

REVIEW

CASCATA LIPOLITICA INTRAVASCOLARE DELLE LIPOPROTEINE RICCHE IN TRIGLICERIDI: VECCHI E NUOVI PROTAGONISTI

Intravascular lipolytic cascade of triglyceride rich lipoproteins: old and new players

SEBASTIANO CALANDRA¹, STEFANO BERTOLINI²

¹Dipartimento di Scienze Biomediche, Metaboliche e Neuroscienze, Università di Modena e Reggio Emilia; ²Dipartimento di Medicina Interna, Università di Genova

SUMMARY

The intravascular "lipolytic cascade" is the process whereby triglycerides (TGs) located in the core of TG-rich lipoproteins (TGr-Lps) (chylomicrons and VLDL) are hydrolyzed by the enzyme Lipoprotein Lipase (LPL). LPL is located on the endoluminal surface of capillary endothelial cells and acts as an omodimer; its activity requires the presence of apolipoprotein C-II (ApoC-II), a protein constituent of TGs-Lps. The lipolytic cascade is made possible and is regulated by other factors, some of which have been identified in the last decade. These factors either facilitate/promote or inhibit LPL activity. The apolipoprotein A-V (Apo A-V), a minor protein constituent of TGr-Lps, facilitates the activity of LPL bound to heparin-sulfate or other components of endothelial cell membrane. Other molecules required for an efficient lipolytic cascade are structural components of either endothelial cells (like the Glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein-1, GPIHBP1) or other cells (like miocytes and adipocytes) which produce and secrete LPL (like Lipase Maturation Factor 1, LMF1). GPIHBP1 acts as a molecular platform that brings together TGr-Lps, LPL, ApoC-II and ApoA-V. LMF1 plays a key role in assembly of two inactive LPL monomers, produced by adipocytes and miocytes, producing the active omodimeric structure of LPL, and in maintaining this configuration during the secretion of the enzyme into the extracellular space. The lipolytic cascade is inhibited by Apolipoprotein C-III (ApoC-III) and by three members of the family of the "angiopoietin like" (ANGPTL) proteins. Apo C-III displaces LPL from its substrate, while ANGPTL-3, ANGPTL-4 and ANGPTL-8 bind LPL and either promote its degradation by proteolytic enzymes or the irreversible disruption of its biologically active omodimeric structure.

Keywords: *Intravascular lipolytic cascade; Lipoprotein Lipase; Apolipoprotein C-II; Apolipoprotein C-III; Apolipoprotein A-V; Lipase Maturation Factor 1; GPIHBP1; Angiopoietin-like proteins.*

Indirizzo per la corrispondenza
Sebastiano Calandra
Dipartimento di Scienze Biomediche
Metaboliche e Neuroscienze,
Università di Modena e Reggio Emilia
Via Campi, 287 - 41125 Modena
E-mail: sebcald@unimore.it

Introduzione

Le lipoproteine plasmatiche sono macromolecole che contengono una parte centrale (core) idrofobica, costituita da trigliceridi ed esteri del colesterolo, ed una parte periferica composta da un mo-

nostrato di fosfolipidi, colesterolo non esterificato ed apolipoproteine. Per lipoproteine ricche in trigliceridi (TGr-Lps) si intendono in senso stretto due classi di lipoproteine secrete rispettivamente dall'intestino (chilomicroni) e dal fegato (lipoproteine a bassissima densità, VLDL). I chilomicroni si formano nell'enterocita a seguito dell'assorbimento di acidi grassi (FAs) e monogliceridi (MGs) dal lume intestinale, a cui segue la loro successiva ri-esterificazione con il glicerolo per riformare TGs. Nell'enterocita i TGs sono incorporati nei chilomicroni, macromolecole di grandi dimensioni, che hanno come componente proteica strutturale la apolipoproteina B-48 (ApoB-48). I TGs di origine endogena, sintetizzati nel fegato, sono incorporati in macromolecole lipoproteiche più piccole (VLDL), nelle quali la componente proteica strutturale è costituita dall'apolipoproteina B-100 (ApoB-100).

I TGs svolgono un ruolo importante nel consentire il trasporto e la disponibilità di acidi grassi (FAs) per soddisfare il fabbisogno dei tessuti. Gli FAs sono molecole con multiple funzioni biologiche, come componenti dei lipidi delle membrane biologiche, come substrati la cui ossidazione rende disponibile energia, e come molecole che hanno funzione di secondi messaggeri. Gli FAs hanno una scarsa solubilità in acqua, formano strutture micellari a basse concentrazioni, e possono essere dannosi per la cellula al di sopra di determinate concentrazioni. Per evitare effetti "potenzialmente tossici" gli FAs sono coniugati con il glicerolo per formare TGs che essendo biologicamente inerti possono essere veicolati nel plasma (incorporati in lipoproteine) e mantenuti all'interno delle cellule (contenuti in goccioline lipidiche, "lipid droplets") fungendo da riserva per la disponibilità di FAs. In

caso di necessità i TGs, sia quelli trasportati nelle lipoproteine che quelli intracellulari, sono idrolizzati da specifiche lipasi (trigliceride idrolasi) che rendono rapidamente disponibili gli FAs. Questa lipolisi avviene quindi sia nel compartimento plasmatico (lipolisi intravascolare o cascata lipolitica intravascolare) che all'interno delle cellule in vari tessuti (lipolisi intracellulare) (1).

Questa breve rassegna si propone di rivisitare la "cascata lipolitica intravascolare" delle TGr-Lps alla luce delle nuove conoscenze, emerse nel corso dell'ultima decade, che hanno reso possibile l'identificazione di nuovi protagonisti di questo processo e le loro interazioni con i protagonisti già conosciuti da tempo.

Ruolo della Lipasi Lipoproteica (LPL)

L'idrolisi dei TGs dei chilomicroni e delle VLDL avviene all'interno della circolazione capillare ad opera dell'enzima Lipasi Lipoproteica (LPL), presente sulla superficie endoluminale del rivestimento endoteliale dei capillari stessi. La LPL rappresenta il "protagonista chiave" della cascata lipolitica, idrolizzando più del 70% dei TGs contenuti nei chilomicroni e nelle VLDL, liberando FAs (che si legano all'albumina ed vengono trasferiti ai vari tessuti) e generando lipoproteine residue (denominate rispettivamente chilomicroni "remnants" e lipoproteine a densità intermedia) (2, 3).

La LPL è una proteina di 474 aminoacidi nella sua forma nascente e di 448 aminoacidi nella sua forma matura, che si genera a seguito della rimozione del peptide segnale. La porzione N-terminale della proteina (corrispondente ai primi 312 aminoacidi) contiene il sito attivo; la porzione C-terminale contiene il dominio di legame con i lipidi substrato (TGs)

(Figura 1). La LPL possiede una grande affinità per l'eparina e per i glicosaminoglicani (eparansolfati) che si trovano sulla superficie endoluminale delle cellule endoteliali; il principale sito di legame per questi composti è costituito da sequenze di aminoacidi con carica positiva che si trovano nel dominio C-terminale della LPL (aminoacidi 402-407) (1-3).

La LPL è prodotta e secreta da alcuni tessuti (in particolare il tessuto adiposo, il tessuto muscolare cardiaco e quello scheletrico) ed è attiva in forma omodimerica; nello specifico, due molecole di LPL si dispongono “testa coda” nel senso che il dominio di legame per i TGs (dominio C-terminale) di una molecola presenta il substrato (TG) al dominio catalitico (dominio N-terminale) della molecola “partner” (Figura 1). La ragione per la quale LPL sia attiva solo in forma di dimero non è chiara. È stato suggerito che questa organizzazione molecolare potrebbe consentire

un più facile controllo post-traduzionale da parte di alcuni inibitori “fisiologici” della LPL, come la angiopoietin-like protein-3 (ANGPTL-3) e la angiopoietin like protein-4 (ANGTLP-4) (vedi oltre) (1-3). Il meccanismo attraverso il quale la LPL, sintetizzata nelle cellule muscolari e negli adipociti, raggiunge la superficie endoluminale dell'endotelio dei capillari è stato per molto tempo un “mistero”, che solo da qualche anno è stato chiarito, a seguito della scoperta della proteina GPIHBP1 (vedi oltre). Questa molecola si è rivelata avere diversi ruoli tra cui quello di trasportare la LPL biologicamente attiva (in forma dimerica) dalla regione sotto endoteliale alla superficie endoluminale dell'endotelio. (1). La LPL, ancorata ai glicosaminoglicani ed altre molecole presenti sulla superficie endoteliale (come GPIHBP1), viene rilasciata nel torrente circolatorio a seguito di una iniezione endovenosa di eparina. Questa procedura consente di de-

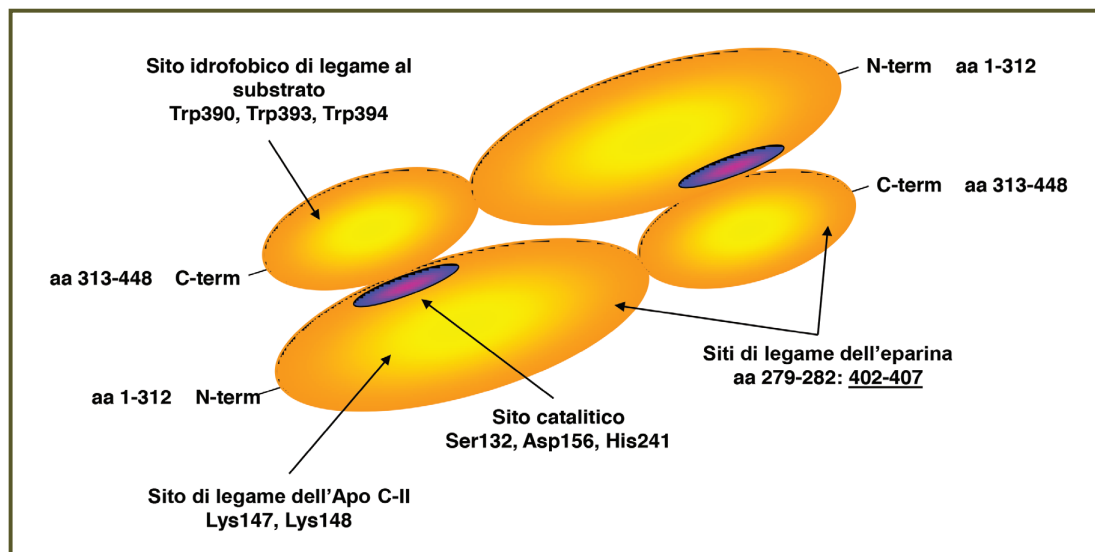


Figura 1 - Rappresentazione della struttura del dimero dell'enzima Lipasi Lipoproteica (LPL). La LPL è attiva come omodimero, che ha una disposizione testa-coda: il dominio N-terminale (contenente il sito catalitico) di una molecola di LPL interagisce con il dominio C-terminale (contenente il sito di legame con il substrato) della molecola “partner”. Il dominio N-terminale contiene anche il sito di legame per l'apolipoproteina C-II (Apo-CII), attivatore fisiologico della LPL. La LPL ha multipli siti di legame con l'eparina.

terminare l'attività e la massa della LPL in un campione di sangue prelevato 10 minuti dopo l'iniezione endovenosa di eparina (attività lipasica post-eparinica).

Poiché l'iniezione di eparina determina il rilascio anche della lipasi epatica (HL) è necessario usare metodi di dosaggio che consentano di differenziare le due attività enzimatiche presenti nel campione di sangue in esame (1).

Attivatori/promotori dell'attività della Lipasi Lipoproteica. Ruolo della apolipoproteina C-II

La LPL "di per se" ha una modesta attività enzimatica; questa viene fortemente amplificata dalla presenza di un attivatore, la apolipoproteina C-II (ApoC-II). La ApoC-II è una singola catena di 79 aminoacidi che contiene:

- 1) un dominio N-terminale fortemente anfipatico che è capace di legare lipidi;
- 2) un dominio C-terminale che è responsabile dell'attivazione della LPL.

L'ApoC-II orienterebbe il substrato lipidico (TGs) verso il sito attivo della LPL rendendo quindi più facile l'accesso dell'enzima al substrato.

L'ApoC-II circola nel plasma come componente di superficie di chilomicroni, VLDL e HDL; essa può facilmente scambiarsi fra le varie frazioni lipoproteiche.

Nei soggetti normolipidemicici la concentrazione plasmatica di ApoC-II è intorno ai 4 mg/dl (4).

Promotore dell'attività della Lipasi Lipoproteica. Ruolo della apolipoproteina A-V (Apo A-V)

L'ApoA-V è una proteina di 366 aminoacidi sintetizzata dal fegato e presente nel plasma nella sua forma matura contenente 343 aminoacidi.

È codificata da un gene localizzato sul cromosoma 11 (11q23) nella regione che contiene anche i geni codificanti per la apolipoproteina A-I (ApoA-1), la apolipoproteina C-III (ApoC-III) e la Apolipoprotein A-IV (Apo A-IV).

Si trova nel plasma in forma monomerica a concentrazioni molto basse (50-500 µg/dl), associata a chilomicroni, VLDL e HDL.

L'osservazione che l'inattivazione del gene *ApoA5* nei topi si associava ad ipertrigliceridemia, mentre l'opposto si osservava nei topi che sovra-esprimevano questo gene, ha suggerito che l'ApoA-V rivestisse un ruolo importante nel controllo della trigliceridemia (5-7).

Il meccanismo con cui l'ApoA-V interviene nel metabolismo dei trigliceridi non è completamente chiaro.

Vi sono evidenze che questo controllo si eserciti attraverso:

- 1) un'inibizione della produzione/secrezione di VLDL nel fegato;
- 2) una stimolazione dell'attività della LPL che si esplica quando l'enzima si trova legato ai proteoglicani o alla piattaforma molecolare GPIHBP1, presenti sulla superficie endoluminale delle cellule endoteliali (vedi oltre).

Sulla superficie endoteliale l'ApoA-V non agirebbe come attivatore diretto della LPL, ma come un "facilitatore" che favorisce l'interazione fra TGr-Lps, piattaforma molecolare (GPIHBP1), Apo C-II ed LPL (*Figura 2*).

È anche stato suggerito che l'Apo A-V favorisca la clearance dei "remnants" delle TGr-Lps da parte di recettori epatici.

Infatti l'Apo A-V si è dimostrata interagire con i recettori della famiglia del recettore delle LDL (LDL-R) attraverso sequenze di aminoacidi basici localizzati nella regione N-terminale (aminoacidi 186-227) (5-7).

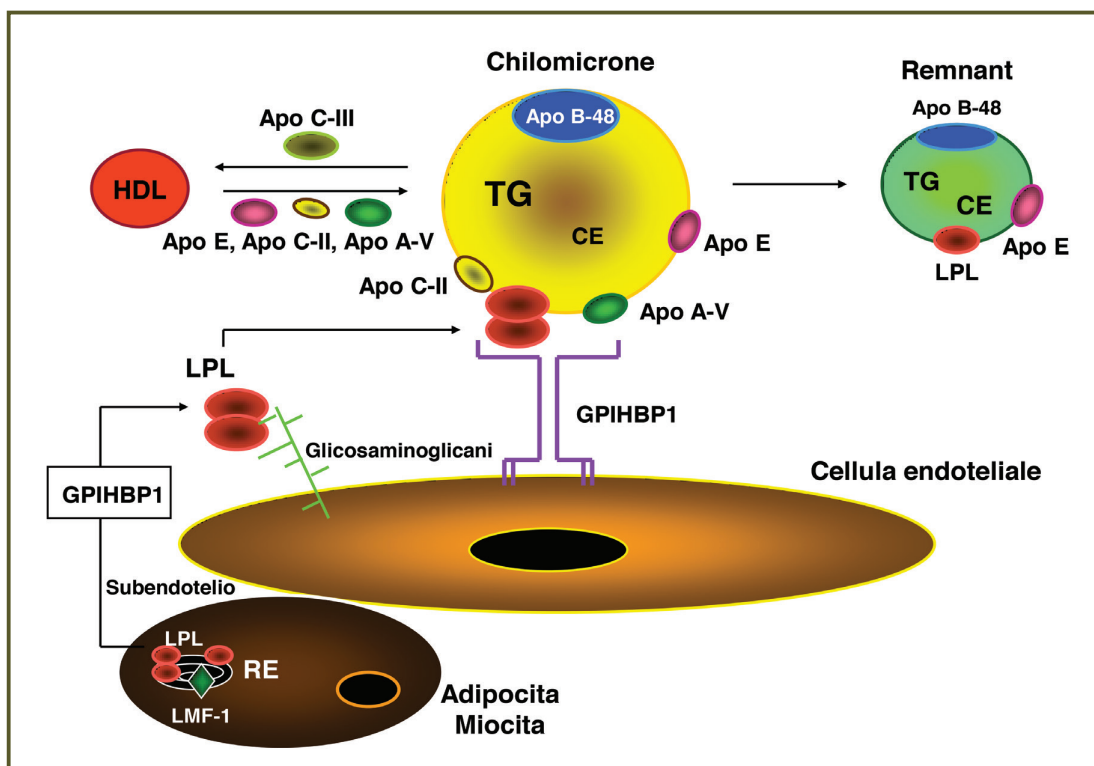


Figura 2 - Modello di interazione fra le molecole che partecipano al processo della “cascata lipolitica intravascolare”. La LPL sintetizzata e stabilizzata in forma di omodimero viene secreta nella regione sotto-endoteliale dalle cellule del muscolo scheletrico e cardiaco (miociti) e dalle cellule del tessuto adiposo (adipociti). Il trasferimento del dimero di LPL dallo spazio sotto-endoteliale alla superficie endo-luminale delle cellule endoteliali è mediato dall'intervento della proteina GPIHBP1 (vedasi figura 5 per dettagli). La LPL in parte si lega a glicosaminoglicani ed in parte interagisce con la proteina GPIHBP1 che costituisce la piattaforma molecolare sulla quale avviene il processo di lipolisi. Questa piattaforma infatti facilita l'interazione della LPL con i chilomicroni e le apolipoproteine Apo C-II e Apo A-V che sono attivatori della LPL. L'idrolisi dei trigliceridi si traduce da un lato nella liberazione di acidi grassi e dall'altro nella formazione di lipoproteine residue (remnants) che sono catturate selettivamente dal fegato. Dall'idrolisi dei trigliceridi dei chilomicroni, si genera un rilascio di fosfolipidi dalla superficie degli stessi, che andranno a costituire HDL nascenti. Le HDL circolanti contengono varie apolipoproteine che si trasferiscono sulla superficie dei chilomicroni facilitandone la lipolisi (come nel caso dell'ApoC-II e ApoA-V) o viceversa inibendola (come nel caso dell'Apo C-III).

Fattore di maturazione della Lipasi Lipoproteica e della Lipasi Epatica (Lipase Maturation Factor I, LMF1)

La scoperta di LMF1 si deve allo studio di un ceppo mutante di topi affetti da una ipertrigliceridemia severa a trasmissione recessiva, che è risultata essere dovuta ad un difetto di attività della Lipasi Lipoproteica (LPL) e della Lipasi Epatica

(HL). Si trattava quindi di un singolare “difetto combinato” che non risultava essere dovuto a mutazioni dei geni *LPL* e *HL* né a riduzione dei rispettivi mRNA. Ciò suggeriva il coinvolgimento di qualche “fattore” capace di controllare l'attività di LPL e HL a livello post-trascrizionale. Questo fattore (denominato Lipase Maturation Factor 1, LMF1) è stato identificato e la sua attività biologica è stata

caratterizzata. LMF1 è una proteina intracellulare inserita nella membrana del reticolo endoplasmatico, che possiede 5 domini transmembrana, un dominio N-terminale citoplasmatico ed un dominio C-terminale che protrude nel lume del reticolo endoplasmatico (*Figura 3*) (8). Indicazioni sulla sua funzione sono derivate dall'osservazione che la sua assenza ha impatto solo su quelle Lipasi che agiscono come omodimero, quali LPL e la HL. Ciò ha suggerito che LMF1 fosse un fattore facilitante la formazione degli omodimeri e/o la loro stabilizzazione

nel processo di secrezione delle Lipasi dal tessuto adiposo/muscolare cardiaco o scheletrico (nel caso della LPL) e tessuto epatico (nel caso della HL). Quindi LMF1 può essere considerato “un fattore cruciale” per consentire alla LPL di mantenersi nella sua configurazione biologicamente attiva (quella omodimerica) nel transito dalla sua sede di produzione fino alla sua destinazione finale sulla superficie endoluminale delle cellule endoteliali. In assenza di LMF1 il dimer non si forma o, se si forma, è fortemente instabile, provocando la successiva aggregazione

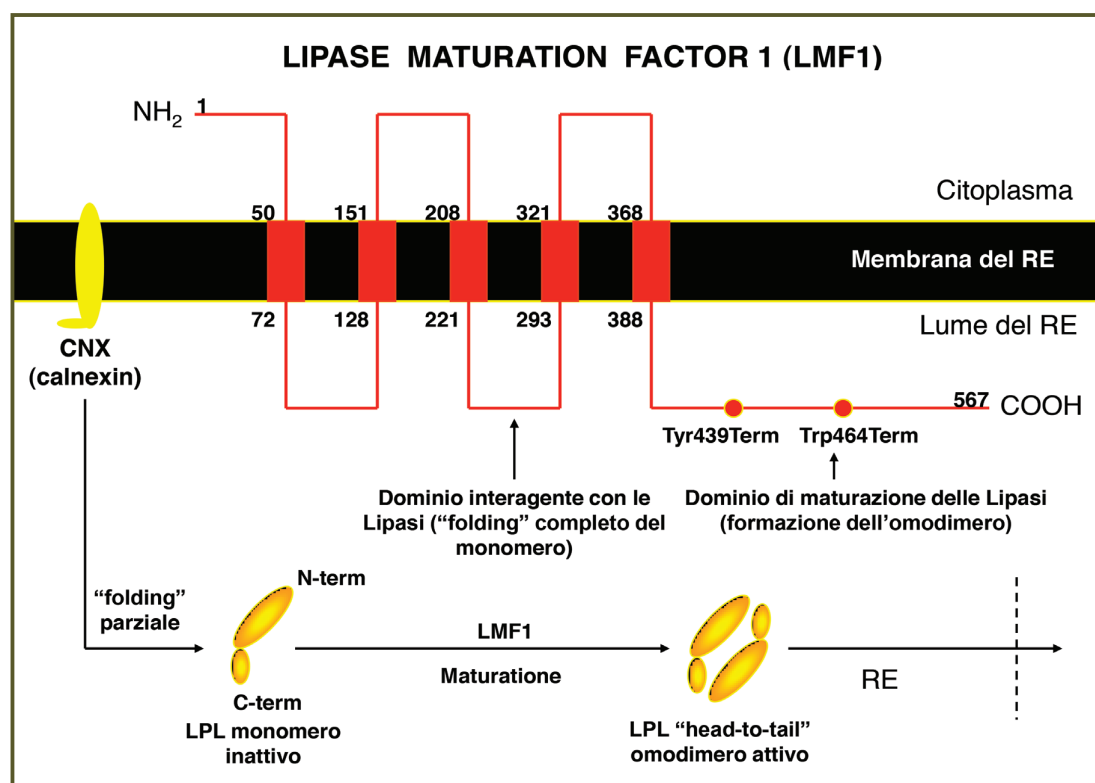


Figura 3 - Rappresentazione della struttura e funzione della proteina LMF1 (Lipase Maturation Factor 1). LMF1 è una proteina intracellulare ancorata alle membrane del reticolo endoplasmatico (RE). L'estremità N-terminale si trova nel citoplasma mentre quella C-terminale si proietta nel lume del RE. LMF1 interviene potenziando l'azione della calnexina (CNX) nel determinare l'avvolgimento (folding) del monomero di LPL, facilitando la formazione dell'omodimero di LPL e garantendone la stabilizzazione durante il suo transito nel lume del reticolo endoplasmatico fino alla secrezione nello spazio extracellulare. Nella figura viene evidenziato il dominio della proteina LMF1 che interagisce con la LPL determinandone il "folding" completo (secondo "loop" nel lume RE) ed il dominio C-terminale che provvede alla formazione dell'omodimero.

dei monomeri in sovrastrutture più grandi (polimeriche) non funzionali e destinate ad una rapida degradazione (8-10).

GPIHBP1: La piattaforma molecolare della cascata lipolitica sulla superficie endoteliale

Nel 2007 la proteina GPIHBP1 (Glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein-1) era nota come una proteina ancorata all'endotelio (GPI-anchored) capace di legare le HDL. Quale fosse il suo ruolo nel meta-

bolismo lipoproteico (in modo specifico delle HDL) era del tutto ignoto. Il suo rapporto con il metabolismo dei trigliceridi è emerso dallo studio di topi in cui il gene codificante questa proteina era stato inattivato (topi *Gpihbp1*^{-/-}). Tali topi presentavano un marcata ipertrigliceridemia (con livelli di trigliceridi compresi tra 3.000 a 5.000 mg/dl) che si accentuava a seguito della somministrazione di una dieta ricca in lipidi (Western Type of Diet). La localizzazione endoteliale di GPIHBP1 ha suggerito che questa proteina fosse, in qualche modo, coinvolta nella cascata li-

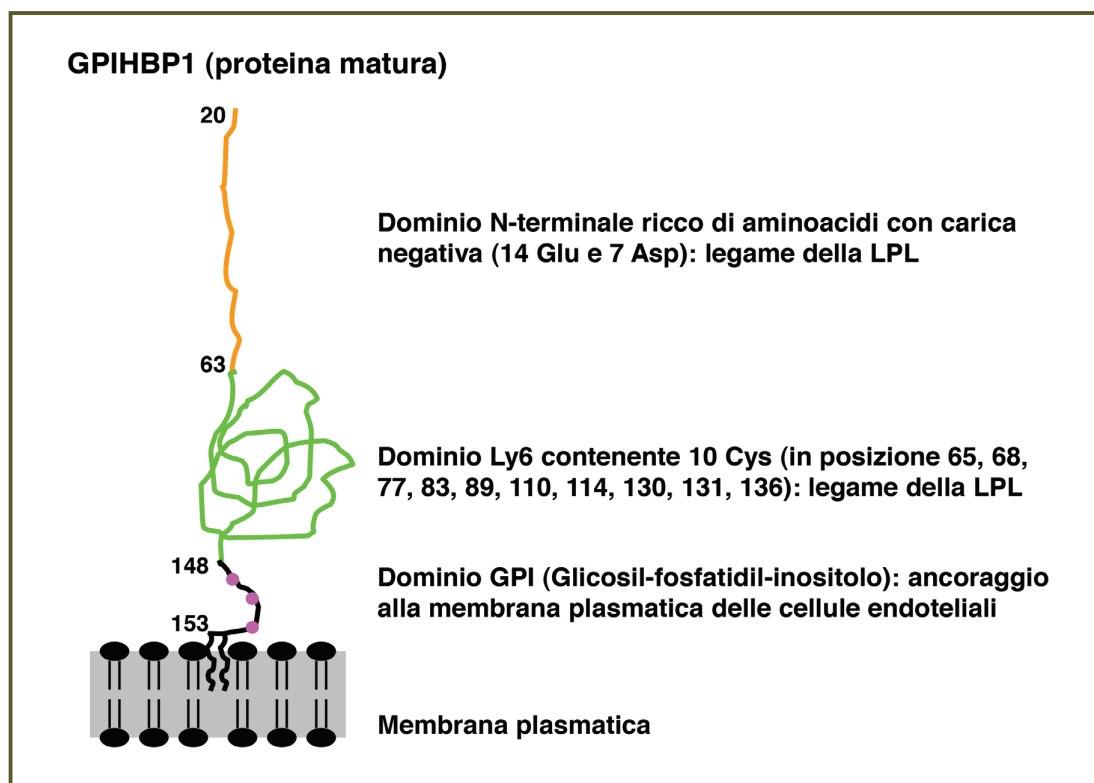


Figura 4 - Struttura monometrica della proteina GPIHBP1, che come omodimero (Figura 2) costituisce la piattaforma molecolare sull'endotelio che permette il processo di lipolisi. GPIHBP1 è ancorata alla membrana plasmatica, contiene un dominio ricco in cisteine (indicato in verde e denominato Ly6) ed un dominio N-terminale con carica negativa (dovuta ad un elevato numero di residui di acido glutammico ed acido aspartico). Il dominio Ly6 ed il dominio N-terminale sono coinvolti nel legame con la Lipasi Lipoproteica (LPL). La proteina nascente subisce il distacco della porzione C-terminale (amino acidi 154-184) ad opera di una transamidasi e la sostituzione di tale porzione con una molecola di Glicosil-fosfatidil-inositolo che ancorano la proteina alla membrana plasmatica.

politica mediata dalla LPL. L'osservazione che GPIHBP1 legava avidamente la LPL in vitro ha suggerito l'idea che questa proteina, ancorata all'endotelio, servisse come piattaforma molecolare consentendo la multipla interazione della LPL con il substrato (TGr-Lps) e con i suoi attivatori/facilitatori (Apo C-II ed Apo A-V). Gli studi biochimici hanno dimostrato che GPIHBP1 umana è una proteina di 184 aminoacidi che possiede diversi domini molecolari ben distinti quali:

1) una sequenza di aminoacidi carichi negativamente alla sua estremità N-terminale;

2) un dominio definito Ly6 (dominio comune ad una famiglia di proteine chiamate "Lymphocyte antigen 6 proteins"), comprendente circa 80 aminoacidi e contenente 10 cisteine. Queste cisteine, attraverso la formazione di una serie di ponti disolfuro, generano una struttura ripiegata che ripropone un'immagine di tre dita (three fingered structure);

3) un dominio GPI (Glycosyl Phosphatidyl Inositol) nella regione C-terminale (Figura 4).

La sequenza di aminoacidi con carica negativa e la sequenza Ly6 conferiscono

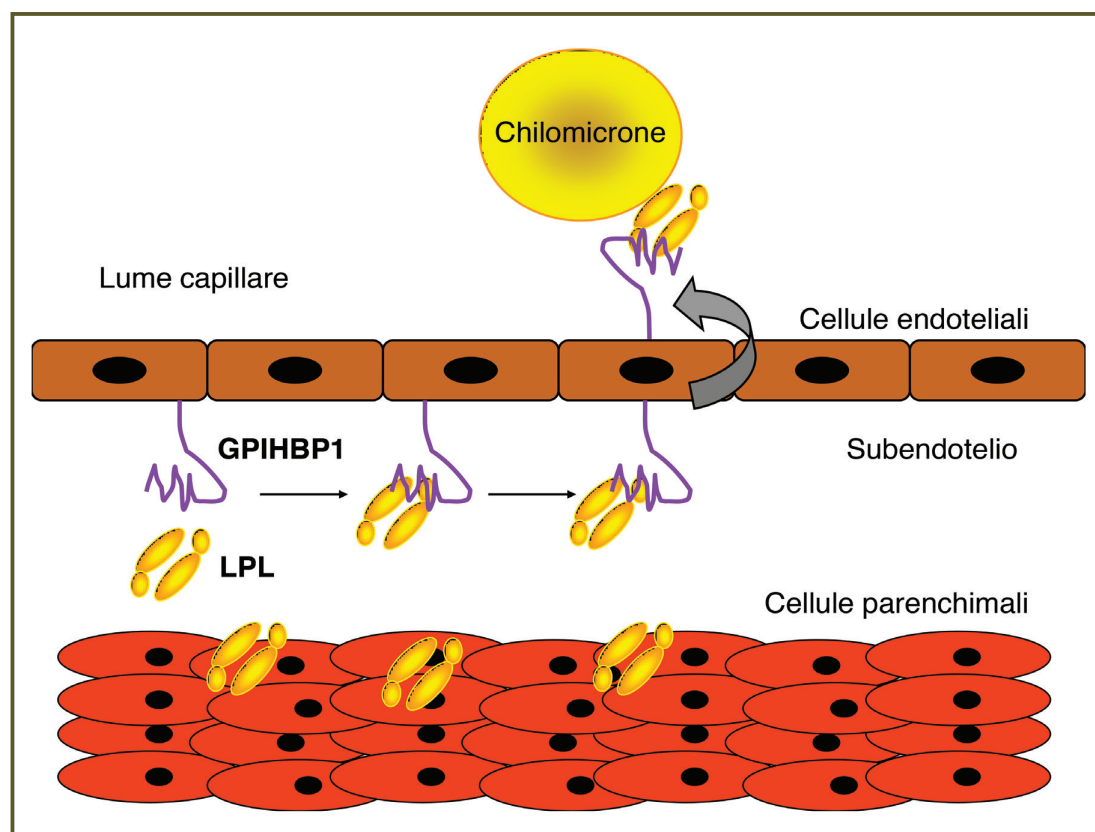


Figura 5 - Funzioni della proteina GPIHBP1. Interagendo con il dimero di Lipasi Lipoproteica (LPL), la proteina GPIHBP1 trasferisce la LPL (secreta dalle cellule parenchimali, quali miociti e adipociti) dallo spazio sotto-endoteliale alla superficie endo-luminale dell'endotelio. Su questa superficie GPIHBP1 assume il ruolo di piattaforma molecolare consentendo l'interazione fra i vari componenti della cascata lipolitica come illustrato nella Figura 2.

no alla molecola la proprietà di legare la LPL, mentre il dominio GPI è cruciale per garantire l'ancoraggio della molecola alla membrana plasmatica delle cellule endoteliali (11, 12). Gli studi successivi hanno dimostrato che i topi *Gpihbp1*^{-/-} hanno normali livelli di LPL tissutale, ma essa non è posizionata in modo corretto sulla superficie endoteliale, quindi non è nelle condizioni di interagire con il substrato (TGr-Lps) e gli attivatori.

Questa mancata localizzazione della LPL sull'endotelio è dovuta al fatto che GPIHBP1 è un fattore necessario per trasportare la LPL dalla regione sotto-endoteliale alla sua destinazione finale sulla superficie endoluminale (Figura 5). Questa azione di trasporto operata da GPIHBP1 è stata dimostrata sia in vitro che in vivo. In particolare nei topi *Gpihbp1*^{-/-} non si osserva LPL localizzata sulla superficie endoluminale dell'endotelio, mentre essa è ben visibile alla periferia delle cellule parenchimali (miociti e adipociti), presenti nella regione sotto endoteliale e responsabili della produzione e secrezione della LPL (11, 12).

Inibitori della Cascata Lipolytica: il caso della Apolipoproteina C-III

La ApoC-III è un singolo peptide di 79 aminoacidi, sintetizzato dal fegato e dall'intestino, la cui concentrazione plasmatica in individui normolipidemic è ~10 mg/dl mentre in soggetti con ipertrigliceridemia può raggiungere anche 30 mg/dl. La ApoC-III è una componente proteica di chilomicroni, VLDL ed HDL con la possibilità di scambiarsi fra queste classi di lipoproteine. Fino dagli anni '70 l'Apo C-III è stata associata al metabolismo dei trigliceridi, a seguito della dimostrazione che questa proteina inibiva l'attività LPL in vitro ed i livelli plasmatici di ApoC-III

erano correlati con i livelli di trigliceridi (13, 14). Tuttavia l'inibizione della LPL non era l'unico meccanismo attraverso il quale l'ApoC-III influenzava il metabolismo dei trigliceridi. Infatti l'ApoC-III si è rivelata stimolare l'assemblaggio e secrezione delle VLDL da parte del fegato così come rallentare la clearance epatica recettore-mediata delle lipoproteine "remnants" (13-15). Un'importante dimostrazione del ruolo dell'ApoC-III nella regolazione dei livelli plasmatici dei trigliceridi è emersa dallo studio di individui eterozigoti per una mutazione del gene *APOC3* che induce la formazione di un'ApoC-III tronca di soli 18 aminoacidi (Arg19Term) completamente inattiva.

I portatori eterozigoti di questa mutazione hanno livelli plasmatici di trigliceridi ridotti del 50% rispetto ai soggetti non portatori, sia in condizioni di digiuno che nella fase post-prandiale (16). Un fenomeno analogo si osserva nei topi knock out (*ApoC3*^{-/-}) nei quali i livelli di trigliceridi a digiuno sono ridotti del 70% e la ipertrigliceridemia post-prandiale è praticamente abolita. In questi animali la clearance dei chilomicroni è più rapida rispetto agli animali di controllo, a suggerire un'efficiente cascata lipolitica intravascolare ed una rapida rimozione dei chilomicroni residui (17). Recentemente è stato dimostrato che l'Apo C-III, quando presente sulla superficie delle TGr-Lps, previene il legame LPL e TGs all'interfaccia fase lipidica/fase acquosa. Questa proprietà è conferita da una sequenza di aminoacidi idrofobici presenti nella parte centrale dell'ApoC-III. Inoltre l'aggiunta di Apo-CIII a particelle ricche in trigliceridi destabilizza l'interazione LPL- TGs, rendendo la LPL più suscettibile alla inattivazione irreversibile da parte di alcuni inibitori come la angiopoietin-like protein 4 (ANGPTL4) (vedi oltre) (18).

Inibitori della Cascata Lipolitica: il caso di alcune proteine della famiglia delle proteine "Angiopietin-like"

Studi condotti nell'ultima decade hanno evidenziato il ruolo inibitorio sulla "cascata lipolitica intravascolare" di alcune glicoproteine plasmatiche appartenenti alla famiglia delle proteine "angiopietin-like" (ANGPTLs). Questa famiglia è costituita da 8 membri, 7 dei quali presentano analogie strutturali con le angiopietine "propriamente dette" (come le angiopietine 1 e 2), ma hanno un modesto o trascurabile effetto di induzione dell'angio-

genes. Tre membri di questa famiglia e precisamente: la angiopietin-like protein 3 (ANGPTL-3), l'angiopietin like protein-4 (ANGPTL-4) e l'angiopietin-like protein 8 (ANGPTL-8) (anche denominata Lipasin o Betatrofina) rivestono un ruolo importante nel metabolismo lipidico, in particolare nel metabolismo dei trigliceridi (19-23). Queste tre molecole infatti esercitano un'inibizione non competitiva sulla Lipasi Lipoproteica. La ANGPTL-3 è una glicoproteina di 460 aminoacidi secreta dal fegato e presente nel plasma a concentrazioni comprese fra 50-800 ng/ml. La ANGPTL-4 è una glicoproteina di 406 aminoacidi, prodotta da diversi tessuti fra

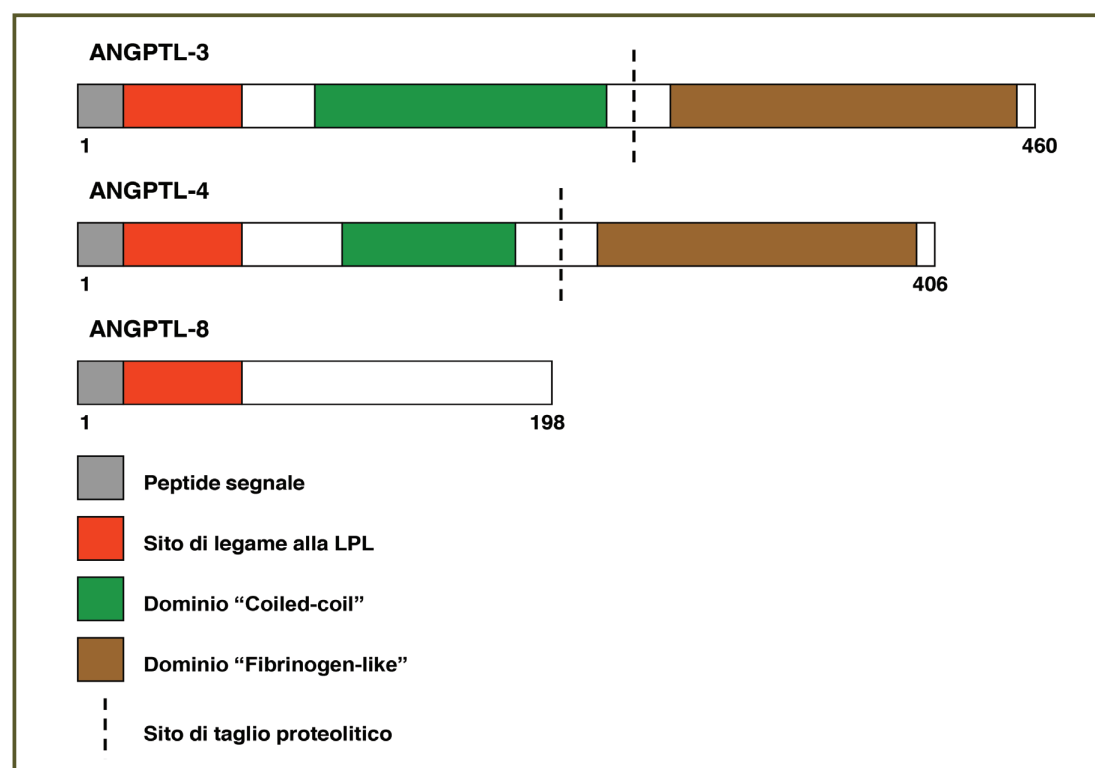


Figura 6 - Struttura di alcuni membri della famiglia delle proteine "angiopietino-simili" (angiopietin-like, ANGPTL). La ANGPTL-3 ed la ANGPTL-4 hanno una struttura simile in cui sono riconoscibili quattro domini. Entrambe subiscono un clivaggio proteolitico (indicato dalla linea verticale tratteggiata), che libera il dominio N-terminale nel quale risiede il sito di legame per la Lipasi Lipoproteica (LPL). La ANGPTL-8 è una proteina più corta, che corrisponde alla metà amino-terminale di ANGPTL-3 e ANGPTL-4. Anche la ANGPTL-8 possiede il dominio di legame per la Lipasi Lipoproteica.

i quali fegato, intestino, tessuto adiposo e muscolo cardiaco, e presente nel plasma a concentrazioni molto basse (4-200 ng/ml). ANGPTL-3 ed ANGPTL-4 hanno una struttura simile costituita da tre principali regioni:

- 1) un dominio N-terminale che contiene la sequenza di legame con la LPL;
- 2) un dominio intermedio che è bersaglio del taglio proteolitico indotto da diverse proteasi;
- 3) un dominio C-terminale denominato “fibrinogen-like” che avrebbe un “debole” effetto angiogenetico (*Figura 6*).

Entrambe le molecole subiscono, sia a livello cellulare, prima della loro secre-

zione, sia nella circolazione sanguigna, un taglio proteolitico che si traduce nella liberazione del frammento corrispondente alla metà N-terminale della molecola. Questo frammento ha grande affinità per la LPL e possiede un maggiore effetto inibitorio sulla LPL rispetto alla molecola intera. Il meccanismo di inibizione della LPL da parte di ANGPTL3 non è univoco. Da un lato ANGPTL3 si legherebbe al dimerico di LPL, bloccandone l'azione catalitica in modo reversibile. Dall'altro lato ANGPTL-3, interagendo con la LPL, ne favorirebbe la degradazione da parte di enzimi proteolitici presenti nel sangue (*Figura 7*). La ANGPTL-4 sembra agire

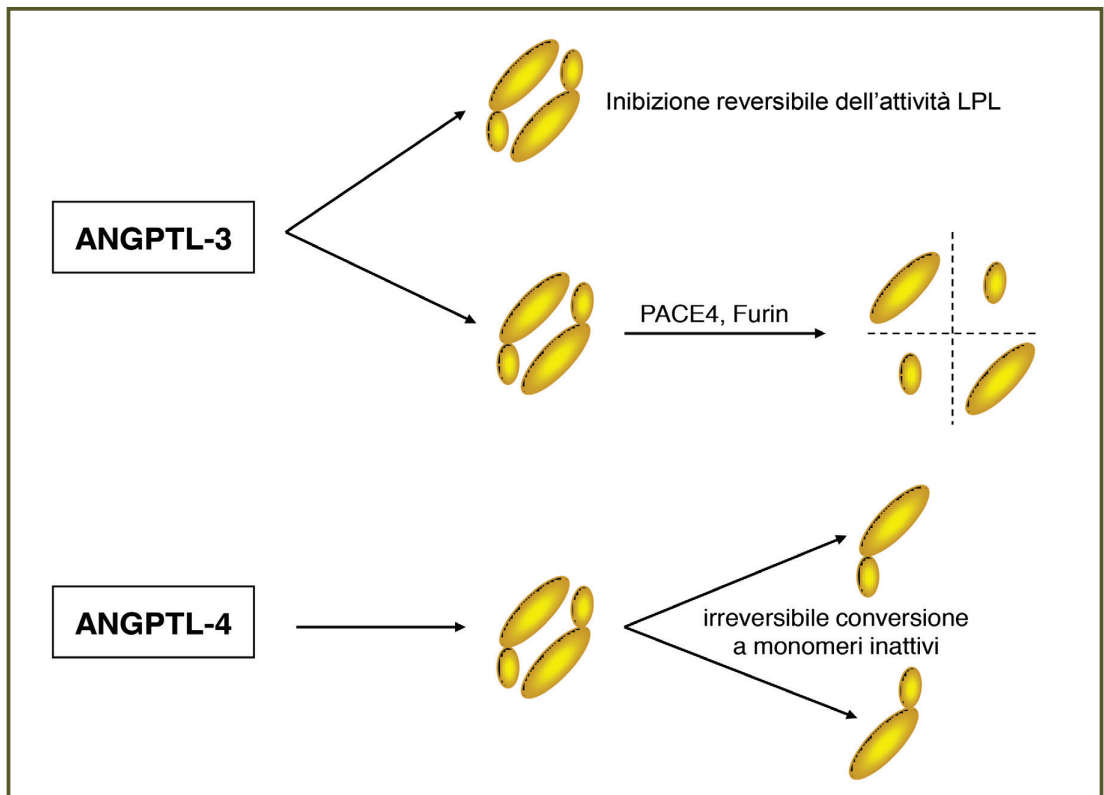


Figura 7 - Meccanismo di inattivazione della Lipasi Lipoproteica (LPL) da parte di ANGPTL-3 ed ANGPTL-4. La ANGPTL-3 sembra agire in due modi: i) inducendo un'inibizione diretta reversibile della LPL o ii) rendendo la LPL più suscettibile alla degradazione enzimatica da parte di alcune proteasi (PACE4 e Furina) circolanti nel plasma. La ANGPTL-4 induce una disgregazione irreversibile dei dimeri di LPL, con la formazione di monomeri inattivi.

direttamente sui dimeri di LPL, provocandone la loro irreversibile conversione in monomeri inattivi (19-21) (*Figura 7*). Questa azione inibitrice è più marcata nei confronti di dimeri di LPL cosiddetti “liberi”, cioè quelli non ancora “inglobati” nella piattaforma molecolare rappresentata da GPIHBP1 e che non hanno legato chilomicroni e/o VLDL. Infatti sia GPIHBP1 (11, 12) che le lipoproteine ricche in trigliceridi (22) hanno un effetto “stabilizzante” nei confronti dei dimeri di LPL, opponendosi quindi non solo all’azione disgregatrice della ANGPTL-4 ma anche all’interazione con ANGPTL-3.

La ANGPTL-8 è una glicoproteina di 198 aminoacidi (prodotta prevalentemente dal fegato ed, in misura minore, dal tessuto adiposo) che condivide con ANGPTL-3 ed ANGPTL-4 l’estremità amino-terminale responsabile del legame con la LPL (*Figura 6*). L’ANGPTL-8 ha quindi una struttura “atipica” rispetto le altre ANGPTLs; tuttavia essa manifesta un effetto inibitorio sulla LPL analogo a quello di ANGPTL-3 ed ANGPTL-4. ANGPTL-8 ed ANGPTL-3, entrambe di origine epatica, agirebbero di concerto nel processo di inibizione della LPL (22-25, 26).

Disordini monogenici della cascata lipolitica intravascolare

La più convincente dimostrazione del ruolo funzionale dei vecchi e dei nuovi protagonisti della “cascata lipolitica intravascolare” è fornita dalle alterazioni del metabolismo dei trigliceridi che si verificano nella condizione di assente o ridotta attività di queste molecole, dovute a mutazioni dei geni corrispondenti. Mutazioni nei geni candidati (*LPL*, *APOC2*, *APOA5*, *GPIHBP1* e *LMF1*) che portano alla perdita di funzione delle proteine corrispondenti, sono associate ad una ipertriglice-

ridemia severa (livello di TG nel plasma superiore 10 mmol/l), con accumulo di chilomicroni a digiuno, condizione nota anche come chilomicronemia familiare (anche se il termine più appropriato sarebbe chilomicronemia primitiva). Si tratta un disordine a trasmissione recessiva dovuto alla presenza di due alleli mutati di uno dei geni candidati (in condizione di omozigosi o di eterozigosi composta) (27). In circa 95% dei casi, la chilomicronemia primitiva è dovuta a mutazioni del gene *LPL* (27). Le mutazioni della *LPL* descritte fino ad ora sono più di 150; nella maggior parte di casi si tratta di mutazioni che determinano una sostituzione di un singolo aminoacido nella sequenza della proteina (28).

Queste mutazioni possono abolire completamente o ridurre in varia misura l’attività enzimatica (con variabile attività enzimatica residua) ovvero, più raramente, interferire con la capacità della *LPL* di interagire con altri componenti della “cascata lipolitica”, come GPIHBP1 (vedi oltre). Sono state anche descritte mutazioni che producono forme troncate di *LPL* completamente prive di funzione (28). È opportuno sottolineare che una ipertrigliceridemia di vario grado (anche severa) si può osservare in soggetti portatori di un solo allele mutato del gene *LPL* (condizione di eterozigosi), particolarmente in concomitanza di condizioni fisiologiche particolari (es. gravidanza), condizioni patologiche (obesità, diabete) o particolari stili di vita (consumo di alcool) che si associano “di per se” ad aumento dei trigliceridi plasmatici (2, 29, 30).

Anche nel caso dei geni *APOC2* ed *APOA5* sono state descritte diverse mutazioni (17 nel caso di *APOC2* e più di 30 nel caso di *APOA5*) (3, 4, 28, 30-38). Nel caso di mutazioni del gene *APOA5* le forme più precoci e severe di chilomicronemia sono

state documentate nei portatori di mutazioni che si traducono nella formazione di proteine tronche, completamente inattive (30, 31-37).

Recentemente sono state segnalate mutazioni del gene *GPIHBP1* che possono indurre sostituzioni di singoli aminoacidi nella sequenza della proteina o determinarne l'assenza (11, 39-45). L'effetto biologico delle sostituzioni di singoli aminoacidi varia a seconda della localizzazione degli stessi nella sequenza della proteina. Per esempio le sostituzioni localizzate nella regione N-terminale aboliscono la capacità di GPIHBP1 di legare la LPL; quelle localizzate nella regione C-terminale sembrano interferire con l'ancoraggio di GPIHBP1 alla membrana delle cellule endoteliali. Nel contempo sono state identificate alcune rare mutazioni che inducono sostituzione di singoli aminoacidi nella sequenza dell'LPL, che non hanno alcun effetto sull'attività catalitica dell'enzima, ma aboliscono la sua capacità di legarsi ad GPIHBP1 (46).

Due sole mutazioni di LMF1 sono state descritte fino ad ora in individui con chilomicronemia primitiva (9, 10). Esse portano alla formazione di proteine tronche che sono prive di parte della regione C-terminale di LMF1 che protrude nel lume del reticolo endoplasmatico (*Figura 3*) e che si ritiene avere un ruolo nell'interazione con il dimero di LPL, favorendone la stabilizzazione.

Anche sul versante degli inibitori della "cascata lipolitica intravascolare", mutazioni dei geni candidati *APOC3* ed *ANGPTL-3* che determinano perdita di funzione delle corrispondenti proteine, sono associate ad un'iperattivazione della LPL, che si traduce in una condizione di più o meno marcata ipotrigliceridemia a digiuno ed in un ridotto incremento della trigliceridemia nella fase post-prandiale.

Questo è il caso dei portatori eterozigoti della mutazione Arg19Term di ApoC-III (vedi sopra) e nei portatori di mutazioni della ANGPTL-3 (particolarmente in individui omozigoti o eterozigoti composti per mutazioni che producono forme troncate inattive della proteina) (47-52). Infine ridotti livelli plasmatici di trigliceridi sono stati osservati in individui eterozigoti portatori di singole sostituzioni aminoacidiche (Glu40Lys o Thr266Met) nella sequenza della ANGPTL-4, che si ritiene riducano la funzione inibitoria di ANGPTL4 nei confronti della LPL (53, 54).

Conclusioni

Le ricerche svolte in questa ultima decade hanno dimostrato che la "cascata lipolitica intravascolare" o "l'idrolisi intravascolare dei trigliceridi" contenuti nei chilomicroni e nelle VLDL, è un processo articolato che coinvolge, accanto alla LPL ed al suo classico attivatore Apo C-II, una serie di nuove molecole. Alcune di queste molecole sono circolanti nel plasma o in forma libera, come ANGPTL-3, ANGPTL-4 e ANGPTL-8, o legate alle lipoproteine, come Apo A-V.

Altre molecole sono componenti strutturali di cellule che producono e secernono LPL (come nel caso LMF1 nei miociti) o di cellule che "sostengono" la cascata lipolitica nel suo svolgimento" (come nel caso di GPIHBP1 nelle cellule endoteliali). Il ruolo funzionale di questi nuovi fattori nell'uomo è dimostrato dall'identificazione di individui portatori di mutazioni con perdita di funzione di qualcuno di questi fattori.

Questi individui presentano livelli molto elevati o, viceversa, livelli molto ridotti di trigliceridi a seconda che la perdita di funzione coinvolga fattori "promuoventi" o "inibenti" la "cascata lipolitica".

Glossario

LPL: Lipasi Lipoproteica, enzima chiave della cascata lipolitica intravascolare

Apo C-II: Apolipoproteina C-II, attivatore della LPL

Apo A-V: Apolipoproteina A-V, attivatore della LPL

GPIHBP1: Glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein-1, piattaforma molecolare su cui si svolge la cascata lipolitica mediata dalla LPL

LMF1: Fattore di maturazione della LPL che mantiene la LPL in forma omodimerica durante l'assemblaggio e la secrezione della LPL dai miociti e adipociti

Apo C-III: Apolipoproteina C-III, inibitore della LPL

ANGPTL-3: Angiopoietin like protein-3, proteina secreta dal fegato che agisce come inibitore della LPL

ANGPTL-4: Angiopoietin like protein-4, proteina secreta da vari tessuti che agisce come inibitore della LPL

ANGPTL-8: Angiopoietin like protein-8, proteina secreta dal fegato che agisce come inibitore della LPL. Prende il nome anche di Lipasin o Betatrofina

Bibliografia

1. Wang H, Eckel RH. Lipoprotein Lipase: from gene to obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2009; 297: E271-288.
2. Johansen CT, Kathiresan S, Hegele RA. Genetic determinants of plasma triglycerides. *J. Lipid Res.* 2011; 52: 189-206.
3. Young SG, Zechner R. Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis. *Genes Dev.* 2013; 27: 459-484.
4. Kei AA, Filippatos TD, Tsimihodimos V, Elisaf MS. A review of the role of apolipoprotein C-II in lipoprotein metabolism and cardiovascular disease. *Metabolism.* 2012; 61: 906-921.
5. Nilsson SK, Heeren J, Olivecrona G, Merkel M. Apolipoprotein A-V: a potent triglyceride reducer. *Atherosclerosis.* 2011; 219: 15-21.
6. Sharma V, Ryan RO, Forte TM. Apolipoprotein A-V dependent modulation of plasma triacylglycerol: a puzzle. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012; 1821: 795-799.
7. Sharma V, Forte T, Ryan RO. Influence of apolipoprotein A-V on the metabolic fate of triacylglycerol. *Curr. Opin. Lipidol.* 2013; 24: 153-159.

RIASSUNTO

La "cascata lipolitica" intravascolare è il processo attraverso il quale sono idrolizzati i trigliceridi contenuti nel "core" delle lipoproteine ricche in trigliceridi (TG-rich-Lps) (chilomicroni e VLDL), per opera dell'enzima Lipasi Lipoproteica (LPL). La LPL è presente, in forma omodimerica, sulla superficie endoluminale delle cellule endoteliali dei capillari ed agisce grazie alla presenza di un attivatore, rappresentato dalla apolipoproteina C-II (ApoC-II), componente proteica di chilomicroni e VLDL. La cascata lipolitica è resa possibile ed è regolata dall'intervento di altri fattori identificati nell'ultima decade. Questi ultimi possono agire sia favorendo/amplificando l'attività della LPL sia inibendola. Alcune delle nuove molecole che promuovono/facilitano l'attività di LPL, come l'apolipoproteina A-V, sono presenti come componenti delle TG-rich-Lps, mentre altre molecole sono componenti strutturali o delle cellule endoteliali (come GPIHBP1, Glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein-1) o delle cellule che producono e secernono la LPL (come LMF1, fattore di maturazione delle lipasi). GPIHBP1 funziona come una piattaforma molecolare che, sulla superficie endoluminale delle cellule endoteliali, consente l'interazione della LPL con il substrato (TG-rich-Lps), e gli attivatori ApoC-II ed ApoA-V. Il ruolo di LMF1 è quello di assemblare e mantenere la LPL, prodotta da adipociti e miociti in forma di monomero, nella sua configurazione omodimerica (quella biologicamente attiva) durante il processo di secrezione. Tra gli inibitori della cascata lipolitica si devono includere l'apolipoproteina C-III (ApoC-III), che spiazzava la LPL dal proprio substrato, e tre membri della famiglia delle proteine "angiopoietin-like" (ANGPTL), quali la ANGPTL-3, la ANGPTL-4 e la ANGPTL-8. Queste tre molecole interagiscono con la LPL facilitandone la degradazione ad opera di proteasi o destabilizzandone la struttura dimerica.

Parole chiave: Cascata lipolitica intravascolare; Lipasi Lipoproteica; Apolipoproteina C-II; Apolipoproteina C-III; Apolipoproteina A-V; Fattore di maturazione delle Lipasi, LMF1; GPIHBP1; Angiopoietin-like proteins.

8. Péterfy M, Ben-Zeev O, Mao HZ, Weissglas-Volkov D, Aouizerat BE, Pullinger CR, Frost PH, Kane JP, Malloy MJ, Reue K, Pajukanta P, Doolittle MH. Mutations in LMF1 cause combined lipase deficiency and severe hypertriglyceridemia. *Nat. Genet.* 2007; 39: 1483-1487.
9. Doolittle MH, Ehrhardt N, Péterfy M. Lipase maturation factor 1: structure and role in lipase folding and assembly. *Curr. Opin. Lipidol.* 2010; 21: 198-203.
10. Péterfy M. Lipase maturation factor 1: a lipase chaperone involved in lipid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012; 1821: 790-794.
11. Young SG, Davies DS, Voss CV, Gin P, Weinstein MM, Tontonoz P, Reue K, Bensadoun A, Fong L.G., Beigneux AP. GPIHBP1, an endothelial cell transporter for lipoprotein lipase. *J. Lipid Res.* 2011; 52: 1869-1884.
12. Davies BS, Beigneux AP, Fong LG, Young SG. New wrinkles in lipoprotein lipase biology. *Curr. Opin. Lipidol.* 2012; 23: 35-42.
13. Ooi EM, Barrett PH, Chan DC, Watts GF. Apolipoprotein C-III: understanding an emerging cardiovascular risk factor. *Clin. Sci.* 2008; 114: 611-624.
14. Zheng C, Khoo C, Furtado J, Sacks FM. Apolipoprotein C-III and the metabolic basis for hypertriglyceridemia and the dense low-density lipoprotein phenotype. *Circulation.* 2010; 121: 1722-1734.
15. Yao Z, Wang Y. Apolipoprotein C-III and hepatic triglyceride-rich lipoprotein production. *Curr. Opin. Lipidol.* 2012; 23: 206-212.
16. Pollin TI, Damcott CM, Shen H, Ott SH, Shelton J, Horenstein RB, Post W, McLenithan JC, Bielak LF, Peyser PA, Mithcell BD, Miller M, O'Connell JR, Schuldiner AR. A null mutation in human APOC3 confers a favorable plasma lipid profile and apparent cardioprotection. *Science.* 2008; 322: 1702-1705.
17. Huff MW, Hegele RA. Apolipoprotein C-III: going back to the future for a lipid drug target. *Circ. Res.* 2013; 112: 1405-1408.
18. Larsson M, Vorrsjo E, Talmud P, Lookene A, Olivecrona G. Apolipoprotein C-I and C-III inhibit lipoprotein lipase activity by displacement of the enzyme from lipid droplets. *J. Biol. Chem.* 2013; 288: 33997-4008.
19. Miida T, Hirayama S. Impacts of angiopoietin-like proteins on lipoprotein metabolism and cardiovascular events. *Curr. Opin. Lipidol.* 2010; 21: 70-75.
20. Lichtenstein L, Kersten S. Modulation of plasma TG lipolysis by Angiopoietin-like proteins and GPIHBP1. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010; 1801: 415-420.
21. Mattijssen F, Kersten S. Regulation of triglyceride metabolism by Angiopoietin-like proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012; 1821: 782-789.
22. Nilsson SK, Anderson F, Ericsson M, Larsson M, Makoveichuk E, Lookene A, Heeren J, Olivecrona G. Triacylglycerol-rich lipoproteins protect lipoprotein lipase from inactivation by ANGPTL3 and ANGPTL4. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012; 1821: 1370-1378.
23. Zhang R. Lipasin, a novel nutritionally-regulated liver-enriched factor that regulates serum triglyceride levels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012; 424: 786-792.
24. Quagliarini F, Wang Y, Kozlitina J, Grishin NV, Hyde R, Boerwinkle E, Valenzuela DM, Murphy AJ, Cohen JC, Hobbs HH. Atypical angiopoietin-like protein that regulates ANGPTL3. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 2012; 109: 19751-19756.
25. Wang Y, Quagliarini F, Gusarova V, Gromada J, Valenzuela DM, Cohen JC, Hobbs HH. Mice lacking ANGPTL8 (Betatrophin) manifest disrupted triglyceride metabolism without impaired glucose homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 2013; 110: 16109-16114.
26. Zhang R, Abou-Samra AB. Emerging roles of Lipasin as a critical lipid regulator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013; 432: 401-405.
27. Brahan A, Hegele RA. Hypertriglyceridemia. *Nutrients.* 2013; 5: 981-1001.
28. Fu J, Kwok S, Sinai L, Abdel-Razek O, Babula J, Chen D, Farago E, Fernandopulle N, Leith S, Loyzer M, Lu C, Malkani N, Morris N, Schmidt M, Stringer R, Whitehead H, Ban MR, Dubé JB, McIntyre A, Johansen CT, Cao H, Wang J, Hegele RA. Western Database of Lipid Variants (WDLV): a catalogue of genetic variants in monogenic dyslipidemias. *Can. J. Cardiol.* 2013; 29: 934-939.

29. Evans D, Arzer J, Aberle J, Beil FU. Rare variants in the lipoprotein lipase (LPL) gene are common in hypertriglyceridemia but rare in Type III hyperlipidemia. *Atherosclerosis*. 2011; 214: 386-390.
30. Surendran RP, Visser ME, Heemelaar S, Wang J, Peter J, Defesche JC, Kuivenhoven JA, Hosseini M, Péterfy M, Kastelein JJ, Johansen CT, Hegele RA, Stroes ES, Dallinga-Thie GM. Mutations in LPL, APOC2, APOA5, GPIHBP1 and LMF1 in patients with severe hypertriglyceridaemia. *J. Intern. Med*. 2012; 272: 185-196.
31. Priore Oliva C, Pisciotta L, Li Volti G, Sambataro MP, Cantafora A, Bellocchio A, Catapano A, Tarugi P, Bertolini S, Calandra S. Inherited apolipoprotein A-V deficiency in severe hypertriglyceridemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2005; 25: 411-417.
32. Marçais C, Verges B, Charrière S, Pruneta V, Merlin M, Billon S, Perrot L, Drai J, Sassolas A, Pennacchio LA, Fruchart-Najib J, Fruchart JC, Durlach V, Moulin P. ApoA5 Q139X truncation predisposes to late-onset hyperchylomicronemia due to lipoprotein lipase impairment. *J. Clin. Invest*. 2005; 115: 2862-2869.
33. Priore Oliva C, Tarugi P, Calandra S, Pisciotta L, Bellocchio A, Bertolini S, Guardamagna O, Schaap FG. A novel sequence variant in APOA5 gene found in patients with severe hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis*. 2006; 188: 215-217.
34. Priore Oliva C, Carubbi F, Schaap FG, Bertolini S, Calandra S. Hypertriglyceridaemia and low plasma HDL in a patient with apolipoprotein A-V deficiency due to a novel mutation in the APOA5 gene. *J. Intern. Med*. 2008; 263: 450-458.
35. Charrière S, Cugnet C, Guitard M, Bernard S, Groisne L, Charcosset M, Pruneta-De-loche V, Merlin M, Billon S, Delay M, Sassolas A, Moulin P, Marçais C. Modulation of phenotypic expression of APOA5 Q97X and L242P mutations. *Atherosclerosis*. 2009; 207: 150-156.
36. Dussaillant C, Serrano V, Maiz A, Eyheramendy S, Cataldo LR, Chavez M, Smalley SV, Fuentes M, Rigotti A, Rubio L, Lagos CF, Martinez JA, Santos JL. APOA5 Q97X mutation identified through homozygosity mapping causes severe hypertriglyceridemia in a Chilean consanguineous family. *BMC Med. Genet*. 2012; 13: 106.
37. Evans D, Aberle J, Beil FU. Resequencing the apolipoprotein A5 (APOA5) gene in patients with various forms of hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis*. 2011; 219: 715-720.
38. Pisciotta L, Fresa R, Bellocchio A, Guido V, Priore Oliva C, Calandra S, Bertolini S. Two novel rare variants of APOA5 gene found in subjects with severe hypertriglyceridemia. *Clin. Chim. Acta*. 2011; 412: 2194-2198.
39. Beigneux AP, Franssen R, Bensadoun A, Gin P, Melford K, Peter J, Walzem RL, Weinstein MM, Davies BS, Kuivenhoven JA, Kastelein JJ, Fong LG, Dallinga-Thie GM, Young SG. Chylomicronemia with a mutant GPIHBP1 (Q115P) that cannot bind lipoprotein lipase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2009; 29: 956-962.
40. Charrière S, Peretti N, Bernard S, Di Filippo M, Sassolas A, Merlin M, Delay M, Debard C, Lefai E, Lachaux A, Moulin P, Marçais C. GPIHBP1 C89F neomutation and hydrophobic C-terminal domain G175R mutation in two pedigrees with severe hyperchylomicronemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2011; 96: E1675-1679.
41. Coca-Prieto I, Kroupa O, Gonzalez-Santos P, Magne J, Olivecrona G, Ehrenborg E, Valdivielso P. Childhood-onset chylomicronaemia with reduced plasma lipoprotein lipase activity and mass: identification of a novel GPIHBP1 mutation. *J. Intern. Med*. 2011; 270: 224-228.
42. Franssen R, Young SG, Peelman F, Hertecant J, Sierts JA, Schimmel AW, Bensadoun A, Kastelein JJ, Fong LG, Dallinga-Thie GM, Beigneux AP. Chylomicronemia with low postheparin lipoprotein lipase levels in the setting of GPIHBP1 defects. *Circ. Cardiovasc. Genet*. 2010; 3: 169-178.
43. Olivecrona G, Ehrenborg E, Semb H, Makoveichuk E, Lindberg A, Hayden MR, Gin P, Davies BS, Weinstein MM, Fong LG, Beigneux AP, Young SG, Olivecrona T, Hennell O. Mutation of conserved cysteines in the Ly6 domain of GPIHBP1 in familial chylomicronemia. *J. Lipid Res*. 2010; 51: 1535-1545.

44. Wang J, Hegele RA. Homozygous missense mutation (G56R) in glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 (GPI-HBP1) in two siblings with fasting chylomicronemia (MIM 144650). *Lipids Health Dis.* 2007; 6: 23.
45. Yamamoto H, Onishi M, Miyamoto N, Oki R, Ueda H, Ishigami M, Hiraoka H, Matsuzawa Y, Kihara S. Novel Combined GPIHBP1 Mutations in a Patient with Hypertriglyceridemia associated with CAD. *J. Atheroscler. Thromb.* 2013; 20: 777-784.
46. Voss CV, Davies BS, Tat S, Gin P, Fong LG, Pelletier C, Mottler CD, Bensadoun A, Beigneux AP, Young SG. Mutations in lipoprotein lipase that block binding to the endothelial cell transporter GPIHBP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA).* 2011; 108: 7980-7984.
47. Musunuru K, Pirruccello JP, Do R, Peloso GM, Guiducci C, Sougnéz C, Garimella KV, Fisher S, Abreu J, Barry AJ, Fennell T, Banks E, Ambrogio L, Cibulskis K, Kernytzky A, Gonzalez E, Rudzicz N, Engert JC, DePristo MA, Daly MJ, Cohen JC, Hobbs HH, Altshuler D, Schonfeld G, Gabriel SB, Yue P, Kathiresan S. Exome sequencing, ANGPTL3 mutations, and familial combined hypolipidemia. *N. Engl. J. Med.* 2010; 363: 2220-2227.
48. Pisciotta L, Favari E, Magnolo L, Simonelli S, Adorni MP, Sallo R, Fancello T, Zavaroni I, Ardigo D, Bernini F, Calabresi L, Franceschini G, Tarugi P, Calandra S. Characterization of three kindreds with familial combined hypolipidemia caused by loss-of-function mutations of ANGPTL3. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2012; 5: 42-50.
49. Minicocci I, Montali A, Robciuc MR, Quagliarini F, Censi V, Labbadia G, Gabiati C, Pigna G, Sepe ML, Pannozzo F, Lütjohann D, Fazio S, Jauhiainen M, Ehnholm C, Arca M. Mutations in the ANGPTL3 gene and familial combined hypolipidemia: a clinical and biochemical characterization. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2012; 97: E1266-1275.
50. Noto D, Cefalù AB, Valenti V, Fayer F, Pinotti E, Ditta M, Spina R, Vigna G, Yue P, Kathiresan S, Tarugi P, Averna MR. Prevalence of ANGPTL3 and APOB gene mutations in subjects with combined hypolipidemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2012; 32: 805-809.
51. Martín-Campos JM, Roig R, Mayoral C, Martínez S, Martí G, Arroyo JA, Julve J, Blanco-Vaca F. Identification of a novel mutation in the ANGPTL3 gene in two families diagnosed of familial hypobetalipoproteinemia without APOB mutation. *Clin. Chim. Acta.* 2012; 413: 552-555.
52. Minicocci I, Santini S, Cantisani V, Stitzel N, Kathiresan S, Arroyo JA, Martí G, Pisciotta L, Noto D, Maranghi M, Cefalù AB, Labbadia G, Pigna G, Pannozzo F, Ceci F, Ciociola E, Bertolini S, Calandra S, Tarugi P, Averna M, Arca M. Clinical characteristics and plasma lipids in subjects with familial combined hypolipidemia: a pooled analysis. *J. Lipid Res.* 2013; 54: 3481-3490.
53. Romeo S, Pennacchio LA, Fu Y, Boerwinkle E, Tybjaerg-Hansen A, Hobbs HH, Cohen JC. Population-based resequencing of ANGPTL4 uncovers variations that reduce triglycerides and increase HDL. *Nat. Genet.* 2007; 39: 513-516.
54. Smart-Halajko MC, Kelley-Hedgpeeth A, Montefusco MC, Cooper JA, Kopin A, McCaffrey JM, Balasubramanyam A, Pownall HJ, Nathan DM, Peter I, Talmud PJ. ANGPTL4 variants E40K and T266M are associated with lower fasting triglyceride levels in Non-Hispanic White Americans from the Look AHEAD Clinical Trial. *BMC Med. Genet.* 2011; 12: 89.