

FOCUS

PCSK9, SINDROME METABOLICA E DIABETE

PCSK9, metabolic syndrome and diabetes

NICOLA FERRI¹, CHIARA MACCHI², MARGHERITA BOTTA², SILVIA MARCHIANÒ², CESARE R SIRTORI³, ALBERTO CORSINI^{2,4}, MASSIMILIANO RUSCICA²

¹Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università degli Studi di Padova;

²Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano;

³Centro Dislipidemie, A.S.S.T. Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano;

⁴IRCCS MultiMedica, Milano

SUMMARY

Hyperlipidemias, multifactorial conditions partly genetically and partly life-habit induced, represent the most important underlying risk factors for cardiovascular disease (CVD). Metabolic syndrome, a condition comprising a cluster of risk factors including insulin resistance, obesity, hypertension and atherogenic dyslipidemia, doubles the risk of atherosclerotic CVD. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9), the key regulator of low-density lipoprotein (LDL) receptor, has been linked also with many of lipid parameters as well as with insulin sensitivity indices. Moreover, although pre-clinical and clinical studies on the relationship between PCSK9 and diabetes mellitus do not show any association, as seen with statins, genetic variants of PCSK9, associated with lower LDL cholesterol, positively correlated to an increased risk of type 2 diabetes mellitus. Notably, this evidence is likely to be confined to subjects with impaired fasting glucose levels. Thus, in the present review, we will discuss the current knowledge on the role of PCSK9 in the context of metabolic syndrome, alteration of lipids, glucose homeostasis and inflammation.

Keywords: *diabetes, insulin resistance, hypertriglyceridemia, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9), metabolic syndrome.*

Introduzione

La sindrome metabolica colpisce il 20-40% della popolazione adulta a livello mondiale, rappresentando un attuale problema clinico per la salute pubblica (1). Clini-

camente, la sindrome metabolica viene identificata dalla concomitante presenza di almeno tre dei cinque fattori di rischio compresi nella "Harmonization definition", ossia:

1. aumentata pressione arteriosa,
2. aumentati livelli di trigliceridi (TG),
3. ridotti livelli di colesterolo HDL (lipoproteine ad alta densità),
4. elevati livelli di glicemia a digiuno,
5. obesità viscerale/addominale (Tabella 1).

In presenza di sindrome metaboli-

Indirizzo per la corrispondenza

Massimiliano Ruscica

E-mail: massimiliano.ruscica@unimi.it

Nicola Ferri

E-mail: nicola.ferri@unipd.it

Tabella I - Fattori di rischio per la diagnosi clinica della sindrome metabolica

	Valori	Indicatori alternativi
Circonferenza vita	*>94 cm nei maschi, >80 cm nelle donne **>102 cm nei maschi, >88 cm nelle donne	
Elevata pressione sanguigna	Sistolica ≥ 130 e/o diastolica ≥ 85 mm Hg	Trattamento dell'ipertensione
Elevata glicemia a digiuno	≥ 100 mg/dL	Diagnosi di DMT2
Elevati livelli di trigliceridi	>150 mg/dL	Specifico trattamento farmacologico
Ridotti livelli di HDL-C	<40 mg/dL nei maschi <50 mg/dL nelle donne	Specifico trattamento farmacologico

* International Diabetes Federation (IDF).

**AHA/NHLBI (ATP III).

DMT2; diabete mellito di tipo 2.

ca, il rischio di sviluppare malattie cardiovascolari è raddoppiato nei soggetti affetti o meno da diabete mellito di tipo 2 (DMT2) (2); in particolare, i pazienti con una diagnosi di DMT2 mostrano un aumento pari al 30% del tasso di eventi cardiovascolari (3). Le linee guida europee per il trattamento delle dislipidemie riportano che per i soggetti affetti da DMT2, l'obiettivo dovrebbe essere il raggiungimento di valori di colesterolo LDL inferiori a 2,6 mmol/L (<100 mg/dL) e in presenza di malattie cardiovascolari e/o danno d'organo inferiori a 1,8 mmol/L (<70 mg/dL) con valori di colesterolo non-HDL inferiori a 2,6 mmol/L (<100 mg/dL) e di apolipoproteina (apo)B inferiori a 80 mg/dL (4).

I soggetti con diagnosi di DMT2 presentano un insieme di alterazioni nei livelli plasmatici dei lipidi e nella composizione delle lipoproteine; in particolare spesso presentano ipertrigliceridemia, ridotti livelli di colesterolo HDL e concentrazioni aumentate di LDL piccole e dense (5).

L'insulino-resistenza è una condizione che precede di diversi anni la comparsa di qualsiasi segno di intolleranza al glucosio, predicendo, così, l'insorgenza di DMT2 [per criteri diagnostici vedere (6)]. In pazienti con DMT2, l'insulino-resistenza a

livello del tessuto adiposo determina un aumento dell'idrolisi intracellulare di TG, con conseguente rilascio di acidi grassi liberi. L'assorbimento di questi ultimi da parte del fegato favorisce la produzione di lipoproteine a densità molto bassa (VLDL), con un incremento dei TG circolanti (7). Sebbene i TG non rappresentino una componente maggiore della placca aterosclerotica, in presenza di valori moderatamente elevati di TG (2-10 mmol/L), il colesterolo all'interno delle particelle ricche in TG contribuisce allo sviluppo della placca (8-10). In tale contesto, l'insulino-resistenza svolge un ruolo centrale nella secrezione e nella clearance di apoB, che risulta determinante nella promozione dell'aterosclerosi (11).

Poiché molto deve essere ancora chiarito riguardo alla relazione esistente tra le diverse componenti della sindrome metabolica e le patologie cardiovascolari, la definizione del ruolo patofisiologico della proteina convertasi subtilisina/kexina di tipo 9 (PCSK9) potrebbe contribuire a colmare questo legame. PCSK9, uno dei principali regolatori del metabolismo del colesterolo LDL, è influenzata da mutazioni del gene *PCSK9* (12), dal sesso (13) e dall'uso di statine (14). Inoltre, PCSK9, la cui espressione aumenta in risposta all'in-

sulina (15), modula i livelli post-trascrizionali di apoB (16) ed è positivamente associata all'indice di massa corporea (17).

Questa rassegna ha lo scopo di riassumere il ruolo di PCSK9 nel contesto della sindrome metabolica ponendo particolare attenzione al diabete mellito di tipo 2.

Struttura e biologia cellulare di PCSK9

Il gene umano di *PCSK9* codifica per una proteina di 692 amino-acidi (pre-proPCSK9, di 72 kDa), la quale è composta progressivamente da un peptide segnale (aa 1-30), da un prodomino N-terminale (aa 31-152), da un domino catalitico serin-proteasico (aa 153-404), da una regione a cerniera (aa 405-454) e da un domino C-terminale ricco di cisteina e istidina (aa 455-692). A livello del reticolo endoplasmatico, PCSK9 subisce un taglio autocatalitico ai residui Gln152 e Ser153, fondamentale per il rilascio della forma matura di PCSK9 di 62 kDa (VFAQ152:SIP) (18). All'interno dell'apparato di Golgi, la proPCSK9 subisce una glicosilazione sul sito N533CS e una solforilazione nel sito Tyr38, ed infine viene secreta (19). I livelli di PCSK9 sono finemente regolati da 2 pro-ormone convertasi (PC), ovvero la Furina e il PC5/6 (20). Successivamente, la forma matura di PCSK9 subisce un taglio catalitico a livello del sito RFHR218:QA (R218 e Q219), questo permette il distacco del pro-domino NH₂-terminale e la formazione della forma di troncata di PCSK9 (55 kDa) (21). Nell'uomo, quest'ultima forma rappresenta circa il 15-40% della totalità di PCSK9 circolante, ed equivarrebbe alla quota inattiva (22). Lipari et al. (23), tuttavia, hanno evidenziato come la forma circolante di PCSK9 tagliata dalla furina sia capace di regolare l'espressione del recettore delle LDL e la concentrazione di cole-

sterolo, anche se in modo meno efficiente rispetto alla forma integra.

L'attività meglio descritta e caratterizzata della proteina PCSK9 è il suo effetto post-trascrizionale sui recettori delle LDL, presenti sulla membrana cellulare (24). Il legame al recettore delle LDL avviene nella regione "A" omologa al fattore di crescita epidermico (EGF-A), determinando due effetti: il primo, in cui PCSK9 agendo da trasportatore favorisce il passaggio del recettore delle LDL dal reticolo endoplasmatico alla membrana cellulare; il secondo, in cui PCSK9 determina invece la degradazione dello stesso recettore sulla superficie cellulare (25).

Oltre al recettore delle LDL, PCSK9 determina la degradazione, benché con minor efficienza, di altri recettori che condividono un determinato grado di omologia con il recettore delle LDL, quali il recettore dell'apolipoproteina (Apo) E 2 (omologia al 46%), il recettore delle lipoproteine a bassissima densità (omologo per il 59%) (26) e la proteina associata al recettore delle LDL di tipo 1 (LRP1) (27).

Regolazione trascrizionale di PCSK9

La sintesi di PCSK9, a livello trascrizionale, è ampiamente regolata dai fattori di trascrizione SREBPs (sterol regulatory element (SRE)-binding proteins) (28, 29) e da HNF-1 (hepatocyte nuclear factor-1) alpha (30). Le proteine SREBPs attivano una molteplicità di enzimi coinvolti nella sintesi endogena di colesterolo, acidi grassi, TG e fosfolipidi (31). Le isoforme di SREBP-1, SREBP-1a e 1c, attivano principalmente i geni coinvolti nella sintesi degli acidi grassi e dei TG, mentre SREBP-2 trascrive principalmente i geni coinvolti nella biosintesi del colesterolo (32). In particolare, topi transgenici, sovra-espri-

menti SREBP-1a o SREBP-2 mostrano una maggiore espressione genica di PCSK9 (SREBP-1a: intervallo di incremento: 7-8,6 volte; SREBP-2: intervallo di incremento: 5,6-6,5 volte) (32).

Il coinvolgimento di HNF-1 alpha, un importante regolatore delle funzioni metaboliche a livello epatico (33) è stato recentemente confermato da Shende et al. (34), i quali hanno dimostrato come, in topi C57BL/6, un knockdown epatico di HNF-1 alpha corrisponde a una riduzione significativa dei livelli di PCSK9 e di colesterolo LDL così come a un aumento del recettore delle LDL.

Perciò, poiché in merito alla biologia di PCSK9, rimane ancora molto da chiarire (35), è importante identificare i regolatori endogeni di PCSK9, in quanto potenzialmente sfruttabili come bersagli terapeutici.

Regolatori fisiologici di PCSK9 nell'ambito della sindrome metabolica

Dieta

Tra i regolatori fisiologici dell'espressione del gene *PCSK9*, lo stato nutrizionale è un aspetto che necessita di ulteriori approfondimenti. Nei roditori, l'espressione epatica di PCSK9 diminuisce dopo digiuno e aumenta in seguito ad assunzione di cibo, in particolare dopo una dieta ricca in carboidrati. I meccanismi molecolari alla base della regolazione di PCSK9 in risposta alla deplezione intracellulare di steroli, sono prevalentemente legati all'attivazione di SREBP-2 (28, 29) sebbene non sia da escludere un coinvolgimento di SREBP-1 (15).

In 12 soggetti sani, una condizione di digiuno per 18 ore è stata associata a una riduzione del 35% dei livelli plasmatici di PCSK9. Un digiuno prolungato ha deter-

minato una riduzione più severa di PCSK9 (-50%) (36). Questi dati sono stati confermati da un ulteriore studio che ha dimostrato come un digiuno fino a 48 ore porta a diminuzione dei livelli di PCSK9, che raggiungono il punto di minimo dopo 36 ore di digiuno (-58%) (37).

In seguito a dieta Mediterranea, seppur in assenza di perdita di peso, i livelli plasmatici di PCSK9 si riducono dell'11,7% ed i livelli di colesterolo LDL del 9,9% (38). Le diete arricchite in acido oleico riducono i livelli di PCSK9, i quali correlano positivamente con marcatori di sintesi del colesterolo (rapporto latosterolo-colesterolo) (39). Rispetto ad una dieta ricca in grassi saturi, dopo diete ricche in acidi grassi polinsaturi (PUFA) si verifica una riduzione di PCSK9; ciò potrebbe essere spiegato dal fatto che i PUFA sono in grado di aumentare il colesterolo epatico con una conseguente diminuzione dell'attività di SREBP-2 (40). Al contrario, seppur un consumo di stanoli vegetali per 6 mesi (3 g/die) sia in grado di aumentare la sintesi del colesterolo tramite attivazione di SREBP-2, questo non influisce sui livelli circolanti di PCSK9 (41).

Glucagone e insulina

Sin dal 1993 è stato riportato come il glucagone possa aumentare il numero di recettori epatici di LDL attraverso un meccanismo post-trascrizionale (42). I ratti, ai quali è stato somministrato glucagone, presentano una aumentata espressione proteica del recettore delle LDL e un calo del 70% dell'espressione di PCSK9 (43).

Per quanto riguarda il rapporto tra PCSK9 e insulina, l'ormone è in grado di regolare l'espressione di PCSK9. In particolare, esperimenti condotti in epatociti primari di topo esposti all'insulina hanno mostrato come i livelli di espressione genica di PCSK9 e SREBP-1c siano aumenta-

ti di quattro volte. Tale effetto può essere ricondotto all'attivazione di SREBP-1c, poiché l'espressione di un dominante negativo per SREBP-1c abolisce l'effetto dell'insulina (15). Ad ulteriore conferma, uno studio del 2015 ha dimostrato che, in epatociti primari di ratto, un trattamento con insulina aumenta di tre volte sia l'espressione di PCSK9 sia la proteina secreta. Tale dato è stato associato a un incremento in SREBP-1c e SREBP-1a rispettivamente di 12 e 2 volte (44). L'effetto dell'insulina sulla regolazione di PCSK9 è stato valutato anche in modelli animali. Topi knockout per il recettore dell'insulina a livello epatico, alimentati sia con dieta standard sia con dieta aterogena, hanno mostrato una diminuzione dei livelli di PCSK9; ratti maschi del ceppo Sprague-Dawley (45) e topi wild-type (42), trattati con streptozotocina (un modello farmacologico del diabete mellito di tipo 1), presentano livelli marcatamente ridotti di PCSK9 epatico e circolante. Al contrario, in topi obesi *ob/ob*, con deficit dell'ormone leptina, i dati riguardanti PCSK9 sono scarsi e non conclusivi. Infatti, in tali topi l'espressione epatica di PCSK9, rispetto ai topi wild-type, risulta invariata (42) o maggiore (46, 47).

In volontari sani (n=8) e in soggetti affetti da DMT2 (n=8), una condizione di moderata iperinsulinemia per 24 ore ha determinato, in entrambi i gruppi, una riduzione plasmatica sia di colesterolo LDL che di apoB; tale cambiamento non è stato associato a variazione nei livelli plasmatici di PCSK9 (48).

Resistina e TNF- α

Nel tessuto adiposo è presente una vasta gamma di cellule immunitarie (comprese le cellule T, i macrofagi e le cellule dendritiche). Gli adipociti secernono molecole bioattive di diversa natura, definite adipochine, molte delle quali hanno azio-

ni immunomodulanti (45). Tra queste, la resistina, un polipeptide umano di 12,5 kDa prodotto principalmente dai macrofagi (49), è stata proposta come un possibile crocevia nella dislipidemia aterogena (50). La resistina sembra essere coinvolta nel processo biochimico della *de novo* lipogenesi epatica e nel controllo del metabolismo lipidico periferico. In soggetti con sindrome metabolica, i livelli plasmatici di resistina correlano positivamente con i livelli circolanti di TG, apoB e inversamente con quelli del colesterolo HDL (51). Nelle cellule HepG2, la resistina aumenta sia l'espressione genica (+40%) che proteica (+30%) di PCSK9; il meccanismo molecolare potrebbe essere legato a una sovraespressione di SREBP-2 o a una stabilizzazione post-trascrizionale della stessa proteina PCSK9 (52).

Gli adipociti producono anche la citochina immuno-regolatoria TNF- α . Per quanto riguarda l'interazione tra TNF- α e PCSK9, in cellule HepG2, il TNF- α è in grado di indurre PCSK9 in modo SOCS-3-dipendente. Infatti, l'utilizzo di siRNA anti-SOCS3 blocca completamente l'effetto di induzione di PCSK9 mediato dal TNF- α (47).

PCSK9 e parametri metabolici associati alla sindrome metabolica: evidenze da studi osservazionali

Ipertrigliceridemia, basse concentrazioni plasmatiche di HDL e cambiamenti qualitativi delle LDL, costituiscono la tipica triade della dislipidemia associata allo stato di insulino-resistenza presente nei pazienti con sindrome metabolica (53). Questa alterazione metabolica è determinata principalmente da una sovrapproduzione di lipoproteine ricche in TG, da parte del fegato e dell'intestino, contenenti apoB48 (46). Nei soggetti con sindrome

metabolica l'ipertrigliceridemia postprandiale è causata da una sovrapproduzione di lipoproteine ricche in TG, in particolare chilomicroni e VLDL, di origine intestinale (54). La sovrapproduzione di VLDL epatiche rappresenta la seconda fonte di lipoproteine ricche in TG nei soggetti insulinoresistenti con sindrome metabolica (46). Queste risposte metaboliche sono principalmente causate da un effetto diretto degli acidi grassi liberi e delle citochine infiammatorie, quali IL-6 e TNF- α , anche se vi possono essere ulteriori contributi. In particolare, fegato e intestino sono le due principali fonti di PCSK9, che regola l'espressione e la funzionalità del recettore delle LDL e l'omeostasi del colesterolo LDL. Al contrario, il ruolo di PCSK9 sul metabolismo delle lipoproteine ricche in TG è ancora poco chiaro e discusso. Il possibile coinvolgimento di PCSK9 in tale ambito, è sostenuto dall'osservazione clinica di una correlazione positiva tra i livelli di PCSK9 e quelli dei TG. In particolare, nel primo studio di correlazione tra livelli plasmatici di PCSK9 e LDL-C, condotto in un piccolo numero di campioni di siero di donatori sani (26 maschi e 29 femmine), non si trovò alcuna correlazione tra livelli di TG e PCSK9 (55). Un'analisi più dettagliata condotta su campioni ematici raccolti a digiuno dai partecipanti al "Dallas Heart Study" (n=3138) mise in evidenza una forte e significativa correlazione tra livelli plasmatici di PCSK9 e le concentrazioni di colesterolo LDL e di TG. Nello stesso studio, gli autori descrissero una associazione meno evidente, seppur significativa tra PCSK9 e diversi indicatori del metabolismo glucidico, inclusi i livelli di glicemia a digiuno, di insulina, e dell'indice HOMA (Homeostasis Model Assessment) di insulinoresistenza (17). Per quanto riguarda il possibile legame tra PCSK9 e i marcatori pro-infiammatori, è importante notare

Bullett points

- La sindrome metabolica è una condizione patologica costantemente in aumento nella popolazione mondiale, caratterizzata dalla presenza concomitante di almeno tre dei seguenti fattori di rischio: 1) ipertensione (sistolica ≥ 130 e/o diastolica ≥ 85 mm Hg), 2) ipertrigliceridemia (≥ 150 mg/dL), 3) ridotti livelli di colesterolo HDL (< 40 mg/dL nei maschi e < 50 mg/dL nelle donne), 4) elevati livelli di glicemia a digiuno (≥ 100 mg/dL), e 5) obesità viscerale (> 102 cm nei maschi, > 88 cm nelle femmine).
- Ipertrigliceridemia, bassi livelli di HDL e presenza di LDL piccole e dense, caratterizzano la dislipidemia aterogena, spesso presente nei soggetti con sindrome metabolica.
- La proteina PCSK9, sintetizzata a livello epatico, intestinale e renale, regola il metabolismo del colesterolo e dei trigliceridi inducendo la degradazione del recettore delle LDL, delle VLDL, LRP1, apoER2, e CD36.
- Dieta, glucagone, insulina, resistina e TNF- α regolano l'espressione di PCSK9.
- PCSK9 si associa con i diversi indicatori del metabolismo glucidico, inclusi i livelli di glicemia a digiuno, insulina, e indice HOMA (Homeostasis Model Assessment) di insulinoresistenza.
- Gli studi clinici condotti con anticorpi monoclonali anti-PCSK9, alirocumab ed evolocumab, non hanno mostrato nessuna differenza per quanto riguarda l'omeostasi glucidica. Tuttavia, studi genetici e di randomizzazione Mendeliana hanno dimostrato come varianti genetiche di *PCSK9* e *HMGCR* correlino con un aumentato rischio diabetogeno in soggetti prediabetici (glicemia a digiuno ≥ 100 mg/dL).
- I dati sul ruolo di PCSK9 e dei suoi inibitori sull'insorgenza di insulinoresistenza sono al momento osservazionali. Il numero crescente di pazienti trattati e l'allungamento della durata del trattamento, potrà definire meglio le relazioni tra PCSK9, sindrome metabolica e diabete.

che, mentre i livelli di proteina C-reattiva erano correlati con PCSK9, le concentrazioni erano associate solo nelle donne e non negli uomini (17).

PCSK9 e diabete: possibili connessioni

Come descritto in precedenza, gli ormoni che regolano il metabolismo glucidico hanno un ruolo diretto nel regolare l'espressione di PCSK9; tuttavia quale sia il ruolo di PCSK9 nello sviluppo del diabete rimane a oggi una domanda senza risposta. Una possibile risposta potrebbe essere ricercata nella relazione tra terapia con statine e il rischio di sviluppare diabete (56). Ad oggi, rimangono non del tutto chiariti i meccanismi molecolari da ascrivere a tale associazione (57).

Con queste premesse, anche la valutazione dell'insorgenza di nuovo diabete in seguito alla diminuzione del colesterolo LDL, con terapie diverse dalle statine, diventa di interesse clinico (58). In particolare, gli effetti della terapia con alirocumab, uno degli inibitori della proteina PCSK9, sono stati valutati in una meta-analisi condotta su 10 trial randomizzati di fase 3 (59) (*Tabella 2a*). Tale analisi, condotta su 3.448 pazienti, ha evidenziato come il rischio di nuova diagnosi di diabete (n=218), in seguito al trattamento con alirocumab, non è più alto di quello registrato nei pazienti trattati con placebo (hazard ratio 0,64; 95%IC, 0,36-1,14) o ezetimibe (hazard ratio 0,55; 95%IC, 0,22-1,41). Anche i valori di emoglobina glicata (HbA1c), altro parametro impiegato nella diagnosi di diabete (60), sono risultati invariati tra i tre gruppi (placebo, alirocumab ed ezetimibe).

In modo simile, i soggetti arruolati nello studio DESCARTES (The Durable Effect of PCSK9 Antibody Compared

with Placebo Study), che hanno ricevuto evolocumab per 52 settimane (420 mg una volta al mese), non hanno mostrato nessuna differenza per quanto riguarda l'omeostasi glucidica tra i soggetti allocati nel gruppo controllo e nel gruppo evolocumab; infatti, i valori di glicemia e insulinemia a digiuno, di HbA1c, di peptide-C e dell'indice HOMA risultavano invariati. In particolare, l'incidenza globale di nuovo diabete è stata del 5,6% nel gruppo evolocumab e del 6,6% nel gruppo placebo. I soggetti con valori borderline di glicemia a digiuno sono stati quelli che hanno mostrato l'incidenza più alta di diabete (placebo: 14,1%; evolocumab: 10,3%) se confrontati ai soggetti normoglicemici all'inizio della randomizzazione (placebo: 1,9%; evolocumab: 2,7%) (61).

In conclusione, sebbene i dati dei trial clinici con gli inibitori di PCSK9 siano rassicuranti in termini di diabetogenicità della terapia, non possono essere esclusi ulteriori effetti a lungo termine. La relazione tra statine e insorgenza di diabete infatti è stata dimostrata solo dopo meta-analisi su larga scala. È importante sottolineare che la distribuzione tissutale di anticorpi monoclonali è molto ridotta, quindi l'effetto di alirocumab ed evolocumab è prevalentemente limitato ad inibire PCSK9 a livello plasmatico. Il loro effetto sulla possibile induzione di insulino-resistenza potrebbe quindi essere conseguente alla riduzione di LDL colesterolo e non all'inibizione di PCSK9 a livello pancreatico (62).

Un'altra limitazione dei dati sin qui descritti, riguarda il fatto che molti dei trials inerenti gli inibitori di PCSK9 vedano coinvolti soggetti già in cura con statine, quindi l'effetto diabetogeno degli anticorpi monoclonali potrebbe essere mascherato dall'assunzione delle statine (63). È proprio in quest'area di ricerca che studi

di associazione genetica, come le randomizzazioni Mendeliane, stanno cercando di rispondere a quesiti a oggi di difficile soluzione. Un recente studio, ha riportato come varianti geniche in PCSK9 siano associate ad un rischio più elevato del 19% di sviluppare diabete, proporzionale alla diminuzione di 1 mmol/L di colesterolo LDL (1,19; 95%IC, 1,02-1,38) (64) (Tabella 2b). Anche varianti del gene NPC1L1

(Niemann-Pick C1-like 1) e HMGCR, entrambe coincidenti con una riduzione della colesterolemia LDL, sono positivamente e direttamente associate al rischio di sviluppare DMT2 (NPC1L1: OR 2,42; 95%CI, 1,70-3,43; HMGCR: OR 1,39; 95%CI, 1,12-1,73) (64).

Un ulteriore tassello in tale ambito giunge dal lavoro di Ference, il quale ha descritto come la presenza di varianti sui

Tabella 2 - (a) Incidenza di diabete in soggetti in trattamento con alirocumab (59); (b) associazione tra le varianti genetiche associate alla riduzione della colesterolemia LDL e il rischio di sviluppare diabete mellito di tipo 2 (64, 65).

A)	Hazard Ratio
Placebo (n=818) vs Alirocumab (n=1620)	0,64 (0,36-1,14); ns (59)
Ezetimibe (n=428) vs Alirocumab (n=582)	0,55 (0,22-1,41); ns (59)

ns, non significativo

B)	Polimorfismo	Cromosoma	Odds Ratio	Note
PCSK9	rs11591147	chr1:55505647	1,19 (1,02-1,38) p=0,03	Valori normalizzati per una riduzione di colesterolo LDL di 38,7 mg/dl (64)
HMGCR	rs12916 rs5744707 rs16872526	chr5:74656539 chr5:74890618 chr5:74675717	1,39 (1,12-1,73) p=0,003	
NPC1L1	rs2073547 rs217386	chr7:44582331 chr7:44600695	2,42 (1,70-3,43) p=9×10 ⁻⁷	
PCSK9	rs11206510	chr1_55277238	i) 1,22 (1,03-1,45; significativo) con glicemia a digiuno >100 mg/dl	Valori normalizzati per una riduzione di colesterolo LDL di 10 mg/dl (65)
	rs2479409	chr1_55277238		
	rs2149041	chr1_55274725	ii) 0,99 (0,84-1,17; ns) con glicemia a digiuno <100 mg/dl	
	rs2479394	chr1_55258652		
	rs10888897	chr1_55285649		
	rs7552841	chr1_55291340		
	rs562556	chr1_55296825		
HMGCR	rs11206510	-	i) 1,19 (1,00-1,41; significativo) con glicemia a digiuno >100 mg/dl	Valori normalizzati per una riduzione di colesterolo LDL di 10 mg/dl (65)
	rs2479409	-		
	rs2149041	-	ii) 1,04 (0,89-1,22; ns) con glicemia a digiuno <100 mg/dl	
	rs2479394	-		
	rs10888897	-		
	rs7552841	-		
	rs562556	-		

HMGCR, 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase; NPC1L1, Niemann-Pick C1-like 1; PCSK9, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; ns, non significativo.

geni di *PCSK9* e *HMGCR*, associate a più bassi livelli di colesterolo LDL, correlino con un aumentato rischio diabetogeno soltanto in soggetti con una ridotta tolleranza al glucosio a digiuno. In particolare, nei soggetti (n=7383) con valori di glicemia a digiuno ≥ 100 mg/dL, le varianti geniche di *PCSK9* sono state associate a un'aumentata incidenza (+22%) di sviluppare diabete per una diminuzione di 10 mg/dL di colesterolo LDL (odd ratio 1,22; CI95%, 1,03-1,45) (65) (Tabella 2b). Valori simili sono stati trovati quando sono state analizzate le varianti di *HMGCR* (+19%; odd ratio 1,19; CI95%, 1,00-1,41). Gli effetti di entrambe le varianti sono additivi sul rischio di diabete (65). La combinazione farmacologica con statine e inibitori di *PCSK9* permette di raggiungere una riduzione nei valori di colesterolo LDL superiore a quanto ottenuto in monoterapia, quindi sono necessari studi su larga scala per superare questa preoccupazione teorica (66).

Al contrario, un'analisi della variante genetica *loss-of-function* (LOF) p.R46L di *PCSK9*, condotta su 4.630 soggetti francesi partecipanti allo studio prospettico "Data from an Epidemiological Study on The Insulin Resistance Syndrome (DESIR)", non ha evidenziato alcun effetto né sui marcatori dell'omeostasi del glucosio (glicemia e insulinemia a digiuno, HBA1c, HOMA-B, HOMA-IR) né sull'incidenza di DMT2 (67).

Poiché questa classe di farmaci è attualmente somministrabile a pazienti ad alto rischio di eventi cardiovascolari - ipercolesterolemia familiare o malattie cardiovascolari preesistenti con colesterolo LDL non a target, nonostante la terapia con le massime dosi tollerate di statine e ezetimibe - è improbabile che un modesto effetto diabetogeno possa modificare le linee guida nell'ambito dei trattamenti farmacologici

anti-*PCSK9*. Ad oggi, con il buon senso clinico e semplici test, i medici dovrebbero continuare a prescrivere gli ipolipemizzanti (principalmente statine) seguendo le linee guida standard. Bisogna sottolineare infatti che qualsiasi potenziale effetto diabetogeno, sia esso reale o potenziale, potrebbe essere controllato, gestito, mitigato da cambiamenti dello stile di vita (68).

Relazione tra *PCSK9* e trigliceridi: dati clinici e possibile meccanismo

Studi epidemiologici e genomici

L'effetto diretto di *PCSK9* sulla produzione di apoB è stato dimostrato in uno studio clinico condotto su una popolazione recante la mutazione *gain-of-function* (GOF) S127R di *PCSK9*, una delle cause di ipercolesterolemia autosomica dominante. Questa mutazione determina un drammatico aumento dei livelli di apoB, di circa tre volte se confrontato con un gruppo di controllo o con i soggetti portatori di mutazioni del gene codificante per il recettore delle LDL (69). Infatti, il fenotipo di questi soggetti è molto diverso da quello osservato in pazienti recanti la mutazione del recettore delle LDL o del gene *APOB*, suggerendo che ci possa essere un duplice effetto di *PCSK9*, sia sull'espressione del recettore delle LDL sia sulla secrezione di apoB.

Ciò nonostante, non può essere esclusa la possibilità che l'incremento nella produzione di VLDL sia dovuto alla mancata internalizzazione delle stesse per degradazione del recettore delle LDL, il principale target di *PCSK9* (70, 71). Infine, la correlazione tra *PCSK9* e le IDL, che rappresentano la frazione più ricca in TG (72), potrebbe far supporre che siano le IDL, lipoproteine a densità intermedia, a determinare la linearità nella relazione tra i livelli di *PCSK9* e di TG.

PCSK9 e ipertrigliceridemia postprandiale: i dati clinici e il potenziale meccanismo d'azione

Studi Epidemiologici

Dati clinici sul ruolo di PCSK9 nell'ipertrigliceridemia familiare sono scarsi. I livelli di PCSK9, infatti, non vengono alterati dopo un carico orale lipidico né in volontari sani né in pazienti che recano la mutazione LOF di PCSK9 R104C-V114A (71). Lo stesso paradigma sperimentale applicato a soggetti obesi ha evidenziato come nel periodo post-prandiale, i livelli circolanti di PCSK9 correlino positivamente con l'area sottesa alla curva (AUC) di apoB48 e come siano invece inversamente correlati al catabolismo di TG ricchi in apoB48. Questi dati suggeriscono come, in individui obesi, nello stato postprandiale, PCSK9 potrebbe influenzare il catabolismo dei chilomicroni che contengono TG e apoB48 (73).

È importante ricordare come PCSK9 possa influenzare l'escrezione trans-intestinale di colesterolo in misura dipendente dal recettore delle LDL (27); tale processo rappresenterebbe un'ulteriore attività sul tratto gastrointestinale da parte di PCSK9. Inoltre, PCSK9 è capace di legare direttamente il recettore delle VLDL promuovendone la degradazione, e questo effetto potrebbe mediare l'accumulo di tessuto adiposo viscerale in modo totalmente dipendente dal recettore delle VLDL e non dal recettore delle LDL (74).

PCSK9 e le lipoproteine ad alta densità

La dislipidemia aterogena, associata alla sindrome metabolica, è caratterizzata da ipertrigliceridemia e da bassi livelli di colesterolo HDL. Pur essendo PCSK9 principalmente coinvolta nella regolazione dei livelli di colesterolo LDL, da studi clini-

ci è emerso un legame tra i livelli plasmatici di PCSK9 e di colesterolo HDL (75). Tuttavia, una particolare mutazione GOF del gene PCSK9, Leu108Arg, è stata associata a un aumento dell'attività della proteina che trasferisce gli esteri del colesterolo (CETP); tale associazione potrebbe essere potenzialmente legata all'aumento delle lipoproteine contenenti apoB, che potrebbero comportarsi da accettori di esteri del colesterolo (76). Uno studio clinico su una coorte cinese, ha dimostrato come il polimorfismo Glu670Gly di PCSK9 sia associato a elevati livelli di colesterolo HDL e apoA-I nei maschi e ad un elevato rapporto apoA-I/apoB nelle donne (77). Alla luce di questi risultati, che indicano una possibile relazione tra livelli di PCSK9 e HDL, non si evince ancora un chiaro coinvolgimento nel metabolismo delle HDL, soprattutto nei pazienti con sindrome metabolica. È da sottolineare che il trattamento con i due inibitori di PCSK9, alirocumab e evolocumab, ha determinato un aumento significativo dei livelli di colesterolo HDL del 4-6% (78). La relazione tra HDL e PCSK9 è osservabile anche in pazienti in trattamento con inibitori della CETP (Cholesterol Ester Transfer Protein), quali anacetrapib, farmaco in grado di aumentare del 19% i livelli di PCSK9 (79).

PCSK9 e LDL piccole e dense

Studi clinici

La dislipidemia diabetica è caratterizzata dalla presenza di LDL piccole e dense che appartengono ad una sottofamiglia delle LDL circolanti. Le LDL piccole e dense rappresentano, nello sviluppo di coronaropatie, un fattore di rischio più importante delle LDL mature (80). Sono stati proposti molteplici meccanismi che potrebbero spiegare l'elevata aterogenicità di queste particelle, come, ad esempio,

l'elevata permeabilità attraverso la parete vascolare, una maggiore emivita plasmatica e una ridotta affinità per il recettore LDL (81).

Da un recente studio è emerso come, in soggetti con angina stabile, i livelli plasmatici di queste particelle correlino in modo significativo con quelli di PCSK9; correlazione che invece non si riscontra nei pazienti non coronaropatici (82). Una possibile spiegazione potrebbe risiedere nel fatto che le LDL piccole e dense siano generate da molteplici precursori quali, ad esempio, le VLDL (83); la produzione epatica di queste ultime è indotta da PCSK9, che, quindi, potrebbe essere indirettamente responsabile dell'aumento delle LDL piccole e dense. Inoltre, in soggetti ipertrigliceridemicici si osserva un'aumentata conversione da VLDL a LDL piccole e dense (83). Un'altra possibile spiegazione potrebbe derivare dalla diversa affinità e *clearance* delle LDL piccole e dense per il recettore delle LDL, rispetto a quelle mature, influenzando quindi l'azione di PCSK9 (7).

Nessuna di queste ipotesi, tuttavia, è in grado di spiegare il motivo per cui la correlazione tra PCSK9 e le LDL piccole e dense si verifichi solo nei pazienti coronaropatici con angina stabile. Non è quindi da escludere il ruolo dell'infiammazione subclinica nella reciproca regolazione delle LDL piccole e dense e di PCSK9, indipendente dal recettore delle LDL.

Conclusioni

Il ruolo di PCSK9 nella regolazione del recettore delle LDL e dei livelli plasmatici di colesterolo LDL è stato definito soltanto nel 2003 e dopo 12 anni sono disponibili

in clinica le prime terapie anti-PCSK9 per il trattamento dell'ipercolesterolemia familiare e per i pazienti ad alto rischio cardiovascolare, non a target con il colesterolo LDL.

Uno sviluppo così rapido ha fortemente limitato lo studio e l'approfondimento del ruolo fisiologico di PCSK9 su altri parametri, che non coinvolgono necessariamente il colesterolo LDL. Con l'avanzamento della ricerca di base e clinica su PCSK9, si stanno delineando per questa proteina nuovi ruoli che coinvolgono anche il metabolismo glucidico e dei TG. Questi dati si basano sulla correlazione tra livelli plasmatici di PCSK9 e quelli dei TG, del glucosio e dei parametri di insulino-resistenza, tutte alterazioni riconducibili alla sindrome metabolica.

Inoltre, recenti studi di randomizzazione Mendeliana hanno evidenziato come mutazioni a carico dell'HMG-CoA riduttasi e di PCSK9, corrispondenti a una riduzione di colesterolo LDL, si associno all'insorgenza di diabete (64, 65). In particolare, l'associazione risulta statisticamente significativa soltanto in soggetti prediabetici (glicemia a digiuno ≥ 100 mg/dl). I dati sul ruolo di PCSK9 in questa alterazione metabolica sono al momento osservazionali, in alcuni casi anche contraddittori. In particolare, i meccanismi molecolari alla base del coinvolgimento di PCSK9 nel metabolismo dei TG e dell'insulino-resistenza, così come nel metabolismo glucidico, non sono ancora del tutto chiari. Tuttavia, come nel caso delle statine, il numero crescente di pazienti trattati con inibitori di PCSK9 e l'allungamento della durata del trattamento, potrà aiutare a definire meglio le relazioni tra PCSK9, sindrome metabolica e diabete.

Glossario

ApoB = apolipoprotein B, apolipoproteina B. È la principale componente proteica delle LDL, delle VLDL e dei chilomicroni (che veicolano i trigliceridi di origine endogena ed esogena). L'apoB è essenziale per l'assemblaggio, la secrezione e il metabolismo di queste lipoproteine. Esistono due isoforme di apoB: apoB100, prodotta a livello epatico e apoB48, sintetizzata esclusivamente a livello dell'intestino tenue come prodotto di editing dell'RNA del gene *APOB*, processo in cui si genera un codone di stop (UAA) a livello del residuo 2153 del gene. Come risultato di questo editing genomico, apoB48 e apoB100 condividono una stessa regione N-terminale, ma apoB48 perde la regione C-terminale di apoB100 legante il recettore per LDL. apoB48 inoltre è così chiamata perché rappresenta il 48% della sequenza di apoB100.

CETP = cholesteryl ester transfer protein, la proteina di trasferimento lipidico. Promuove il trasferimento degli esteri di colesterolo dalle HDL alle lipoproteine contenenti apo B (VLDL e LDL).

CVD = cardiovascular diseases, malattie cardiovascolari.

DMT2 = diabete mellito di tipo 2.

IDL = intermediate-density lipoprotein, lipoproteine a densità intermedia.

HDL = high-density lipoprotein, lipoproteine ad alta densità.

HMGCR = 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, Idrossi-Metil-Glutaryl-Coenzima A riduttasi.

HOMA-IR = homeostatic model assessment, indice che permette di valutare l'insulino-resistenza. Si ottiene applicando la seguente formula: (glicemia a digiuno x insulinemia a digiuno) / 405 se la glicemia è espressa in mg/dL; ove la glicemia fosse espressa in mmol/L, la formula da applicare è (glicemia x insulinemia)/22,5.

GOF = gain of function (o guadagno di funzione; si applica a varianti genetiche che determinano l'aumento di funzione di una specifica proteina).

LDL = low-density lipoprotein, lipoproteine a bassa densità.

LDL-C = LDL-cholesterol, colesterolo LDL.

LOF = loss of function (o perdita di funzione; si applica a varianti genetiche che determinano la perdita di funzione di una specifica proteina).

NPC1L1 = Niemann-Pick C1-Like 1, proteina Niemann-Pick C1-Like 1, presente sia nelle cellule epiteliali intestinali che in quelle epatiche; responsabile della captazione intestinale di colesterolo e fitosteroli.

PCSK9 = proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, proproteina convertasi subtilisina/kexina di tipo 9. Proteina che interagendo con LDLR ne impedisce il riciclo sulla membrana plasmatica promuovendone la degradazione lisosomiale.

PUFA = polyunsaturated fatty acids, acidi grassi polinsaturi.

SREBP = Sterol regulatory element binding protein, fattore trascrizionale che stimola l'espressione del gene codificante il recettore delle LDL e il gene codificante l'enzima HMG-CoA riduttasi, in condizioni di ridotto contenuto intracellulare di colesterolo.

TG = triglycerides, trigliceridi.

VLDL = very low density lipoprotein, lipoproteine a densità molto bassa.

RIASSUNTO

La sindrome metabolica, una condizione che comprende un cluster di fattori di rischio fra i quali l'insulino-resistenza, l'obesità, l'ipertensione e la dislipidemia aterogena, raddoppia il rischio di malattie cardiovascolari aterosclerotiche. I livelli circolanti della proteina PCSK9 (proteina convertasi subtilisina/kexina di tipo 9), il principale regolatore del recettore delle lipoproteine a bassa densità (LDL), correla con molti parametri lipidici nonché con gli indici di sensibilità all'insulina. Inoltre, sebbene studi clinici e preclinici inerenti l'associazione fra PCSK9 e l'insorgenza di diabete non abbiano dimostrato un effetto significativo dell'inibizione di PCSK9 sul metabolismo del glucosio, recenti analisi di randomizzazione Mendeliana hanno evidenziato come mutazioni a carico dei geni *HMG-CoA* riduttasi e *PCSK9*, corrispondenti a una riduzione di colesterolo LDL, si associno all'insorgenza di diabete. Quindi, lo scopo di questa rassegna è stato quello di riassumere i dati presenti in letteratura inerenti il ruolo di PCSK9 nella sindrome metabolica e nell'alterazione del profilo lipidico, dell'omeostasi del glucosio e dello stato infiammatorio.

Parole chiave: *diabete, insulino-resistenza, ipertrigliceridemia, proproteina convertasi subtilisina/kexina di tipo 9 (PCSK9), sindrome metabolica.*

Bibliografia

1. Grundy SM. Metabolic syndrome pandemic. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28: 629-36.
2. Alberti,KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009; 120: 1640-5.
3. Cholesterol Treatment Trialists C, Kearney PM, Blackwell L, Collins R, et al. Efficacy of cholesterol-lowering therapy in 18,686 people with diabetes in 14 randomised trials of statins: a meta-analysis. *Lancet*. 2008; 371: 117-25.
4. Catapano AL, Graham I, De Backer G, Wiklund O, et al. 2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias: The Task Force for the Management of Dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and European Atherosclerosis Society (EAS) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur Heart J*. 2016.
5. Haas ME, Attie AD, Biddinger SB. The regulation of ApoB metabolism by insulin. *Trends Endocrinol Metab*. 2013; 24: 391-7.
6. van der Aa MP, Fazeli Farsani S, Kromwijk LA, de Boer A, et al. How to screen obese children at risk for type 2 diabetes mellitus? *Clin Pediatr (Phila)*. 2014; 53: 337-42.
7. Ginsberg HN. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Invest*. 2000; 106: 453-8.
8. Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A, Lewis B. Influx *in vivo* of low density, intermediate density, and very low density lipoproteins into aortic intimas of genetically hyperlipidemic rabbits. Roles of plasma concentrations, extent of aortic lesion, and lipoprotein particle size as determinants. *Arterioscler Thromb*. 1992; 12: 6-18.
9. Nordestgaard BG, Wootton R, Lewis B. Selective retention of VLDL, IDL, and LDL in the arterial intima of genetically hyperlipidemic rabbits *in vivo*. Molecular size as a determinant of fractional loss from the intima-inner media. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995; 15: 534-42.
10. Tabas I, Williams KJ, Boren J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation*. 2007; 116: 1832-44.
11. Sparks JD, Sparks CE, Adeli K. Selective hepatic insulin resistance, VLDL overproduction, and hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012. 32: 2104-12.
12. Chernogubova E, Strawbridge R, Mahdessian H, Malarstig A, et al. Common and low-frequency genetic variants in the PCSK9 locus influence circulating PCSK9 levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012; 32: 1526-34.
13. Ghosh M, Galman C, Rudling M, Angelin B. Influence of physiological changes in endogenous estrogen on circulating PCSK9 and LDL cholesterol. *J Lipid Res*. 2015; 56: 463-9.
14. Feng Q, Wei WQ, Chung CP, Levinson RT, et al. The effect of genetic variation in PCSK9 on the LDL-cholesterol response to statin therapy. *Pharmacogenomics J*. 2016.
15. Costet P, Cariou B, Lambert G, Lalanne F, et al. Hepatic PCSK9 expression is regulated by nu-

- tritional status via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c. *J Biol Chem.* 2006; 281: 6211-8.
16. Rashid S, Tavori H, Brown PE, Linton MF, et al. Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 promotes intestinal overproduction of triglyceride-rich apolipoprotein B lipoproteins through both low-density lipoprotein receptor-dependent and -independent mechanisms. *Circulation.* 2014; 130: 431-41.
 17. Lakoski SG, Lagace TA, Cohen JC, Horton JD, et al. Genetic and metabolic determinants of plasma PCSK9 levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94: 2537-43.
 18. Seidah NG, Prat A. The proprotein convertases are potential targets in the treatment of dyslipidemia. *J Mol Med.* 2007; 85: 685-96.
 19. Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, Marcinkiewicz J, et al. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100: 928-33.
 20. Benjannet S, Rhoads D, Essalmani R, Mayne J, et al. NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol Chem.* 2004; 279: 48865-75.
 21. Essalmani R, Susan-Resiga D, Chamberland A, Abifadel M, et al. In vivo evidence that furin from hepatocytes inactivates PCSK9. *J Biol Chem.* 2011; 286: 4257-63.
 22. Han B, Eacho PI, Knierman MD, Troutt JS, et al. Isolation and characterization of the circulating truncated form of PCSK9. *J Lipid Res.* 2014; 55: 1505-14.
 23. Lipari MT, Li W, Moran P, Kong-Beltran M, et al. Furin-cleaved proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) is active and modulates low density lipoprotein receptor and serum cholesterol levels. *J Biol Chem.* 2012; 287: 43482-91.
 24. Dewpura T, Raymond A, Hamelin J, Seidah NG, et al. PCSK9 is phosphorylated by a Golgi casein kinase-like kinase ex vivo and circulates as a phosphoprotein in humans. *FEBS J.* 2008; 275: 3480-93.
 25. Strom TB, Tveten K, Leren TP. PCSK9 acts as a chaperone for the LDL receptor in the endoplasmic reticulum. *Biochem J.* 2014; 457: 99-105.
 26. Poirier S, Mayer G, Poupon V, McPherson PS, et al. Dissection of the endogenous cellular pathways of PCSK9-induced low density lipoprotein receptor degradation: evidence for an intracellular route. *J Biol Chem.* 2009; 284: 28856-64.
 27. Canuel M, Sun X, Asselin MC, Paramithiotis E, et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) can mediate degradation of the low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1). *PLoS One.* 2013; 8: e64145.
 28. Careskey HE, Davis RA, Alborn WE, Troutt JS, et al. Atorvastatin increases human serum levels of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *J Lipid Res.* 2008; 49: 394-8.
 29. Jeong HJ, Lee HS, Kim KS, Kim YK, et al. Sterol-dependent regulation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 expression by sterol-regulatory element binding protein-2. *J Lipid Res.* 2008; 49: 399-409.
 30. Li H, Dong B, Park SW, Lee HS, et al. Hepatocyte nuclear factor 1alpha plays a critical role in PCSK9 gene transcription and regulation by the natural hypocholesterolemic compound berberine. *J Biol Chem.* 2009; 284: 28885-95.
 31. Eberle D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P, et al. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie.* 2004; 86: 839-48.
 32. Horton JD, Shah NA, Warrington JA, Anderson NN, et al. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100: 12027-32.
 33. Pramfalk C, Jiang ZY, Cai Q, Hu H, et al. HNF1alpha and SREBP2 are important regulators of NPC1L1 in human liver. *J Lipid Res.* 2010; 51: 1354-62.
 34. Shende VR, Wu M, Singh AB, Dong B, et al. Reduction of circulating PCSK9 and LDL-C levels by liver-specific knockdown of HNF1alpha in normolipidemic mice. *J Lipid Res.* 2015; 56: 801-9.
 35. Norata GD, Tavori H, Pirillo A, Fazio S, et al. Biology of proprotein convertase subtilisin kexin 9: beyond low-density lipoprotein cholesterol lowering. *Cardiovasc Res.* 2016; 112: 429-42.
 36. Persson L, Cao G, Stahle L, Sjoberg BG, et al. Circulating proprotein convertase subtilisin kexin type 9 has a diurnal rhythm synchronous with cholesterol synthesis and is reduced by fasting in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30: 2666-72.
 37. Browning JD, Horton JD. Fasting reduces plasma proprotein convertase, subtilisin/kexin type 9 and cholesterol biosynthesis in humans. *J Lipid Res.* 2010; 51: 3359-63.
 38. Richard C, Couture P, Desroches S, Benjannet S, et al. Effect of the Mediterranean diet with and without weight loss on surrogate markers of cholesterol homeostasis in men with the metabolic syndrome. *Br J Nutr.* 2012; 107: 705-11.
 39. Rodriguez-Perez, C., V.R. Ramprasath, S. Pu, A. Sabra, et al., Docosahexaenoic Acid Attenuates Cardiovascular Risk Factors via a Decline in Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) Plasma Levels. *Lipids.* 2016; 51: 75-83.
 40. Bjermo H, Iggman D, Kullberg J, Dahlman I, et

- al. Effects of n-6 PUFAs compared with SFAs on liver fat, lipoproteins, and inflammation in abdominal obesity: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2012; 95: 1003-12.
41. Simonen P, Stenman UH, Gylling H. Serum proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 concentration is not increased by plant stanol ester consumption in normo- to moderately hypercholesterolaemic non-obese subjects. The BLOOD FLOW intervention study. *Clin Sci (Lond).* 2015; 129: 439-46.
 42. Rudling M, Angelin B. Stimulation of rat hepatic low density lipoprotein receptors by glucagon. Evidence of a novel regulatory mechanism in vivo. *J Clin Invest.* 1993; 91: 796-805.
 43. Persson L, Galman C, Angelin B, Rudling M. Importance of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 in the hormonal and dietary regulation of rat liver low-density lipoprotein receptors. *Endocrinology.* 2009; 150: 1140-6.
 44. Miao J, Manthena PV, Haas ME, Ling AV, et al. Role of Insulin in the Regulation of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015; 35: 1589-96.
 45. Khodabandehloo H, Gorgani-Firuzjaee S, Panahi G, Meshkani R. Molecular and cellular mechanisms linking inflammation to insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Transl Res.* 2016; 167: 228-56.
 46. Adeli K, Taghibiglou C, Van Iderstine SC, Lewis GF. Mechanisms of hepatic very low-density lipoprotein overproduction in insulin resistance. *Trends Cardiovasc Med.* 2001; 11: 170-6.
 47. Ruscica M, Ricci C, Macchi C, Magni P, et al. Suppressor of Cytokine Signaling-3 (SOCS-3) Induces Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9 (PCSK9) Expression in Hepatic HepG2 Cell Line. *J Biol Chem.* 2016; 291: 3508-19.
 48. Kappelle PJ, Lambert G, Dullaart RP. Plasma proprotein convertase subtilisin-kexin type 9 does not change during 24 h insulin infusion in healthy subjects and type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis.* 2011; 214: 432-5.
 49. Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, Murdock PR, et al. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 300: 472-6.
 50. Rashid S, Kastelein JJ. PCSK9 and resistin at the crossroads of the atherogenic dyslipidemia. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2013; 11: 1567-77.
 51. Codoner-Franch P, Alonso-Iglesias E. Resistin: insulin resistance to malignancy. *Clin Chim Acta.* 2015; 438: 46-54.
 52. Melone M, Wilsie L, Palyha O, Strack A, et al. Discovery of a new role of human resistin in hepatocyte low-density lipoprotein receptor suppression mediated in part by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *J Am Coll Cardiol.* 2012; 59: 1697-705.
 53. Lewis GF, Steiner G. Hypertriglyceridemia and its metabolic consequences as a risk factor for atherosclerotic cardiovascular disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev.* 1996; 12: 37-56.
 54. Shojaee-Moradie F, Ma Y, Lou S, Hovorka R, et al. Prandial hypertriglyceridemia in metabolic syndrome is due to an overproduction of both chylomicron and VLDL triacylglycerol. *Diabetes.* 2013; 62: 4063-9.
 55. Alborn WE, Cao G, Careskey HE, Qian YW, et al. Serum proprotein convertase subtilisin kexin type 9 is correlated directly with serum LDL cholesterol. *Clin Chem.* 2007; 53: 1814-9.
 56. Ridker PM, Pradhan A, MacFadyen JG, Libby P, et al. Cardiovascular benefits and diabetes risks of statin therapy in primary prevention: an analysis from the JUPITER trial. *Lancet.* 2012; 380: 565-71.
 57. Ruscica M, Macchi C, Morlotti B, Sirtori CR, et al. Statin therapy and related risk of new-onset type 2 diabetes mellitus. *Eur J Intern Med.* 2014; 25: 401-6.
 58. Collins PD, Sattar N. Glycaemic Effects of Non-statin Lipid-Lowering Therapies. *Curr Cardiol Rep.* 2016; 18: 133.
 59. Colhoun HM, Ginsberg HN, Robinson JG, Leiter LA, et al. No effect of PCSK9 inhibitor alirocumab on the incidence of diabetes in a pooled analysis from 10 ODYSSEY Phase 3 studies. *Eur Heart J.* 2016; 37: 2981-9.
 60. Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, et al. Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes, 2015: a patient-centred approach. Update to a position statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetologia.* 2015; 58: 429-42.
 61. Blom DJ, Koren MJ, Roth E, Monsalvo ML, et al. Evaluation of the efficacy, safety and glycaemic effects of evolocumab (AMG 145) in hypercholesterolaemic patients stratified by glycaemic status and metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab.* 2017; 19: 98-107.
 62. Ferri N, Bellosta S, Baldessin L, Boccia D, et al. Pharmacokinetics interactions of monoclonal antibodies. *Pharmacol Res.* 2016; 111: 592-9.
 63. Athyros VG, Tziomalos K, Doumas M, Sfikas G, et al. The effect of proprotein convertase subtilisin-kexin type 9 and its inhibition on glucose metabolism and cardiovascular risk. We should do better the second time after statins. *Curr Pharm Des.* 2017.
 64. Lotta LA, Sharp SJ, Burgess S, Perry JR, et al.

- Association Between Low-Density Lipoprotein Cholesterol-Lowering Genetic Variants and Risk of Type 2 Diabetes: A Meta-analysis. *JAMA*. 2016; 316: 1383-91.
65. Ference BA, Robinson JG, Brook RD, Catapano AL, et al. Variation in PCSK9 and HMGCR and Risk of Cardiovascular Disease and Diabetes. *N Engl J Med*. 2016; 375: 2144-53.
 66. Preiss D, Mafham M. PCSK9 inhibition: the dawn of a new age in cholesterol lowering? *Diabetologia*. 2016.
 67. Bonnefond A, Yengo L, Le May C, Fumeron F, et al. The loss-of-function PCSK9 p.R46L genetic variant does not alter glucose homeostasis. *Diabetologia*. 2015; 58: 2051-5.
 68. Sattar N. PCSK9 inhibitors and diabetes risk: a question worth asking? *Eur Heart J*. 2016; 37: 2990-2.
 69. Ouguerram K, Chetiveaux M., Zair Y., Costet P, et al. Apolipoprotein B100 metabolism in autosomal-dominant hypercholesterolemia related to mutations in PCSK9. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24: 1448-53.
 70. Twisk J, Gillian-Daniel DL, Tebon A, Wang L, et al. The role of the LDL receptor in apolipoprotein B secretion. *J Clin Invest*. 2000; 105: 521-32.
 71. Cariou B, Langhi C, Le Bras M, Bortolotti M, et al. Plasma PCSK9 concentrations during an oral fat load and after short term high-fat, high-fat high-protein and high-fructose diets. *Nutr Metab (Lond)*. 2013; 10: 4.
 72. Kwakernaak AJ, Lambert G, Dullaart RP. Plasma proprotein convertase subtilisin-kexin type 9 is predominantly related to intermediate density lipoproteins. *Clin Biochem*. 2014; 47: 679-82.
 73. Chan DC, Wong AT, Pang J, Barrett PH, et al. Inter-relationships between proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, apolipoprotein C-III and plasma apolipoprotein B-48 transport in obese subjects: a stable isotope study in the postprandial state. *Clin Sci (Lond)*. 2015; 128: 379-85.
 74. Roubtsova A, Munkonda MN, Awan Z, Marcinkiewicz J, et al. Circulating proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) regulates VLDL protein and triglyceride accumulation in visceral adipose tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011; 31: 785-91.
 75. Paradis G, Lambert M, O'Loughlin J, Lavallee C, et al. The Quebec Child and Adolescent Health and Social Survey: design and methods of a cardiovascular risk factor survey for youth. *Can J Cardiol*. 2003; 19: 523-31.
 76. Abifadel M, Guerin M, Benjannet S, Rabes JP, et al. Identification and characterization of new gain-of-function mutations in the PCSK9 gene responsible for autosomal dominant hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2012; 223: 394-400.
 77. Aung LH, Yin RX, Miao L, Hu XJ, et al. The proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 gene E670G polymorphism and serum lipid levels in the Guangxi Bai Ku Yao and Han populations. *Lipids Health Dis*. 2011; 10: 5.
 78. Ferri N, Corsini A, Macchi C, Magni P, et al. Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 and high-density lipoprotein metabolism: experimental animal models and clinical evidence. *Transl Res*. 2016; 173: 19-29.
 79. Millar JS, Reyes-Soffer G, Jumes P, Dunbar RL, et al. Anacetrapib lowers LDL by increasing ApoB clearance in mildly hypercholesterolemic subjects. *J Clin Invest*. 2015; 125: 2510-22.
 80. Hirayama S, Miida T. Small dense LDL: An emerging risk factor for cardiovascular disease. *Clin Chim Acta*. 2012; 414: 215-24.
 81. Diffenderfer MR, Schaefer EJ. The composition and metabolism of large and small LDL. *Curr Opin Lipidol*. 2014; 25: 221-6.
 82. Zhang Y, Xu RX, Li S, Zhu CG, et al. Association of plasma small dense LDL cholesterol with PCSK9 levels in patients with angiographically proven coronary artery disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2015; 25: 426-33.
 83. 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: 1722-34.