, 2007), ad esempio, tramite un incremento della produzione di apoA-I o una riduzione della *clearance* plasmatica delle particelle (Davidson MH, Toth PP, 2007). Dal punto di vista clinico, il problema è affrontato attraverso approcci di tipo farmacologico e di tipo non-farmacologico (Singh IM, et al., 2007).

Gli interventi di tipo farmacologico si avvalgono di comuni agenti terapeutici, come acido nicotinico, fibrati, statine, o di nuove classi di composti in via di sperimentazione, tra cui inibitori della CETP, bloccanti del recettore dei cannabinoidi CB1, agonisti dei recettori PPAR (Singh IM, et al., 2007). In questo tipo di approccio, rientrano anche le terapie emergenti a base di derivati biotecnologici, come l'infusione di complessi apoA-I/fosfolipidi, contenenti forme normali o mutate di apoA-I, e l'utilizzo di peptidi apoA-I-mimetici (Singh IM, et al., 2007; Davidson MH, Toth PP, 2007).

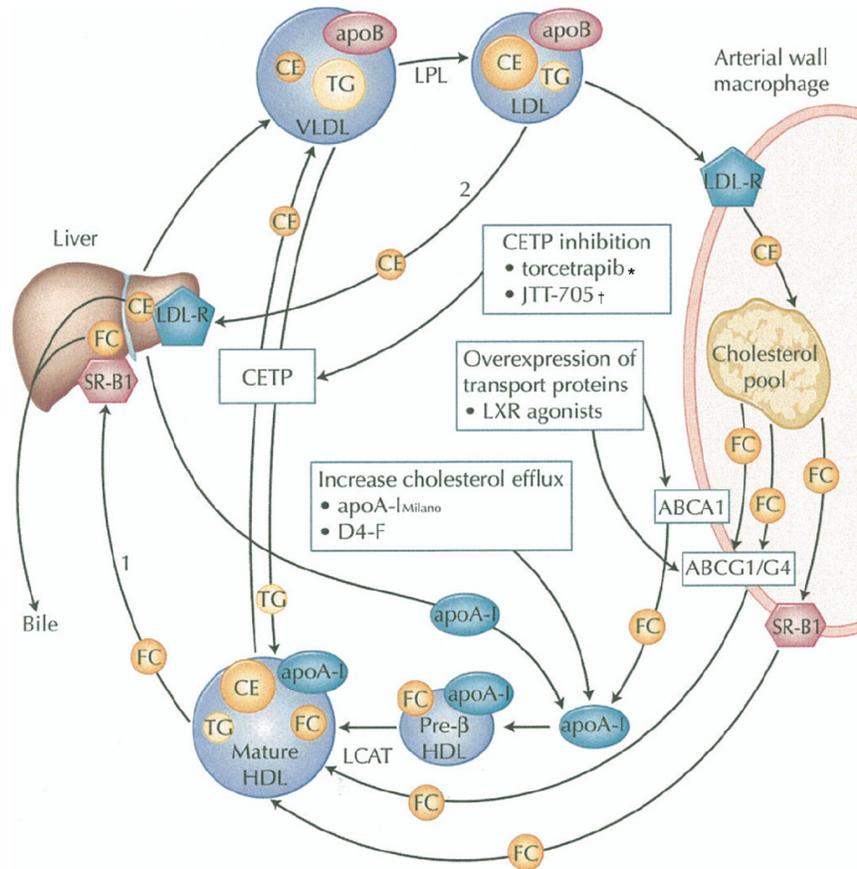
Le strategie di tipo non-farmacologico, invece, riguardano interventi sullo stile di vita, come esercizio fisico, abbandono dell'abitudine al fumo, perdita di peso, consumo di alcol ed altri fattori dietetici (Singh IM, et al., 2007; Davidson MH, Toth PP, 2007).

Dal punto di vista sperimentale, la promozione del RCT prevede un approccio più radicale. Molti degli studi effettuati riguardano interventi capaci di modificare in modo mirato l'attività di alcuni "attori" del RCT, siano essi recettori nucleari, fattori di trascrizione, proteine-trasportatrici o lipoproteine. In questo modo, si cerca di intervenire nei singoli processi che favoriscono la produzione di apoA-I ed altri accettori lipidici, l'arricchimento in lipidi di tali accettori attraverso l'efflusso cellulare, l'up-regulation degli stessi sistemi di efflusso. La strategia, quindi, risulta mirata direttamente alla rimozione dell'eccesso di colesterolo nei compartimenti periferici. Sembra molto probabile, infatti, che l'estrazione dell'eccesso lipidico dai tessuti periferici, in particolare dai macrofagi, ed il conseguente passaggio nel compartimento plasmatico siano le tappe limitanti del RCT (Sviridov D, Nestel P, 2002). Lo studio approfondito di tali dinamiche ha portato a definire l'insieme dei meccanismi coinvolti come "RCT macrofagico" (Cuchel M and Rader DJ, 2006).

La valutazione del RCT attraverso queste tappe risulta molto più accurata rispetto alla semplice osservazione dei livelli di HDL (Sviridov D, Nestel P, 2002). La promozione del RCT, infatti, potrebbe comportare principalmente variazioni di tipo qualitativo e non quantitativo a carico delle lipoproteine (Sviridov D, Nestel P, 2002; Kontush A, Chapman MJ, 2006; Singh IM, et al., 2007).

Una delle strategie più studiate è quella che prevede la modulazione farmacologica del sistema LXR/RXR (Geyeregger R, et al., 2005), visto l'ampio spettro d'azione di questi recettori nucleari all'interno del metabolismo lipidico. Tuttavia, anche farmaci comunemente usati in terapia, come le statine, hanno dimostrato di poter avere degli

effetti importanti nella promozione del RCT (Zanotti I, et al 2004; Zanotti I, et al 2006; Singh IM, et al., 2007; Davidson MH, Toth PP, 2007).



**Figura 20** : strategie per la modulazione del RCT (da: Davidson MH, Toth PP., 2007)

### ***Le statine***

Gli inibitori della 3-idrossi-3metilglutaril coenzimaA (HMG-CoA) reductasi (statine) sono farmaci ampiamente utilizzati per la prevenzione primaria e secondaria delle malattie cardiovascolari.

Le prime statine sono state isolate da una muffa, il *Penicillium Citrinium*. Nel 1976 Endo e collaboratori riconobbero le statine come inibitori della sintesi di colesterolo. In particolare Brown et al., nel 1978, dimostrarono che l'azione delle statine nella sintesi di colesterolo era dovuta all'inibizione competitiva dell'enzima 3-idrossi-3metilglutaril coenzimaA (HMG-CoA) reductasi. Quest'enzima porta alla formazione di mevalonato, una tappa limitante nella sintesi di colesterolo. Le statine in particolare si legano al sito

attivo dell'enzima impedendo stericamente il legame del substrato naturale (Corsini, 2002; Hardman, 2003).

### Chimica e farmacocinetica

La prima statina studiata nell'uomo fu la compactina, nota anche come mevastatina, che dimostrò il potenziale terapeutico di questa classe di farmaci, mentre la prima statina approvata per l'impiego nell'uomo fu la lovastatina. In seguito altre statine vennero approvate per l'utilizzo in terapia, come la pravastatina e la simvastatina. Queste quattro statine sono di derivazione naturale e hanno forti analogie strutturali (Hardman, 2003).

Ora vi sono in commercio anche statine di derivazione sintetica come fluvastatina (la prima statina di origine interamente sintetica), atorvastatina, rosuvastatina e pitavastatina. La cerivastatina è anch'essa di derivazione sintetica, ma dopo essere stata approvata, è stata ritirata dal mercato e non è attualmente disponibile per l'uso clinico. L'elemento strutturale comune sia delle statine naturali, sia di quelle sintetiche è l'acido 3,5-diidrossi eptanoico o 3,5-diidrossi-2-eptenoico, a seconda che vi sia o meno un doppio legame in posizione 2. Questa catena può essere in forma aperta o ciclizzata lattonica, dove la funzione carbossilica e il gruppo idrossilico in 3 sono condensati. Le statine (come lovastatina e simvastatina) somministrate in forma lattonica sono profarmaci, necessitano cioè dell'idrolizzazione e dell'apertura dell'anello, che avviene nel tratto intestinale, per esplicare la funzione inibitoria; questa catena acida mima infatti il substrato dell'HMG-CoA redutasi (Corsini, 2002; Hardman, 2003). Le differenze strutturali tra le statine determinano le differenti caratteristiche nel rapporto lipofilia/idrofilia e nella potenza (Sowers, 2003). La somministrazione di una statina come lattone o come acido, cambia quindi la solubilità e la farmacocinetica del farmaco. Le statine, infatti, per esplicare la loro azione, devono penetrare nella cellula attraversando la membrana plasmatica. Questo passaggio richiede una certa lipofilia del farmaco. Rosuvastatina e pravastatina non sono sufficientemente lipofile da riuscire a penetrare nella cellula, ma esplicano comunque la loro azione inibitoria a livello epatico in quanto sfruttano specifici sistemi di trasporto cellulare, come il trasportatore di anioni organici (OAT). Le differenze nell'attivazione, nella captazione, nonché nella possibile espulsione di questi farmaci dalla cellula, attraverso la proteina per la resistenza multipla ai farmaci (MDR-2), possono spiegare la variabilità degli effetti collaterali tessuto-specifici tra farmaci e individui (Corsini, 2002; Wierzbicki, 2003).

Le caratteristiche farmacocinetiche sono particolarmente importanti per spiegare l'attività farmacologica o valutare l'interazione con altri farmaci: ogni statina ha un profilo farmacocinetico peculiare, che ne caratterizza il profilo farmacodinamico. L'assorbimento nella somministrazione per via orale varia da statina a statina e provoca un elevato metabolismo di primo passaggio nel fegato, che diminuisce la disponibilità plasmatica del farmaco al 5-20% della dose somministrata. Il legame alle proteine plasmatiche dei farmaci o dei metaboliti attivi è elevato (95%). L'escrezione dei metaboliti avviene per il 70% a livello epatico con la bile. L'escrezione renale delle statine varia invece da statina a statina, da valori non valutabili, fino ad un 20-30% della pravastatina. L'emivita plasmatica è generalmente breve, ma questo non incide sull'effetto, poiché l'azione delle statine è svolta principalmente nel fegato, che viene raggiunto soprattutto grazie all'assorbimento enterico.

Recentemente è stata introdotta sul mercato una forma a rilascio prolungato di fluvastatina, che ne accentua l'effetto terapeutico, diminuendo la velocità di scomparsa del farmaco dall'organismo, che altresì si mantiene in concentrazioni efficaci per più tempo (Corsini, 2002; Hardman, 2003; Wierzbicki, 2003).

#### Farmacodinamica e studi clinici

L'azione delle statine è legata in particolare alla diminuita sintesi di colesterolo nel fegato e al ridotto livello di colesterolo intracellulare negli epatociti, cui fa seguito una diminuita degradazione dei recettori per le LDL e soprattutto un aumento dell'espressione del gene per il recettore delle LDL attraverso l'attivazione dei fattori di trascrizione SREBP.

Questi eventi comportano l'aumento del numero di recettori per le LDL sulla superficie degli epatociti, con conseguente maggiore rimozione di LDL ed IDL dal sangue e diminuzione dei livelli plasmatici di colesterolo LDL (Hardman, 2003).

In questo modo le statine abbassano i livelli di LDL dal 20 al 70%, a seconda della dose, la quale correla linearmente con la diminuzione di colesterolo plasmatico. Le statine seguono la "regola del 5-7", cioè raddoppiando la dose, si ha un decremento dei livelli di LDL di un ulteriore 5-7% (Wierzbicki, 2003).

Le statine hanno anche altri effetti lipidici, quali la riduzione della produzione epatica di LDL e HDL, probabilmente dovuta alla minore quantità di colesterolo cellulare epatico; questi effetti presumibilmente contribuiscono alla diminuzione plasmatica di LDL,

derivando queste ultime dalle VLDL. Le statine riducono anche i livelli di trigliceridi, questa osservazione può essere spiegata proprio grazie alla diminuita sintesi di VLDL, molto ricche di trigliceridi. Infine le statine hanno dimostrato di aumentare i livelli plasmatici di colesterolo HDL del 5-10% e di apoA-I del 3-9%. Quest'aumento, non lineare, né dose dipendente, può risultare un fattore positivo nel ridurre il rischio cardiovascolare in pazienti con bassi livelli di HDL (Rader, 2003; Hardman, 2003). Benché il meccanismo dell'aumento di HDL non sia stato chiarito, l'incremento dei livelli di apoA-I, secondo uno studio, avviene attraverso la trascrizione e l'attivazione (via fosforilazione) del promotore per questa proteina, ovvero il recettore PPAR $\alpha$  (peroxisome proliferator activator receptor). Le statine attivano PPAR $\alpha$ , inibendo la via di trasduzione del segnale della proteina RhoA. Un altro studio recente evidenzia come anche un diminuito catabolismo delle HDL possa essere un meccanismo grazie al quale le statine aumentano i livelli delle stesse lipoproteine (Chong, 2002; Wierzbicki, 2003).

Le statine agiscono quindi positivamente sulla cosiddetta "triade lipidica", una componente che correla con un maggiore rischio cardiovascolare in cui vi sono alti livelli di colesterolo LDL e trigliceridi e bassi livelli di colesterolo HDL. Gli effetti lipidici delle statine e in particolare la diminuzione del colesterolo LDL, sono ritenuti il principale effetto benefico sulla malattia cardiovascolare cardiaca esercitata da tali farmaci. Si è infatti ipotizzato che le statine possano ridurre la componente lipidica della placca aterosclerotica, rendendola meno suscettibile alla rottura. Inoltre, l'alto livello di LDL è un riconosciuto fattore di rischio nello sviluppo dell'aterosclerosi (Corsini, 2002).

Le statine sono state oggetto di numerosi trial clinici e meta-analisi, dimostrando di essere in grado di ridurre l'entità della lesione aterosclerotica, ma soprattutto di ridurre gli eventi cardiovascolari ad essa legati. E' stato inequivocabilmente dimostrata una riduzione di morbilità e mortalità cardiovascolare associata a questi farmaci, con un effetto favorevole sulla mortalità totale (Corsini, 2002). Questi studi, però, oltre ad associare alle statine un aumento della sopravvivenza del 30-40% sia in prevenzione primaria che secondaria (cioè sia prima sia dopo l'evento cardiovascolare), hanno dimostrato che tale effetto benefico non è limitato ai soli soggetti ipercolesterolemici, ma anche a quelli normocolesterolemici; inoltre le statine, sono attive anche nel ridurre il rischio cerebrovascolare, che notoriamente è debolmente associato ai valori plasmatici

di colesterolo. Le statine non possono quindi essere considerati solo come farmaci ipolipemizzanti, ma come efficaci agenti antiaterosclerotici (Corsini, 2002;Wierzbicki, 2003).

### Effetti pleiotropici

In linea con questa ipotesi, numerosi studi sperimentali indicano che meccanismi non legati all'effetto ipocolesterolemizzante possono potenzialmente contribuire all'attività farmacologia delle statine. Recentemente anche studi clinici hanno evidenziato il beneficio sugli eventi cardiovascolari di simvastatina e fluvastatina indipendentemente dai livelli di colesterolo LDL basali dei soggetti trattati. Trial clinici come WOSCOPS, inoltre, valutando la riduzione delle LDL avrebbero previsto una riduzione di eventi cardiovascolari del 24%, mentre l'effettiva riduzione è stata del 35%, facendo supporre che l'effetto ipolipemizzante sulle LDL non sia l'unico elemento favorevole nella riduzione di rischio cardiovascolare legato alla terapia con statine (Wierzbicki, 2003).

Gli effetti non lipidici delle statine sono chiamati effetti pleiotropici, e derivano anch'essi dall'effetto inibitorio delle statine sull'HMG-CoA redattasi. Il significato clinico di questi effetti, nella maggior parte dei casi, risulta non del tutto chiarito, anche perchè le concentrazioni di statine, in alcuni degli studi che hanno evidenziato questi effetti, erano più alte di quelle che normalmente si hanno nei pazienti trattati (Libby, 2002; Corsini, 2002; Li, 2002).

Il colesterolo non è infatti l'unico rappresentante dei prodotti del mevalonato; anche gruppi isoprenoidi come geranilgeraniolo e farnesolo derivano dal mevalonato. Questi due prodotti portano all'isoprenilazione di proteine (come Rho, Ras e altre chinasi e proteine GTP dipendenti) responsabili della regolazione di numerose funzioni cellulari, a livello delle fibre di actina nel citoscheletro, dei siti di adesione focale o nella mitosi, nella migrazione e nella proliferazione cellulare. Potenzialmente queste proteine possono essere coinvolte nei processi aterosclerotici.

L'isoprenilazione permette alle proteine di legarsi alla membrana cellulare e di localizzarsi a livello subcellulare, eventi indispensabili per la loro azione. Le statine, quindi, bloccando la sintesi di colesterolo, bloccano anche la formazione di prodotti isoprenoidi, diminuendo l'azione di queste proteine. Le statine riducono anche i livelli di colesterolo ossidato e di colesterolo disponibile per l'ossidazione da parte dell'idrossilasi; questa azione può avere ripercussioni su altre vie metaboliche in cui sono coinvolti gli ossisteroli, secondi messaggeri che attivano LXR e indirettamente

promuovono quindi l'espressione di ABCA1 e l'efflusso di colesterolo (Wierzbicki, 2003; Corsini, 2002; Hardman, 2003; Hansson, 2005; Sower, 2003).

L'aumento della stabilità della placca dato dalle statine, pare essere dovuto, tra gli altri fattori, all'inibizione della sintesi di unità isoprenoidi nei macrofagi. Si è visto infatti che vi è una riduzione della capacità di endocitosi di LDL modificate nei macrofagi in vitro, dovuta al trattamento con statine, in quanto questi farmaci determinano una downregulation del recettore scavenger di classe A. Tale effetto è antagonizzato dall'aggiunta di geranilgeraniolo, ma non di farnesolo, facendo così supporre il coinvolgimento di una proteina geranilgeranilata negli eventi dell'endocitosi di LDL modificate (Corsini, 2002); si ha così una ridotta formazione di cellule schiumose, che sono particolarmente presenti nelle placche più vulnerabili.

Le statine aumentano quindi la stabilità della placca agendo sulla composizione cellulare della stessa, diminuendo la possibilità che questa vada incontro alla rottura del cappuccio fibroso. La stabilità della placca è anche aumentata grazie alla diminuita capacità di secernere metalloproteasi da parte dei macrofagi in seguito a trattamento con statine; anche questa azione è antagonizzata dal mevalonato (Corsini, 2002; Hardman, 2003). I prodotti della via del mevalonato sono importanti anche nella proliferazione cellulare, in quanto proteine isoprenilate della famiglia RAS sembrano coinvolte in questo processo. Le statine in particolare inibiscono in vitro la proliferazione di cellule muscolari lisce coinvolte nell'aterogenesi. Questa azione antiproliferativa che è stata confermata in vivo, è inibita sia da geranilgeraniolo sia da farnesolo (Corsini, 2002). Questi farmaci, accanto a quest'attività, inducono anche la morte per apoptosi piuttosto che per necrosi, evitando così la liberazione di frammenti cellulari, scatenanti risposte infiammatorie (Corsini, 2002; Hardman, 2003).

Le statine, secondo studi in vivo, migliorano la funzione endoteliale anche senza ridurre la colesterolemia: l'effetto pare mediato dalla stabilizzazione dell'mRNA e dall'attivazione post-trascrizionale della eNOS (nitrossido sintetasi endoteliale) che porta alla sintesi di NO e ad un aumentato flusso sanguigno. NO è responsabile di una serie di effetti quali vasodilatazione, inibizione dell'aterogenesi, inibizione dell'attivazione e dell'aggregazione piastrinica, attenuazione dell'apoptosi delle cellule endoteliali e promozione dell'angiogenesi. L'aggiunta di geranilgeraniolo antagonizza

questa attivazione, suggerendo che l'inibizione della proteina isoprenilata Rho sia coinvolta in tale effetto.

Sembra infatti che Rho sia un regolatore negativo della eNOS. Quindi una diminuita produzione di geranilgeraniolo a causa del blocco della sintesi del mevalonato potrebbe portare ad una diminuita attività di Rho, con conseguente aumento nell'attività di eNOS e aumentata produzione di NO. Il miglioramento della funzione endoteliale nell'uomo è stato confermato da studi clinici (Corsini, 2002; Wierzbicki, 2003).

Le statine sono inoltre in grado di ridurre l'ossidabilità delle LDL. L'effetto si esplica in diversi modi, tra cui l'aumento dei livelli plasmatici di paraossonasi associato alle HDL da parte di atorvastatina, e il legame delle statine stesse alla frazione fosfolipidica delle LDL, così da prevenire la diffusione di radicali liberi all'interno del nucleo lipidico della lipoproteina. Si ha inoltre un aumento dei livelli di antiossidanti naturali (glutazione, vitamina C, vitamina E), una ridotta produzione di ossigeno cellulare e una diminuita produzione di radicali liberi da parte di macrofagi e cellule endoteliali. Anche in questo effetto il blocco della sintesi di mevalonato pare essere un fattore essenziale. Infine, anche l'effetto ipolipemizzante delle statine può ridurre l'ossidabilità delle LDL, dal momento che LDL in circolo da più tempo risultano più suscettibili alla modificazione ossidativa (Corsini, 2002; Hardman, 2003; Sower, 2003).

Le statine esercitano anche un effetto antinfiammatorio a livello della placca sui monociti e macrofagi, riducendo l'espressione di molecole di adesione solubili nelle cellule endoteliali. Viene diminuito il rilascio di citochine, chemochine e di interleuchine infiammatorie e proaterogene, insieme ad una diminuzione di espressione e produzione di ciclossigenasi-2, che produce eicosanoidi infiammatori come prostaglandine e trombossani. Le statine si sono inoltre dimostrate in grado di ridurre i livelli di proteina C reattiva un marker di infiammazione sistemica, correlata con aumentato rischio per patologie coronariche, prodotto dal fegato in risposta a citochine come l'inteleuchina 6. L'mRNA e la stessa proteina C reattiva sono stati trovati anche in macrofagi e in cellule muscolari lisce. Rimane da stabilire se la proteina C reattiva sia solo un marker infiammatorio o se contribuisca alla patogenesi dell'aterosclerosi. Un'evidenza di quest'ultima ipotesi deriva da uno studio in cui la proteina C reattiva attiva i monociti favorendo l'adesione endoteliale.

Le statine hanno svariati effetti, che non correlano con la diminuzione di colesterolo, su fattori protrombotici come il fattore tissutale, gli inibitori del fattore tissutale, l'aggregazione piastrinica, la viscosità del sangue, il fibrinogeno e gli inibitori del plasminogeno; in particolare è stato notato un aumento della fibrinolisi in seguito al trattamento con statine. Inoltre il sangue di pazienti trattati con statine, ha dimostrato una riduzione nella formazione di trombi piastrinici (Corsini, 2002; Hardman, 2003; Li, 2002; Wierzbicki, 2003; Hansson, 2005).

Vi sono infine prove di un'azione angiogenica delle statine (Libby, 2002).

#### Effetti collaterali ed interazioni

L'uso delle statine nella prevenzione primaria e secondaria richiede una terapia a lungo termine. E' quindi importante valutare la tollerabilità e la sicurezza di questi farmaci: le statine in monoterapia sono generalmente ben tollerate, con un ottimo profilo di sicurezza, a causa di una bassa percentuale (1%) di effetti collaterali. Fra questi si annoverano dolori addominali, sintomi gastrointestinali, insonnia, rash cutanei (Corsini, 2002). I più importanti, benché rari, sono miopatia (con aumento dei livelli plasmatici di creatin chinasi) e un aumento asintomatico delle transaminasi epatiche. I livelli di transaminasi possono aumentare di 3 volte, se l'aumento è persistente è necessario sospendere la terapia e riprenderla con dosi più basse, in quanto questo effetto è di solito dose-dipendente. La miopatia, se non viene sospeso il farmaco, può portare a rabdomiolisi con mioglobinuria ed eventuale blocco renale, anche fatale; il meccanismo di questi effetti rimane sconosciuto (Corsini, 2002; Wierzbicki, 2003).

Particolarmente importante a livello clinico è l'interazione delle statine con altri farmaci. Un caso su tutti è quello che ha portato al ritiro dal commercio la cerivastatina. Questo farmaco cosomministrato con altri farmaci ipolipemizzanti, i fibrati, ha determinato una serie di casi di rabdomiolisi fatale in numero nettamente superiore alle altre statine. In generale, comunque, le interazioni tra diversi farmaci e statine sono associate ad un aumentato rischio di miopatia rispetto alla monoterapia.

La miopatia è generalmente risultante da un'interazione complessa tra farmaco, condizione fisiopatologica del paziente e terapia concomitante. Le differenze tra statina e statina nelle interazioni tra farmaci dipendono dalle diverse caratteristiche farmacocinetiche delle stesse. I farmaci con cui si sono rilevate le interazioni più

importanti sono fibrati, ciclosporina A, niacina, macrolidi, digossina, calcioantagonisti, antifungini e anticoagulanti cumarinici (Corsini, 2002).

Le interazioni sono in gran parte dovute all'inibizione o all'induzione degli isoenzimi della famiglia del citocromo P450; in particolare l'inibizione del citocromo 3A4, che è una delle isoforme più importanti nel metabolismo dei farmaci, causata da antifungini azolici, macrolidi, ciclosporina A, succo di pompelmo e calcio antagonisti, comporta l'aumento delle concentrazioni sieriche di statine. Al contrario induttori del citocromo 3A4 come troglitazone, rifampicina e fenitoina possono ridurre i livelli plasmatici delle statine (Corsini, 2002).

Un'interazione importante per la frequenza dell'utilizzo in terapia è quella con altri farmaci ipolipemizzanti. La cosomministrazione di statine e resine sequestranti gli acidi biliari, esita in una ridotta biodisponibilità di statine, evitabile somministrando la resine qualche ora prima dei pasti e la statina la sera prima di coricarsi.

L'interazione con i fibrati è estremamente importante in quanto entrambi i farmaci in monoterapia possono determinare miopatia come effetto collaterale. Quindi, oltre ad un effetto additivo come ipolipemizzanti, può esservi anche un effetto tossico additivo, come in effetti è stato riportato in diversi studi epidemiologici. La base dell'interazione tossica non è però chiara e potrebbe essere sia farmacocinetica, sia farmacodinamica. L'uso delle statine è infine controindicato in gravidanza e nell'allattamento, in quanto la sicurezza di questi farmaci non è stata dimostrata; inoltre da alcuni studi in vivo risulta che le statine, possano essere embriotossici e tendano ad accumularsi nel latte (Hardman, 2003).

#### Statine ed efflusso cellulare di colesterolo

In ultimo, è importante dedicare attenzione ad un altro effetto pleiotropico: l'azione delle statine sull'espressione di proteine che mediano l'efflusso cellulare di colesterolo: SR-B1 ed ABCA1.

Uno studio recente (Han, 2004) ha dimostrato che le statine aumentano significativamente in modo dose e tempo dipendente, mRNA ed espressione della proteina SR-B1 in linee cellulari macrofagiche, in macrofagi peritoneali murini e in monociti umani. Inoltre nei macrofagi, la pitavastatina aumenta il legame delle HDL, la captazione delle stesse e l'efflusso di colesterolo ad HDL.

Studi altrettanto recenti hanno invece dimostrato che l'espressione di mRNA di ABCA1 è diminuita in modo dose-dipendente in macrofagi murini trattati con statine (Sone, 2004), mentre è aumentata in epatomi umani (Maejima, 2004).

### ***Il sistema LXR***

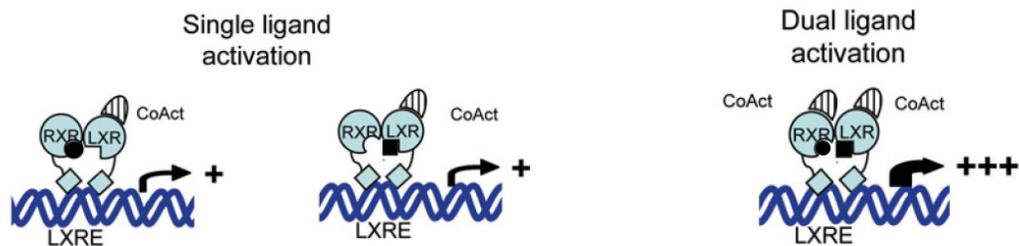
I “Liver X receptors (LXRs)” appartengono alla superfamiglia dei recettori nucleari, implicati nella regolazione di geni coinvolti in tappe essenziali del metabolismo (Peet DJ, et al., 1998; Mangelsdorf DJ, et al., 1995). I recettori nucleari sono fattori di trascrizione attivati da ligando. Molti di loro si legano al DNA solo dopo la formazione di un eterodimero con il “retinoid X receptor (RXR)” e presentano un'attivazione di tipo “permissivo”, cioè possono essere attivati anche dal solo ligando di RXR (Mangelsdorf DJ and Evans RM, 1995). Diversi recettori, partner di RXR, sono stati clonati sulla base dell'omologia di sequenza o della funzione biologica, prima della scoperta dei loro ligandi specifici (Mangelsdorf DJ and Evans RM, 1995). Per questo motivo essi sono stati classificati inizialmente come recettori nucleari “orfani” (Mangelsdorf DJ and Evans RM, 1995). I ligandi endogeni, successivamente identificati (Willson TM, et al., 2001), si sono rivelati degli intermedi o dei prodotti finali delle vie metaboliche controllate dagli stessi recettori (Repa JJ and Mangelsdorf DJ, 2000). Ad esempio, i ligandi endogeni del recettore LXR sono alcuni derivati ossidati del colesterolo (ossisteroli). A differenza di quanto avviene per i recettori nucleari ormonali, attivati anche da basse concentrazioni di ligando (steroidi, vitamine liposolubili, ormoni tiroidei), gli ossisteroli si legano ad LXR tramite un'interazione a bassa affinità; tale caratteristica rende conto dell'alta concentrazione fisiologica raggiunta da questi ligandi (Geyerregger R, et al., 2005).

Molti eterodimeri RXR risiedono costitutivamente nel nucleo e non necessitano di sistemi di trasferimento tra citoplasma e compartimento nucleare, come, ad esempio, gli ormoni steroidei. L'eterodimero, in seguito al legame del ligando, cambia conformazione, staccandosi da molecole dette corepressori ed interagendo con proteine coattivatrici, e promuove la trascrizione del gene (Glass CK and Rosenfeld MG, 2000). Sono stati identificati molti fattori capaci di interagire con i recettori nucleari, in maniera dipendente o meno dal ligando, andando a formare un complesso multiproteico. Tali complessi coattivatori mediano la riorganizzazione di specifici domini della cromatina ed il reclutamento di altri fattori, come ATP-asi DNA-dipendenti, istone-

acetiltransferasi e TFIID, il fattore di trascrizione generale formato dalla “TATA-binding protein” e dalla RNA polimerasi II (Rosenfeld MG and Glass CK, 2001; Wade PA and Wolffe AP, 1999). Le specifiche sequenze di DNA, cui i recettori nucleari si legano e attraverso cui possono attivare la trascrizione, sono sequenze bersaglio dette elementi di risposta all’ormone, “hormon response elements (HREs)” (Evans RM, 1988; Beato M, 1991).

#### Attivazione del recettore

La sottofamiglia dei recettori LXR contiene due membri, LXR $\alpha$  (NR1H3) (Apfel R, et al., 1994) ed LXR $\beta$  (NR1H2) (Teboul M, et al., 1995). LXR $\alpha$  e  $\beta$  condividono la struttura canonica dei recettori nucleari (Apfel R, et al., 1994; Willy PJ, et al., 1995). L’eterodimero LXR/RXR si lega ad elementi di risposta (LXREs) contenenti la sequenza esamerica AGGTCA separata da quattro nucleotidi (DR4) (Apfel R, et al., 1994; Teboul M, et al., 1995; Willy PJ, Mangelsdorf DJ, 1997). L’eterodimero può essere attivato da ligandi specifici per RXR, come l’acido 9-*cis*-retinoico, o per LXR, come gli ossisteroli, ma quando l’attivazione avviene in modo combinato si ha un effetto sinergico notevole (Schwartz K, et al., 2000; Costet P, et al., 2000) (fig. 21).



**Figura 21:** attivazione del dimero RXR/LXR mediata da ligandi (da: Geyeregger R, et al., 2005)

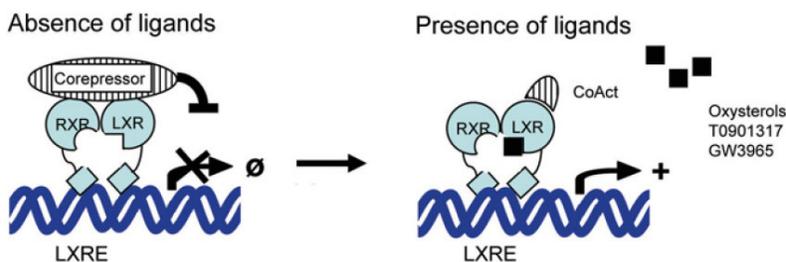
Le due isoforme LXR condividono un’elevata omologia di sequenza, rispondono agli stessi ligandi endogeni, ma presentano una distribuzione tissutale differente . LXR $\alpha$  è espresso nel fegato, nel tessuto adiposo e nei macrofagi, mentre LXR $\beta$  è espresso in modo ubiquitario (Repa JJ and Mangelsdorf DJ, 2000). Gli attivatori naturali più potenti, capaci di indurre la trascrizione alle concentrazioni fisiologiche, sono il 22-(R)-, 20-(S), 24-(S)-idrossicolesterolo ed il 24-(S),25-epossicolesterolo (Janowski BA, et al., 1999). Il 24-(S),25-epossicolesterolo è particolarmente abbondante nel fegato. Tuttavia, gli ossisteroli menzionati in precedenza sembrano non essere presenti nei macrofagi carichi di colesterolo (Fu X, et al., 2001). In queste cellule, il 27-idrossi-colesterolo sembra essere

il ligando preferenziale di LXR. L'enzima capace di generarlo, infatti, la 27-idrolasi (CYP27), nei macrofagi è presente in alte concentrazioni (Fu X, et al., 2001).

La maggior parte dei ligandi endogeni identificati è in grado di attivare entrambe le isoforme LXR, ad eccezione del 5,6,24-(S),25-diepossicolesterolo ed i 6 $\alpha$ -idrossi-acidi biliari, specifici per LXR $\alpha$  (Song C, et al., 2000). Accanto ai ligandi endogeni, sono stati sviluppati anche degli agonisti sintetici, come il T0901317 ed il GW3965, capaci di attivare sia LXR $\alpha$  che LXR $\beta$  (Repa JJ, et al., Science 2000; Collins JL, et al., 2002).

I coattivatori implicati nella transattivazione di LXR includono la proteina Grip1 (Huuskonen J, et al., 2004), la proteina associata a domini di trascrizione (TRRAP) (Unno A, et al., 2005) ed il PPAR $\gamma$  coattivatore-1a (PGC-1a) (Oberkofler H, et al., 2003). In particolare, PGC-1a è implicato sia nella gluconeogenesi sia nel mantenimento dell'omeostasi cellulare del colesterolo (Oberkofler H, et al., 2003).

In assenza di ligando, i recettori nucleari LXR possono reprimere la trascrizione genica, (fig. 22) sia nel fegato che nei macrofagi (Wagner BL, et al., 2003; Hu X, et al., 2003), attraverso il reclutamento di due corepressori: il corepressore specifico, detto NCoR (Horlein AJ, et al., 1995), ed il "silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor (SMRT)" (Chen JD and Evans RM, 1995; Wagner BL, et al., 2003; Hu X, et al., 2003).



**Figura 22:** repressione ed attivazione del dimero RXR/LXR (da: Geyereggera R, et al., 2005)

Vi è una serie di composti endogeni dotati di attività antagonista nei confronti di LXR, che potrebbero contrastare l'attività regolatoria esercitata dal recettore sull'omeostasi del colesterolo e sull'aterogenesi (Geyereggera R, et al., 2005).

Un intermedio della biosintesi del colesterolo, il geranyl-geranyl-pirofosfato (GGPP), è in grado di inibire l'azione di LXR $\alpha/\beta$ , interferendo con l'interazione tra il recettore ed i coattivatori (Forman B, et al., 1997; Gan X, et al., 2001). Allo stesso modo, gli acidi grassi

poli-insaturi si comportano da antagonisti competitivi del legame degli ossisteroli o di altri ligandi, inibendo l'attivazione LXR (Ou J, et al., 2001; Yoshikawa T, et al., 2002).

Inoltre, altri derivati ossidati presenti nel plasma, i colesterolo-3-solfati, agiscono da antagonisti naturali per entrambe le isoforme LXR $\alpha$  e  $\beta$  (Song C, et al., 2001; Tamasawa N, et al., 1993).

#### Metabolismo del colesterolo e delle lipoproteine

Uno dei primi target di LXR, il gene Cyp7a1, è stato individuato nel topo, attraverso studi su animali knock-out per LXR $\alpha$  (LXR $\alpha^{-/-}$ ) (Peet DJ, et al., 1998). Cyp7a1 codifica per l'enzima 7- $\alpha$ -idrossilasi (CYP7a1), la cui azione è tappa limitante nel processo di trasformazione del colesterolo in acidi biliari. La trascrizione epatica di Cyp7a1 è indotta dal consumo di una dieta ad alto contenuto di colesterolo. Nei topi LXR $\alpha^{-/-}$  si osservava proprio che la dieta ipercolesterolemizzante non era in grado di stimolare l'espressione dell'enzima CYP7a1 (Peet DJ, et al., 1998).

Nell'uomo, l'elemento di risposta ad LXR (LXRE) all'interno del gene Cyp7a1, è mutato. Ciò implica che, a differenza di quanto accade nel topo, la sintesi degli acidi biliari nell'uomo potrebbe non coinvolgere LXR (Goodwin B, et al., 2003).

Diversi geni target di LXR sono implicati nel trasporto inverso del colesterolo. Un esempio di cui si è parlato in precedenza (cfr. pag. 38-54), riguarda gli ABC-trasportatori.

Il gene dell'apoE è un altro gene coinvolto nell'omeostasi del colesterolo e direttamente regolato da LXR (Laffitte BA, et al., 2001). In alcune regioni del gene apoE, responsabili dell'espressione tessuto-specifica della proteina, sono state ritrovate sequenze LXREs (Laffitte BA, et al., 2001); infatti, LXR media l'espressione del gene apoE nei macrofagi e negli adipociti, ma non nel fegato (Laffitte BA, et al., 2001).

ApoE è la proteina principale delle VLDL e dei chilomicroni residui ed è coinvolta nel loro uptake epatico (cfr pag. 21-22). In più, apoE può funzionare da accettore di colesterolo nell'efflusso ABCA1-mediato (Curtiss LK and Boisvert WA, 2000).

LXR, quindi, promuove l'RCT a diversi livelli, mediando l'up-regulation dei trasportatori (ABC) ed aumentando la disponibilità degli accettori (apoE). Inoltre, LXR regola l'espressione di enzimi coinvolti nel rimodellamento delle lipoproteine, come LPL, CETP e PLP (Laffitte BA, et al., 2003; Luo Y and Tall AR, 2000).

Proprietà specifiche, riguardanti il metabolismo delle HDL, verranno discusse nel paragrafo dedicato agli agonisti LXR.

### Lipogenesi

Oltre ad essere implicato nel metabolismo del colesterolo e delle lipoproteine, LXR regola anche la biosintesi degli acidi grassi. Topi  $LXR\alpha^{-/-}$  mostrano un deficit significativo di SREBP-1c (cfr pag. 23), acido grasso sintasi (FAS), stearil-coenzimaA-desaturasi (SCD)-1 e acil-CoA-carbossilasi (ACC) (Peet DJ, et al., 1998). La regolazione della biosintesi degli acidi grassi è mediata da LXR principalmente attraverso l'induzione di SREBP-1c (Repa JJ, et al., 2000; Yoshikawa T, et al., 2001), ma anche tramite un'azione diretta su FAS (Joseph SB, et al., 2002) e PLTP (Cao G, et al., 2002; Laffitte BA, et al., 2003). Tali attività sono alla base dell'ipertrigliceridemia e della steatosi epatica osservate durante il trattamento con agonisti LXR (Joseph SB, et al., 2002; Schultz JR, et al., 2000). Dati recenti, comunque, sembrano indicare che la regolazione della lipogenesi tramite LXR potrebbe essere molto più complessa (Geyeregger R, et al., 2005) e coinvolgerebbe direttamente le vie insuliniche (Tobin KA, et al., 2002).

Oltre che nella regolazione del metabolismo lipidico, LXR gioca un ruolo fondamentale anche nel metabolismo dei carboidrati, mediando un'azione insulino-sensibilizzante e favorente la gluconeogenesi (Grefhorst A, et al., 2005), e nella regolazione di alcune risposte immunitarie, capaci di conferire resistenza alle infezioni (Joseph SB, et al., 2004).

### LXR ed aterosclerosi

La prima evidenza di un ruolo protettivo di LXR nei confronti dell'aterogenesi proviene da studi che prevedevano il trattamento con agonisti LXR di topi suscettibili all'aterosclerosi (Joseph SB, et al., PNAS 2002). In particolare, tali studi hanno dimostrato che il trattamento con l'agonista sintetico GW3965 è in grado di ridurre l'area della lesione arteriosa in topi  $apoE^{-/-}$  e  $LDLR^{-/-}$  (Joseph SB, et al., PNAS 2002). Studi effettuati tramite trapianto di midollo osseo, attraverso cui si è riusciti a rimuovere selettivamente LXR dal comparto ematopoietico in topi  $apoE^{-/-}$  e  $LDLR^{-/-}$ , hanno dimostrato che, in tali condizioni, è possibile osservare un incremento significativo delle lesioni aterosclerotiche (Tangirala RK, et al., 2002).

Si ritiene che gli effetti antiaterosclerotici di LXR siano mediati sia da un'azione diretta sul metabolismo dei macrofagi sia dalla modulazione della risposta infiammatoria (Geyereggera R, et al., 2005).

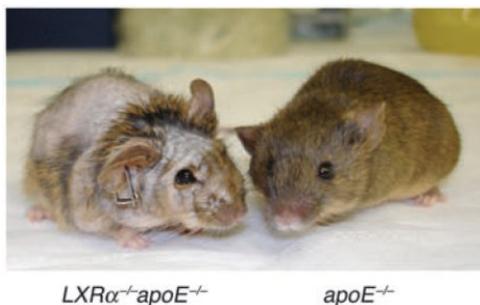
#### Aspetti terapeutici degli agonisti LXR

La scoperta che i recettori LXR potevano esercitare un ruolo fondamentale nel RCT, tramite l'up-regulation di ABCA1 e le loro proprietà antinfiammatorie (Geyereggera R, et al., 2005), ha dato grande impulso alla ricerca di sostanze dotate di attività agonista per tali recettori. Tuttavia, l'entusiasmo per questa classe di composti è stato ridimensionato nel tempo dalla comparsa di importanti effetti avversi in seguito al trattamento con gli agonisti a disposizione. Come abbiamo visto, tali effetti includono l'aumento della lipogenesi, con accumulo di trigliceridi nel plasma e nel fegato, l'induzione di citochine proinfiammatorie, come TNF- $\alpha$ , ed alcuni effetti, potenzialmente proaterogeni, sulle lipasi macrofagiche (Geyereggera R, et al., 2005).

Il fegato è l'organo maggiormente coinvolto nell'aumento indesiderato della lipogenesi. Una delle soluzioni possibili per dissociare l'attivazione di LXR dagli effetti avversi di origine epatica potrebbe essere quella di sviluppare un agonista LXR $\beta$ -selettivo. Tale ipotesi è supportata da studi effettuati su topi knock-out per l'una o l'altra isoforma e topi suscettibili all'aterosclerosi. Ad esempio, è stato dimostrato che topi LXR $\alpha$ <sup>-/-</sup> hanno una concentrazione plasmatica di trigliceridi ridotta rispetto a topi LXR $\beta$ <sup>-/-</sup>, e lo stesso accade anche per i livelli epatici di mRNA degli enzimi coinvolti nella biosintesi degli acidi grassi (Peet DJ, et al., 1998; Alberti S, et al., 2001). Questi risultati, insieme al dato della ridotta espressione epatica di LXR $\beta$  (Repa JJ and Mangelsdorf DJ, 2000), suggeriscono che LXR $\alpha$  sia l'isoforma coinvolta nella trascrizione del gene *SREBP-1c* a livello epatico (Peet DJ, et al., 1998; Alberti S, et al., 2001). Alcuni studi, effettuati trattando macrofagi peritoneali di topi LXR $\alpha$ <sup>-/-</sup> e LXR $\beta$ <sup>-/-</sup> con agonisti LXR, tendono a sottolineare che entrambe le isoforme siano importanti nell'indurre la trascrizione di ABCA1 in queste cellule (Repa JJ, et al., Science 2000).

Di recente, un gruppo di ricerca dell'Università della California ha dimostrato che, contrariamente a quanto si credeva, LXR $\alpha$  gioca un ruolo molto importante nell'omeostasi del colesterolo di tutto l'organismo e non solo a livello epatico (Bradley MN, et al., 2007). In questi esperimenti, topi LXR $\alpha$ <sup>-/-</sup>apoE<sup>-/-</sup> mostravano un fenotipo sensibilmente differente rispetto ai topi apoE<sup>-/-</sup> (fig. 23). I primi, infatti, presentavano un

forte accumulo di colesterolo nei tessuti periferici (nella cute e, soprattutto nei macrofagi dermici) e, diffusamente, in tutto l'organismo (fig. 23). L'entità delle lesioni aterosclerotiche, inoltre, risultava aumentata in modo significativo nei topi  $LXR\alpha^{-/-}$   $apoE^{-/-}$  rispetto ai topi knock-out per apoE.



**Fig. 23:** (da: Bradley MN, et al., 2007)

Tali risultati suggeriscono che l'*attivazione basale* della sola isoforma  $\beta$  non è sufficiente a controllare le esigenze metaboliche dell'organismo in condizioni di ipercolesterolemia.

Al contrario, in questi topi, il trattamento con l'agonista LXR misto GW3965, somministrato tramite dieta o "gavage" orale, aveva degli effetti importanti. Rispetto ai gruppi controllo, i topi trattati esibivano: riduzione nei livelli plasmatici di colesterolo totale, colesterolo libero, trigliceridi; assenza di steatosi epatica; aumento dei livelli plasmatici di HDL; aumento dell'espressione dei trasportatori ABCA1 e ABCG1 nei macrofagi; riduzione significativa delle lesioni aterosclerotiche. In tali condizioni sperimentali, gli effetti terapeutici del trattamento farmacologico potevano essere mediati esclusivamente dall'isoforma  $\beta$  (Bradley MN, et al., 2007).

Sulla base di questi dati si può ipotizzare che un agonista  $LXR\beta$ -selettivo possa combinare la stimolazione dell'efflusso di colesterolo dai macrofagi con una minore induzione della lipogenesi epatica, prevenendo questo effetto indesiderato.

Gli agonisti LXR non si comportano tutti nella stessa maniera riguardo all'attivazione del recettore e dei suoi geni target. Le differenze, infatti, non risiedono solo nella selettività per le singole isoforme, ma anche nella capacità di reclutare coattivatori e corepressori (Geyeregger R, et al., 2005).

Tale caratteristica sussiste anche a livello fisiologico. Ad esempio, topi  $LXR\alpha^{-}/\beta^{-}$ , rispetto alle loro controparti wild-type, mostrano espressione basale di ABCA1 e livelli plasmatici basali di HDL-C aumentati (Repa JJ, et al., Science 2000; Wagner BL, et al., 2003; Grefhorst A, et al., 2002). Questi effetti, mediati da meccanismi di “derepressione”, non coinvolgono il promotore del gene *SREBP-1c* (Geyereggera R, et al., 2005), ma direttamente il promotore del gene *ABCA1*: il corepressore NCoR si lega al promotore di *ABCA1* in maniera LXR-dipendente; ciò ha come risultato che, sia la presenza di un agonista LXR sia l’annullamento dell’espressione genica di LXR, riducano il reclutamento del corepressore sul promotore di *ABCA1* (Geyereggera R, et al., 2005).

I recettori LXR, quindi, mediano attivazione e repressione dei geni target. Questa caratteristica potrebbe essere usata per selezionare agonisti sintetici appropriati, diversi da quelli di prima generazione, come il T0901317. Ad esempio, ligandi capaci di allontanare il corepressore senza reclutare dei coattivatori potrebbero mimare gli effetti osservati nei topi  $LXR\alpha^{-}/\beta^{-}$  (Geyereggera R, et al., 2005) e promuovere l’RCT senza indurre lipogenesi.

Agonisti che mediano tali attività regolatorie sono stati sviluppati per i recettori RXR (Germain P, et al., 2002) e per i recettori degli estrogeni (Shang Y and Brown M, 2002). Anche l’agonista LXR GW3965 sembra agire attraverso un meccanismo modulatore, incrementando l’espressione di ABCA1, ma solo minimamente quella di SREBP-1c e FAS nel fegato (Geyereggera R, et al., 2005).

Uno studio recente (Naik SU, et al., 2006) ha fornito la dimostrazione che il trattamento con un agonista LXR può aumentare il trasporto inverso di colesterolo in vivo.

Lo studio è stato effettuato utilizzando un metodo innovativo (Zhang Y, Zanotti I, et al., 2003), che permette di valutare il trasporto inverso di colesterolo specificamente dai macrofagi, fornendo uno strumento importante per lo studio di questo processo e delle sue implicazioni fisiopatologiche. Il pool di colesterolo mobilitato dai macrofagi, infatti, è in stretto rapporto con quello presente nelle lesioni aterosclerotiche, ma troppo piccolo per essere rilevato tramite i metodi analitici di massa (Zhang Y, Zanotti I, et al., 2003).

Il nuovo metodo, standardizzato nel topo, prevede di iniettare per via intraperitoneale una sospensione di macrofagi carichi di colesterolo radiomarcato ( $^3\text{H}$ -colesterolo), molto simili alle “foam cells” riscontrabili nelle lesioni aterosclerotiche. La tappa

successiva prevede la misurazione della radioattività (legata agli steroli radiomarcati, <sup>3</sup>H-steroli, provenienti dai macrofagi) presente nel plasma, nel fegato e la radioattività escreta con le feci. Questa metodica ha permesso di evidenziare che la sovraespressione di apoA-I, nel topo, stimola significativamente l'RCT (Zhang Y, Zanotti I, et al., 2003).

Nello studio di Naik et al., sono stati utilizzati sia topi wild-type sia topi transgenici, in particolare topi LDLR/apobec-1 doppio knock-out e ApoB/CETP (Naik SU, et al., 2006). I topi LDLR/apobec-1 doppio knock-out hanno un profilo lipidico caratterizzato da livelli elevati di LDL-C ed apoB-100, e sviluppano aterosclerosi diffusa quando nutriti con una dieta a basso contenuto di grassi (Powell-Braxton L, et al., 1998). Il modello murino LDLR/apobec-1 doppio knock-out, quindi, ha delle caratteristiche che lo rendono più simile ad un modello umano. Lo stesso vale per il topo ApoB/CETP, caratterizzato dalla presenza di apoB umana e dall'introduzione della CETP, enzima assente nel topo wild-type.

In tutti i modelli murini utilizzati, il trattamento con l'agonista GW3965 è stato in grado di aumentare l'escrezione fecale di steroli e l'espressione epatica ed intestinale dei geni *ABCA1*, *ABCG1*, *ABCG5* e *G8*. Anche i livelli plasmatici di HDL-C e di <sup>3</sup>H-colesterolo erano aumentati dal trattamento con GW3965, tranne che nei topi LDLR/apobec-1 doppio knock-out, nei quali non si riscontravano variazioni significative.

Lo studio, quindi, fornisce l'evidenza che il trattamento con un agonista LXR può stimolare il trasporto inverso del colesterolo e, in particolare, la rimozione del colesterolo dai macrofagi e la sua escrezione nelle feci.

La promozione del RCT macrofagico potrebbe essere uno dei meccanismi attraverso cui la stimolazione dei recettori LXR riduce le lesioni aterosclerotiche (Naik SU, et al., 2006).

## *Scopo della ricerca*

Il trasporto inverso del colesterolo (RCT) è un processo metabolico a più stadi che consente la rimozione del colesterolo in eccesso dai tessuti periferici favorendone l'eliminazione da parte del fegato. L'efflusso cellulare di colesterolo è la prima tappa dell'RCT, al quale partecipa modulando due azioni principali: favorisce l'omeostasi del colesterolo cellulare tramite i meccanismi di diffusione acquosa semplice o facilitata dal recettore SR-BI e determina un impoverimento delle scorte cellulari di colesterolo attraverso la proteina ABCA1, trasportatore di membrana che trasferisce attivamente colesterolo e fosfolipidi all'esterno della cellula verso accettori di lipidi quali le HDL (Rader DJ, 2003).

Potenziare l'RCT potrebbe essere la via più efficace per ridurre in modo significativo l'accumulo di colesterolo nei tessuti periferici e, quindi, il rischio di sviluppare eventi cardiovascolari avversi su base aterosclerotica (Cuchel M and Rader DJ, 2006). Tali caratteristiche fanno del trasporto inverso del colesterolo un importante target terapeutico.

Questo lavoro di ricerca è stato mirato all'approfondimento delle conoscenze relative alla modulazione del RCT. In particolare, ci si è occupati dello studio di due aspetti principali: 1) la regolazione, a livello cellulare, dei primi stadi del RCT da parte delle statine; 2) la modulazione del RCT attraverso la stimolazione farmacologica del sistema LXR/RXR.

Farmaci comunemente usati in terapia, come le statine, hanno dimostrato di poter avere degli effetti importanti nella promozione del RCT (Zanotti I, et al 2004; Zanotti I, et al 2006; Singh IM, et al., 2007; Davidson MH, Toth PP, 2007). Le statine rappresentano l'agente di prima linea nella terapia ipolipidemizzante in pazienti con aterosclerosi e malattia cardiovascolare (Corsini, 2002; Wierzbicki, 2003; Hardman, 2003). L'azione delle statine si esplica soprattutto a livello epatico. Esse inibiscono l'enzima HMG-CoA reduttasi, implicato in una tappa limitante della biosintesi del colesterolo, che porta alla produzione di mevalonato (Hardman, 2003). Il blocco della via del mevalonato non genera solo un impoverimento di colesterolo, ma anche numerosi metaboliti coinvolti in differenti funzioni cellulari. Oltre all'effetto ipolipidemizzante, quindi, le statine possono mediare altri effetti, detti pleiotropici, che consistono in modificazioni della

funzione endoteliale, riduzione della risposta infiammatoria e stabilizzazione della placca (Corsini, 2002).

Studi recenti in vitro hanno indagato, in diverse linee cellulari, un nuovo effetto pleiotropico delle statine: la modulazione dell'espressione di ABCA1. Modulando espressione e funzione di ABCA1, le statine potrebbero esercitare un controllo diretto sull'efflusso cellulare di colesterolo, prima tappa del RCT.

In particolare, Sone e collaboratori, hanno verificato che la trascrizione di mRNA per ABCA1 è diminuita in modo dose dipendente dalle statine in macrofagi murini (Sone, 2004); Wong ha confermato questi dati ed ha notato la diminuita produzione di ossisteroli, ligandi endogeni del recettore LXR, che, se attivato, stimola la trascrizione di ABCA1. In entrambi gli studi, l'espressione dell'mRNA è ripristinata da un'aggiunta di mevalonato concomitante al trattamento con statine (Wong, 2004). Ando ha evidenziato che anche l'arricchimento delle cellule con colesterolo o l'aggiunta di un ossisterolo esogeno, come il 22-idrossi colesterolo, annullano l'effetto inibitorio delle statine sui livelli di mRNA per ABCA1 (Ando, 2004). Infine, in linee cellulari di epatomi umani, le statine hanno mostrato un'azione diversa, producendo un aumento nell'espressione dell'mRNA per ABCA1 e per LXR $\alpha$  (Sone, 2004; Maejima, 2004).

I risultati di questi studi indicano come l'azione delle statine nell'efflusso cellulare di colesterolo necessiti di ulteriori evidenze sperimentali, specialmente in merito alla funzionalità della proteina e ai meccanismi d'azione con cui le statine stesse mediano gli effetti dimostrati.

Dati acquisiti in precedenza nel nostro laboratorio hanno evidenziato che, in cellule di epatoma di ratto Fu5AH, statine come pitavastatina e compactina sono in grado di provocare un incremento significativo e dose dipendente dell'efflusso ABCA1-mediato (Zanotti I, et al., 2004). Diversamente, la compactina è in grado di ridurre l'efflusso di colesterolo ad apoA-I in macrofagi murini in linea J774, quando ABCA1 viene stimolata dal cAMP.

Partendo da questi dati, abbiamo approfondito ulteriormente la modulazione della funzionalità della proteina ABCA1 da parte delle statine, in rapporto alle singole modalità di induzione della proteina. In particolare, abbiamo studiato l'influenza delle statine sull'efflusso cellulare di colesterolo, sull'espressione di ABCA1 a livello trascrizionale e traduzionale e su processi cellulari come la biosintesi di colesterolo.

Gli studi sono stati effettuati in linee cellulari di macrofagi murini ed in colture primarie di macrofagi peritoneali murini wild-type o privi del gene LXR.

Numerose evidenze sperimentali suggeriscono che la stimolazione LXR è coinvolta nella modulazione del RCT. Ad esempio, gli agonisti LXR, mediando l'up-regulation di ABCA1 e ABCG1 nelle cellule in coltura, possono stimolare l'efflusso cellulare di colesterolo, la prima tappa del RCT (Schwartz K, 2000; Wang N, et al., 2006). In diversi modelli murini, la somministrazione dell'agonista LXR GW3965 ha stimolato la mobilitazione del colesterolo, dimostrando la possibilità di modulare l'RCT in vivo (Naik SU, et al., 2006). In quest'ultimo studio, tuttavia, nonostante i dati presentati siano numerosi e convincenti, non viene fornita alcuna spiegazione riguardo al possibile meccanismo biochimico coinvolto negli effetti mediati dall'attivazione LXR.

Molti studi hanno rivelato che il trattamento con agonisti quali T0901317 o GW3965 può indurre un aumento significativo delle HDL circolanti nei topi (Schultz JR, et al., 2000; Terasaka N, et al., 2003; Miao B, et al., 2004). Dato che queste proteine hanno un ruolo ben stabilito nell'efflusso di colesterolo, agendo da accettori lipidici, ci siamo chiesti se l'aumento del RCT osservato in seguito allo stimolo LXR potesse dipendere da un aumento del potenziale di efflusso del plasma.

Alla luce di queste considerazioni, nel nostro lavoro di ricerca abbiamo indagato sulle eventuali relazioni esistenti tra stimolazione dei recettori LXR, aumento del RCT ed efflusso cellulare di colesterolo. Per fare ciò, abbiamo trattato dei topi wild-type con dosi crescenti dell'agonista T0901317. Il passo successivo è stato quello di confermare che, nelle nostre condizioni sperimentali, la stimolazione LXR in vivo promuovesse la mobilitazione del colesterolo dai macrofagi al plasma, al fegato ed alle feci, e fosse in grado di modificare il profilo lipidico degli animali. Abbiamo, poi, valutato se il plasma degli animali trattati col T0901317 possedesse una capacità più alta di stimolare il rilascio di colesterolo da cellule in coltura.

Gli studi di efflusso sono stati effettuati su diversi modelli cellulari: cellule di epatoma di ratto Fu5AH, che esprimono costitutivamente alti livelli di SR-BI e bassi livelli di ABCA1; cellule COS-7 controllo o transfettate in modo transiente con SR-BI; macrofagi murini J774, che esprimono alti livelli di ABCA1 in seguito ad incubazione con cpt-cAMP, e bassi livelli di SR-BI. L'uso, come accettore, di aliquote di plasma

intero al posto di frazioni lipoproteiche isolate fornisce uno strumento ideale per valutare la capacità del plasma di singoli animali (o individui) nel promuovere l'efflusso di colesterolo dalle cellule. Infatti, in tali condizioni sperimentali, si è in presenza di tutti i potenziali fattori capaci di influenzare l'efflusso e quest'approccio risulta di particolare utilità quando si vuole stabilire una correlazione tra efficienza dei primi stadi dell'RCT e profilo lipidico dell'animale (o del paziente).

## *Materiali e metodi*

## **Manipolazione delle colture cellulari**

### ***Caratteri generali***

Tutte le operazioni riguardanti la manipolazione delle colture cellulari vengono effettuate in condizioni di sterilità, utilizzando una cappa a flusso laminare verticale.

La vetreria viene sterilizzata in stufa a secco (Air Concept, FIRLABO Lione) per 4 ore a 180°C, mentre i materiali plastici (puntali per pipettatrici automatiche, vials) in autoclave (Certoclav, Austria) per 20 minuti a 121°C ad 1 atmosfera.

Le cellule sono mantenute in incubatore (Napco, Chicago, Illinois) a 37°C con un tasso di umidità del 90-95% e di anidride carbonica del 5%.

L'osservazione morfologica delle cellule viene effettuata con un microscopio ad ottica invertita (Leica, Germania).

### ***Reagenti***

La soluzione di tampone fosfato PBS, utilizzata per il lavaggio delle cellule, viene sterilizzata in autoclave (20 minuti a 121°C ad 1 atmosfera) e conservata in recipienti in vetro a temperatura ambiente.

Le flask, le piastre, le bottiglie di Teflon ed i criotubi sterili per la coltivazione e la conservazione delle cellule sono acquistate dalla Nunc. Le provette sterili monouso provengono dalla Falcon. La glutammina, il piruvato di sodio, gli aminoacidi non essenziali e la tripsina sono forniti dalla Gibco.

I terreni di coltura per le cellule J774 (macrofagi murini in linea) (RPMI 1640, Cambrex) e per le Fu5AH (epatomi di ratto) (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Cambrex) sono addizionati di penicillina e streptomina o gentamicina (Sigma) prima dell'uso e conservati a 4°C; all'occorrenza vengono completati con siero fetale bovino (Fetal Calf Serum, FCS, Cambrex Bioscience, Verviers Belgio) o con albumina (BSA, Bovine Serum Albumin, Sigma).

Il siero viene aliquotato, sterilizzato per filtrazione (Millipore) e conservato ad una temperatura di -20°C; al momento dell'uso è scongelato in un bagno termostato a 37°C.

Il terreno di coltura usato per la marcatura delle cellule viene preparato utilizzando medium completo all'1% di FCS addizionato di [1,2-<sup>3</sup>H]-colesterolo o cloridrato di

metil [<sup>3</sup>H]-colina (Amersham Biosciences – Uppsala, Sweden), che sono conservati in toluene a -20°C; il toluene viene eliminato per trattamento con etanolo assoluto ed evaporazione in corrente d'azoto. Prima dell'incubazione con le cellule il medium radiomarcato viene lasciato equilibrare per qualche ora in presenza di 1% di FCS ed eventualmente lipoproteine acetilate (AcLDL).

Il 22-idrossicolesterolo e l'acido 9-*cis*-retinoico (entrambi Sigma – St. Louis, MO, USA) sono solubilizzati in dimetilsolfossido (DMSO, Merck – Darmstadt, Germany), mentre il clorofeniltio-adenosinmonofosfato ciclico (cpt-cAMP) è disciolto in soluzione fisiologica, conservato in freezer in aliquote da 30mM e utilizzato alla concentrazione di 0,3mM. Il volume di 22-idrossicolesterolo e acido 9-*cis*-retinoico, aggiunti durante il trattamento, rappresenta complessivamente lo 0,5% del volume del terreno di coltura. La compactina (Sigma) è sciolta in etanolo ed anche in questo caso il volume della soluzione di farmaco per il trattamento rappresenta lo 0,5% del totale. La pitavastatina è sciolta in DMSO (Merck) ed è stata gentilmente fornita da Kowa Company Ltd (Tokyo, Japan); come nei casi precedenti, il volume della soluzione di trattamento rappresenta lo 0,5% del totale. Il mevalonato (Sigma) è solubilizzato in fisiologica. Il geranilgeraniolo (GGOH – Roche) è sciolto in DMSO ed il volume della soluzione di trattamento rappresenta lo 0,5% del totale. L'inibitore dell'ACAT (SAH 58035, Sandoz) è sciolto in DMSO, utilizzato alla concentrazione di 2µg/ml e aggiunto in un volume tale che, nel medium finale, non superi lo 0,5%. Il T0901317 (Alexis Biochemicals, Lausen, Switzerland), per il trattamento in vivo tramite “gavage” orale, è stato disciolto in glicole propilenico/Tween 80 4:1 ed utilizzato alle dosi di 10-100mg/kg/day.

I campioni di plasma sono conservati a -20°C in apposite vials; al momento dell'uso, vengono scongelati in ghiaccio e mantenuti in tale condizione per tutta la durata del trattamento. La quota di siero aggiunta è pari al 2,5% del volume di medium del triplo considerato.

L'apolipoproteina A-I è stata gentilmente fornita dal prof. Guido Franceschini e dalla prof.ssa Laura Calabresi del centro “E. Grossi Paoletti” dell'Università di Milano. Le LDL vengono gentilmente fornite dal Dott. Stefano Bellosta del Dipartimento di Scienze Farmacologiche dell'Università di Milano e acetilate tramite incubazione con anidride acetica.

I liquidi di scintillazione per la lettura della radioattività nel  $\beta$ -counter sono Formula 989 per i solventi acquosi e Instafluor per i solventi organici (Packard).

I tamponi ed i reagenti per il Western blot sono stati acquistati dall'Invitrogen (Carlsbad, CA). L'anticorpo secondario (HRP) e il kit ECL-Plus per la chemoluminescenza sono dell'Amersham-Pharmacia (Little Chalfont, Buckinghamshire England). L'anticorpo primario anti-ABCA1 è della Novus Biological (Cambridge, UK); l'anticorpo secondario è un anti-rabbit Ig coniugato con perossidasi (Amersham Biosciences).

### **Sub-coltivazione e semina di linee cellulari**

Le linee cellulari utilizzate nel nostro studio sono state periodicamente sub-coltivate. La sub-coltivazione deve essere condotta in sterilità. Le cellule incubate, contenute in flask, sono lavate con 10ml di PBS sterile e successivamente staccate dal fondo. A questo scopo, si usano circa 2 ml di tripsina per le Fu5AH; per le J774, invece, un apposito strumento chiamato "cells-scraper" o "rubber", dopo aver aggiunto alla flask 3 ml di medium fresco. Una parte della sospensione cellulare è trasferita in flask nuove; si porta, poi, ad un volume di 10ml con medium fresco addizionato con il 10% di FCS. Le cellule vengono quindi mantenute nell'incubatore.

Prima dei trattamenti, le cellule sono seminate in apposite piastre con 24 pozzetti (da 18mm, volume di semina 0,6 ml e di trattamento 0,3 ml), con 12 pozzetti (da 24 mm, volume di semina 1 ml e di trattamento 0,5 ml), con 6 pozzetti (da 35 mm, volume di semina 2 ml e di trattamento 1 ml) o in piastre Petri da 100 mm (volume di semina e trattamento 5 ml). In questa procedura le cellule vengono lavate e staccate dal fondo della flask, come descritto in precedenza, e trasferite in una provetta sterile; le cellule possono essere centrifugate (1500-1800 rpm) formando un pellet. Qui, le cellule vengono risospese in medium fresco addizionato con il 10% di FCS.

In ogni pozzetto da 18 mm sono seminate un numero di cellule compreso tra 150.000 e 350.000, in modo da averle al 90% di confluenza al momento della marcatura, in un volume di medium di 0,6 ml per pozzetto. Nei pozzetti da 24 mm vengono seminate fino a 700.000 cellule, in modo, comunque, da averle al 90% di confluenza al momento della marcatura, in un volume di medium di 1 ml per pozzetto. Anche per le piastre da 6 (circa un milione di cellule per pozzetto per 3 giorni, prima del trattamento) e le piastre

da 100 mm (circa 2 milioni di cellule per pozzetto per 3 giorni, prima del trattamento), le cellule vengono fatte crescere fino al 90% di confluenza, radiomarcate e poi trattate. Ogni trattamento è ripetuto in triplo per ottimizzare la riproducibilità dei risultati. La significatività statistica è stata determinata con il *t* test di Student a due code. Dopo un periodo di incubazione di 24-72 ore le cellule vengono sottoposte a marcatura e quindi al trattamento sperimentale, come da protocollo.

### **Valutazione dell'efflusso di colesterolo dalla cellula**

La determinazione del colesterolo rilasciato nel medium viene effettuata alla fine del trattamento previsto dal protocollo sperimentale su cellule in coltura marcate ed incubate per 24 ore con [1,2-<sup>3</sup>H]-colesterolo 2μCi/ml in presenza dell'1% di FCS ) e l'inibitore dell'ACAT 2μg/ml; durante tale periodo, nei casi richiesti, si arricchiscono le cellule di colesterolo aggiungendo AcLDL 50μg/ml. Al termine di questo periodo di marcatura, le cellule sono equilibrate per 18 ore in medium contenente lo 0,2% di albumina (BSA) e l'inibitore dell'ACAT 2μg/ml. L'equilibramento è condotto in presenza o meno di cpt-cAMP 0,3mM, 22OH-colesterolo 5, 10 e 20 μg/ml o 10μM, acido 9-cis-retinoico (cRA) 10μM, compactina 10μM, pitavastatina a concentrazioni crescenti 0,1-1-10-50-100 μM, mevalonato 100μM, geranylgeraniolo (GGOH) 10μM.

L'efflusso di colesterolo viene promosso con l'aggiunta al medium di accettori, quali il plasma al 2,5%, l'apoA-I 10-20μg/ml; le cellule vengono mantenute in queste condizioni in incubatore per 4 ore. Il medium viene prelevato e filtrato attraverso una membrana filtrante (Millipore) allo scopo di eliminare eventuali cellule staccate dal monostrato e sospese nel mezzo di coltura.

Al termine di questa operazione si trasferiscono 100μl di medium in vials, dove vengono aggiunti 4ml di liquido di scintillazione (FORMULA 989, Packard).

I campioni vengono poi vorticati e lasciati riposare, per essere poi contati al β-Counter.

Il monostrato cellulare viene lavato con PBS non sterile e i lipidi cellulari sono estratti con 0,6 ml di isopropanolo (in piastre da 24 pozzetti; nelle piastre da 12 si estrae con 1 ml per pozzetto) in un ambiente saturo del solvente per un'intera notte. Il giorno seguente si raccolgono nella stessa provetta gli estratti ed il lavaggio, effettuato sempre con 0,6 ml di isopropanolo. I campioni vengono portati a secco in corrente di azoto. Il

residuo è ripreso con 1ml di toluene; da questo sono prelevati 200µl e trasferiti in vials con l'aggiunta di 4ml di liquido di scintillazione (Insta-Fluor, Packard). Dopo essere stati vorticati, i campioni sono lasciati riposare e messi a contare al β-Counter. La radioattività presente nel medium è un indice del colesterolo libero escreto dalle cellule; l'efflusso è calcolato come il rapporto percentuale tra la radioattività del medium e quella totale, valutata sommando la radioattività presente nel medium con quella presente nel monostrato cellulare.

### **Valutazione dell'efflusso di fosfolipidi dalla cellula**

Le cellule sono marcate con cloridrato di [<sup>3</sup>H]-metil-colina 4µCi/ml in presenza dell'1% di FCS, dell'ACAT inibitore 2µg/ml e tenute in incubazione per 48 ore a 37°C. Durante il successivo periodo di equilibramento in BSA allo 0,2% e ACAT inibitore 2µg/ml, ABCA1 viene indotta dal trattamento con 22OH 5µg/ml e cRA 10µM o cAMP 0,3mM, in presenza o assenza dei farmaci. L'efflusso lipidico è promosso a 20µg/ml apoA-I per 6 h. Al termine di questo periodo i media cellulari sono raccolti e centrifugati; il surnatante è separato e sottoposto ad un'estrazione lipidica di Bligh Dyer con metanolo: cloroformio: acqua 2:2:1,8. La fase acquosa è rimossa e quella lipofila viene lavata tre volte con metanolo: acqua 10:9 per eliminare l'eventuale residuo di <sup>3</sup>H-colina libera. La fase lipofila è infine portata a secco, dissolta in toluene e letta al β-counter. Per analizzare i lipidi cellulari i monostrati sono estratti in isopropanolo e successivamente sottoposti all'estrazione col metodo sopra descritto. L'efflusso viene calcolato come rapporto percentuale tra la radioattività presente nel medium e quella totale (medium+monostrato).

### **Western Blotting**

I monostrati cellulari sono lisati con una soluzione costituita da 1% Triton X-100, 0.5% NP-40, 10mM Tris buffer, in presenza di inibitori delle proteasi. Un'uguale quantità di proteina (40µg) è separata su un gel di tris acetato al 5% e trasferita su una membrana PVDF; questa viene incubata con l'anticorpo primario anti-ABCA1 diluito 1:1000 per 1h e con il secondario diluito 1:2000 per 1h. La successiva aggiunta del kit ECL provoca lo sviluppo di una reazione di chemoluminescenza, grazie alla quale la banda

corrispondente alla proteina è impressa su lastra fotografica ed identificata attraverso il confronto con una miscela di composti a PM noto.

### **Real Time RT-PCR**

L'RNA è stato isolato da colture confluenti di J774 utilizzando il kit NucleoSpin RNA II Flyer (Macherey-Nagel, eguendo le indicazioni del produttore; successivamente l'RNA è stato retrotrascritto a cDNA utilizzando il cDNA Archive kit, fornito dalla Applied Biosystem e conservato a  $-80^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'utilizzo.

Per la RT-PCR, aliquote definite dei campioni di cDNA sono state incubate con la polimerasi (Taqman Universal Master Mix Applied Biosystem) e con i primers e probes per ABCA1 murino (Assay on Demands, Applied Biosystem). I campioni sono stati sottoposti a 40 cicli di amplificazione (15 sec a  $95^{\circ}\text{C}$  e 1 minuto a  $60^{\circ}\text{C}$ ) nell'ABI Prism 7000 (Applied Biosystem). I risultati sono stati estrapolati da una curva standard realizzata con un campione noto ed espressi come numero di volte di aumento dell'espressione di ABCA1 rispetto al basale.

### **Analisi statistica**

I risultati degli esperimenti in vitro sono riportati come media di triplicati  $\pm$  deviazione standard. La significatività statistica è stata determinata dal test di Student. Le variazioni osservate sono state ritenute significative a partire da  $p < 0,05$ .

### **Valutazione del trasporto inverso del colesterolo *in vivo***

#### ***Allestimento di colture in sospensione di macrofagi J774***

I macrofagi J774 vengono fatti crescere in sospensione in bottiglie di Teflon in RPMI supplementato con 10% di FCS; la crescita viene monitorata attraverso un conteggio in camera di Burker, fino al raggiungimento del numero prestabilito per l'esperimento (circa  $7,8 \cdot 10^6$  cellule/animale, contenenti circa  $3,8 \cdot 10^6$  cpm). Le cellule vengono quindi radiomarcate con  $5\mu\text{Ci/ml}$  di  $^3\text{H}$ -colesterolo e arricchite di colesterolo con  $100\mu\text{g/ml}$  di AcLDL. Al termine del periodo d'incubazione (48h), le foam cells così formatesi

vengono lasciate equilibrare per 6h in medium contenente lo 0,2% di BSA ed infine centrifugate, risospese in un idoneo volume di medium (0,5ml/animale) ed iniettate nel peritoneo dei topolini.

La distribuzione del  $^3\text{H}$ -colesterolo cellulare nelle forme libera ed esterificata è stata determinata attraverso una cromatografia su strato sottile (TLC).

### ***Quantificazione dell'RCT in vivo***

Nel giorno dell'iniezione con la sospensione cellulare, topi di ceppo BALB/c (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Me) vengono suddivisi in gabbie singole. Il sangue è stato raccolto dal plesso retroorbitale nelle 24h successive, dalla vena cava dopo il sacrificio degli animali; le conte nel plasma sono quantificate con liquido di scintillazione. Le feci vengono raccolte alle 24h e alle 48h dall'iniezione delle cellule. Alle 48h i topi vengono anestetizzati con etere, i vasi vengono perfusi con soluzione salina e fegato, milza e polmoni vengono prelevati.

### ***Estrazione del colesterolo e degli acidi biliari fecali***

Il colesterolo e gli acidi biliari nelle feci sono estratti come descritto in precedenza (Batta, 1999). Brevemente, un'aliquota esattamente pesata di feci viene sospesa in 3ml di EtOH assoluto ed omogeneizzata, dopo l'aggiunta di uno standard interno ( $^{14}\text{C}$ -colesterolo, [0,04 $\mu\text{Ci}$ /5ml] di etanolo). Viene addizionato 0,4ml di NaOH 5N e i campioni vengono riscaldati a 95°C per 1h, in modo da favorire la salificazione degli acidi biliari. Al termine di questo periodo, vengono isolati gli steroli neutri attraverso tre successive estrazioni con esano; la fase lipofila, una volta mandata a secco e ripresa con un ugual volume di toluene, viene letta al  $\beta$ -counter. Alla restante fase idrofila viene aggiunto HCl concentrato, in modo da riportare i sali biliari in forma acida; si procede quindi con un'ulteriore serie di estrazioni con acetato di etile, che permette di separare gli acidi biliari nella fase lipofila e di quantificarli dopo aggiunta del liquido di scintillazione, come in precedenza per gli steroli neutri.

### ***Estrazione dei tessuti e degli organi***

I lipidi presenti nel fegato vengono estratti secondo il metodo di Bligh e Dyer (Iverson, 2001): dopo l'aggiunta di uno standard interno interno ( $^{14}\text{C}$ -colesterolo, [0,04 $\mu\text{Ci}$ /5ml] di etanolo) e l'omogenizzazione in 0,8ml di acqua, vengono aggiunti in sequenza 2ml di metanolo, 1ml di cloroformio, 1ml di cloroformio e 1ml di acqua. La sospensione viene centrifugata, la fase sovrastante eliminata e quella sottostante lipofila viene mandata a secco, ripresa con toluene e letta al  $\beta$ -counter.

### ***Analisi del profilo lipidico del plasma***

*(in collaborazione col Centro "E. Grossi Paoletti", Dipartimento di Scienze Farmacologiche dell'Università di Milano, dott.ssa Elsa Moleri, prof.ssa Laura Calabresi, prof. Guido Franceschini)*

I livelli plasmatici di HDL sono stati misurati tramite tecniche enzimatiche standard utilizzando lo strumento Roche diagnostics Integra 400 autoanalyzer. Le lipoproteine del siero sono state analizzate tramite gel-filtrazione su una colonna 10/30 Superose 6B (fast protein liquid chromatography, FPLC, Amersham Pharmacia Biotech) a 0.5 ml/min, in tampone fosfato contenente EDTA 0.1 mM e sodio-azide 0.02%. Nelle frazioni raccolte, le concentrazioni plasmatiche di colesterolo totale, fosfolipidi e trigliceridi sono state misurate tramite tecniche enzimatiche standard.

### ***Elettroforesi bidimensionale ("2D gel electrophoresis")***

*(in collaborazione col Centro "E. Grossi Paoletti", Dipartimento di Scienze Farmacologiche dell'Università di Milano, dott.ssa Elsa Moleri, prof.ssa Laura Calabresi, prof. Guido Franceschini)*

Le sottoclassi di HDL plasmatiche sono state separate tramite elettroforesi bidimensionale, nella quale l'elettroforesi su gel di agarosio viene seguita da elettroforesi su gel di poliacrilamide in condizioni non-denaturanti e successivo immunoblotting. Nella prima dimensione, il plasma (5  $\mu\text{l}$ ) è stato fatto correre su gel di agarosio 0,5%; "strips" di gel di agarosio contenenti le lipoproteine separate sono state, poi, trasferite su di un gel a gradiente (3-20%) di poliacrilamide. La separazione nella seconda dimensione è stata realizzata tramite migrazione a 30mA per 4 h. Le frazioni di

HDL, dopo elettroblotting su una membrana di nitrocellulosa, sono state rivelate da un anticorpo anti apoA-I.

# *Risultati*

Questo lavoro di ricerca è stato mirato all'approfondimento delle conoscenze relative alla modulazione del RCT. In particolare, ci si è occupati dello studio di due aspetti principali: 1) la regolazione, a livello cellulare, dei primi stadi del RCT da parte delle statine; 2) la modulazione del RCT attraverso la stimolazione farmacologica del sistema LXR/RXR.

Nella prima parte dello studio, abbiamo approfondito la modulazione della funzionalità della proteina ABCA1 da parte delle statine, in rapporto alle singole modalità di induzione della proteina. In particolare, abbiamo studiato l'influenza delle statine sull'efflusso cellulare di colesterolo, sull'espressione di ABCA1 a livello trascrizionale e traduzionale e su processi cellulari come la biosintesi di colesterolo.

Gli studi sono stati effettuati in linee cellulari di macrofagi murini ed in colture primarie di macrofagi peritoneali murini wild-type o privi del gene LXR.

Nella seconda parte del nostro lavoro di ricerca, invece, abbiamo indagato sulle eventuali relazioni esistenti tra stimolazione dei recettori LXR, aumento del RCT ed efflusso cellulare di colesterolo. Per fare ciò, abbiamo trattato dei topi wild-type con dosi crescenti dell'agonista T0901317. Il passo successivo è stato quello di confermare che, nelle nostre condizioni sperimentali, la stimolazione LXR in vivo promuovesse la mobilitazione del colesterolo dai macrofagi al plasma, al fegato ed alle feci, e fosse in grado di modificare il profilo lipidico degli animali. Abbiamo, poi, valutato se il plasma degli animali trattati col T0901317 possedesse una capacità più alta di stimolare il rilascio di colesterolo da cellule in coltura.

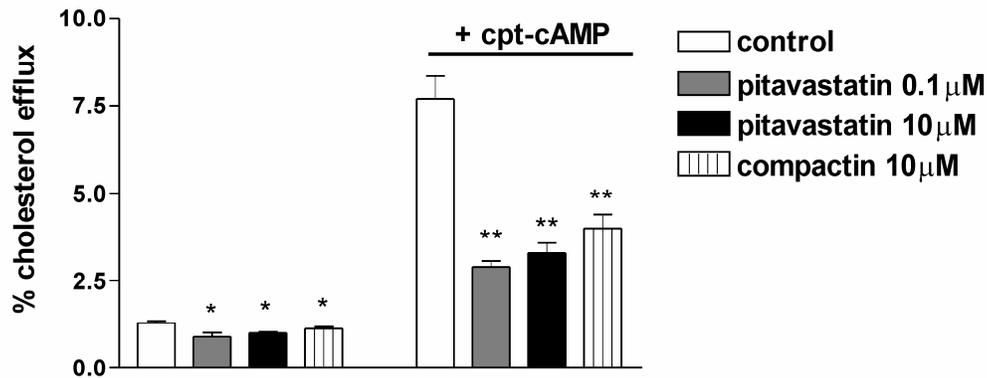
Gli studi di efflusso sono stati effettuati su diversi modelli cellulari: cellule di epatoma di ratto Fu5AH, che esprimono costitutivamente alti livelli di SR-BI e bassi livelli di ABCA1; cellule COS-7 controllo o transfettate in modo transiente con SR-BI; macrofagi murini J774, che esprimono alti livelli di ABCA1 in seguito ad incubazione con cpt-cAMP, e bassi livelli di SR-BI.

## *Modulazione della funzionalità della proteina ABCA1 da parte delle statine nei macrofagi*

Per valutare l'effetto delle statine sull'efflusso lipidico da cellule macrofagiche, ABCA1 è stata indotta attraverso diversi trattamenti. L'espressione di ABCA1 nei macrofagi in coltura, infatti, può essere stimolata dal trattamento con analoghi del cAMP (Bortnick AE et al., 2000), dal trattamento con ligandi dei recettori nucleari LXR e RXR (Costet P, et al., 2000) e attraverso carico cellulare di colesterolo (Costet P, et al., 2000).

Per prima cosa, abbiamo valutato l'effetto della pitavastatina e della compactina sull'efflusso ABCA1-mediato in macrofagi preincubati con cpt-cAMP. Il trattamento dei macrofagi J774 con entrambe le statine ha prodotto una riduzione del 60% dell'efflusso di colesterolo ad apoA-I (fig. 24).

### **Effetto delle statine sull'efflusso di colesterolo ad apoA-I in cellule J774 stimulate o meno con cpt-cAMP**

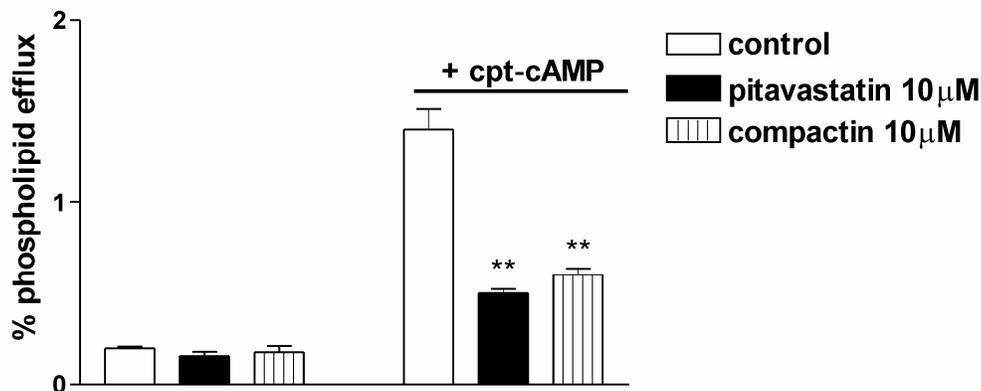


**Figura 24:** le J774 sono state radiomarcate con  $^3\text{H}$ -colesterolo  $2\mu\text{Ci/ml}$  per 24h; nelle successive 18h l'espressione di ABCA1 è stata indotta dal trattamento con cpt-cAMP  $0,3\text{ mM}$ , in presenza delle due statine. L'efflusso è stato promosso ad apoA-I  $20\mu\text{g/ml}$  per 4h ed espresso come: conte per minuto (cpm) nel medium/(cpm medium + cpm monostrato)  $\times 100$ . I dati sono espressi come valori medi  $\pm$  deviazione standard (SD) (n=3). \*,  $p<0,05$ ; \*\*,  $p<0,01$  rispetto al controllo.

Il massimo effetto inibitorio è stato osservato a concentrazioni di pitavastatina comprese tra 0,1 e 10  $\mu\text{M}$ . La concentrazione 10  $\mu\text{M}$  è stata scelta ed utilizzata per tutti gli esperimenti successivi.

Per stabilire se l'inibizione dell'efflusso mediata dalle statine fosse causata semplicemente da una deplezione diretta di colesterolo come substrato dell'efflusso, abbiamo valutato l'effetto di pitavastatina e compactina sull'efflusso di fosfolipidi, un altro processo specificamente mediato da ABCA1 e, probabilmente, indipendente dall'efflusso di colesterolo (Kiss RS, et al., 2005; Wang N, et al., 2001). Anche in questo caso, il trattamento con pitavastatina e compactina ha prodotto una significativa riduzione della radioattività rilasciata dalle cellule nel medium (fig. 25), suggerendo che l'attività di ABCA1 venga diminuita dalle statine in modo specifico.

**Effetto delle statine sull'efflusso di  
fosfolipidi ad apoA-I in cellule J774  
stimolate o meno con cpt-cAMP**

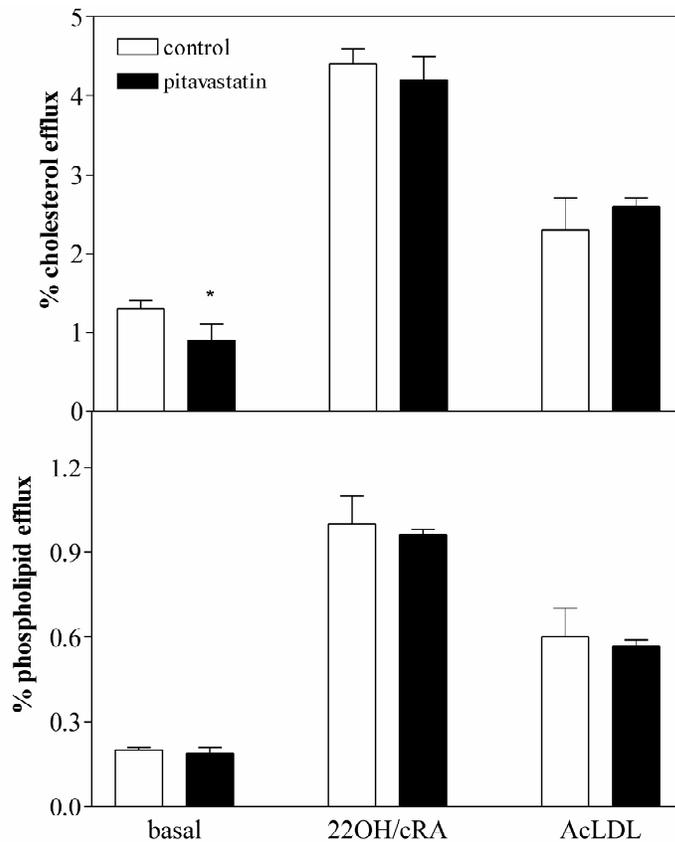


**Figura 25:** le J774 sono state radiomarcate con  $^3\text{H}$ -colina 4 $\mu\text{Ci/ml}$  per 48h; nelle successive 18h l'espressione di ABCA1 è stata indotta dal trattamento con cpt-cAMP 0,3 mM, in presenza delle due statine. L'efflusso è stato promosso ad apoA-I 20 $\mu\text{g/ml}$  per 6h ed espresso come: cpm nel medium/(cpm medium + cpm monostrato) x 100. I dati sono espressi come valori medi  $\pm$  SD (n=3). \*\*, p<0,01 rispetto al controllo.

Nelle cellule non stimolate con cpt-cAMP, l'efflusso lipidico è risultato sempre molto basso (fig. 24 e 25); in queste condizioni, le statine esercitano un effetto inibitorio minore, rispetto a quanto accade nei macrofagi pretrattati col cpt-cAMP (fig. 24 e 25).

Quando l'efflusso di lipidi attraverso ABCA1 viene promosso da trattamenti diversi dalla preincubazione con cAMP, come il trattamento con l'associazione 22-idrossi colesterolo (22OH)/acido 9-*cis*-retinoico (cRA) e/o il carico di colesterolo con LDL acetilate (AcLDL), la pitavastatina non esercita alcun effetto inibitorio sul rilascio di colesterolo né su quello di fosfolipidi (fig. 26).

**Effetto delle statine sull'efflusso di colesterolo e fosfolipidi ad apoA-I in cellule J774 stimolate o meno con 22OH/cRA o AcLDL**



**Figura 26:** le J774 sono state radiomarcate con <sup>3</sup>H-colesterolo 2μCi/ml per 24h o con <sup>3</sup>H-colina 4μCi/ml per 48h; nelle successive 18h l'espressione di ABCA1 è stata indotta dal trattamento con 22OH/cRA, in

presenza di pitavastatina 10  $\mu$ M. Diversamente, l'induzione di ABCA1 tramite carico con AcLDL 50 $\mu$ g/ml è avvenuta durante il periodo di marcatura. L'efflusso è stato promosso ad apoA-I 20 $\mu$ g/ml per 4h (colesterolo) o 6h (fosfolipidi) ed espresso come: cpm nel medium/(cpm medium + cpm monostrato) x 100. I dati sono espressi come valori medi  $\pm$  SD (n=3). \*, p<0,05 rispetto al controllo.

Questa caratteristica delle statine, di modulare differentemente l'efflusso di colesterolo, è stata confermata utilizzando colture primarie di macrofagi peritoneali murini (MPM). In tali cellule, sia la pitavastatina che la compactina hanno ridotto significativamente il rilascio di colesterolo e fosfolipidi mediato da ABCA1, quando la proteina veniva indotta dal trattamento con cpt-cAMP. L'incubazione con 22OH/cRA o con acLDL, invece, era in grado di prevenire l'effetto delle statine (tab. 3).

**Tabella 3:** effetto della pitavastatina sull'efflusso di colesterolo ad apoA-I 20 $\mu$ g/ml da MPM pretrattati con cpt-cAMP 0.3mM, 22OH 5 $\mu$ g/ml /cRA 10 $\mu$ M or AcLDL 50 $\mu$ g/ml. Condizioni sperimentali come nelle legende delle figure 24 e 26.

	cpt-cAMP (0,3mM)	AcLDL (50 $\mu$ g/ml)	22OH (5 $\mu$ g/ml) /cRA (10 $\mu$ M)
<i>% of cholesterol efflux</i>			
Control	6.3 $\pm$ 0.8	7.4 $\pm$ 0.8	8.2 $\pm$ 0.8
Compactin, 10 $\mu$ M	4.4 $\pm$ 0.8*	6.3 $\pm$ 1.6 <sup>n.s.</sup>	7.0 $\pm$ 0.3 <sup>n.s.</sup>
Pitavastatin, 10 $\mu$ M	4.7 $\pm$ 0.4*	6.6 $\pm$ 0.7 <sup>n.s.</sup>	7.3 $\pm$ 1.0 <sup>n.s.</sup>

\*p<0.05 rispetto al controllo.

n.s. non significativo rispetto al controllo.

L'inibizione dell'attività di ABCA1 da parte delle statine in determinate condizioni sperimentali ci ha permesso di ipotizzare che queste molecole interferiscano con alcune tappe dell'attivazione molecolare di ABCA1 mediata dal cAMP.

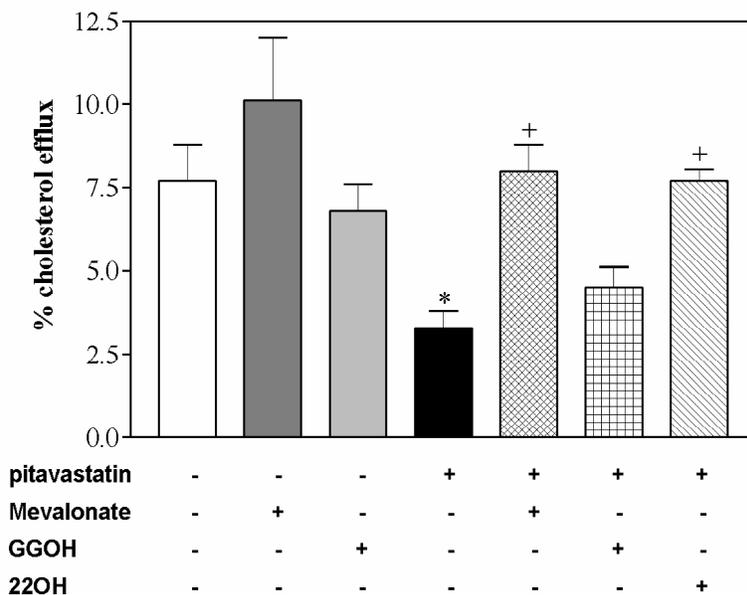
Il meccanismo d'azione delle statine è stato oggetto di studi ulteriori. Trattando i macrofagi J774 con mevalonato, geranil geraniolo (GGOH) o 22OH, in presenza o meno di pitavastatina e cpt-cAMP, abbiamo valutato l'influenza rispettivamente di un precursore, un intermedio ed un prodotto ossidato della via biosintetica del colesterolo,

sull'inibizione dell'efflusso mediata dalle statine. Infatti, se tale effetto inibitorio dipendesse direttamente dall'attività farmacologica delle statine sulla HMG-CoA reductasi, la supplementazione esogena di un precursore o un intermedio della via biosintetica del colesterolo potrebbe ripristinare la normale capacità di efflusso. Inoltre, avendo dimostrato che le statine non esercitano alcun effetto inibitorio nei macrofagi stimolati con 22OH, abbiamo ipotizzato che la diminuzione dell'efflusso osservata nelle cellule preincubate con cpt-cAMP potesse essere attenuata dal trattamento dei macrofagi con l'ossisterolo.

Nelle nostre condizioni sperimentali, il mevalonato è stato in grado di ripristinare completamente la capacità di efflusso, riportandola ai valori controllo. Al contrario, il GGOH non ha prodotto alcun recupero significativo, rispetto alle cellule trattate con pitavastatina (fig. 27).

Ciò suggerisce che l'inibizione mediata dalle statine potrebbe coinvolgere la deplezione di derivati non-isoprenoidi.

**Effetto di mevalonato, GGOH e 22OH sull'inibizione dell'efflusso mediata da pitavastatina in cellule J774 stimulate con cpt-cAMP**



**Figura 27:** le J774 sono state radiomarcate e trattate con cpt-cAMP 0,3 mM come in precedenza; durante il trattamento con pitavastatina sono stati aggiunti mevalonato 100µM o geraniol geraniolo (GGOH) 10µM. L'efflusso è stato promosso ad apoA-I 20µg/ml per 4h ed espresso come: cpm nel medium/(cpm

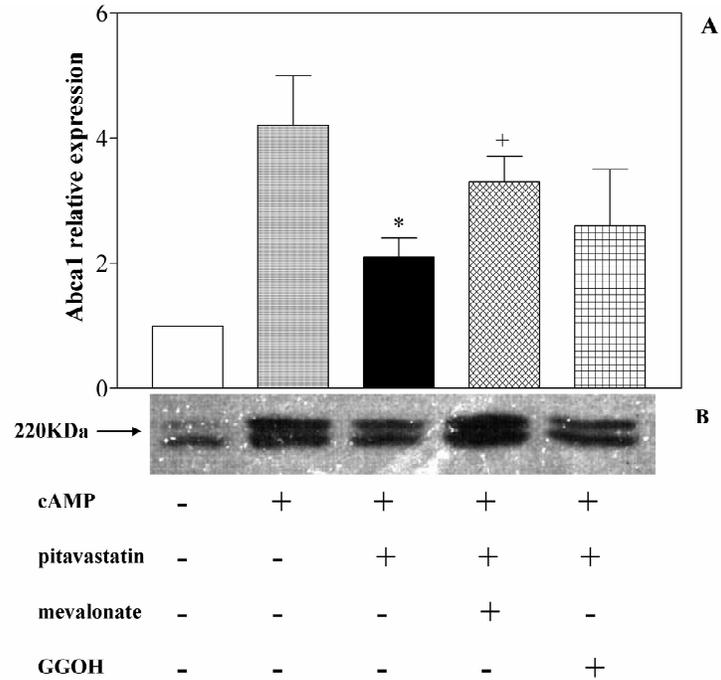
medium + cpm monostrato) x 100. I dati sono espressi come valori medi  $\pm$  SD (n=3). \*, p<0,05 rispetto al trattamento con cpt-cAMP; +, p<0,05 rispetto al trattamento con pitavastatina.

Inoltre, nel nostro modello, l'efflusso di colesterolo ad apoA-I viene recuperato completamente e riportato ai valori controllo in presenza di 22OH (fig. 27), indicando che le statine potrebbero mediare l'inibizione dell'efflusso tramite la deplezione di un derivato sterolico.

Per indagare ulteriormente il meccanismo d'azione delle statine e valutare se esso coinvolgesse un'interferenza con la trascrizione genica o l'espressione di ABCA1, sono stati condotti esperimenti di RT-PCR e Western blotting. Di recente, infatti, alcuni studi hanno dimostrato che le statine possono ridurre l'espressione del gene o della proteina ABCA1 nei macrofagi (Ando et al., 2004; Sone et al., 2004; Wong et al., 2004), senza approfondire la potenziale interferenza con la stimolazione mediata dal cAMP.

Nelle stesse condizioni sperimentali in cui si era osservata l'inibizione dei processi cellulari mediati da ABCA1, la pitavastatina si è dimostrata in grado di ridurre sia l'mRNA che la proteina ABCA1, rispetto alle cellule trattate con solo cpt-cAMP. Parallelamente ai risultati dell'efflusso, il mevalonato, ma non il GGOH, ha ripristinato le condizioni controllo (fig. 28, pagina successiva).

**Effetto di pitavastatina, mevalonato e GGOH  
sull'espressione di ABCA1 (RT-PCR e Western  
blot) in cellule J774 stimulate con cpt-cAMP**



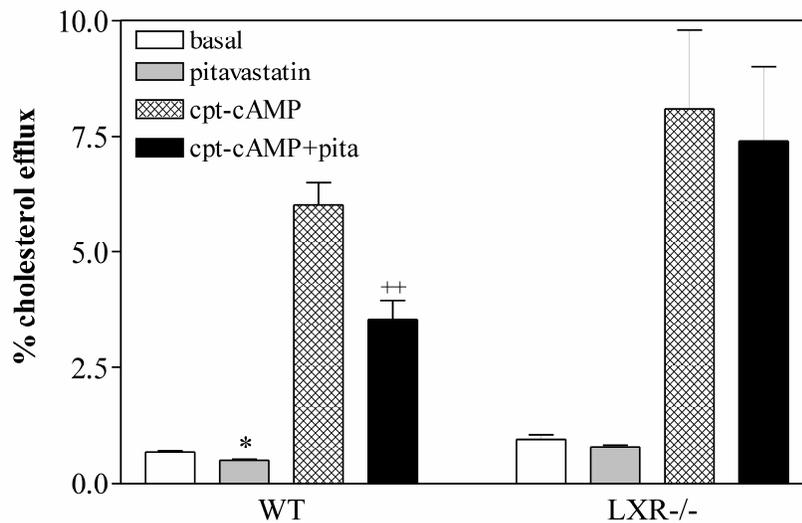
**Figura 28:** (A e B) le cellule sono state trattate con RPMI+0,2% di BSA in presenza o meno di cpt-cAMP 0,3mM. Simultaneamente sono stati aggiunti pitavastatina 10µM, mevalonato 100µM o GGOH 10µM dove indicato. (A) La RT-PCR è stata condotta come descritto nella sezione *Materiali e metodi*. I dati sono espressi come valori medi  $\pm$  SD (n=3). \*, p<0,05 rispetto al trattamento con cpt-cAMP; +, p<0,05 rispetto al trattamento con pitavastatina. (B) Le proteine sono state isolate come descritto nella sezione *Materiali e metodi*; ABCA1 è stata riconosciuta con un anticorpo primario contro ABCA1 ed un secondario coniugato a per ossidasi.

I risultati indicano che le statine possono interferire con la via cAMP-dipendente che porta all'up-regulation di ABCA1.

Per stabilire se le statine siano in grado di diminuire l'attivazione di ABCA1 tramite la riduzione del contenuto intracellulare di steroli (via LXR-dipendente) e se il cAMP possa agire tramite un intermedio sterolico, sono stati effettuati degli esperimenti su MPM provenienti da topi  $LXR^{-/-}$ .

L'efflusso di colesterolo nelle cellule prive di LXR è rimasto inalterato dalla preincubazione con cpt-cAMP e dal trattamento con pitavastatina (fig. 29).

**Effetto di cpt-cAMP e pitavastatina  
sull'efflusso di colesterolo ABCA1-mediato in  
MPM wild-type (WT) o  $LXR^{-/-}$**



**Figura 29:** le cellule sono state radiomarcate con  $^3H$ -colesterolo  $2\mu Ci/ml$  per 24h; nelle successive 18h l'espressione di ABCA1 è stata indotta dal trattamento con cpt-cAMP 0,3 mM, in presenza delle due statine. L'efflusso è stato promosso ad apoA-I 5-20 $\mu g/ml$  per 4-6h ed espresso come:  $cpm$  nel medium/( $cpm$  medium +  $cpm$  monostrato) x 100. I dati sono espressi come valori medi  $\pm$  SD (n=3). \*,  $p < 0,05$  rispetto al basale; ++,  $p < 0,01$  rispetto al trattamento con cAMP.

Per verificare se la stimolazione di ABCA1 da parte del cAMP potesse coinvolgere una up-regulation della biosintesi degli steroli, abbiamo valutato l'incorporazione di [2-<sup>14</sup>C]-acetato negli steroli intracellulari totali.

I dati ottenuti indicano che il cpt-cAMP non modifica, o, al massimo, riduce la sintesi intracellulare di steroli; come atteso, la pitavastatina inibisce fortemente questo processo biochimico (tab. 4).

**Tabella 4:** effetto del cpt-cAMP 0.3 mM sulla sintesi di steroli in macrofagi murini J774 e MPM.

Le cellule sono state incubate con [2-<sup>14</sup>C]-acetato per 20 h in RPMI+0.2%BSA in presenza o meno di pitavastatina 10μM. Il trattamento con cpt-cAMP 0,3 mM è stato effettuato durante le 20 h di incubazione. I dati dell'incorporazione di [2-<sup>14</sup>C]-acetato negli steroli totali, sono espressi in cpm per mg di proteina, e sono tutti valori medi ± SD (n=3).

	<u>J774</u>	<u>MPM</u>
	<i>cpm/mg protein</i>	
Control	30042±4260	26021±5950
cpt-cAMP	15757±2365 **	18257±4111 n.s.
Pitavastatin 10μM	4236±305 ***	9583±743 **
cpt-cAMP+Pitavastatin 10μM	3000±550 +	7436±658 +

\*\* p<0.01; \*\*\* p<0,001 rispetto al controllo; + p<0,05 rispetto a pitavastatina 10μM;  
n.s., non significativo vs controllo.

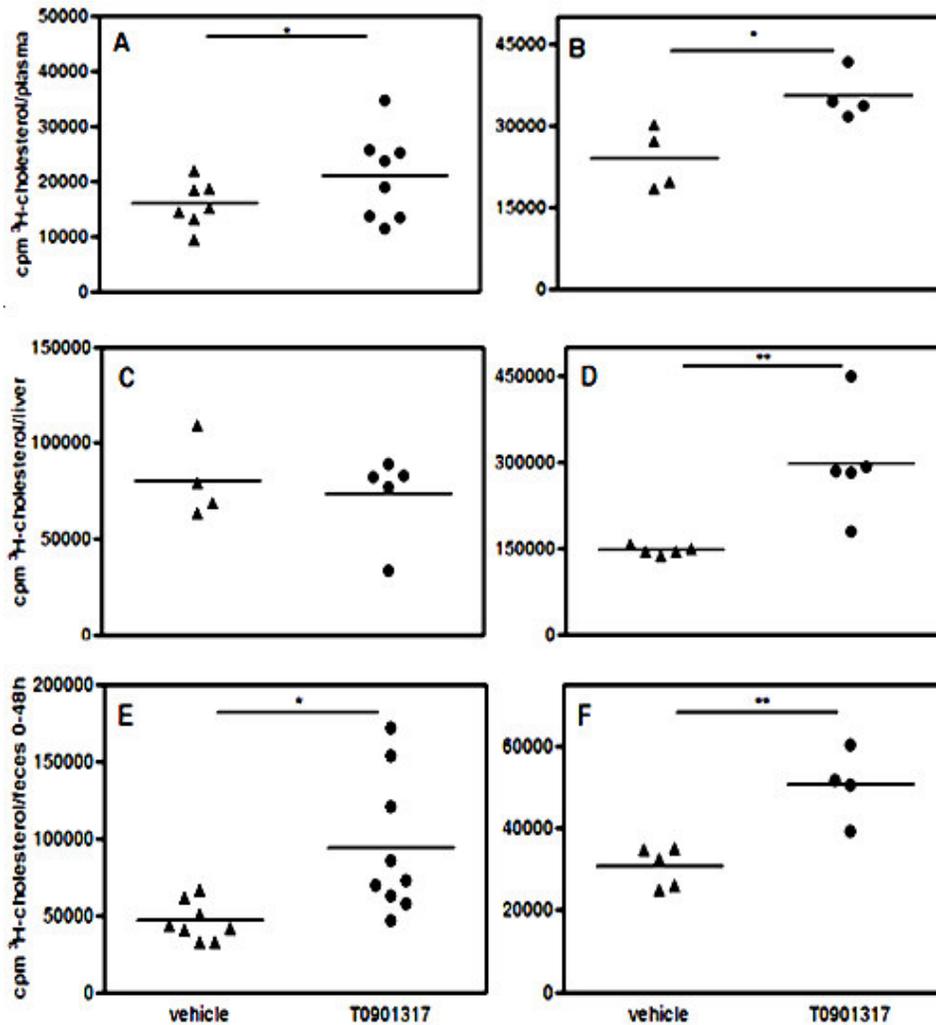
## ***Modulazione del RCT attraverso la stimolazione farmacologica del sistema LXR/RXR***

Nella prima parte di questo studio abbiamo cercato di confermare che la stimolazione LXR fosse in grado di promuovere l'RCT macrofagico in vivo.

Diversamente da quanto riportato nello studio di Naik e collaboratori (Naik SU, et al., 2006), abbiamo trattato gli animali con l'agonista sintetico T0901317 (T0) alla dose di 10mg/kg/die o 100mg/kg/die per 8 giorni. La scelta dei dosaggi è stata fatta sulla base di dati di letteratura: la dose 10mg/kg/die si è dimostrata in grado di ridurre lo sviluppo dell'aterosclerosi (Terasaka N, et al., 2003), mentre la dose 100mg/kg/die si è dimostrata in grado di influenzare significativamente la quantità e la qualità delle HDL nel topo (Cao G, et al., 2002).

Entrambe le dosi di agonista LXR sono state efficaci nell'aumentare il contenuto di <sup>3</sup>H-colesterolo nel plasma dei topi trattati (fig. 30A e 30B). Il contenuto epatico di <sup>3</sup>H-colesterolo era più alto nei topi trattati con T0 100mg/kg/die rispetto ai non trattati (fig. 30D), mentre alla dose più bassa non era possibile apprezzare alcuna differenza significativa (fig. 30C). Infine, il trattamento con T0 si è dimostrato efficace nell'incrementare significativamente l'escrezione fecale di <sup>3</sup>H-steroli, rispetto al trattamento con solo veicolo (fig. 30E e 30F).

**Promozione del RCT in vivo tramite  
stimolazione LXR:  $^3\text{H}$ -steroli in plasma (A, B),  
fegato (C, D) e feci (E, F)**



**Figura 30:** aliquote di plasma provenienti da topi trattati con veicolo (glicole propilenico/Tween 80 4:1) e con T0 10mg/kg/die (A) o con T0 100mg/kg/die (B) sono state contate tramite scintillazione liquida in un  $\beta$ -counter. Campioni di fegato e feci (400mg) provenienti da topi trattati con veicolo e con T0 10mg/kg/die (C ed E, rispettivamente) o con T0 100mg/kg/die (D ed F rispettivamente) sono stati estratti tramite il metodo Bligh and Dyer, al fine di isolare le frazioni steroliche. La quantificazione della radioattività è stata condotta tramite scintillazione liquida in un  $\beta$ -counter. I risultati sono espressi come radioattività totale nel plasma, nel fegato e nelle feci. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  rispetto al trattamento col solo veicolo.

Come riportato in letteratura, la stimolazione di LXR in vivo può influenzare il profilo lipoproteico del plasma (Schultz JR, et al., 2000; Terasaka N, et al., 2003; Naik SU, et al., 2006; Miao B, et al., 2004) e l'espressione epatica di alcuni geni (Millatt LJ, et al., 2003). In accordo con i dati di letteratura, nel nostro studio abbiamo osservato che il trattamento con T0 100mg/kg/die, rispetto al controllo, causa un incremento della concentrazione plasmatica delle HDL (valori medi  $\pm$  deviazione standard: 110.5 mg/dl  $\pm$  2.1 nei trattati, e 41.0 mg/dl  $\pm$  9.9 nei controlli;  $p < 0,05$ ) ed un incremento di 2.8 volte nell'espressione epatica del mRNA per *ABCA1*, come valutato tramite RT-PCR quantitativa (dati non mostrati).

Le HDL svolgono un ruolo primario come accettori fisiologici di colesterolo. L'incremento dei livelli plasmatici di HDL nel nostro modello ci ha indotti a formulare delle ipotesi circa il meccanismo che sta alla base dell'aumento del RCT macrofagico. In particolare, ci siamo chiesti se l'aumento del RCT potesse essere correlato ad un potenziamento della capacità del plasma di accettare colesterolo dalle cellule e, quindi, alla stimolazione dell'efflusso cellulare di colesterolo, primo "step" del RCT.

Per valutare tali ipotesi, il plasma proveniente dai topi trattati con T0 è stato testato in esperimenti di efflusso di colesterolo. Gli esperimenti sono stati condotti *in vitro* su modelli cellulari diversi, per poter valutare il contributo dei singoli meccanismi di efflusso lipidico: l'efflusso SR-BI-mediato, la diffusione passiva e l'efflusso ABCA1-mediato.

I primi esperimenti sono stati condotti su cellule di epatoma di ratto Fu5AH, che esprimono alti livelli di SR-BI in condizioni basali e sono un modello ampiamente utilizzato per caratterizzare l'efflusso mediato da SR-BI (Favari E, et al., 2004; Asztalos BF, et al., 2005; Fournier N, et al., 2003).

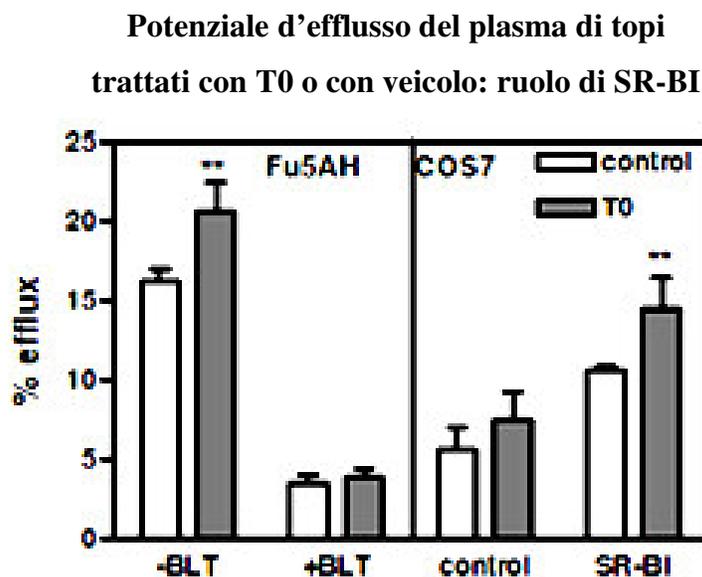
I nostri risultati indicano che il trattamento dei topi con T0 provoca un incremento dose-dipendente del potenziale di efflusso del plasma degli animali trattati rispetto ai controlli. In particolare, tale incremento ha elevato il potenziale di efflusso dal 4.7%  $\pm$  0.6, in cellule esposte al plasma di animali controllo, al 7.4%  $\pm$  2.2 ( $p < 0,05$ ) e al 9.3%  $\pm$  0.2 ( $p < 0,001$ ), in cellule esposte al plasma di topi trattati rispettivamente con T0 10mg/kg/die o con T0 100mg/kg/die.

L'aumento del potenziale di efflusso, quindi, potrebbe coinvolgere un meccanismo dipendente da SR-BI.

Per confermare ciò, abbiamo ripetuto l'esperimento incubando le cellule Fu5AH con BLT-1, un bloccante selettivo ed efficace dell'attività di SR-BI (Nieland TJ, et al., 2002).

In condizioni di piena funzionalità di SR-BI, il plasma degli animali trattati con T0 era in grado di mediare il rilascio di colesterolo in modo molto più efficiente rispetto al plasma degli animali controllo (fig. 31, riquadro a sinistra). Al contrario, la preincubazione delle cellule con BLT-1, annullava le variazioni del potenziale di efflusso tra i due gruppi (fig. 31, riquadro a sinistra), confermando il ruolo specifico di SR-BI in questo processo.

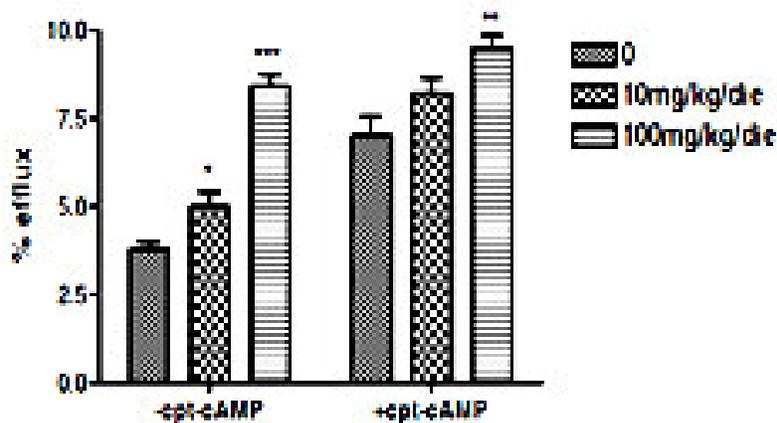
Inoltre, l'esperimento è stato ripetuto anche in cellule COS-7 transfettate o meno con SR-BI. In condizioni basali, il plasma dei topi trattati con T0 ha mostrato un incremento trascurabile del potenziale di efflusso rispetto al plasma controllo; tuttavia, l'espressione di SR-BI nelle cellule transfettate è stata in grado di aumentare significativamente la differenza tra i due gruppi (fig. 31, riquadro a destra).



**Figura 31:** cellule Fu5AH, trattate o meno con BLT-1 (riquadro a sinistra), e cellule COS-7 controllo o transfettate in modo transiente con SR-BI (riquadro di destra) sono state marcate con <sup>3</sup>H-colesterolo, equilibrate in un medium contenente albumina ed esposte a plasma 2,5% per 4h. L'efflusso è espresso come  $\text{cpm nel medium} / (\text{cpm medium} + \text{cpm monostrato}) \times 100$ . \*\* $p < 0.01$  rispetto alle Fu5AH non trattate con BLT-1; \*\* $p < 0.01$  rispetto alle COS-7 transfettate con SR-BI ed esposte al plasma di animali trattati col solo veicolo (controlli).

La capacità del plasma di mediare l'efflusso di colesterolo attraverso la diffusione passiva è stata valutata in macrofagi J774 in condizioni basali. In questo modello, il plasma degli animali trattati con T0 è stato in grado di aumentare l'efflusso rispetto al plasma controllo (fig. 32); tuttavia, la stimolazione delle cellule con cpt-cAMP, riduce l'incremento osservato nelle cellule in condizioni basali (fig. 32). Di conseguenza, si può ipotizzare che il contributo di ABCA1 all'efflusso totale sia diminuito (contributo di ABCA1 all'efflusso = %efflusso da cellule J774 stimulate con cpt-cAMP - %efflusso da cellule J774 in condizioni basali).

**Potenziale d'efflusso del plasma di topi trattati con T0 o con veicolo: diffusione passiva ed efflusso ABCA1-mediato**



**Figura 32:** le cellule J774 sono state marcate con <sup>3</sup>H-colesterolo, equilibrate in un medium contenente albumina ed esposte a plasma 2,5% per 4h. Le J774 utilizzate come modello d'efflusso ABCA1-mediato sono state equilibrate in presenza di cpt-cAMP 0,3mM, in modo da stimolare l'espressione della proteina. L'efflusso è espresso come cpm nel medium/(cpm medium + cpm monostrato) x 100. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 rispetto alle cellule esposte al plasma dei topi controllo.

L'insieme dei risultati suggerisce che la stimolazione di LXR in vivo possa causare delle modificazioni qualitative del profilo lipoproteico plasmatico. Tali variazioni potrebbero influenzare direttamente il potenziale di efflusso del plasma.

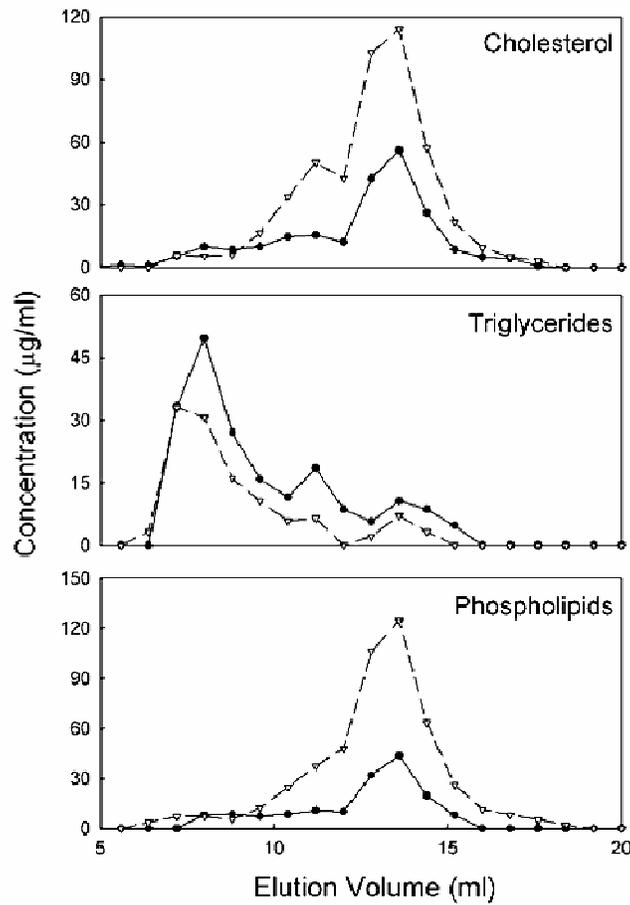
La capacità del plasma di stimolare il rilascio di lipidi attraverso un meccanismo specifico è una proprietà strettamente correlata alla presenza di particelle caratteristiche, che agiscono da accettori di colesterolo (Yancey PG, et al., 2003).

Per questo motivo, abbiamo valutato l'effetto del T0 sulla distribuzione delle lipoproteine plasmatiche. Tali esperimenti sono stati sviluppati in collaborazione con la dott.ssa Elsa Moleri, la prof.ssa Laura Calabresi ed il prof. Guido Franceschini del Centro "E. Grossi Paoletti", Dipartimento di Scienze Farmacologiche dell'Università di Milano.

Campioni di plasma proveniente da topi trattati o meno con T0 sono stati sottoposti ad analisi FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) e ad elettroforesi bidimensionale (elettroforesi su gel 2D).

In tutte le frazioni di plasma proveniente da animali trattati con T0 100mg/kg/die è stato possibile osservare un incremento del colesterolo e dei fosfolipidi (fig. 33), ed una lieve diminuzione dei trigliceridi (fig. 33). L'analisi del plasma dei topi trattati con T0 alla dose più bassa (10mg/kg/die) ha prodotto risultati analoghi ai precedenti (dati non mostrati).

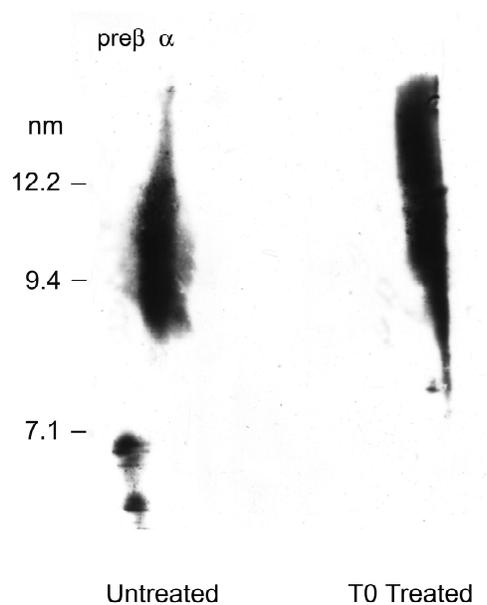
**Profilo di eluizione del plasma di topi trattati  
con T0 (-▽-) o con veicolo (-●-) su “Fast Protein  
Liquid Chromatography”, FPLC**



**Figura 33:** 500 µl di plasma, provenienti da topi trattati con T0 (100mg/kg/die) o col solo veicolo, sono stati applicati su una colonna 30/10 Superose 6B. La concentrazione di colesterolo, trigliceridi e fosfolipidi in ogni frazione è indicata sull'asse y.

L'elettroforesi bidimensionale ha rivelato che i topi trattati con T0 possiedono delle HDL più grandi rispetto ai topi non trattati. Inoltre, i primi risultano praticamente sprovvisti della frazione lipoproteica  $pre\beta$  (fig. 34).

### Sottoclassi di HDL nel plasma di topi trattati con T0 o con veicolo



**Figura 34:** le sottoclassi di HDL sono state separate tramite elettroforesi bidimensionale (2D). Successivamente le frazioni sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa, sulla quale le lipoproteine sono state rivelate con un anticorpo anti apoA-I.

# *Discussione*

Il trasporto inverso del colesterolo (RCT) è un processo metabolico a più stadi che consente la rimozione del colesterolo in eccesso dai tessuti periferici favorendone l'eliminazione da parte del fegato. L'efflusso cellulare di colesterolo è la prima tappa del RCT, al quale partecipa modulando due azioni principali: favorisce l'omeostasi del colesterolo cellulare tramite i meccanismi di diffusione acquosa semplice o facilitata dal recettore SR-BI e determina un impoverimento delle scorte cellulari di colesterolo attraverso la proteina ABCA1, trasportatore di membrana che trasferisce attivamente colesterolo e fosfolipidi all'esterno della cellula verso accettori di lipidi quali le HDL (Rader DJ, 2003).

Potenziare l'RCT potrebbe essere la via più efficace per ridurre in modo significativo l'accumulo di colesterolo nei tessuti periferici e, quindi, il rischio di sviluppare eventi cardiovascolari avversi su base aterosclerotica (Cuchel M and Rader DJ, 2006). Tali caratteristiche fanno del trasporto inverso del colesterolo un importante target terapeutico.

Le strategie sperimentali messe in atto per stimolare l'RCT riguardano interventi capaci di modificare in modo mirato l'attività di alcuni "attori" del RCT, siano essi recettori nucleari, fattori di trascrizione, proteine-trasportatrici o lipoproteine. In questo modo, si cerca di intervenire nei singoli processi che favoriscono la produzione di apoA-I ed altri accettori lipidici, l'arricchimento in lipidi di tali accettori attraverso l'efflusso cellulare, l'up-regulation degli stessi sistemi di efflusso. La strategia, quindi, risulta mirata direttamente alla rimozione dell'eccesso di colesterolo nei compartimenti periferici. Sembra molto probabile, infatti, che l'estrazione dell'eccesso lipidico dai tessuti periferici, in particolare dai macrofagi, ed il conseguente passaggio nel compartimento plasmatico siano le tappe limitanti del RCT (Sviridov D, Nestel P, 2002). Lo studio approfondito di tali dinamiche ha portato a definire l'insieme dei meccanismi coinvolti come "RCT macrofagico" (Cuchel M and Rader DJ, 2006).

La valutazione del RCT attraverso queste tappe risulta molto più accurata rispetto alla semplice osservazione dei livelli di HDL (Sviridov D, Nestel P, 2002). La promozione del RCT, infatti, potrebbe comportare principalmente variazioni di tipo qualitativo e non quantitativo a carico delle lipoproteine (Sviridov D, Nestel P, 2002; Kontush A, Chapman MJ, 2006; Singh IM, et al., 2007).

In questo lavoro di ricerca ci siamo occupati di approfondire le conoscenze relative alla modulazione del RCT.

In particolare, sono stati studiati due aspetti principali: 1) la regolazione, a livello cellulare, dei primi stadi del RCT da parte delle statine; 2) la modulazione del RCT attraverso la stimolazione farmacologica del sistema LXR/RXR.

Nella prima parte della ricerca, abbiamo valutato l'effetto di due statine, la pitavastatina e la compactina, sull'attività di ABCA1 nei macrofagi. I dati ottenuti indicano che l'inibizione della HMG-CoA reduttasi riduce l'efflusso lipidico ABCA1-mediato nei macrofagi murini J774. Tale riduzione avviene specificamente quando ABCA1 è indotta dalla stimolazione con cpt-cAMP. Infatti, in cellule stimolate tramite incubazione con ligandi dei recettori LXR/RXR, o tramite arricchimento di colesterolo, il rilascio di lipidi via ABCA1 non è influenzato in alcun modo dal trattamento con statine. Nei macrofagi J774 stimolati con cpt-cAMP, le statine, oltre ad inibire l'efflusso cellulare di lipidi, riducono il contenuto cellulare di mRNA e proteina ABCA1.

Di recente è stato dimostrato che il cAMP media l'attivazione di ABCA1 prevalentemente tramite un meccanismo trascrizionale diretto (Le Goff W, et al., 2006). I nostri risultati indicano che le statine possono esercitare un effetto inibitorio sull'attivazione della trascrizione del gene *ABCA1* mediata dal cAMP. Questi dati suggeriscono che l'attivazione cAMP-dipendente di ABCA1 coinvolga un intermedio sterolico, derivante dalla sintesi del colesterolo. Infatti, nelle nostre condizioni sperimentali, l'effetto inibitorio delle statine è stato contrastato dall'aggiunta di mevalonato, ossisteroli e colesterolo, tutti capaci di ripristinare i valori controllo dell'efflusso e dell'espressione di ABCA1. Al contrario, il geranil geraniolo non ha prodotto alcun effetto di recupero, suggerendo che la via degli isoprenoidi non sia coinvolta nell'attivazione di ABCA1 da parte del cAMP. I nostri risultati concordano perfettamente con quelli di un lavoro precedente, nel quale veniva riconosciuto il coinvolgimento di diversi prodotti della via del mevalonato nell'attivazione di LXR $\alpha$ , l'isoforma maggiormente espressa nei macrofagi (Forman BM, et al., 1997).

I nostri dati suggeriscono che la sensibilità al trattamento con statine, osservata nei macrofagi, sia attribuibile alla capacità del cAMP di indurre l'espressione di ABCA1 anche attraverso un'interazione con la via LXR attivata dagli steroli. Questa conclusione

è supportata dal fatto che, negli esperimenti effettuati sui macrofagi peritoneali murini (MPM) knock-out per il recettore LXR ( $LXR^{-/-}$ ), le statine non inibiscono l'efflusso lipidico. La possibile interazione tra cAMP ed LXR è stata, inoltre, documentata in un lavoro recente, che indica che  $LXR\alpha$  può legarsi ad un elemento di risposta del cAMP e funzionare come fattore di trascrizione per il gene della renina (Morello F, et al., 2005).

I risultati riportati in letteratura, riguardo agli effetti delle statine su ABCA1, sono controversi (cfr. pag. 79) e l'effetto finale sembra dipendere da una fine regolazione dei prodotti isoprenoidi e non-isoprenoidi della via del mevalonato e dalla tipologia cellulare (Zanotti I, et al., 2006).

In conclusione, i nostri dati suggeriscono che nei macrofagi siano presenti due principali vie regolatorie, capaci di mediare l'attivazione di ABCA1 in seguito a stimolazione con cpt-cAMP. La prima via, sensibile alle statine, è sostenuta da steroli endogeni che agiscono da ligandi per LXR, e non coinvolge meccanismi mediati da prodotti isoprenoidi. La seconda, come dimostrato anche dagli esperimenti sui macrofagi  $LXR^{-/-}$ , non è sensibile all'azione delle statine e non coinvolge l'attivazione delle vie LXR-dipendenti né la via del mevalonato.

E' importante notare che l'effetto inibitorio delle statine sull'efflusso mediato da ABCA1 non si manifesta in cellule arricchite di colesterolo, escludendo, quindi, che queste molecole possano esercitare *in vivo* un effetto pleiotropico negativo sullo sviluppo dell'aterosclerosi, favorendo la formazione di "foam cells" o inibendo il RCT.

Nella seconda parte del nostro lavoro di ricerca, abbiamo indagato sulle eventuali relazioni esistenti tra stimolazione dei recettori LXR, aumento del RCT ed efflusso cellulare di colesterolo.

I meccanismi attraverso cui LXR può esercitare le sue proprietà antiaterosclerotiche sono multipli. Molti geni target di LXR sono coinvolti in processi di omeostasi lipidica; in particolare, l'up-regulation dei trasportatori ABCA1 e ABCG1, stimolando l'efflusso di lipidi dalle cellule, potrebbe esercitare un ruolo positivo nel ridurre l'accumulo di colesterolo nelle placche aterosclerotiche.

Recentemente, è emerso il concetto di RCT macrofagico (Cuchel M and Rader DJ, 2006), evidenziando l'importanza del rilascio di colesterolo specificamente dai macrofagi. Tale processo è di particolare rilevanza, visto che i macrofagi sono le cellule maggiormente

implicate nello sviluppo dell'aterosclerosi. La rimozione del colesterolo dai macrofagi presenti nella parete arteriosa potrebbe spiegare la funzione ateroprotettiva del RCT.

L'utilizzo di un metodo capace di quantificare il trasporto del colesterolo in modo specifico dai macrofagi al plasma, al fegato ed alle feci permette di evidenziare le potenziali proprietà antiaterosclerotiche dei farmaci.

Nel nostro lavoro di ricerca, abbiamo indagato sui possibili meccanismi attraverso cui la stimolazione LXR può promuovere il RCT.

Lo studio di Naik e collaboratori (Naik SU, et al., 2006), pur presentando dati numerosi e convincenti, non fornisce alcuna spiegazione riguardo al possibile meccanismo biochimico coinvolto negli effetti mediati dall'attivazione LXR.

In accordo col precedente lavoro, abbiamo riportato che la stimolazione in vivo dei recettori LXR con l'agonista sintetico T0901317 (T0) è in grado di aumentare il trasporto di colesterolo dai macrofagi al plasma, al fegato ed alle feci in modo dose-dipendente, indicando una promozione del RCT.

Nel nostro modello, il contenuto di steroli radioattivi nel plasma è risultato più alto nei topi trattati con entrambe le dosi di T0, rispetto ai topi trattati col solo veicolo (controlli). Ciò suggerisce che il primo "step" del RCT, l'efflusso cellulare di colesterolo (dai macrofagi iniettati nel peritoneo), possa essere più efficiente grazie alla stimolazione di LXR.

L'analisi del contenuto epatico di  $^3\text{H}$ -lipidi ha mostrato che il trattamento con T0 100mg/kg/die è in grado di aumentare significativamente la quantità di colesterolo nel fegato, rispetto al controllo. Alla dose più bassa (T0 10mg/kg/die), tuttavia, non si è potuto osservare alcun aumento significativo, a fronte di un aumento del contenuto di  $^3\text{H}$ -steroli nel plasma e nelle feci degli animali trattati. Risultati simili sono stati ottenuti anche da Naik e collaboratori, utilizzando l'agonista GW3965 (Naik SU, et al., 2006), i quali hanno suggerito che, 48h dopo l'iniezione dei macrofagi J774 radiomarcanti (cioè, al momento del sacrificio degli animali), il  $^3\text{H}$ -colesterolo presente nel fegato poteva già essere stato escreto per via fecale.

Alternativamente, la mancanza di differenze significative nel contenuto epatico di  $^3\text{H}$ -steroli può essere spiegata, come proposto da Kruit e collaboratori, dall'esistenza di una via LXR-dipendente capace di mediare l'escrezione fecale degli steroli, senza coinvolgere il fegato (Kruit JK, et al., 2005).

L'incremento del <sup>3</sup>H-colesterolo nel plasma potrebbe essere dovuto a: 1) aumento della capacità dei macrofagi di rilasciare colesterolo; 2) aumento della capacità del plasma di agire come accettore di lipidi cellulari. Sebbene un effetto diretto del T0 sulla capacità di efflusso dei macrofagi iniettati non possa essere esclusa con sicurezza, i nostri dati supportano la seconda ipotesi.

Per verificare ciò, su cellule in coltura, abbiamo valutato il rilascio di colesterolo indotto dal plasma di animali trattati o meno con T0.

L'efflusso SR-BI-mediato è stato promosso in modo più efficiente dal plasma degli animali trattati con T0 rispetto al plasma dei controlli. L'interazione tra plasma ed SR-BI è stata documentata conducendo gli esperimenti in due modelli cellulari diversi: le cellule Fu5AH, che esprimono costitutivamente alti livelli del recettore, la cui attività può essere efficacemente inibita dal BLT-1 (Nieland TJ, et al., 2002); le cellule COS-7, che possono essere facilmente transfettate in modo transiente con SR-BI. In entrambi i sistemi, il plasma degli animali trattati ha promosso in maniera significativa l'efflusso di colesterolo attraverso SR-BI.

La capacità del plasma di mediare l'efflusso di colesterolo attraverso la diffusione passiva è stata valutata in macrofagi J774 in condizioni basali. In questo modello, il plasma degli animali trattati con T0 è stato in grado di aumentare l'efflusso rispetto al plasma controllo. Tuttavia, l'espressione di ABCA1 nelle cellule, indotta con cpt-cAMP, non ha alterato, o ha lievemente ridotto l'incremento osservato nelle cellule in condizioni basali.

Nonostante i nostri dati, relativi al potenziale di efflusso, evidenzino un incremento solo per quanto riguarda i meccanismi mediati da SR-BI e dalla diffusione passiva, un coinvolgimento di ABCA1 in vivo non può essere escluso con certezza.

Le HDL sono accettori fisiologici di colesterolo e la loro concentrazione plasmatica, così come la loro composizione, rappresentano i determinanti principali della capacità del plasma di promuovere il rilascio di lipidi dalle cellule (il cosiddetto "potenziale d'efflusso").

In questo lavoro di ricerca, abbiamo riportato, per la prima volta, che la stimolazione in vivo con un agonista LXR causa un riarrangiamento quali-quantitativo delle HDL plasmatiche, capace di influenzare il potenziale d'efflusso del plasma. In più, in linea con lavori precedenti (Schultz JR, et al., 2000; Terasaka N, et al., 2003; Naik SU, et al., 2006; Miao

B, et al., 2004), abbiamo dimostrato che il trattamento con l'agonista T0 incrementa significativamente i livelli plasmatici di HDL, probabilmente tramite l'up-regulation epatica di ABCA1.

Come riportato in letteratura, le HDL di grandi dimensioni e arricchite di fosfolipidi ( $\alpha$ -HDL) promuovono l'efflusso di colesterolo preferenzialmente tramite la diffusione passiva o il meccanismo SR-BI-mediato (Yancey PG, et al., 2000).

Basandoci sui dati dell'efflusso, abbiamo perciò ipotizzato che il trattamento con l'agonista LXR T0 potesse incrementare in modo specifico la componente HDL del plasma capace di promuovere l'efflusso tramite diffusione passiva o tramite SR-BI. Tale ipotesi è stata confermata da analisi FPLC ed elettroforesi bidimensionale, che hanno mostrato che le HDL dei topi trattati con T0 erano più grandi e arricchite di colesterolo e fosfolipidi. Questi dati sono concordi con quelli di altri studi effettuati in precedenza, nei quali si è osservato un incremento delle HDL grandi nel plasma, in seguito a stimolazione LXR (Cao G, et al., 2002; Grefhorst A, et al., 2002).

Inoltre, l'analisi delle sottopopolazioni di HDL è risultata in accordo con i dati sull'efflusso ABCA1-mediato, che non indicavano variazioni significative per tale processo. Infatti, nel plasma degli animali trattati con T0 si è osservata una fortissima riduzione della frazione pre $\beta$ .

Possiamo, perciò, concludere che la stimolazione di LXR migliora il potenziale d'efflusso del plasma degli animali trattati attraverso un'alterazione della composizione e della distribuzione delle HDL.

Nel nostro lavoro di ricerca, quindi, abbiamo confermato che la stimolazione farmacologica di LXR è efficace nel promuovere l'RCT dai macrofagi alle feci in vivo. In più, abbiamo fornito l'evidenza che tale effetto può essere mediato, almeno in parte, dall'incremento del potenziale di efflusso del plasma.

# *Bibliografia*

# **BIBLIOGRAFIA**

Acton S., et al., Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J Biol Chem* 1994; 269: 21003-21009

Acton S., et al., Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 1996; 271: 518

Aiello RJ, Brees D, and Francone OL. ABCA1-deficient mice: insights into the role of monocyte lipid efflux in HDL formation and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 972–980, 2003

Alberti S., Schuster G., Parini P., Feltkamp D., Diczfalusy U., Rudling M. et al. (2001) Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXRbeta-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 107: 565–573

Altmann SW, Davis HR Jr, Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, Iyer SP, Maguire M, Golovko A, Zeng M, Wang L, Murgolo N, Graziano MP. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science*. 2004; 303:1201–1204.

Ando H, Tsuruoka S, Yamamoto H, Takamura T, Kaneko S and Fujimura A (2004) Effects of pravastatin on ATP-binding cassette transporter A1. *J Pharmacol Exp Ther* 311: 420-425

Anitschkow N and Chalator S. Ueber experimentelle Cholesterinsteatose. *Zbl allg Path path Anat* 24: 1–9, 1913

Apfel R., Benbrook D., Lernhardt E., Ortiz M. A., Salbert G. and Pfahl M. (1994) A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily. *Mol. Cell. Biol.* 14: 7025–7035

Arakawa R and Yokoyama S. Helical apolipoproteins stabilize ATP-binding cassette transporter A1 by protecting it from thiol protease-mediated degradation. *J Biol Chem* 277: 22426–22429, 2002;

Assmann G, Cuilen P, Schulte H. The Munster Heart Study (PROCAM). Results of follow-up at 8 years. *Eur Heart J* 1998;19(suppl A):A2-A11.

Asztalos B.F., M. de la Llera-Moya, G.E. Dallal, K.V. Horvath, E.J. Schaefer, and G.H. Rothblat. 2005..Differential effects of HDL subpopulations on cellular ABCA1- and SR-BI-mediated cholesterol efflux. *J Lipid Res.* 46:2246-53.

Attie A. D., et al., Pivotal role of ABCA1 in reverse cholesterol transport influencing HDL levels susceptibility to atherosclerosis. *J Lipid Res* 2001; 42: 1717-1726

Attie AD, (2007) ABCA1: at the nexus of cholesterol, HDL and atherosclerosis. *TRENDS in Biochemical Sciences* Vol.32 No.4

Baldan A, Tarr P, Lee R, Edwards PA. ATP-binding cassette transporter G1 and lipid homeostasis. *Curr Opin Lipidol.* 2006;17:227–232

Barbagallo C. M., Fan J., et al., Overexpression of human hepatic lipase and ApoE in transgenic rabbits attenuates response to dietary cholesterol and alters lipoprotein subclass distribution. *ATVB* 1999; 19: 625-632

Barter P (2004) HDL: a recipe for longevity. *Atheroscler Suppl* 5:25–31.

Barter P. J., Hugh Sinclair Lecture: The regulation and remodeling of HDL by plasma factors. *Atherosclerosis Suppl.* 2002; 3: 39-47

- Beato M. (1991) Transcriptional control by nuclear receptors. *FASEB J.* 5: 2044–2051
- Bensadoun A., Berryman D. E., Genetics and molecular biology of hepatic lipase. *Curr Opin Lipidol* 1996; 7: 77-81
- Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, Kwiterovich P, Shan B, Barnes R, Hobbs HH. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science*. 2000; 290:1771–1775.
- Binder CJ, Chang MK, Shaw PX, Miller YI, Hartvigsen K, Dewan A, and Witztum JL. Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nat Med* 8: 1218–1226, 2002.;
- Birn H., Verroust P. J., et al., *J Biol Chem* 1997; 272: 26497
- Blacklow, S.C. and Kim, P.S. (1996) Protein folding and calcium binding defects arising from familial hypercholesterolemia mutations of the LDL receptor. *Nat. Struct. Biol.* 3, 758–762
- Bodzioch M., Orsò E., et al., The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet* 1999; 22: 347-351
- Bonow RO, Smaha LA, Smith SC Jr, Mensah GA, and Lenfant C. World Heart Day 2002: the international burden of cardiovascular disease: responding to the emerging global epidemic. *Circulation* 106: 1602–1605, 2002
- Bortnick AE, Rothblat GH, et al., The correlation of ATP-binding cassette 1 mRNA levels with cholesterol efflux from various cell lines. *J Biol Chem* 2000; 275: 28634-28640
- Bradley MN, Hong C, Chen M, Joseph SB, Wilpitz DC, Wang X, Lusic AJ, Collins A, Hseuh WA, Collins JL, Tangirala RK and Peter Tontonoz. Ligand activation of LXR $\beta$  reverses atherosclerosis and cellular cholesterol overload in mice lacking LXR $\alpha$  and apoE. *J. Clin. Invest.* 117:2337–2346 (2007)
- Braschi S., Neville T. A., et al., *Biochemistry* 2000; 39: 5441
- Brooks-Wilson A, Marcil M., et al., Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial High density lipoprotein deficiency. *Nat Genet* 1999; 22: 336-345
- Brown MS and JL Goldstein 1999. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(20): 11041-11048
- Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*. 1986 Apr 4; 232(4746):34-47.
- Brunham, L.R. et al. (2006) Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J. Clin. Invest.* 116, 1052–1062
- Brunham, L.R. et al. (2006) Variations on a gene: rare and common variants in ABCA1 and their impact on HDL cholesterol levels and atherosclerosis. *Annu. Rev. Nutr.* 26, 105–129
- Bungert S, Molday LL, and Molday RS. 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, 2001;
- Burnham, L.R. et al. (2006) Tissue-specific induction of intestinal ABCA1 expression with a liver X receptor agonist raises plasma HDL cholesterol levels. *Circ. Res.* 99, 672–674
- Camps L., Reina M., et al., *Am J Physiol* 1990; 258: C673

- Cao G., Beyer T. P., Yang X. P., Schmidt R. J., Zhang Y., Bensch W. R. et al. (2002) Phospholipid transfer protein is regulated by liver X receptors in vivo. *J. Biol. Chem.* 277: 39561–39565;
- Castelli WP, Anderson K, Wilson PW et al. Lipids and risk of coronary heart disease. The Framingham Study. *Ann Epidemiol* 1992;2:23-28
- Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PWF, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels: the Framingham Study. *JAMA* 1986;256:2835–2838
- Chapman MJ, Assmann G, Fruchart JC, Shepherd J, and Sirtori C (2004) Raising high-density lipoprotein cholesterol with reduction of cardiovascular risk: the role of nicotinic acid—a position paper developed by the European Consensus Panel on HDL-C. *Curr Med Res Opin* 20:1253–1268.
- Chen J. D. and Evans R. M. (1995) A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377: 454–457
- Chinetti G., et al., CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. *Circulation* 2000; 101: 2411
- Chinetti G., et al., PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophages foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med* 2001; 7: 53-58
- Chisolm GM and Steinberg D (2000) The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med* 28:1815–1826.
- Chong PH et al., High-density lipoprotein cholesterol and the role of statins. *Circulation Journal*, 2002; 66: 1037-1044
- Chroni A, Liu T, Fitzgerald ML, Freeman MW, and Zannis VI. Cross-linking and lipid efflux properties of apoA-I mutants suggest direct association between apoA-I helices and ABCA1. *Biochemistry* 43: 2126–2139, 2004.
- Clay M. A., et al., Cholesteryl ester transfer protein and hepatic lipase activity promote shedding of apoA-I from HDL and subsequent formation of discoidal HDL. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1124: 52-58
- Clay M. A., et al., Formation of spherical, reconstituted high density lipoproteins containing both apolipoproteins A-I and A-II is mediated by lecithin:cholesterol acyltransferase. *J Biol Chem* 2000; 275: 9019-9025
- Collins J. L., Fivush A. M., Watson M. A., Galardi C. M., Lewis M. C., Moore L. B. et al. (2002) Identification of a nonsteroidal liver X receptor agonist through parallel array synthesis of tertiary amines. *J. Med. Chem.* 45: 1963–1966
- Connelly P. W., The role of hepatic lipase in lipoprotein metabolism. *Clin Chim Acta* 1999; 286: 243-255
- Corsini A, Bernini F. Le statine: farmacologia e clinica. *Farmaci (Suppl. alla rivista Farmaci)*; 2002, vol.26, n.3: 1-24
- Costet P, Luo Y, Wang N, Tall AR. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem.* 2000; 275:28240 –28245.
- Croop JM, Tiller GE, Fletcher JA, Lux ML, Raab E, Goldenson D, Son D, Arciniegas S, Wu RL. Isolation and characterization of a mammalian homolog of the *Drosophila* white gene. *Gene.* 1997;185:77– 85.
- Cuchel M., and D.J. Rader. 2006. Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis? *Circulation.* 113:2548-2555

- Curtiss L. K. and Boisvert W. A. (2000) Apolipoprotein E and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 11: 243-251
- Davidson MH, Toth PP. High-Density Lipoprotein Metabolism: Potential Therapeutic Targets *Am J Cardiol* 2007; 100[suppl]:32N-40N
- Davies MJ. Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis—The Paul Dudley White Lecture 1995. *Circulation* 94: 2013-2020, 1996;
- Dawson, R.J.P. and Locher, K.P. (2006) Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature* 443, 180-185
- Dean M, Hamon Y, and Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* 42: 1007-1017, 2001
- Denis, M. et al. (2004) Characterization of oligomeric human ATP binding cassette transporter A1. Potential implications for determining the structure of nascent high density lipoprotein particles. *J. Biol. Chem.* 279, 41529-41536
- Drobnik W, Borsukova H, Bottcher A, Pfeiffer A, Liebisch G, Schutz GJ, Schindler H, and Schmitz G. Apo AI/ABCA1-dependent and HDL3-mediated lipid efflux from compositionally distinct cholesterol-based microdomains. *Traffic* 3: 268-278, 2002
- Evans R. M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240: 889-895
- Evans G. F., Bensch W. R., *J Lipid Res* 1994; 35: 1634
- Favari E., et al., Depletion of pre- $\beta$ -high density lipoprotein by human chymase impairs ATP-binding cassette transporter A1- but not scavenger receptor class B type I-mediated lipid efflux to high density lipoprotein. *J Biol Chem* 2004; 279 (11): 9930-9936
- Fellin R., Vigna G.B.. Le iperlipidemie: storia e classificazione. 2004, in *Manuale delle dislipidemie e dell'arteriosclerosi*, AA.VV. Società Italiana per lo Studio dell'Aterosclerosi
- Feng B and Tabas I (2002) ABCA1-mediated cholesterol efflux is defective in free cholesterol-loaded macrophages. Mechanism involves enhanced ABCA1 degradation in a process requiring full NPC1 activity. *J. Biol. Chem.* 277, 43271-43280
- Feng, B. et al. (2003) The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nat. Cell Biol.* 5, 781-792
- Fitzgerald ML, Morris AL, Chroni A, Mendez AJ, Zannis VI, and Freeman MW. ABCA1 and amphipathic apolipoproteins form high-affinity molecular complexes required for cholesterol efflux. *J Lipid Res* 45: 287-294, 2004
- Fitzgerald ML, Morris AL, Rhee JS, Andersson LP, Mendez AJ, and Freeman MW. Naturally occurring mutations in the largest extracellular loops of ABCA1 can disrupt its direct interaction with apolipoprotein A-I. *J Biol Chem* 277: 33178-33187, 2002
- Forman B. M., Ruan B., Chen J., Schroepfer G. J, Jr. and Evans R. M. (1997) The orphan nuclear receptor LXRalpha is positively and negatively regulated by distinct products of mevalonate metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 10588-10593
- Foretz, M., Guichard, C., Ferre, P., and Foufelle, F. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 12737-12742;

- Fournier N., O. Francone, G. Rothblat, D. Goudouneche, M. Cambillau, G. Kellner-Weibel, P. Robinet, L. Royer, N Moatti, A. Simon, and J.L. Paul. 2003. Enhanced efflux of cholesterol from ABCA1-expressing macrophages to serum from type IV hypertriglyceridemic subjects. *Atherosclerosis*. 171:287-93.
- Forman BM, Ruan B, Chen J, Schroepfer GJ Jr and Evans RM (1997) The orphan nuclear receptor LXRalpha is positively and negatively regulated by distinct products of mevalonate metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:10588-10593
- Franceschini G., et al., Reverse cholesterol transport: physiology and pharmacology. *Atherosclerosis* 1991; 88: 99-107
- Franceschini G (2001) Epidemiologic evidence for high-density lipoprotein cholesterol as a risk factor for coronary artery disease. *Am J Cardiol* 88:9N-13N.
- Francis G. A., Knopp R. H., Oram J. F., Defective removal of cellular cholesterol and phospholipids by apolipoprotein A-I in Tangier disease. *J Clin Invest* 1995; 96: 78-87
- Fu X, Menke JG, Chen Y, Zhou G, MacNaul KL, Wright SD, Sparrow CP, Lund EG. 27-hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells. *J Biol Chem*. 2001;276: 38378-38387
- Gan X, Kaplan R, Menke JG, MacNaul K, Chen Y, Sparrow CP, Zhou G, Wright SD, and Cai TQ. Dual mechanisms of ABCA1 regulation by geranylgeranyl pyrophosphate. *J Biol Chem* 276: 48702-48708, 2001.
- Gelissen IC, Harris M, Rye KA, Quinn C, Brown AJ, Kockx M, Cartland S, Packianathan M, Kritharides L, Jessup W. ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26:534-540.
- Germain P., Iyer J., Zechel C. and Gronemeyer H. (2002) Coregulator recruitment and the mechanism of retinoic acid receptor synergy. *Nature* 415: 187-192;
- Geyerregger R, Zeyda M and Stulniga TM. Liver X receptors in cardiovascular and metabolic disease (2005) *Cell. Mol. Life Sci*.
- Gillotte KL, Zaiou M, Lund-Katz S, Anantharamaiah GM, Holvoet P, Dhoest A, Palgunachari MN, Segrest JP, Weisgraber KH, Rothblat GH, and Phillips MC. Apolipoprotein-mediated plasma membrane microsolubilization. Role of lipid affinity and membrane penetration in the efflux of cellular cholesterol and phospholipid. *J Biol Chem* 274: 2021-2028, 1999;
- Gimbrone MA Jr and Buchanan MR. Interactions of platelets and leukocytes with vascular endothelium: in vitro studies. *Ann NY Acad Sci* 401: 171-183, 1982
- Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, and Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 316: 1371-1375, 1987
- Glass CK and Witztum JL. Atherosclerosis the road ahead. *Cell* 104: 503-516, 2001.;
- Glass C. K. and Rosenfeld M. G. (2000) The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev*. 14: 121-141
- Glomset J. A., The plasma lecithin:cholesterol acyltransferase reaction. *Journal of Lipid Research* 1968; 9: 155-167
- Goldberg I. J., Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J Lipid Res* 1996; 37: 693-707

- Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, and Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 333–337, 1979
- Goldstein, J.L. et al. (2006) Protein sensors for membrane sterols. *Cell* 124, 35–46
- Goodman and Gilman. *The pharmacological basis of therapeutics*. 9th ed. Mc Graw Hill 1996: 861-864
- Goodwin B., Watson M. A., Kim H., Miao J., Kemper J. K. And Kliewer S. A. (2003) Differential regulation of rat and human CYP7A1 by the nuclear oxysterol receptor liver X receptor-alpha. *Mol. Endocrinol.* 17: 386–394
- Gotto AM Jr and Brinton EA (2004) Assessing low levels of high-density lipoprotein cholesterol as a risk factor in coronary heart disease: a working group report and update. *J Am Coll Cardiol* 43:717–724
- Graf GA, Cohen JC, Hobbs HH. Missense mutations in ABCG5 and ABCG8 disrupt heterodimerization and trafficking. *J Biol Chem.* 2004; 279:24881–24888.
- Graf GA, Li WP, Gerard RD, Gelissen I, White A, Cohen JC, Hobbs HH. Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface. *J Clin Invest.* 2002; 110:659–669.
- Graf GA, Yu L, Li WP, Gerard R, Tuma PL, Cohen JC, Hobbs HH. ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion. *J Biol Chem.* 2003; 278:48275–48282.
- Grefhorst A., Elzinga B. M., Voshol P. J., Plosch T., Kok T., Bloks V. W. et al. (2002) Stimulation of lipogenesis by pharmacological activation of the liver X receptor leads to production of large, triglyceride-rich very low density lipoprotein particles. *J. Biol. Chem.* 277: 34182–34190
- Grefhorst A., van Dijk T. H., Hammer A., van der Sluijs F. H., Havinga R., Havekes L. M. et al. (2005) Differential effects of pharmacological liver X receptor activation on hepatic and peripheral insulin sensitivity in lean and ob/ob mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 289: E829–E838
- Gu X., Kozarsky K., Krieger M., Scavenger receptor class B, type I-mediated [3H]cholesterol efflux to high and low density lipoproteins is dependent on lipoprotein binding to the receptor. *J Biol Chem* 2000; 275: 29993-30001
- Guendouzi K., Collet X., et al., *Biochemistry* 1998; 37: 14974
- Hamon Y, Luciani MF, Becq F, Verrier B, Rubartelli A, and Chimini G. Interleukin-1beta secretion is impaired by inhibitors of the ATP binding cassette transporter, ABC1. *Blood* 90: 2911–2915, 1997;
- Han J et al., Functional interplay between the macrophage scavenger receptor class B Type I and pitavastatin (NK-104) *Circulation.* 2004; 110: 3472-3479
- Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, and Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res* 91: 281–291, 2002
- Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352: 1685–1695, 2005
- Hardmann JG, Limbiro LE Goodmann Gilman A. *Goodmann & Gilman - Le basi farmacologiche della terapia.* 2003; McGraw-Hill, Milano; pp. 923-928; 935-940
- Havel R. J., Hamilton R. L., Hepatic Catabolism of Remnant Lipoproteins: Where the Action Is. *ATVB* 2004; 24: 213-215

- Hegele R., Little J. L., et al., Hepatic lipase deficiency: clinical, biochemical, and molecular genetic characteristics. *Arterioscl Thromb* 1993; 13: 720-728
- Heinecke JW (1998) Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis* 141:1–15.
- Hobbs H. H., Rader D. J., ABCA1: connecting yellow tonsils, neuropathy, and very low HDL. *J. Clin. Invest.* 1999; 104: 1015-1017
- Horlein A. J., Naar A. M., Heinzel T., Torchia J., Gloss B., Kurokawa R. et al. (1995) Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377: 397–404
- Hu X., Li S., Wu J., Xia C. and Lala D. S. (2003) Liver X receptors interact with corepressors to regulate gene expression. *Mol. Endocrinol.* 17: 1019–1026
- Hubacek JA, Berge KE, Cohen JC, Hobbs HH. Mutations in ATPcassette binding proteins G5 (ABCG5) and G8 (ABCG8) causing sitosterolemia. *Hum Mutat.* 2001; 18:359 –360
- Huuskonen J, Vishnu M, Pullinger CR, Fielding PE, and Fielding CJ. Regulation of ATP-binding cassette transporter A1 transcription by thyroid hormone receptor. *Biochemistry* 43: 1626–1632, 2004.
- Huuskonen J., Fielding P. E. and Fielding C. J. (2004) Role of p160 coactivator complex in the activation of liver X receptor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24: 703–708
- Ignatowski A. Wirkung de tierischen Nahrung auf den Kaninchenorganismus. *Ber Milit-med Akad* 16: 154–176, 1908
- Inazu A., Jiang X., et al., *J Clin Invest* 1994; 94:1872
- Innis SM, Hamilton JJ. Effects of developmental changes and early nutrition on cholesterol metabolism in infancy: a review. *J Am Coll Nutr.* 1992 Jun;11 Suppl:63S-68S;
- Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, and Herz J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest* 92: 883–893, 1993.;
- Ishibashi S, Goldstein JL, Brown MS, Herz J, and Burns DK. Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J Clin Invest* 93: 1885– 1893, 1994;
- Ishibashi S, Herz J, Maeda N, Goldstein JL, and Brown MS. The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in “knockout” mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4431–4435, 1994.;
- Jain KS, Kathiravan MK, Somania RS and Shishoo CJ. The biology and chemistry of hyperlipidemia. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15 (2007) 4674–4699
- Janowski BA. et al. (1999) Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRA and LXRb. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 266–271;
- Jaye M., Lynch K. J., et al., A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism. *Nat Genet* 1999; 21: 424-428
- Ji Y., Jian B., et al., Scavenger receptor B1 promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem* 1997; 272: 20982-5
- Ji Y., et al., Hepatic Scavenger Receptor BI promotes rapid clearance of high density lipoprotein free cholesterol and its transport into bile. *J Biol Chem* 1999; 274: 33398-33402

- Jian B., et al., Modification of the cholesterol efflux properties of human serum by enrichment with phospholipid. *J Lipid Res* 1997; 38: 734-74
- Johnson W. J., Rothblat G. H., et al., Cholesterol transport between cells and high density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1085: 273-298
- Jonas A., Synthetic substrates of lecithin:cholesterol acyltransferase. *J Lipid Res* 1986; 27: 689-698
- Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, and Hansson G. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis* 6: 131–138, 1986.
- Joseph S. B., Bradley M. N., Castrillo A., Bruhn K. W., Mak P. A., Pei L. et al. (2004) LXR-dependent gene expression is important for macrophage survival and the innate immune response. *Cell* 119: 299–309
- Joseph S. B., Laffitte B. A., Patel P. H., Watson M. A., Matsukuma K. E., Walczak R. et al. (2002) Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J. Biol. Chem.* 277: 11019–11025;
- Joseph S. B., McKilligin E., Pei L., Watson M. A., Collins A. R., Laffitte B. A. et al. (2002) Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 7604–7609
- Joseph, S.B. and Tontonoz, P. (2003) LXRs: new therapeutic targets in atherosclerosis? *Curr. Opin. Pharmacol.* 3, 192–197
- Joyce C, Freeman L, Brewer HB Jr, and Santamarina-Fojo S. Study of ABCA1 function in transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 965–971, 2003;
- Kalaany, N.Y. and Mangelsdorf, D.J. (2006) LXRS and FXR: the yin and yang of cholesterol and fat metabolism. *Annu. Rev. Physiol.* 68, 159–191
- Kallio, M. J. T., L. Salmenpera, M. A. Shes, J. Perheentupa, H. Gylling, and T. A. Miettinen. Apoprotein E phenotype determines serum cholesterol in infants during both high cholesterol breast feeding and low-cholesterol formula feeding. *J. Lipid Res.* 1997. 38: 759-764.
- Karten B, Campenot RB, Vance DE, Vance JE. Expression of ABCG1, but not ABCA1, correlates with cholesterol release by cerebellar astroglia. *J Biol Chem.* 2006; 281:4049–4057
- Kellner-Weibel G, Luke SJ, and Rothblat GH. Cytotoxic cellular cholesterol is selectively removed by apoA-I via ABCA1. *Atherosclerosis* 171: 235–243, 2003
- Kennedy MA, Barrera GC, Nakamura K, Baldan A, Tarr P, Fishbein MC, Frank J, Francone OL, Edwards PA. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab.* 2005; 1:121–131
- Khalil MF, Wagner WD, and Goldberg IJ (2004) Molecular interactions leading to lipoprotein retention and the initiation of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:2211–2218
- Kiss, R.S. et al. (2005) Lipid efflux in human and mouse macrophagic cells: evidence for differential regulation of phospholipid and cholesterol efflux. *J. Lipid Res.* 46, 1877–1887
- Kobayashi A, Takanezawa Y, Hirata T, Shimizu Y, Misasa K, Kioka N, Arai H, Ueda K, Matsuo M. Efflux of sphingomyelin, cholesterol and phosphatidylcholine by ABCG1. *J Lipid Res.* 2006; 47:1791–1802.

- Kontush A, Chapman MJ. Functionally Defective High-Density Lipoprotein: A New Therapeutic Target at the Crossroads of Dyslipidemia, Inflammation, and Atherosclerosis. 2006; *Pharmacol Rev* 58:342–374
- Kosters A, Kunne C, Looije N, Patel SB, Oude Elferink RP, Groen AK. The mechanism of Abcg5/Abcg8 in biliary cholesterol secretion in mice. *J Lipid Res.* 2006;47:1959–1966
- Kozyraki R., Fyfe J., et al., *Nat Med* 1999; 5: 656
- Krieger M., Herz J., Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: Macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annual Review of Biochemistry* 1994; 63: 601-607
- Krieger M., Charting the fate of the “good cholesterol”: identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annu Rev of Biochem* 1999; 68: 523-558
- Krieger M., *Curr Opin Lipidol* 1997; 8: 275
- Kruit J.K., T. Plosch, R. Havinga, R. Boverhof, P.H. Groot, A.K. Groen, and F. Kuipers. 2005. Increased fecal neutral sterol loss upon liver X receptor activation is independent of biliary sterol secretion in mice. *Gastroenterology.* 128:147-156.
- Kuivenhoven J. A., Pritchard H., et al., The molecular pathology of lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency syndromes. *J. Lipid Research* 1997; 38: 191-205
- Laffitte B. A., Joseph S. B., Chen M., Castrillo A., Repa J., Wilpitz D. et al. (2003) The phospholipid transfer protein gene is a liver X receptor target expressed by macrophages in atherosclerotic lesions. *Mol. Cell. Biol.* 23: 2182–2191
- Laffitte B. A., Repa J. J., Joseph S. B., Wilpitz D. C., Kast H. R., Mangelsdorf D. J. et al. (2001) LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 507–512
- Lange, Y. (1991) Disposition of intracellular cholesterol in human fibroblasts. *J. Lipid Res.* 32, 329–339
- Langheim S, Yu L, von Bergmann K, Lutjohann D, Xu F, Hobbs HH, Cohen JC. ABCG5 and ABCG8 require MDR2 for secretion of cholesterol into bile. *J Lipid Res.* 2005; 46:1732–1738.
- Langmann T, Klucken J, Reil M, Liebisch G, Luciani MF, Chimini G, Kaminski WE, Schmitz G. Molecular cloning of the human ATPbinding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;257: 29–33.
- LaRosa JC, Hunninghake D, Bush D et al. The cholesterol facts: a summary of the evidence relating dietary fats, serum cholesterol, and coronary heart disease. *Circulation* 1990; 81:1721 - 1733.
- Lawn RM, Wade DP, Garvin MR, Wang X, Schwartz K, Porter JG, Seilhamer JJ, Vaughan AM, Oram JF. The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J Clin Invest.* 1999;104:R25–R31.
- Le Goff, W. et al. (2006) Identification of the cAMP-responsive enhancer of the murine ABCA1 gene: requirement for CREB1 and STAT3/4 elements. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 527–533
- Lee MH, Lu K, Hazard S, Yu H, Shulenin S, Hidaka H, Kojima H, Allikmets R, Sakuma N, Pegoraro R, Srivastava AK, Salen G, Dean M, Patel SB. Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nat Genet.* 2001;27:79–83.
- Leibowitz J. *The History of Coronary Disease.* London: Wellcome Institute of the History of Medicine, 1970

- Leiter L. A., Vezina C., et al., Apolipoprotein A-I Q[-2] X causing isolated apolipoprotein A-I deficiency in a family with an alpha-lipoproteinemia. *Journ Clin Invest* 1994; 93: 223-229
- Lewis G, Rader D. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res* 2005; 96:1221–1232.
- Li AC and Glass CK. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat Med* 8: 1235–1242, 2002
- Libby P and Aikawa M. Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets. *Nature Medicine* 2002; 8; 11: 1257-1262
- Libby P and Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation* 111: 3481–3488, 2005
- Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 104: 365–372, 2001.
- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420: 868–874, 2002.;
- Lopez AD and Murray CC. The global burden of disease, 1990–2020. *Nat Med* 4: 1241–1243, 1998;
- Lund-Katz S., Laboda H. M., et al., Influence of molecular packing and phospholipid type on rates of cholesterol exchange. *Biochemistry* 1988; 27: 3416-3423
- Luo Y. and Tall A. R. (2000) Sterol upregulation of human CETP expression in vitro and in transgenic mice by an LXR element. *J. Clin. Invest.* 105: 513–520
- Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 407: 233–241, 2000.
- Madamanchi NR, Vendrov A, and Runge MS (2005) Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:29–38;
- Maejima T, et al., Effect of pitavastatin on apolipoprotein A-I production in HepG2 cells. 2004 ; *Biochem Biophysical Res Commun.* 2004; 324: 835-839
- Mangelsdorf D. J. and Evans R. M. (1995) The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83: 841–850
- Mangelsdorf D. J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schutz G., Umesono K. et al. (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83: 835–839
- Maron DJ (2000) The epidemiology of low levels of high-density lipoprotein cholesterol in patients with and without coronary artery disease. *Am J Cardiol* 86:11L–14L;
- Martin MJ, Hutley SB, Browner WS et al. Serum cholesterol, blood pressure, and mortality: implications from a cohort of 361,662 men. *Lancet* 1986;2: 933 - 936.;
- Mathers CD, Ezzati M, Lopez AD (2007) Measuring the Burden of Neglected Tropical Diseases: The Global Burden of Disease Framework. *PLoS Negl Trop Dis* 1(2): e114
- McCoy M., Sun G. S., et al., *J Lipid Res* 2002; 43: 921
- Meisinger C, Baumert J, Khuseynova N, Loewel H, and Koenig W (2005) Plasma oxidized low-density lipoprotein, a strong predictor for acute coronary heart disease events in apparently healthy, middle-aged men from the general population. *Circulation* 112:651–657.
- Mendez AJ, Anantharamaiah GM, Segrest JP, and Oram JF. Synthetic amphipathic helical peptides that mimic apolipoprotein A-I in clearing cellular cholesterol. *J Clin Invest* 94: 1698–1705, 1994;

- Mendez AJ, Lin G, Wade DP, Lawn RM, and Oram JF. Membrane lipid domains distinct from cholesterol/sphingomyelin-rich rafts are involved in the ABCA1-mediated lipid secretory pathway. *J Biol Chem* 276: 3158–3166, 2001
- Miao B., S. Zondlo, S. Gibbs, D. Cromley, V.P. Hosagrahara, T.G. Kirchgessner, J. Billheimer, and R. Mukherjee. 2004. Raising HDL cholesterol without inducing hepatic steatosis and hypertriglyceridemia by a selective LXR modulator. *J. Lipid Res.* 45:1410-1417
- Miettinen TA, Klett EL, Gylling H, Isoniemi H, Patel SB. Liver transplantation in a patient with sitosterolemia and cirrhosis. *Gastroenterology*. 2006; 130:542–547.
- Miettinen TA. Phytosterolaemia, xanthomatosis and premature atherosclerotic arterial disease: a case with high plant sterol absorption, impaired sterol elimination and low cholesterol synthesis. *Eur J Clin Invest.* 1980; 10:27–35.
- Millatt L.J., V. Bocher, J.C. Fruchart, and B. Staels. 2003. Liver X receptors and the control of cholesterol homeostasis: potential therapeutic targets for the treatment of atherosclerosis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1631:107-118.
- Moestrup S. K., Kozyraki R., et al., *J Biol Chem* 1998; 273: 5235
- Morello F, de Boer RA, Steffensen KR, Gnecci M, Chisholm JW, Boomsma F, Anderson LM, Lawn RM, Gustafsson JA, Lopez-Illasaca M, Pratt RE, and Dzau VJ (2005) Liver X receptors  $\alpha$  and  $\beta$  regulate renin expression in vivo. *J Clin Invest* 115: 1913-1922
- Morrow JD (2005) Quantification of isoprostanes as indices of oxidant stress and the risk of atherosclerosis in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:279–286
- Mueller CF, Laude K, McNally JS, and Harrison DG (2005) Redox mechanisms in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:274–278.
- Murao K., et al., Characterization of CLA-1, a human homologue of rodent scavenger receptor BI, as a receptor for high density lipoprotein and apoptotic thymocytes. *J Biol Chem* 1997; 272: 17551
- Naik SU, Xun Wang, PhD; Jaqueline S. Da Silva, PhD; Michael Jaye, PhD; Colin H. Macphee, PhD; Muredach P. Reilly, MD; Jeffrey T. Billheimer, PhD; George H. Rothblat, PhD; Daniel J. Rader, MD Pharmacological Activation of Liver X Receptors Promotes Reverse Cholesterol Transport In Vivo. *Circulation*. 2006; 113: 90-97
- Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, and Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 14: 133–140, 1994;
- Natarajan P, Forte TM, Chu B, Phillips MC, Oram JF, and Bielicki JK. Identification of an apolipoprotein A-I structural element that mediates cellular cholesterol efflux and stabilizes ATP binding cassette transporter A1. *J Biol Chem* 279: 24044–24052, 2004
- Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature* 420: 846–852, 2002.
- Neufeld EB, Remaley AT, Demosky SJ, Stonik JA, Cooney AM, Comly M, Dwyer NK, Zhang M, Blanchette-Mackie J, Santamarina-Fojo S, and Brewer HB Jr. Cellular localization and trafficking of the human ABCA1 transporter. *J Biol Chem* 276: 27584–27590, 2001;
- Neufeld EB, Stonik JA, Demosky SJ Jr, Knapper CL, Combs CA, Cooney A, Comly M, Dwyer N, Blanchette-Mackie J, Remaley AT, Santamarina-Fojo S, and Brewer HB Jr. The ABCA1 transporter modulates late endocytic trafficking: insights from the correction of the genetic defect in Tangier disease. *J Biol Chem* 279: 15571–15578, 2004

- Nieland T.J., M. Penman, L. Dori, M. Krieger, and T. Kirchhausen. 2002. Discovery of chemical inhibitors of the selective transfer of lipids mediated by the HDL receptor SR-BI. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:15422-7.
- Norata G. D., A. L. Catapano. *Metabolismo e trasporto delle lipoproteine plasmatiche*. 2004, in *Manuale delle dislipidemie e dell'arteriosclerosi*, AA.VV. Società Italiana per lo Studio dell'Aterosclerosi
- Oberkofler H., Schraml E., Krempler F. and Patsch W. (2003) Potentiation of liver X receptor transcriptional activity by peroxisome-proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 alpha. *Biochem. J.* 371: 89-96
- Oliver W. R., et al., A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 5306-5311
- Olofsson S-O, Borèn J. Apolipoprotein B: a clinically important apolipoprotein which assembles atherogenic lipoproteins and promotes the development of atherosclerosis (Review Article). *J Intern Med* 2005; 258: 395-410
- Olsson AG, Schwartz GG, Szarek M, Sasiela WJ, Ezekowitz MD, Ganz P, Oliver MF, Waters D, and Zeiher, (2005) High-density lipoprotein, but not low-density lipoprotein cholesterol levels influence short-term prognosis after acute coronary syndrome: results from the MIRACL trial. *Eur Heart J* 26:890-896.
- Oram JF and Heinecke JW, ATP-Binding Cassette Transporter A1: A Cell Cholesterol Exporter That Protects Against Cardiovascular Disease *Physiol Rev* 85: 1343-1372, 2005
- Oram JF and Lawn RM. ABCA1: the gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol. *J Lipid Res* 42: 1173-1179, 2001
- Oram JF, Vaughan AM, and Stocker R. ATP-binding cassette transporter A1 mediates cellular secretion of alpha-tocopherol. *J Biol Chem* 276: 39898-39902, 2001
- Oram JF. HDL apolipoproteins and ABCA1: partners in the removal of excess cellular cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 720-727, 2003;
- Oram JF and Vaughan AM, ATP-Binding Cassette Cholesterol Transporters and Cardiovascular Disease, *Circ. Res.* 2006; 99: 1031-1043
- Orsò E., et al., Transport of lipids from golgi to plasma membrane is defective in Tangier disease patients and Abc1-deficient mice. *Nat Genet* 2000; 24: 192-196
- Ou J, Tu H, Shan B, Luk A, DeBose-Boyd RA, Bashmakov Y, Goldstein JL, and Brown MS. Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6027-6032, 2001
- Ou J., Tu H., Shan B., Luk A., DeBose-Boyd R. A., Bashmakov Y. et al. (2001) Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 6027-6032;
- Owen J. S., Mulcahy J. V., ATP-binding cassette A1 protein and HDL homeostasis. *Atherosclerosis Suppl* 2002; 3: 13-22
- Panagotopoulos SE, Witting SR, Horace EM, Hui DY, Maiorano JN, and Davidson WS. The role of apolipoprotein A-I helix 10 in apolipoprotein-mediated cholesterol efflux via ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1). *J Biol Chem* 277: 13, 2002

- Panousis C. G., Zuckerman S. H., Interferon-g induces down-regulation of Tangier disease gene (ATP-binding cassette transporter A1) in macrophage-derived foam cells. *ATVB* 2000; 20: 1565-1571
- Peet D. J., Janowski B. A. and Mangelsdorf D. J. (1998) The LXRs: a new class of oxysterol receptors. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8: 571–575;
- Peet D. J., Turley S. D., Ma W., Janowski B. A., Lobaccaro J. M., Hammer R. E. et al. (1998) Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 93: 693–704
- Philippe Costet, Bertrand Cariou, Gilles Lambert, Florent Lalanne, Bernard Lardeux, Anne-Laure Jarnoux, Aldo Grefhorst, Bart Staels, and Michel Krempf. Hepatic PCSK9 Expression Is Regulated by Nutritional Status via Insulin and Sterol Regulatory Element-binding Protein 1c. *J. Biol. Chem.*, 2006, 281; 10: 6211–6218
- Phillips M. C., Gillotte K. L., et al., Mechanisms of high density lipoprotein-mediated of cholesterol from cell plasma membranes. *Atherosclerosis* 1998; 137: S13-S17
- Phillips M. C., Johnson W. J., et al., Mechanism and consequence of cellular cholesterol exchange and transfer. *Biochim Biophys Acta* 1987; 906: 223-276
- Playford DA, G. F. Watts, “Management of Lipid Disorders in the Elderly”. *Drugs & Aging* 1997 Jun; 10 (6): 446-7
- Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aaltosetala K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, and Breslow JL. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein-E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 71: 343–353, 1992.;
- Poole JC and Florey HW. Changes in the endothelium of the aorta and the behaviour of macrophages in experimental atheroma of rabbits. *J Pathol Bacteriol* 75: 245–251, 1958.
- Powell-Braxton L, Veniant M, Latvala RD, Hirano KI, Won WB, Ross J, Dybdal N, Zlot CH, Young SG, Davidson NO. A mouse model of human familial hypercholesterolemia: markedly elevated low density lipoprotein cholesterol levels and severe atherosclerosis on a low-fat chow diet. *Nat Med.* 1998; 4: 934–938
- Qin S., Kawano K., et al., Phospholipid transfer protein gene knock-out mice have low high density lipoprotein levels, due to hypercatabolism, and accumulate apo A-IV-rich lamellar lipoproteins. *J Lipid Res* 2000; 41: 269-276
- Rader D. J., Jaye M., Endothelial lipase: a new member of the triglyceride lipase gene family. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11: 141-147
- Rader D. J., Regulation of Reverse Cholesterol Transport and Clinical Implications. *Am J Cardiol* 2003; 92(suppl.): 42J-49J
- Reddick RL, Zhang SH, and Maeda N. Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arterioscler Thromb* 14: 141–147, 1994
- Remaley A. T., et al., Decreased reverse cholesterol transport from Tangier disease fibroblast: acceptor specificity and effect of brefeldine on lipid efflux. *ATVB* 1997; 17: 1813-1821
- Remaley A. T., et al., Apolipoprotein specificity for lipid efflux by the human ABCA1 transporter. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280: 818-823
- Repa J. J. and Mangelsdorf D. J. (2000) The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 16: 459–481

- Repa J. J., Liang G., Ou J., Bashmakov Y., Lobaccaro J. M., Shimomura I. et al. (2000) Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev.* 14: 2819–2830;
- Repa J. J., Turley S. D., Lobaccaro J. A., Medina J., Li L., Lustig K. et al. (2000) Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 289: 1524–1529
- Repa JJ, Berge KE, Pomajzl C, Richardson JA, Hobbs H, Mangelsdorf DJ. Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem.* 2002; 277:18793–18800.
- Repa JJ, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptor regulation of cholesterol and bile acid metabolism. *Curr Opin Biotechnol.* 1999;10:557–563.
- Rigotti A., Trigatti B. L., et al., Scavenger receptor B1: a cell surface receptor for high density lipoprotein. *Current Opinion in Lipidology* 1997; 8: 181-188
- Rosenfeld M. G. and Glass C. K. (2001) Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J. Biol. Chem.* 276: 36865–36868;
- Ross R and Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis. *N Engl J Med* 295: 369–377; 420–425, 1976.
- Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340: 115–126, 1999
- Ross R. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 46: 155–169, 1986
- Rothblat G. H., et al., Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. *Journal of lipid Research* 1999; 40: 781-796
- Rothblat G. H., Favari E., et al., Cellular cholesterol flux studies: methodological considerations. *Atherosclerosis* 2002; 163: 1-8
- Ruffer M. On arterial lesions found in Egyptian mummies (158 BC-AD 525). *J Pathol Bact* 15: 453–462, 1911.
- Rye K-A, Clay MA, Barter PJ, Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors. *Atherosclerosis* 1999; 145: 227-238
- Sakai N., Yamashita S., et al., *J Clin Invest* 1995; 25: 332
- Salen G, Patel S, Batta AK. Sitosterolemia. *Cardiovasc Drug Rev.* 2002; 20:255–270.
- Salen G, Shefer S, Nguyen L, Ness GC, Tint GS, Shore V. Sitosterolemia. *J Lipid Res.* 1992; 33:945–955.
- Salen G, von Bergmann K, Lutjohann D, Kwiterovich P, Kane J, Patel SB, Musliner T, Stein P, Musser B. Ezetimibe effectively reduces plasma plant sterols in patients with sitosterolemia. *Circulation.* 2004; 109:966–971.
- Sanan D. A., Fan J., et al., *J Lipid Res* 1997; 38: 1002
- Sandison A. Degenerative vascular disease in the Egyptian mummy. *Med Hist* 6: 77–81, 1962
- Santamarina-Fojo S, Remaley AT, Neufeld EB, and Brewer HB Jr. Regulation and intracellular trafficking of the ABCA1 transporter *J Lipid Res* 42: 1339–1345, 2001;

- Santamarina-Fojo S., Genetic dyslipoproteinemias: role of lipoprotein lipase and apolipoprotein C-II. *Curr Opin Lipidol* 1992; 3: 186-195
- Savary S, Denizot F, Luciani M, Mattei M, Chimini G. Molecular cloning of a mammalian ABC transporter homologous to *Drosophila* white gene. *Mamm Genome*. 1996;7:673– 676.
- Schroder, M. and Kaufman, R.J. (2005) The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 739–789
- Schultz J. R., Tu H., Luk A., Repa J. J., Medina J. C., Li L. et al. (2000) Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev.* 14: 2831–2838
- Schwartz C., et al., Preferential utilization of free cholesterol from high density lipoproteins for biliary cholesterol secretion in man. *Science* 1978; 200: 62-64
- Schwartz K, Lawn RM, Wade DP. ABC1 gene expression and ApoAI-mediated cholesterol efflux are regulated by LXR. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;274:794–802
- Schwedhelm E, Bartling A, Lenzen H, Tsikas D, Maas R, Brummer J, Gutzki FM, Berger J, Frolich JC, and Boger RH (2004) Urinary 8-iso-prostaglandin F2 $\alpha$  as a risk marker in patients with coronary heart disease: a matched case-control study. *Circulation* 109:843–848;
- See, R.H. et al. (2002) Protein kinase A site-specific phosphorylation regulates ATP-binding cassette A1 (ABCA1)-mediated phospholipids efflux. *J. Biol. Chem.* 277, 41835–41842
- Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Brouillette CG, Venkatachalapathi YV, and Anantharamaiah GM. The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *J Lipid Res* 33: 141–166, 1992
- Shang Y. and Brown M. (2002) Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science* 295: 2465–2468
- Sharrett AR, Ballantyne CM, Coady SA, Heiss G, Sorlie PD, Catellier D, and Patsch W (2001) Coronary heart disease prediction from lipoprotein cholesterol levels, triglycerides, lipoprotein (a), apolipoproteins A-I and B, and HDL density subfractions: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation* 104: 1108–1113.;
- Shimano, H., Horton, J. D., Shimomura, I., Hammer, R. E., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1997) *J. Clin. Investig.* 99, 846–854
- Shimomura, I., Shimano, H., Horton, J. D., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (1997) *J. Clin. Investig.* 99, 838–845
- Simons, K. and Eehalt, R. (2002) Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J. Clin. Invest.* 110, 597–603
- Singaraja RR, Brunham LR, Visscher H, Kastelein JJ, and Hayden MR. Efflux and atherosclerosis: the clinical and biochemical impact of variations in the ABCA1 gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 1322–1332, 2003
- Singaraja, R.R. 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
- Singh IM, Shishehbor MH, Ansell BJ. High-Density Lipoprotein as a Therapeutic Target A Systematic Review. *JAMA*, 2007-August 15, vol 298, No. 7
- Smit JJ, Schinkel AH, Oude Elferink RP, Groen AK, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, Ottenhoff R, van der Lugt NM, van Roon MA, van der Valk MA, Offerhaus GJ, Berns AJ, Borst P. Homozygous

disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell*. 1993; 75:451–462.

Smith, J. D., W. Le Goff, M. Settle, G. Brubaker, C. Waelde, A. Horwitz, and M. N. Oda. ABCA1 mediates concurrent cholesterol and phospholipid efflux to apolipoprotein A-I. *J. Lipid Res.* 2004. 45: 635–644

Sone H, Shimano H, Shu M, Nakakuki M, Takahashi A, Sakai M, Sakamoto Y, Yokoo T, Matsuzaka K, Okazaki H, Nakagawa Y, Iida KT, Suzuki H, Toyoshima H, Horiuchi S and Yamada N (2004) Statins downregulate ATP-binding-cassette transporter A1 gene expression in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 316: 790-794

Song C., Hiipakka R. A. and Liao S. (2000) Selective activation of liver X receptor alpha by 6alpha-hydroxy bile acids and analogs. *Steroids* 65: 423–427

Song C., Hiipakka R. A. and Liao S. (2001) Auto-oxidized cholesterol sulfates are antagonistic ligands of liver X receptors: implications for the development and treatment of atherosclerosis. *Steroids* 66: 473–479;

Sowers JR. Effect of statins on the vasculature: implications for aggressive lipid management in the cardiovascular metabolic syndrome. *Am J Cardiol.* 2003; 91 (suppl): 14B-22B

Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, and Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis: a report from the committee on vascular lesions of the council on arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 92: 1355–1374, 1995

Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, and Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 320: 915–924, 1989

Sviridov D, Nestel P. Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2002; 161: 245-254

Tabas, I. (2002) Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *J. Clin. Invest.* 110, 905–911

Tachikawa M, Watanabe M, Hori S, Fukaya M, Ohtsuki S, Asashima T, Terasaki T. Distinct spatio-temporal expression of ABCA and ABCG transporters in the developing and adult mouse brain. *J Neurochem.* 2005; 95:294–304.

Takahashi Y and Smith JD. Cholesterol efflux to apolipoprotein AI involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 11358–11363, 1999

Tamasawa N., Tamasawa A. and Takebe K. (1993) Higher levels of plasma cholesterol sulfate in patients with liver cirrhosis and hypercholesterolemia. *Lipids* 28: 833–836

Tangirala R. K., Bischoff E. D., Joseph S. B., Wagner B. L., Walczak R., Laffitte B. A. et al. (2002) Identification of macrophage liver X receptors as inhibitors of atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 11896–11901

Teboul M., Enmark E., Li Q., Wikstrom A. C., Pelto-Huikko M. and Gustafsson J. A. (1995) OR-1, a member of the nuclear receptor superfamily that interacts with the 9-cis-retinoic acid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 2096–2100

Terasaka N., A. Hiroshima, T. Koieyama, N. Ubukata, Y. Morikawa, D. Nakai, and T. Inaba. 2003. T0901317, a synthetic liver X receptor ligand, inhibits development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *FEBS Lett.* 536:6-11

- Timmins, J.M. et al. (2005) Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I. *J. Clin. Invest.* 115, 1333–1342
- Tobin K. A., Ulven S. M., Schuster G. U., Steineger H. H., Andresen S. M., Gustafsson J. A. et al. (2002) Liver X receptors as insulin-mediating factors in fatty acid and cholesterol biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 277: 10691–10697
- Uehara Y, Engel T, Li Z, Goepfert C, Rust S, Zhou X, Langer C, Schachtrup C, Wiekowski J, Lorkowski S, Assmann G, and Von Eckardstein A. Polyunsaturated fatty acids and acetoacetate downregulate the expression of the ATP-binding cassette transporter A1. *Diabetes* 51: 2922–2928, 2002.
- Unno A., Takada I., Takezawa S., Oishi H., Baba A., Shimizu T. et al. (2005) TRRAP as a hepatic coactivator of LXR and FXR function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327: 933–938
- van Meer, G. et al. (2006) ABC lipid transporters: extruders, flippases, or floppase activators? *FEBS Lett.* 580, 1171–1177
- Vaughan AM, Oram JF. ABCG1 redistributes cell cholesterol to domains removable by high density lipoprotein but not by lipid-depleted apolipoproteins. *J Biol Chem.* 2005; 280:30150–30157.
- Vaughan, A.M. and Oram, J.F. (2003) ABCA1 redistributes membrane cholesterol independent of apolipoprotein interactions. *J. Lipid Res.* 44, 1373–1380
- Vedhachalam C, Liu L, Nickel M, Dhanasekaran P, Anantharamaiah GM, Lund-Katz S, Rothblat GH, and Phillips MC. Influence of ApoA-I structure on the ABCA1-mediated efflux of cellular lipids. *J Biol Chem* 279: 49931–49939, 2004
- Verschuren WM, Jacobs DR, Bloembergen BP et al. Serum total cholesterol and long-term coronary heart disease mortality in different cultures. Twenty-five-year follow-up of the seven countries study. *JAMA* 1995;274:131-136.
- Virchow R. Phlogose und Thrombose im Gefasssystem. In: *Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medizin.* Frankfurtam- Main: F. Meidinger Sohn, 1856, p. 458–521.
- Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, and Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 1262–1275, 2000
- von Bergmann K, Sudhop T, and Lütjohann D. Cholesterol and Plant Sterol Absorption: Recent Insights *Am J Cardiol* 2005;96(suppl):10D–14D
- Von Eckardstein A, Langer C, Engel T, Schaukal I, Cignarella A, Reinhardt J, Lorkowski S, Li Z, Zhou X, Cullen P, and Assmann G. ATP binding cassette transporter ABCA1 modulates the secretion of apolipoprotein E from human monocyte-derived macrophages. *FASEB J* 15: 1555–1561, 2001
- Von Eckardstein A., et al., High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *ATVB* 2001; 21: 13-27
- Wade P. A. and Wolffe A. P. (1999) Transcriptional regulation: SWItching circuitry. *Curr. Biol.* 9: R221–R224
- Wagner B. L., Valledor A. F., Shao G., Daige C. L., Bischoff E. D., Petrowski M. et al. (2003) Promoter-specific roles for liver X receptor/corepressor complexes in the regulation of ABCA1 and SREBP1 gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 23: 5780–5789;
- Wang M., Briggs M. R., HDL: The Metabolism, Function, and Therapeutic Importance. *Chem. Rev.* 2004; 104: 119-137

- Wang N, Chen W, Linsel-Nitschke P, Martinez LO, Agerholm-Larsen B, Silver DL, and Tall AR. A PEST sequence in ABCA1 regulates degradation by calpain protease and stabilization of ABCA1 by apoA-I. *J Clin Invest* 111: 99–107, 2003
- Wang N, Lan D, Chen W, Matsuura F, Tall AR. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:9774–9779.
- Wang N, Ranalletta M, Matsuura F, Peng F, Tall AR. LXR-induced redistribution of ABCG1 to plasma membrane in macrophages enhances cholesterol mass efflux to HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26:1310–1316.
- Wang, N. et al. (2000) Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1. *J. Biol. Chem.* 275, 33053–33058
- Wang, N. et al. (2001) ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) functions as a cholesterol efflux regulatory protein. *J. Biol. Chem.* 276, 23742–23747
- Wang, Y. and Oram, J.F. (2002) Unsaturated fatty acids inhibit cholesterol efflux from macrophages by increasing degradation of ATP-binding cassette transporter A1. *J. Biol. Chem.* 277, 5692–5697
- Watanabe Y. Serial inbreeding of rabbits with hereditary hyperlipidemia (WHHL-rabbit). *Atherosclerosis* 36: 261–268, 1980
- Webb N. R., et al., SR-BII, an isoform of the scavenger receptor BI containing an alternate cytoplasmic tail, mediates lipid transfer between high density lipoprotein and cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 15241
- Weissberg PL, Clesham GJ, and Bennett MR. Is vascular smooth muscle cell proliferation beneficial? *Lancet* 347: 305–307, 1996
- Wellington CL, Walker EK, Suarez A, Kwok A, Bissada N, Singaraja R, Yang YZ, Zhang LH, James E, Wilson JE, Francone O, McManus BM, Hayden MR. ABCA1 mRNA and protein distribution patterns predict multiple different roles and levels of regulation. *Lab Invest*. 2002;82: 273–283
- Wierzbicki AS et al., The lipid and non-lipid effects of statins. *Pharmacology & Therapeutics*. 2003; 99: 95-112
- Williams D. L., Rothblat G. H., et al., Scavenger receptor BI and cholesterol trafficking. *Curr Opin Lipidol* 1999; 10: 329-339
- Willson T. M., Jones S. A., Moore J. T. and Kliewer S. A. (2001) Chemical genomics: functional analysis of orphan nuclear receptors in the regulation of bile acid metabolism. *Med. Res. Rev.* 21: 513–522
- Willy P. J. and Mangelsdorf D. J. (1997) Unique requirements for retinoid-dependent transcriptional activation by the orphan receptor LXR. *Genes Dev.* 11: 289–298
- Willy P. J., Umesono K., Ong E. S., Evans R. M., Heyman R. A. and Mangelsdorf D. J. (1995) LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev.* 9: 1033–1045
- Wilson PW (1990) High-density lipoprotein, low-density lipoprotein and coronary artery disease. *Am J Cardiol* 66:7A–10A.
- Wong J, Quinn CM and Brown AJ (2004) Statins inhibit synthesis of an oxysterol ligand for the Liver X Receptor in human macrophages with consequences for cholesterol flux. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 24: 1-7
- Wong, J. et al. (2006) SREBP-2 positively regulates transcription of the cholesterol efflux gene, ABCA1 by generating oxysterol ligands for LXR. *Biochem. J.* 400, 485–491

- Yamashita S., Sprecher D., et al., . J Clin Invest 1990; 86: 688
- Yamauchi Y, Chang CC, Hayashi M, Abe-Dohmae S, Reid PC, Chang TY, and Yokoyama S. Intracellular cholesterol mobilization involved in the ABCA1/apolipoprotein-mediated assembly of high density lipoprotein in fibroblasts. J Lipid Res 45: 1943–1951, 2004
- Yamauchi Y, Hayashi M, Abe-Dohmae S, and Yokoyama S. ApoA-I activates PKC $\alpha$  signaling to phosphorylate and stabilize ABCA1 for the HDL assembly. J Biol Chem. 278: 47890–47897, 2003
- Yancey P.G., A.E. Bortnick, G. Kellner-Weibel, M. de la Llera-Moya, M.C. Phillips, and G.H. Rothblat. 2003. Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 23:712-719.
- Yancey P. G., de la Llera-Moya M., et al., High-density lipoprotein phospholipid composition is a major determinant of the bi-directional flux and net movement of cellular free cholesterol mediated by scavenger receptor B1. Journal of Biological Chemistry 2000; 275: 36596-36604
- Yancey P. G., Rothblat G. H., et al., In vivo modulation of HDL phospholipids has opposing effects on SR-BI and ABCA1 mediated cholesterol efflux. Journal of Lipid Research 2004; 45(2): 337-346
- Yang, C. et al. (2006) Sterol intermediates from cholesterol biosynthetic pathway as LXR ligands. J. Biol. Chem. 281, 27816–27826;
- Yao, P.M. and Tabas, I. (2000) Free cholesterol loading of macrophages induces apoptosis involving the fas pathway. J. Biol. Chem. 275, 23807–23813
- Yao, P.M. and Tabas, I. (2001) Free cholesterol loading of macrophages is associated with widespread mitochondrial dysfunction and activation of the mitochondrial apoptosis pathway. J. Biol. Chem. 276, 42468–42476;
- Yokoyama S., Release of cellular cholesterol: molecular mechanism for cholesterol homeostasis in cells and in body. Biochim Biophys Acta 2000; 1529: 231-244
- Yoshikawa T., Shimano H., Amemiya-Kudo M., Yahagi N., Hasty A. H., Matsuzaka T. et al. (2001) Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter. Mol. Cell. Biol. 21: 2991–3000
- Yoshikawa T., Shimano H., Yahagi N., Ide T., Amemiya-Kudo M., Matsuzaka T. et al. (2002) Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements. J. Biol. Chem. 277: 1705–1711
- Yu L, von Bergmann K, Lutjohann D, Hobbs HH, Cohen JC. Ezetimibe normalizes metabolic defects in mice lacking ABCG5 and ABCG8. J Lipid Res. 2005; 46:1739 –1744.
- Yu L, York J, von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC, Hobbs HH. Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8. J Biol Chem. 2003;278:15565–15570.
- Yuejin Yu and Allan Bradley, Engineering Chromosomal Rearrangements In Mice, Nature, October, 2: 780-790, (2001)
- Zanotti I, Favari E, Sposito AC, Rothblat GH and Bernini F. Pitavastatin increases ABCA1-mediated lipid efflux from Fu5AH rat hepatoma cells Biochem Biophys Res Commun. 2004; 321: 670-674
- Zanotti I, Poti F, Favari E, Steffensen KR, Gustafsson JA and Bernini F Pitavastatin effect on ATP Binding Cassette A1-Mediated Lipid Efflux from Macrophages: Evidence for Liver X Receptor (LXR)-Dependent and LXR-Independent Mechanisms of Activation by cAMP. J Pharm Experim Therap. 2006; 317: 395-401

Zhang H, Reddick RL, Piedrahita JA, and Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein-E. *Science* 258: 468–471, 1992

Zhang Y, Zanotti I, Reilly MP, Glick JM, Rothblat GH, Rader DJ. Overexpression of apolipoprotein A-I promotes reverse transport of cholesterol from macrophages to feces in vivo. *Circulation*. 2003;108: 661–663

Zhao Y. Y., Marcel Y., Serum albumine is a significant intermediate in cholesterol transfer between cells and lipoproteins. *Biochem* 1996; 35: 7174-7180

Zheng, B. et al. Engineering a mouse balancer chromosome. *Nature Genet.* 22, 375–378 (1999)

Zhou X, Engel T, Goepfert C, Erren M, Assmann G, and von Eckardstein A. The ATP binding cassette transporter A1 contributes to the secretion of interleukin 1beta from macrophages but not from monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 291: 598–604, 2002