

MODELLI DI MALATTIA**PCSK9 E ATEROSCLEROSI:
SOLO LDL COLESTEROLO?****PCSK9 and atherosclerosis:
effects beyond LDL cholesterol****MASSIMILIANO RUSCICA¹, CESARE R. SIRTORI², ALBERTO CORSINI¹,
NICOLA FERRI³**¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano;²Centro Dislipidemie, A.S.S.T. Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano;³Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università degli Studi di Padova**SUMMARY**

The identification of PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9), as a pivotal regulator of LDL cholesterol (LDL-C) is relatively recent, and a number of studies have described its physiological function. This is of particular interest since the approval of monoclonal antibodies anti PCSK9 for therapeutic use. Results from *in vitro*, clinical and pre-clinical studies, indicate a possible involvement of PCSK9 on inflammatory response, such as the recruitment of pro-inflammatory monocytes in the atherosclerotic plaque and the size of the necrotic core in human plaques. In addition, PCSK9 seems to influence the vascular response facilitating the accumulation of smooth muscle cells in the neointima and to facilitate the platelet aggregation. However, to what extent PCSK9 acts directly on the vascular wall still needs to be determined. Nevertheless, the effect of monoclonal antibodies anti PCSK9 could determine not only a strong reduction of LDL-C, but also a potential pleiotropic effect, as previously suggested with statins. New therapeutic strategies such as siRNA and vaccine, potentially more effective than monoclonal antibodies to inhibit the intracellular PCSK9, may help to better understand the potential pleiotropic effects of PCSK9. In the present review, it will be described the direct role of PCSK9 on atherosclerosis and its potential use as circulating biomarker for a better stratification of the cardiovascular risk.

Keywords: PCSK9; atherosclerosis; pleiotropic effects; smooth muscle cells; platelets.

Introduzione

L'interesse per la proteina PCSK9 (proteina convertasi subtilisina/kexina di tipo 9) nasce dall'osservazione di Abifadel et al. del 2003 inerente l'associazione tra le mutazioni genetiche a carico del suo gene codificante *PCSK9* e l'ipercolesterolemia

autosomica dominante (1). La scoperta di questa convertasi ha permesso di identificare un nuovo importante modulatore dell'omeostasi del colesterolo e a favorire intense attività di ricerca di base. Studi su modelli sperimentali *in vivo* ed *in vitro*, hanno quindi permesso di chiarire meglio il legame tra questa proteina extracellulare, l'espressione del recettore delle lipoproteine a bassa densità (LDL) e, quindi, della colesterolemia LDL (LDL-C).

PCSK9, attraverso l'interazione con il

Indirizzo per la corrispondenza

Nicola Ferri

E-mail: nicola.ferri@unipd.it

recettore delle LDL (LDL-R), induce la sua degradazione veicolandolo nei lisosomi e bloccandone il suo riciclo sulla membrana citoplasmatica (2). Poiché PCSK9 induce la degradazione del LDL-R, una sua inibizione farmacologica prolungherebbe la sua durata d'azione, determinando una riduzione drastica di LDL-C (3). Da qui nasce l'interesse in PCSK9 quale possibile bersaglio farmacologico. Tuttavia, oltre all'ovvia associazione inerente la degradazione del LDL-R mediato da PCSK9 e l'ipercolesterolemia, nuove evidenze sperimentali e cliniche stanno ampliando le nostre conoscenze su questa proteina e altri meccanismi attraverso i quali PCSK9 potrebbe facilitare lo sviluppo dell'aterosclerosi, in maniera indipendente dal suo impatto sul metabolismo lipidico. Nella presente rassegna verranno riassunti e discussi i dati ad oggi disponibili sull'impatto di PCSK9 sull'aterosclerosi in maniera dipendente e indipendente dai lipidi.

PCSK9 e metabolismo delle lipoproteine

L'impatto di PCSK9 sulle LDL è dimostrato chiaramente sia da studi di correlazione sulla popolazione generale sia da evidenze genetiche. Lo studio multi-etnico di popolazione, condotto su 6.101 adulti, residenti nella contea di Dallas, denominato "Dallas Heart Study", ha dimostrato una correlazione tra i livelli plasmatici di PCSK9 e quelli di LDL-C (4). Tuttavia, sebbene molto riproducibile, questa associazione è molto debole. Infatti, nonostante le concentrazioni plasmatiche di PCSK9 correlino con quelle del LDL-C, l'associazione inversa non è sempre dimostrata ed il cambiamento nella concentrazione plasmatica di LDL-C non necessariamente determina cambiamenti nei livelli di

PCSK9. La variazione dei livelli plasmatici di PCSK9 è responsabile di circa il 7% della variazione del LDL-C (4).

Lo studio genetico ARIC (Atherosclerosis Risk in Communities), ha successivamente permesso di identificare come mutazioni a carico del gene *PCSK9* si riflettessero sui livelli plasmatici di LDL-C e sulle patologie cardiovascolari (5). Lo studio ha previsto il reclutamento di 13.761 soggetti e l'analisi di mutazioni a carico di *PCSK9* in 9.524 soggetti caucasici e 3.362 soggetti di colore; il 2,6% di quest'ultimi sono risultati portatori di mutazioni non-senso di *PCSK9*. Queste mutazioni erano associate ad una riduzione media del 28% del LDL-C e dell'88% del rischio cardiovascolare. In modo simile, il 3,2% dei soggetti caucasici presentavano una mutazione sul gene *PCSK9* associata a una riduzione sia del del LDL-C (-15%) che del rischio cardiovascolare (-47%) (5). I risultati di questo studio hanno, non solo consolidato la relazione tra PCSK9 e LDL-C, ma anche indicato come una riduzione moderata e duratura del LDL-C, causata dalla mutazione di *PCSK9*, sia associata ad una riduzione molto significativa del rischio cardiovascolare, anche in una popolazione con alta prevalenza di fattori di rischio cardiovascolari indipendenti dai lipidi.

A queste evidenze genetiche/epidemiologiche, si sono poi susseguiti studi sperimentali che hanno potuto confermare la relazione tra LDL-C e PCSK9. Per esempio, modelli animali knockout per il gene di *PCSK9* mostrano una riduzione dei livelli plasmatici di colesterolo totale del 40% e del LDL-C dell'80% rispetto ai rispettivi controlli non mutati (wild-type) (6, 7). A tale riguardo, la delezione specifica a livello epatico dell'espressione di *PCSK9* porta ad una drastica riduzione dei livelli plasmatici di PCSK9 (7). Questo dato suggerisce come i valori di PCSK9

plasmatico siano principalmente di origine epatica, sebbene altri tessuti ne esprimano livelli significativi. Quindi, PCSK9 prodotto dai tessuti extraepatici potrebbe esercitare effetti esclusivamente intracellulari o extracellulari di tipo autocrino. La delezione del gene *PCSK9* a livello epatico ha determinato una riduzione dei livelli di colesterolo totale del 27%, quindi un fenotipo attenuato rispetto al modello animale "full knock-out" (-42% di colesterolo totale); questa osservazione dimostra come la secrezione extraepatica di PCSK9 svolga un ruolo importante nell'omeostasi del colesterolo (7).

Con l'avanzare delle nostre conoscenze si sta sempre più delineando l'ipotesi che l'impatto di PCSK9 sui lipidi e sull'aterosclerosi coinvolga meccanismi che vanno oltre la regolazione della clearance delle lipoproteine LDL. PCSK9, infatti, non lega esclusivamente il LDL-R ma ha, come ulteriori bersagli molecolari, il recettore delle lipoproteine a densità molto bassa (VLDL), il CD36, l'ApoER2 e recettore delle LDL di tipo 1 (LRP1) (8-10). Il contributo di questi recettori nell'omeostasi del colesterolo deve ancora essere chiarito, sebbene vi siano numerose evidenze che coinvolgono il metabolismo delle lipoproteine ricche in trigliceridi (TRL). Vista l'importanza delle TRL nell'induzione e propagazione della placca aterosclerotica, l'impatto di PCSK9 su queste particelle altamente pro-aterogene potrebbe fornire un ulteriore meccanismo attraverso il quale gli inibitori di PCSK9 possono ridurre il rischio di patologie cardiovascolari su base aterosclerotica.

La relazione tra PCSK9 e TRL, deriva dalla correlazione delle sue concentrazioni plasmatiche e i livelli dei trigliceridi a digiuno, sia negli uomini che nelle donne, ma non negli obesi (4, 11-15). Soggetti portatori della mutazione S127R, associata

ad un aumento di funzionalità di PCSK9, mostrano dei livelli più alti della norma di lipoproteine contenenti apoB100, comprese le VLDL e i remnants (16). Inoltre, anticorpi monoclonali anti-PCSK9 riducono i livelli plasmatici di trigliceridi, sebbene quest'ultimo effetto risulti modesto rispetto a quello esercitato sulla colesterolemia LDL, anche considerando l'effetto delle statine sui livelli plasmatici circolanti di trigliceridi (17, 18).

Il turnover dell'apolipoproteina B (apoB) è fortemente influenzato dalla captazione, di lipoproteine contenenti apoB, mediata dal LDL-R. L'inibizione farmacologica di PCSK9 potrebbe quindi avere un impatto significativo sulle concentrazioni delle TRL, tramite la sua azione sul LDL-R. Le apoB di neosintesi vengono degradate, in misura importante, da compartimenti autofagici, prima di essere secreta dalle cellule (19). Quindi, la quantità di apoB secreta dal fegato, e dunque di VLDL, è dipendente dalla frazione di apoB che evita la degradazione post-traduzionale (20). Inoltre, anche la ricaptazione di lipoproteine di neosintesi rientra nel bilancio netto di apoB liberata dal fegato (21). Il LDL-R influenza il destino post-traduzionale di apoB aumentandone la degradazione prima della sua secrezione e mediando la ricaptazione di particelle lipoproteiche nascenti (22). In questo contesto, la degradazione del LDL-R mediata da PCSK9 può causare ipertrigliceridemia liberando apoB dal catabolismo intracellulare indotto dal LDL-R, così come riducendo la captazione di lipoproteine nascenti contenenti apoB (per esempio le VLDL). A tale riguardo, numerosi modelli sperimentali hanno dimostrato come PCSK9 aumenti direttamente la produzione epatica di apoB e di lipoproteine contenenti apoB. Un'aumentata espressione di PCSK9 a livello epatico in topi a digiuno, porta a un aumento mol-

to significativo della produzione di apoB e di trigliceridi legati alle VLDL (23), così come un aumento nella *de novo* lipogenesi, anche in assenza di apoE e del LDL-R (24). A variazioni nella produzione epatica di PCSK9 corrispondono cambiamenti in quelli della produzione di VLDL (25). In modelli animali l'assenza di PCSK9 determina una riduzione dei livelli plasmatici di trigliceridi postprandiali (26).

Questo effetto potrebbe essere causato dall'aumentata espressione, a livello del tessuto adiposo viscerale, sia del recettore delle VLDL che del CD36. Infatti, modelli animali PCSK9 knockout mostrano un accumulo di trigliceridi a livello del tessuto adiposo perigonadale e perirenale, effetto dipendente dall'aumentata espressione del recettore delle VLDL e quindi della captazione di TRL (26). Malgrado questi dati sperimentali, i meccanismi che governano la relazione tra PCSK9 e il metabolismo delle TRL sono ancora da definire.

L'intestino è secondo solo al fegato in termini di livelli di espressione di PCSK9, dove quest'ultima proteina svolge un ruolo importante nella regolazione delle TRL plasmatiche di derivazione intestinale e contenenti apoB48, quale principale proteina strutturale. PCSK9 aumenta la produzione e la secrezione di TRL intestinali tramite meccanismi dipendenti e indipendenti dalla trascrizione genica, così come dai fattori di trascrizione SREBP (sterol-regulatory element-binding proteins), con conseguente accumulo di lipidi negli enterociti (26-29). Sebbene, nel modello animale si sia osservato un impatto importante di PCSK9 nell'ipertrigliceridemia postprandiale, soggetti portatori della doppia mutazione R104C/V114A, associata a perdita di funzionalità a carico di PCSK9, non hanno dimostrato una variazione significativa del profilo tri-

gliceridemico postprandiale (11). Inoltre, in volontari sani, la somministrazione di alirocumab (5 iniezioni da 150 mg ogni due settimane) non sembra influenzare in maniera significativa lo stesso parametro (30). Tuttavia, al momento non si può escludere un effetto ateroprotettivo addizionale degli inibitori di PCSK9 mediante un miglioramento del profilo trigliceridemico postprandiale. A tale riguardo, PCSK9 non solo regola il metabolismo delle TRL, ma riduce l'assorbimento del colesterolo inibendo l'espressione della proteina Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1), il fattore principale responsabile della captazione del colesterolo dal lume intestinale, a opera degli enterociti (28). Infine, recentemente si è osservato come il contributo positivo di PCSK9 sui livelli di colesterolo plasmatico e sui livelli di trigliceridi sia dipendente esclusivamente dall'espressione del LDL-R a livello epatico ma non a livello intestinale (24).

Una terza lipoproteina modulata da PCSK9, è la Lipoproteina (a) (Lp(a)), una particella lipoproteica a bassa densità costituita da una lipoproteina(a) (variante proteica con un numero altamente eterogeneo di "plasminogen kringle 4 repeats") legata covalentemente a una apolipoproteina B (31). Dati epidemiologici e genetici hanno dimostrato, in maniera molto riproducibile, che la Lp(a) è un fattore di rischio indipendente nell'ambito delle patologie cardiovascolari su base aterosclerotica (32-35). Gli anticorpi monoclonali anti-PCSK9 riducono del 25-30% i livelli plasmatici di Lp(a), indipendentemente dai suoi livelli di pretrattamento (36, 37). Questa osservazione ha generato un nuovo interesse nel definire il legame molecolare e cellulare tra PCSK9, LDL-R e metabolismo della Lp(a), anche in considerazione del fatto che, ad oggi, non vi siano terapie valide per ridurre la Lp(a).

La riduzione di Lp(a), ad opera degli inibitori di PCSK9, è potenzialmente ascrivibile al loro effetto molto marcato di induzione del LDL-R e quindi della clearance di Lp(a). Tuttavia, va ricordato come nell'uomo LDL-R non è una via fisiologicamente rilevante del catabolismo della Lp(a) (38). In modo opposto, uno studio più recente ha dimostrato che l'effetto di PCSK9 sulla Lp(a) da una aumentata ricaptazione piuttosto che una ridotta secrezione (39). Infine, vi è anche da sottolineare che PCSK9 può circolare in forma legata alle particelle Lp(a) in soggetti con livelli elevati delle stesse (40). In questo contesto, l'iniezione di anticorpi anti- PCSK9 potrebbe portare alla formazione di immunocomplessi sulla superficie delle particelle di

Lp(a) che verrebbero poi eliminate mediante meccanismi solitamente non coinvolti con il catabolismo delle lipoproteine ma più delle IgG (41).

PCSK9 e ruolo proaterosclerotico

PCSK9 induce una perturbazione del metabolismo lipidico con conseguente variazione nei livelli lipidici circolanti; tale assioma rappresenta il meccanismo più ovvio che lega PCSK9 all'aterosclerosi. Tuttavia, recentemente sono stati condotti studi sia sperimentali sia clinici, al fine di verificare un effetto diretto di PCSK9 sulla placca aterosclerotica, indipendentemente dalle variazioni dei lipidi. I risultati di questi studi hanno chiarito che l'azione proaterosclerotica di PCSK9 non è dovuta

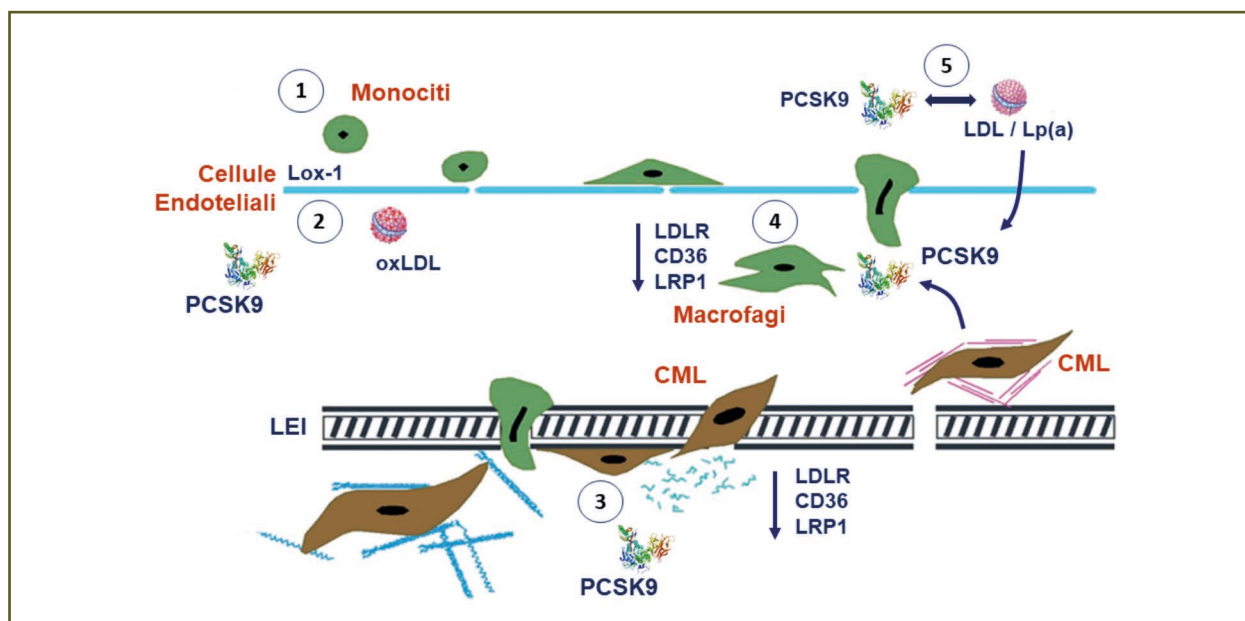


Figura 1 - Rappresentazione schematica degli effetti diretti di PCSK9 sulla placca. 1) Evidenze sperimentali e cliniche suggeriscono che PCSK9 regoli il reclutamento di monociti proinfiammatori circolanti (Ly6C^{hi}) nella placca aterosclerotica. 2) PCSK9 induce l'espressione del recettore delle LDL ossidate (oxLDL) in cellule endoteliali e muscolari lisce (CML). Questo effetto potrebbe contribuire all'evoluzione della placca aterosclerotica. PCSK9 è presente nella placca aterosclerotica ed espressa da CML. 3) PCSK9 modula la proliferazione e la migrazione delle CML e l'espressione di recettori di superficie, quali LDL-R, LRP1 e CD36. 4) Il suo rilascio da queste cellule influenza direttamente l'espressione di LDL-R sui macrofagi. 5) PCSK9 è presente nel circolo sistemico in forma libera e legata alle lipoproteine (LDL e Lp(a)); in forma legata potrebbe accumularsi nella placca aterosclerotica, influenzandone la composizione. LEI: lamina elastica interna.

esclusivamente all'effetto sulle concentrazioni plasmatiche delle lipoproteine contenenti apoB (*Figura 1*).

Un primo dato inerente un effetto diretto di PCSK9 a livello della placca ateromasica è rappresentata dalla scoperta che la proteina PCSK9 è espressa a livello delle cellule muscolari lisce (CML) e, in misura minore, nelle cellule endoteliali (42-45). Inoltre, PCSK9 è riscontrabile a livello della placca aterosclerotica (endoarterectomie carotidiche) in aree parzialmente sovrapponibili a quelle occupate dalle CML (42, 46). Da un punto di vista meramente funzionale, PCSK9, rilasciato dalle CML, potrebbe influenzare, in modo paracrino, l'espressione del LDL-R sulla superficie cellulare dei macrofagi (42). L'espressione di PCSK9 nelle CML è influenzata dallo "shear stress", con una massima secrezione a valori inferiori di stress corrispondenti alla correlazione tra shear stress e punti di biforcazione delle arterie (44). Inoltre, in assenza di PCSK9, si osserva una parziale protezione della formazione della neointima in risposta ad insulto vascolare (47).

Un aspetto molto interessante della relazione tra infiammazione, PCSK9 e aterosclerosi, coinvolge il recettore LOX-1 coinvolto nella captazione delle LDL ossidate. L'espressione di LOX-1 è aumentata in uno stato infiammatorio. Nel modello animale knock-out per il *LDL-R* e sottoposto a dieta ipercolesterolemica, l'aterosclerosi e infiammazione vascolare sono ridotte in assenza di *LOX-1* (48). La relazione tra PCSK9 e LOX-1 risiede proprio in un'autoregolazione che coinvolge PCSK9 nell'induzione della trascrizione di LOX-1, il quale a seguito della sua attivazione stimola PCSK9 (43). L'effetto delle nuove terapie anti-PCSK9 su LOX-1, e il loro possibile effetto antiaterosclerotico, sono ancora da definirsi.

L'effetto di PCSK9 sulla placca aterosclerotica, nei modelli sperimentali, è del tutto dipendente dall'espressione del LDL-R, tuttavia in assenza di apoE, non si osservano variazioni significative nel profilo lipidico, ma la sovraespressione di PCSK9 influenza direttamente la lesione aterosclerotica (49, 50). Inoltre, la placca ateromasica dei topi apoE knock-out ma transgenici per PCSK9 hanno un contenuto maggiore di monociti Ly6C^{hi}, ovvero a carattere proinfiammatorio (24). Queste osservazioni dimostrano come PCSK9 possa influenzare in maniera significativa la placca aterosclerotica mediante meccanismi indipendenti dalla variazione dei lipidi plasmatici. PCSK9 potrebbe promuovere l'aterosclerosi in modo diretto modulando l'ingresso di monociti proinfiammatori nella parete vasale, sempre mediante l'azione a carico del LDL-R presente nella placca. Ciò suggerisce come un'azione inibitoria a carico di PCSK9 potrebbe migliorare la patologia cardiovascolare aterosclerotica mediante meccanismi dipendenti ed indipendenti dai lipidi.

Un'ulteriore validazione del ruolo di PCSK9 sull'infiammazione intrapacca, quindi indipendente dai lipidi plasmatici, deriva da studi condotti in modelli animali knock-out per apoE e LDL-R ma sovraesprimenti PCSK9 in cellule di derivazione midollare (51). Sebbene questi animali abbiano valori molto simili di lipidi plasmatici e dimensioni delle placche, la presenza di livelli elevati di PCSK9 nei monociti/macrofagi determinano a un aumento del contenuto di monociti Ly6C^{hi}. Inoltre, l'espressione di citochine proinfiammatorie è influenzata dalla presenza di PCSK9, in maniera sempre dipendente dalla presenza del LDL-R (51).

È importante considerare le evidenze

di questi studi in un contesto più ampio. In particolare, studi precedenti hanno dimostrato che leucociti proinfiammatori possono modulare la composizione della lesione ateromasica e sono mediatori importanti nella progressione dell'aterosclerosi. Inoltre, la composizione della lesione, e non le dimensioni, rappresenta il fattore più rilevante per l'eventuale rottura della placca e la successiva trombosi (52, 53). Quindi, sulla base di questi dati sperimentali, e non solo, si potrebbe ipotizzare che, anche in assenza di variazioni del profilo lipidico, PCSK9 contribuisce direttamente all'aterogenesi alterando la morfologia della placca e aumentando l'infiltrazione dei monociti Ly6C^{hi}. Questi effetti sembrerebbero essere per lo più dipendenti dal LDL-R, sebbene altri componenti della famiglia del LDL-R, quali

LRP1, possono giocare un ruolo nella risposta infiammatoria associata all'aterosclerosi (54).

PCSK9 e aterosclerosi: studi clinici

Dagli studi sperimentali descritti in precedenza si è poi cercato di traslare e verificare in ambito clinico, mediante studi di "imaging", la relazione PCSK9 e placca aterosclerotica (Tabella). Chan e collaboratori, misurando l'ispessimento carotideo dell'intima-media (CIMT) in 295 soggetti asintomatici, hanno osservato un'associazione significativa tra PCSK9 e il CIMT, indipendente dai classici fattori di rischio cardiovascolari, quali sesso, ipertensione, fumo di sigaretta, LDL-C, trigliceridi, Lp(a), obesità, e biomarcatori infiammatori (55). Questa osservazione

Tabella - Evidenze cliniche di correlazione tra livelli plasmatici di PCSK9 e parametri di patologia cardiovascolare.

Parametro	Effetto	Referenza
cIMT	Associazione positiva con i livelli plasmatici di PCSK9 in soggetti asintomatici, ipertesi, e con ipercolesterolemia familiare	(55-57)
Entità subclinica di aterosclerosi	Nessuna correlazione tra le concentrazioni di PCSK9 e CIMT, dilatazione flusso-mediata, o integrale della velocità di risposta di iperemia post-ischemica	(58)
Velocità dell'onda sfingica	Associazione positiva con i livelli plasmatici di PCSK9 in soggetti sani	(59)
Calcificazione arteriosa coronarica	Correlazione positiva con i livelli plasmatici di PCSK9 in soggetti sani	(60)
Espressione monocitaria della chemochina CCR2	Inibitori di PCSK9 (alirocumab ed evolocumab) riducono l'espressione di CCR2, marcatore proinfiammatorio monocitario	(61)
IVUS-VH	Associazione tra PCSK9 e dimensione del core necrotico	(63)
Aggregazione piastrinica	Relazione diretta tra i livelli di PCSK9 e la reattività piastrinica misurata ex-vivo dopo stimolazione con ADP	(77)
hsCRP	Relazione positiva tra PCSK9 e hsCRP	(4)
hsCRP	Inibitori di PCSK9 (alirocumab, evolocumab e bococizumab) non riducono i livelli di hsCRP	(64)
Area totale della placca	Correlazione positiva con i livelli di PCSK9 in soggetti non infartuati	(67)
Area totale della placca	Regression della placca dopo riduzione marcata di LDL-C con evolocumab	(90)

cIMT: ispessimento carotideo dell'intima-media; IVUS-VH: tecniche istologiche virtuali di ultrasonografia intravascolare; hsCRP: proteina C reattiva ad alta sensibilità.

è in linea con quanto osservato in studi più piccoli focalizzati sempre sulla correlazione PCSK9 e CIMT (56, 57). Risultati contrastanti sono stati invece osservati in una sottoanalisi dello studio FATE (Firefighters and Their Endothelium) che ha valutato i fattori di rischio quali biomarcatori, dilatazione flusso-mediata e CIMT, in 1.527 uomini di mezza età esenti da patologia vascolare (58). In questo caso, mentre le concentrazioni di PCSK9 correlavano con numerosi fattori di rischio tradizionali, non si è riscontrata una relazione tra i suoi livelli plasmatici e l'entità subclinica dell'aterosclerosi. In una sottopopolazione dello studio Brisighella, i livelli plasmatici di PCSK9 correlavano in modo diretto con la velocità dell'onda sfingica, indice di rigidità vascolare, indipendentemente dai fattori di rischio tradizionali (59). Questa relazione si manteneva indipendentemente dal sesso e dall'età degli individui considerati (59).

L'associazione tra PCSK9 e aterosclerosi è stata valutata anche nell'ambito di studi di tomografia assiale computerizzata (TAC) per la valutazione della calcificazione arteriosa coronarica (CAC). Alonso e collaboratori hanno studiato una coorte di 161 pazienti con ipercolesterolemia familiare (FH - familial hypercholesterolemia), geneticamente diagnosticata, dei quali si conoscevano le concentrazioni plasmatiche di PCSK9 (60). Nello studio si è osservato che le concentrazioni di PCSK9 erano predittive, in modo indipendente, della CAC. Le concentrazioni più basse e più alte di PCSK9 si osservavano, rispettivamente, nei pazienti senza e con lo score CAC assoluto più elevato. Forse più rilevante, dopo la correzione con possibili variabili confondenti, quali età, sesso, indice di massa corporea, glucosio a digiuno, terapia con statine, fumo di sigaretta, ipertensione, e parametri lipidici,

solo PCSK9 e apo(a) rimanevano predittivi, in maniera significativa, dello score CAC (60). Sempre in pazienti FH, si è osservato come l'espressione del recettore della chemochina CCR2 fosse circa tre volte superiore a quella di soggetti controllo (61). Questa aumentata espressione era associata a una maggiore capacità migratoria degli stessi monociti, effetto che veniva bloccato dal trattamento con inibitori di PCSK9 e dalla drastica riduzione del LDL-C (61). Il contenuto intracellulare di colesterolo sembrerebbe conferire questo fenotipo proinfiammatorio dei monociti e PCSK9. Vi sono però dati sperimentali che dimostrano un effetto diretto di PCSK9 sull'espressione di CCR2 a livello monocitario, indipendentemente dal LDL-C (62).

La valutazione della relazione tra PCSK9 e infiammazione, osservata negli studi sperimentali, è stata poi estesa in ambito clinico mediante l'utilizzo di tecniche istologiche virtuali di ultrasonografia intravascolare (IVUS-VH) (63). In questo studio si è valutata l'associazione tra i livelli sierici di PCSK9 e le dimensioni del core necrotico delle placche aterosclerotiche, in pazienti con patologia cardiovascolare conclamata. Le concentrazioni di PCSK9 erano associate in maniera lineare con i livelli più alti di frazione del core necrotico nelle placche coronariche. Questa osservazione permaneva in tutti i sottogruppi di pazienti considerati e indipendentemente dai livelli di LDL-C e dall'uso di statine (63).

Sebbene si sia osservata una relazione tra i livelli plasmatici di PCSK9 e quelli di hs-CRP (marcatore circolante di infiammazione cronica) (4), uno studio di meta-analisi basato su un totale di 2.546 partecipanti ha mostrato come i valori circolanti di hs-CRP non sono influenzati dalla somministrazione dei due anticorpi monoclo-

nali, evolocumab e alirocumab (64). Infatti considerando tutti i trial clinici, multicentrici, con un disegno randomizzato e doppio cieco, la variazione media nei valori di hs-CRP, nei gruppi che ricevevano gli anticorpi anti-PCSK9, è stata di 0,002 mg/l (CI 95%: -0,017/0,021; $p=0,807$). Tale effetto è indipendente dal tipo di anticorpo, dalla dose e dalla tempistica di somministrazione. Anche considerando soltanto gli studi con evolocumab la differenza media nei valori di hs-CRP, nel gruppo che riceveva il trattamento rispetto al gruppo controllo, è stata di 0,002 mg/l (CI 95%: -0,02/0,02; $p=0,855$) così come in seguito a somministrazione di alirocumab la differenza media è stata pari a 0,15 mg/l (CI 95%: -0,11/0,40; $p=0,259$). Un'ulteriore sottanalisi che ha preso in esame soltanto la somministrazione bisettimanale o mensile di evolocumab e alirocumab ha evidenziato variazioni medie nei valori di hs-CRP rispettivamente di 0,13 mg/l, (CI 95%: -0,20/0,46; $p=0,433$) e 0,003 mg/l (CI 95%: -0,01/0,01; $p=0,59$) (64).

Un'ulteriore conferma inerente la non efficacia degli anticorpi anti-PCSK9 sui valori circolanti di hs-CRP deriva dagli studi SPIRE-1 e 2 con bococizumab, l'anticorpo monoclonale umanizzato anti-PCSK9 di Pfizer il cui sviluppo è stato interrotto nel novembre del 2016. Infatti, nei 13.718 pazienti ad alto rischio trattati per 52 settimane con bococizumab (150 mg con somministrazione bisettimanale), i valori di hs-CRP (2.0 mg/l) sono rimasti invariati prima e dopo trattamento (65).

Recentemente è stato ipotizzato come la non corrispondenza tra le riduzioni molto significative di colesterolo LDL in seguito a somministrazione di anticorpi anti-PCSK9 e la non variazione dei livelli di hs-CRP sia dovuta al fatto che i soggetti reclutati nei diversi trials (evolocumab e alirocumab) non avevano un grado signi-

ficativo di infiammazione sistemica, riportando in generale valori medi di hs-CRP inferiori a 2 mg/dl (66).

È stata anche valutata la relazione tra PCSK9 e la progressione della patologia. Questa analisi è stata eseguita quale parte dello studio Chinese Multi-provincial Cohort Study (67). Gli autori hanno riscontrato che tra i 643 partecipanti della popolazione generale, esente da patologia cardiovascolare al momento del reclutamento, i livelli di PCSK9 erano associati alla progressione dell'aterosclerosi misurata in termini di area totale della placca. Ancora una volta tale relazione era indipendente dalle concentrazioni di LDL-C.

Più recentemente, lo studio clinico GLAGOV (Global Assessment of Paque reGression With a PCSK9 antiBody as Measured by intraVascular Ultrasound) ha valutato l'effetto dell'inibitore di PCSK9, evolocumab, sulla progressione dell'aterosclerosi in pazienti in trattamento con statine mediante IVUS (68). GLAGOV è uno studio multicentrico, doppio cieco, verso placebo, con pazienti randomizzati al reclutamento, in base alla patologia a livello coronarico determinata da analisi angiografica, destinati al trattamento con statine più (n=484) o meno (n=484) evolocumab. La IVUS è stata eseguita al tempo zero e dopo 72 settimane di trattamento, per verificare la variazione dell'aterosclerosi coronarica. Gli autori hanno osservato una riduzione più pronunciata in termini di percentuale del volume dell'ateroma (differenza dell'1%), nel gruppo in trattamento con evolocumab (68). Inoltre, il trattamento con evolocumab era associato ad una regressione di placca in una percentuale maggiore rispetto a pazienti con placebo (64,3% vs 47,3%; differenza 17%) (68). Questo studio ha, quindi, dimostrato che l'inibizione

di PCSK9, con un effetto di riduzione di LDL-C molto marcato, è associata a una regressione modesta del volume della placca. Quindi, rimane ancora da definire se questo effetto sia del tutto dipendente dal LDL-C o se possa coinvolgere anche effetti pleiotropici di PCSK9.

Un'ulteriore considerazione, sui possibili effetti diretti di PCSK9 sulla parete vascolare, scaturisce da un confronto tra i risultati degli studi FOURIER (con evolocumab) e SPIRE 1 e 2 (con bococizumab) con quelli riportati nella metanalisi condotta sugli studi con le statine del Cholesterol Treatment Trialists (CTT) (69, 70). È emerso come la riduzione del rischio cardiovascolare con evolocumab e bococizumab fosse in qualche misura inferiore rispetto a quella osservata con le statine. In particolare, la riduzione del rischio degli obiettivi primari (infarto miocardico, ictus, ospedalizzazione per angina instabile che richiede interventi di rivascularizzazione) era in un intervallo del 11-14,5% per ogni mmol/L (38,7 mg/dL) di riduzione di LDL-C *vs* circa il 22% osservato nei trial con statine. Tuttavia, quale possibile limitazione in tale confronto va considerato che le analisi del CTT sono state condotte con risultati ottenuti da un follow-up di 5 anni di trattamento, mentre i risultati del FOURIER e degli SPIRE 1 e 2 derivano rispettivamente da un periodo di trattamento di 7 mesi (SPIRE 1), 1 anno (SPIRE 2) e 2,1 anni (FOURIER). Tuttavia nell'ambito dei CTT, se la linea di regressione, che stima l'effetto delle statine sul rischio cardiovascolare, viene ricalcolata considerando la durata totale dei diversi trattamenti si osserva che la riduzione del rischio si attesta intorno al 10-12% durante il primo anno di trattamento per poi raggiungere il 22-24% dal secondo anno in poi. Confrontando quindi i risultati per ogni anno di trattamento si è osservato che l'effetto

protettivo degli inibitori di PCSK9 sia del tutto sovrapponibile con quello ottenuto con le statine (71). Questa analisi suggerisce come gli inibitori di PCSK9 potrebbero, così come le statine, esercitare effetti "pleiotropi" di parete, oltre alla riduzione del LDL-C.

PCSK9 quale biomarcatore del rischio di patologia cardiovascolare aterosclerotica

Dati i risultati ottenuti dagli studi pre-clinici e clinici che dimostrano la relazione importante tra PCSK9 e lipidi aterogeni, infiammazione e aterosclerosi, è nato l'interesse di esplorare la possibilità che PCSK9 potesse essere un biomarcatore del rischio di patologie cardiovascolari su base aterosclerotica, sia in prevenzione primaria sia secondaria. Quale parte dello studio FATE, al fine di valutare la capacità delle concentrazioni di PCSK9 di prevedere eventi cardiovascolari, sono stati seguiti longitudinalmente, per un periodo medio di 7,2 anni, 1.527 soggetti di mezza età senza patologia vascolare (58). Mentre PCSK9 correlava con LDL-C, insulina e trigliceridi, i suoi livelli non avevano una relazione significativa con gli eventi cardiovascolari. Successivamente, Ridker e collaboratori hanno analizzato una coorte di 28.000 donne americane, inizialmente sane, di età ≥ 45 anni e non in terapia con statine, facenti parte dello studio Women's Health Study (72). Gli autori hanno misurato le concentrazioni plasmatiche di PCSK9 all'arruolamento in 358 casi con infarto miocardico, ictus trombotico e morte cardiovascolare e 358 controlli abbinati per età, fumo di sigaretta e terapia ormonale sostitutiva. Le concentrazioni medie di PCSK9 non erano significativamente differenti tra i due gruppi di soggetti (rispettivamente 304,4 *vs* 299,7 ng/

ml) (72). Come atteso, si è osservata un'associazione tra i livelli di PCSK9 e apoB e trigliceridi. Mentre i valori di apoB al reclutamento erano associati agli eventi cardiovascolari, i livelli basali di PCSK9 non lo erano. Più recentemente si è analizzata una popolazione di 4.232 soggetti, sia maschi che donne dell'età superiore ai 60 anni, residenti nella contea di Stoccolma per valutare l'associazione tra PCSK9 e futuri eventi cardiovascolari (infarto miocardico fatale e non fatale, angina, patologia cardiaca ischemica cronica, morte improvvisa cardiaca, ictus ischemico fatale e non fatale) (73). Durante i 15 anni di monitoraggio, l'incidenza cumulativa degli eventi è stata del 13%. Come previsto, si è osservata una correlazione, sebbene modesta, tra i livelli di PCSK9 e LDL-C. Gli autori hanno riscontrato una maggiore sopravvivenza senza eventi cardiovascolari nei soggetti con livelli di PCSK9 nel quartile inferiore, e la più alta incidenza in quelli nel quartile maggiore. È interessante notare che i soggetti aventi un rapporto LDL-C e PCSK9 discordante (alto PCSK9 e basso LDL-C), avevano il più alto rischio di incorrere in eventi, anche rispetto a quelli aventi alti livelli di LDL-C e alti di PCSK9. Le differenze tra i diversi studi sono, probabilmente riconducibili al fatto che nello studio condotto sui soggetti residenti a Stoccolma la concentrazione media di PCSK9, misurata con un saggio ELISA non commerciale, era di molto inferiore rispetto allo studio sulla coorte del Women's Health Study (rispettivamente 94,3 ng/ml e circa 300 ng/ml). Inoltre, nel primo studio si è arruolato un campione rappresentativo di donne e uomini dalla popolazione generale Svedese, mentre nel secondo studio Ridker e collaboratori hanno valutato i livelli di PCSK9 in una sotto-coorte di pazienti di uno studio clinico randomizzato controllato in donne

in terapia con aspirina o vitamina E per la prevenzione cardiovascolare.

Per quel che riguarda la prevenzione secondaria, Werner et al., hanno valutato se le concentrazioni sieriche di PCSK9 a digiuno erano predittive di eventi cardiovascolari in una coorte molto estesa di pazienti in trattamento con statine e con livelli di LDL-C ben controllati e con patologia coronarica diagnosticata tramite analisi angiografica (74). 504 soggetti con patologia coronarica stabile sono stati arruolati. Questi pazienti sono stati seguiti in maniera prospettica per un obiettivo primario di morte per eventi cardiovascolari, sindrome coronarica acuta, o rivascolarizzazione coronarica a seguito di sintomatologia. Mentre i livelli di PCSK9 hanno predetto il risultato primario dello studio in soggetti in terapia con statine e con livelli di LDL-C ben controllati, questa associazione veniva meno dopo correzione per i livelli di trigliceridi plasmatici. Forse questa osservazione non è così sorprendente considerando l'influenza che ha PCSK9 sulle frazioni lipoproteiche aterogene non-LDL. Si è poi condotto uno studio su 616 cinesi con patologia coronarica stabile per un periodo di 17 mesi, al fine di valutare l'associazione tra i livelli di PCSK9 e gli eventi cardiovascolari, quali morte, ictus, infarto miocardico, rivascolarizzazione, e angina instabile (75). Questi soggetti non erano in terapia ipolipemizzante prima dell'arruolamento, ma hanno ricevuto terapie mediche con o senza interventi di rivascolarizzazione nel corso dello studio. Gli autori hanno osservato l'associazione tra i livelli di PCSK9 e la gravità della patologia cardiovascolare. Più nello specifico, i livelli di PCSK9 erano significativamente più elevati nei soggetti con un punteggio SYNTAX nel terzile più alto rispetto a quello più basso (75). Inoltre, dopo 17 mesi gli eventi sono stati più frequenti nei pazienti

con i livelli di PCSK9 più alti, ma esclusivamente nei pazienti trattati farmacologicamente, e non in quelli che avevano ricevuto una rivascolarizzazione coronarica (75).

Il valore prognostico dei livelli di PCSK9 è stato, inoltre, studiato in pazienti con sindrome coronarica acuta. Le concentrazioni plasmatiche di PCSK9 sono state valutate su 2.030 pazienti affetti da sindrome coronarica acuta sottoposti ad angiografia coronarica (76). I partecipanti sono stati seguiti per 30 giorni e 1 anno dopo l'evento per la valutazione dell'obiettivo primario di morte per tutte le cause. Si è osservato che le concentrazioni di PCSK9 in soggetti con sindrome coronarica acuta, erano associate con l'entità dello stato infiammatorio, con la terapia ipolipemizzante, e l'insorgenza clinica delle sindromi. Tuttavia, i livelli elevati di PCSK9 non erano associati alla mortalità ad un anno. Uno studio simile, sempre condotto su pazienti con sindrome coronarica acuta (lo studio PCSK9-REACT), ha valutato la relazione tra i livelli di PCSK9 e la reattività piastrinica misurata ex-vivo dopo stimolazione con ADP (77). Inoltre, dopo 1 anno si è valutata sempre la relazione tra PCSK9 e gli eventi cardiovascolari maggiori (morte cardiovascolare, infarto miocardico, angina instabile, trombosi intrastent, ripetuta rivascolarizzazione, ictus trombotico). È interessante notare come si sia riscontrata un'associazione diretta tra reattività piastrinica e livelli di PCSK9 (77). Inoltre la maggiore reattività piastrinica si è osservata nei pazienti col terzile più alto delle concentrazioni di PCSK9 rispetto a quello più basso. Per quel che riguarda i risultati clinici, dopo un anno di monitoraggio dei 178 pazienti arruolati, i soggetti del terzile più alto dei livelli di PCSK9 sono andati incontro a eventi cardiovascolari maggiori con una frequenza del 22% rispetto al 3,4% dei pazienti nel terzile inferiore (77).

Questo studio fa presupporre che aumentati livelli di PCSK9 sono associati a una maggiore reattività piastrinica e sono potenzialmente predittivi di eventi ischemici in pazienti con sindrome coronarica acuta che sono andati incontro a rivascolarizzazione.

È chiaro che, sulla base degli studi condotti sino a oggi, emergono dei risultati altamente discrepanti che non permettono di definire il ruolo di PCSK9 quale biomarcatore del rischio cardiovascolare. Sulla base di queste osservazioni si è svolta una revisione sistematica ed una metanalisi su tutti gli studi che hanno valutato la relazione tra PCSK9 e il rischio di eventi cardiovascolari futuri. Nell'analisi sono stati inclusi otto studi con un totale di 12.081 pazienti seguiti per un periodo medio di 6,6 anni (78). L'osservazione più importante scaturita da questa analisi è che i livelli di PCSK9 sono correlati in maniera significativa, sebbene modesta, con il rischio di eventi cardiovascolari totali. Più specificatamente, livelli alti vs bassi di PCSK9 sono associati con un rischio più alto del 23% di eventi cardiovascolari. Inoltre, un aumento dei livelli di PCSK9 pari alla sua deviazione standard corrisponde ad un aumento del 10% degli eventi totali (78). Sulla base dei dati disponibili, il valore dei livelli plasmatici di PCSK9 non è, al momento, definito. La sua associazione con gli eventi cardiovascolari su base aterosclerotica è modesta e meno robusta di altri biomarcatori più validati e comunemente utilizzati in clinica. Tuttavia, queste analisi sottolineano la necessità di standardizzare e raffinare le metodologie dei saggi per PCSK9. Al momento, ci sono due metodi comunemente utilizzati per misurare i livelli di PCSK9, il saggio ELISA e la spettrometria di massa. Non bisogna inoltre dimenticare che vi sono diverse forme circolanti di PCSK9, quella biologicamen-

te più attiva del peso di 64kDa e quella di 55kDa processata dall'enzima furina (79-82). Entrambe le isoforme sono presenti in forma libera o associata, in misura maggiore o minore, alle lipoproteine LDL e Lp(a) (40, 83, 84). I saggi ELISA a oggi disponibili non sono in grado di distinguere le varie forme di PCSK9 presenti nel plasma. Lo sviluppo di saggi più pratici e più riproducibili in grado di quantificare le diverse forme di PCSK9 potrebbero migliorare il valore aggiunto di questo parametro quale biomarcatore del rischio cardiovascolare.

Conclusioni

Sulla base degli studi sperimentali, clinici ed epidemiologici, fino a qui descritti è possibile concludere che PCSK9 sia legato imprescindibilmente all'aterosclerosi in maniera dipendente e non dai lipidi. Questo legame è inoltre consolidato dai risultati positivi del primo studio di fase III condotto con l'anticorpo monoclonale anti PCSK9, evolocumab. Lo studio FOURIER (Further Cardiovascular Outcomes Research with PCSK9 Inhibition in Subjects with Elevated Risk), ha dimostrato un effetto protettivo sugli eventi cardiovascolari in pazienti in terapia con statine e con valori di LDL-C ben controllati (85). Ad oggi è difficile distinguere quanto l'efficacia sulla protezione vascolare di evolocumab sia esclusivamente dipendente dal forte effetto ipocolesterolemizzante e quanto possa essere il contributo diretto sulla placca aterosclerotica. Tuttavia, è importante osservare che il trattamento con inibitori di PCSK9 non portano ad una riduzione significativa dei livelli di proteine C reattiva circolante, marcatore di infiammazione cronica (64). Effetto molto diverso dalle statine e per il quale si è sempre ipotizzato una loro attività pleiotropica oltre alla ridu-

zione del LDL-C (86). Tuttavia, vi è da considerare che gli anticorpi monoclonali, a causa della loro ridotta distribuzione, inibiscono PCSK9 plasmatico e probabilmente non quello tessutale o presente nella placca aterosclerotica. Lo sviluppo di nuove terapie, quali gli oligonucleotidi antisense, gli small interfering RNA o le molecole classiche (87), potrebbe invece chiarire l'importanza di PCSK9 intracellulare sia sull'infiammazione che sull'aterosclerosi. Lo sviluppo clinico del siRNA anti-PCSK9 inclisiran (88), così come quello preclinico di vaccini anti PCSK9 (89), potrebbe aiutarci a rispondere a quest'ultimo quesito.

Elenco argomenti trattati

- I livelli circolanti di PCSK9 correlano positivamente con numerosi parametri di patologia cardiovascolare, quali core necrotico misurato mediante IVUS-VH, cIMT, CAC e velocità dell'onda sfigmica.
- Il marcatore di infiammazione hsCRP correla positivamente con i livelli plasmatici di PCSK9, tuttavia gli anticorpi monoclonali anti PCSK9 non sembrano influenzare tale parametro.
- PCSK9 correla con l'aggregazione piastrinica residua in pazienti con sindrome coronarica acuta in trattamento con prasugrel e ticagrelor.
- L'analisi di due studi clinici recentemente condotti con inibitori di PCSK9 (FOURIER e SPIRES) insieme ad una rivalutazione della curva di regressione dei CTT ha evidenziato come l'effetto sul rischio cardiovascolare sia del tutto sovrapponibile a quello delle statine.
- Lo sviluppo clinico di siRNA anti PCSK9, inclisiran, così come quello di vaccini anti PCSK9, potrebbe aprire nuovi fronti di ricerca nello studio dei suoi effetti pleiotropici vascolari.

RIASSUNTO

L'identificazione della proteina PCSK9 (proproteina convertasi subtilisina/kexina di tipo 9), quale molecola in grado di regolare in maniera importante il colesterolo LDL (LDL-C), è di recente scoperta e numerosi studi stanno delineando la sua funzione fisiologica anche alla luce dell'approvazione per uso clinico di anticorpi monoclonali inibitori di tale proteina. Studi su modelli *in vitro*, pre-clinici e clinici indicano un possibile coinvolgimento di PCSK9 nella risposta infiammatoria, in particolare sul reclutamento di monociti proinfiammatori nella placca aterosclerotica e sull'espansione del suo core necrotico. PCSK9 sembra, inoltre, influenzare la risposta vascolare facilitando l'accumulo di cellule muscolari lisce vasali nella neointima e l'aggregazione piastrinica. Ad oggi, tuttavia, è ancora da definire l'entità dell'azione diretta di PCSK9 sull'aterosclerosi, indipendente dall'effetto sul metabolismo del LDL-C. Inoltre, l'inibizione di PCSK9 plasmatico, ad opera degli anticorpi monoclonali, potrebbe determinare non solo una riduzione significativa del LDL-C e del rischio cardiovascolare, ma anche un possibile effetto pleiotropico come, già, postulato per le statine. Nuove strategie terapeutiche, quali i siRNA e i vaccini, potenzialmente più efficaci degli anticorpi monoclonali nell'inibire la sintesi di PCSK9 a livello intracellulare, potrebbero aiutare a comprendere meglio i suoi eventuali effetti pleiotropi. La presente rassegna descrive le evidenze di un effetto diretto di PCSK9 sull'aterosclerosi e il suo possibile ruolo quale biomarcatore per la stratificazione del rischio cardiovascolare.

Parole chiave: *PCSK9, aterosclerosi, piastrine, monociti, calcificazione coronarica, IMT, IVUS.*

Bibliografia

1. Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, et al., Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet.* 2003; 34: 154-156.
2. Zhang DW, Lagace TA, Garuti R, Zhao Z, et al. Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J Biol Chem.* 2007; 282: 8602-18612.
3. Costet P, Krempf M, Cariou B, PCSK9 and LDL cholesterol: unravelling the target to design the bullet. *Trends Biochem Sci.* 2008; 33: 426-434.
4. Lakoski SG, Lagace TA, Cohen JC, Horton JD, et al. Genetic and metabolic determinants of plasma PCSK9 levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94: 2537-2543.
5. Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH Jr, Hobbs HH. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med.* 2006; 354: 1264-1272.
6. Rashid S, Curtis DE, Garuti R, Anderson NN, et al. Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102: 5374-5379.
7. Zaid A, Roubtsova A, Essalmani R, Marcinkiewicz J, et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration. *Hepatology.* 2008; 48: 646-654.
8. Poirier S, Mayer G, Benjannet S, Bergeron E, et al. The proprotein convertase PCSK9 induces the degradation of low density lipoprotein receptor (LDLR) and its closest family members VLDLR and ApoER2. *J Biol Chem.* 2008; 283: 2363-2372.
9. Demers A, Samami S, Lauzier B, Des Rosiers C, et al. PCSK9 Induces CD36 Degradation and Affects Long-Chain Fatty Acid Uptake and Triglyceride Metabolism in Adipocytes and in Mouse Liver. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015; 35: 2517-2525.
10. 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.
11. 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.
12. Kwakernaak AJ, Lambert G, Dullaart RP. Plasma proprotein convertase subtilisin-kexin type 9 is predominantly related to intermediate density lipoproteins. *Clin Biochem.* 2014; 47: 679-682.
13. Sullivan S, Fabbrini E, Horton JD, Korenblat K, et al., Lack of a relationship between plasma PCSK9 concentrations and hepatic lipoprotein kinetics in obese people. *Transl Res.* 2011; 158: 302-306.
14. Baass A, Dubuc G, Tremblay M, Delvin EE, et al. Plasma PCSK9 is associated with age, sex,

- and multiple metabolic markers in a population-based sample of children and adolescents. *Clin Chem*. 2009; 55: 1637-1645.
15. Janis MT, Tarasov K, Ta HX, Suoniemi M, et al. Beyond LDL-C lowering: distinct molecular sphingolipids are good indicators of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) deficiency. *Atherosclerosis*. 2013; 228: 380-385.
 16. 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: 1448-1453.
 17. Koren MJ, Lundqvist P, Bolognese M, Neutel JM, et al. Anti-PCSK9 Monotherapy for Hypercholesterolemia: The MENDEL-2 Randomized, Controlled Phase III Clinical Trial of Evolocumab. *J Am Coll Cardiol*. 2014; 63: 2531-2540.
 18. Blom DJ, Hala T, Bolognese M, Lillestol MJ, et al. A 52-Week Placebo-Controlled Trial of Evolocumab in Hyperlipidemia. *N Engl J Med*. 2014.
 19. Borchardt RA, Davis RA. Intrahepatic assembly of very low density lipoproteins. Rate of transport out of the endoplasmic reticulum determines rate of secretion. *J Biol Chem*. 1987; 262: 16394-16402.
 20. Yao Z, Tran K, McLeod RS. Intracellular degradation of newly synthesized apolipoprotein B. *J Lipid Res*. 1997; 38: 1937-1953.
 21. Williams KJ, Brocia RW, Fisher EA. The unstirred water layer as a site of control of apolipoprotein B secretion. *J Biol Chem*. 1990; 265: 16741-1674.
 22. 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.
 23. Costet P, Cariou B, Lambert G, Lalanne F, et al. Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c. *J Biol Chem*. 2006; 281: 6211-6218.
 24. Tavori H, Giunzioni I, Predazzi IM, Plubell D, et al. Human PCSK9 promotes hepatic lipogenesis and atherosclerosis development via apoE- and LDLR-mediated mechanisms. *Cardiovasc Res*. 2016; 110: 268-278.
 25. Sniderman AD, Qi Y, Ma CI, Wang RH, et al. Hepatic cholesterol homeostasis: is the low-density lipoprotein pathway a regulatory or a shunt pathway? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013; 33: 2481-2490.
 26. Le May C, Kourimate S, Langhi C, Chetiveaux M, et al. Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 null mice are protected from postprandial triglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009; 29: 684-690.
 27. 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: 431-441.
 28. Levy E., Ben Djoudi Ouadda A, Spahis S, Sane AT, et al. PCSK9 plays a significant role in cholesterol homeostasis and lipid transport in intestinal epithelial cells. *Atherosclerosis*. 2013; 227: 297-306.
 29. Gillian-Daniel DL, Bates PW, Tebon A, Attie AD. Endoplasmic reticulum localization of the low density lipoprotein receptor mediates presecretory degradation of apolipoprotein B. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 4337-4342.
 30. Reyes-Soffer G, Pavlyha M, Ngai C, Thomas T, et al. Effects of PCSK9 Inhibition With Alirocumab on Lipoprotein Metabolism in Healthy Humans. *Circulation*. 2017; 135: 352-362.
 31. Albers JJ, Kennedy H, Marcovina SM. Evidence that Lp(a) contains one molecule of apo(a) and one molecule of apoB: evaluation of amino acid analysis data. *J Lipid Res*. 1996; 37: 192-196.
 32. Danesh J, Collins R, Peto R. Lipoprotein(a) and coronary heart disease. Meta-analysis of prospective studies. *Circulation*. 2000; 102: 1082-1085.
 33. Kamstrup PR, Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R, Nordestgaard BG. Genetically elevated lipoprotein(a) and increased risk of myocardial infarction. *JAMA*. 2009; 301: 2331-2339.
 34. Lamon-Fava S, Marcovina SM, Albers JJ, Kennedy H, et al. Lipoprotein(a) levels, apo(a) isoform size, and coronary heart disease risk in the Framingham Offspring Study. *J Lipid Res*. 2011; 52: 1181-1187.
 35. Li Y, Luke MM, Shiffman D, Devlin JJ. Genetic variants in the apolipoprotein(a) gene and coronary heart disease. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011; 4: 565-573.
 36. Raal FJ, Giugliano RP, Sabatine MS, Koren MJ, et al. Reduction in lipoprotein(a) with PCSK9 monoclonal antibody evolocumab (AMG 145): a pooled analysis of more than 1,300 patients in 4 phase II trials. *J Am Coll Cardiol*. 2014; 63: 1278-1288.
 37. Gaudet D, Kereiakes DJ, McKenney JM, Roth EM, et al. Effect of alirocumab, a monoclonal proprotein convertase subtilisin/kexin 9 antibody, on lipoprotein(a) concentrations (a pooled analysis of 150 mg every two weeks

- dosing from phase 2 trials). *Am J Cardiol.* 2014; 114: 711-715.
38. Rader DJ, Mann WA, Cain W, Kraf HG, et al. The low density lipoprotein receptor is not required for normal catabolism of Lp(a) in humans. *J Clin Invest.* 1995; 95: 1403-1408.
 39. Villard EF, Thedrez A, Blankenstein J, Croyal M, et al. PCSK9 Modulates the Secretion But Not the Cellular Uptake of Lipoprotein(a) Ex Vivo. An Effect Blunted by Alirocumab. *JACC: Basic to translational science.* 2016; 1: 419-427.
 40. Tavori H, Christian DC, Minnier J, Plubell D, et al. PCSK9 Association With Lipoprotein(a). *Circ Res.* 2016.
 41. Shapiro MD, Fazio S. From Lipids to Inflammation: New Approaches to Reducing Atherosclerotic Risk. *Circ Res.* 2016; 118: 732-749.
 42. Ferri N, Tibolla G, Pirillo A, Cipollone F, et al. Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) secreted by cultured smooth muscle cells reduces macrophages LDLR levels. *Atherosclerosis.* 2012; 220: 381-386.
 43. Ding Z, Liu S, Wang X, Deng X, et al. Cross-talk between LOX-1 and PCSK9 in vascular tissues. *Cardiovasc Res.* 2015; 107: 556-567.
 44. Ding Z, Liu S, Wang X, Deng X, et al. Hemodynamic shear stress via ROS modulates PCSK9 expression in human vascular endothelial and smooth muscle cells and along the mouse aorta. *Antioxid Redox Signal.* 2015; 22: 760-771.
 45. Wu CY, Tang ZH, Jiang L, Li XF, et al. PCSK9 siRNA inhibits HUVEC apoptosis induced by ox-LDL via Bcl/Bax-caspase9-caspase3 pathway. *Mol Cell Biochem.* 2011; 359: 347-358.
 46. Perisic L, Hedin E, Razuvaev A, Lengquist M, et al. Profiling of atherosclerotic lesions by gene and tissue microarrays reveals PCSK6 as a novel protease in unstable carotid atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013; 33: 2432-2443.
 47. Ferri N, Marchiano S, Tibolla G, Baetta R, et al. PCSK9 knock-out mice are protected from neointimal formation in response to perivascular carotid collar placement. *Atherosclerosis.* 2016; 253: 214-224.
 48. Mehta JL, Sanada N, Hu CP, Chen J, et al. Deletion of LOX-1 reduces atherogenesis in LDLR knockout mice fed high cholesterol diet. *Circ Res.* 2007; 100: 1634-1642.
 49. Roche-Molina M, Sanz-Rosa D, Cruz FM, Garcia-Prieto J, et al. Induction of Sustained Hypercholesterolemia by Single Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Transfer of Mutant hPCSK9. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology.* 2015; 35: 50-59.
 50. Denis M, Marcinkiewicz J, Zaid A, Gauthier D, et al. Gene inactivation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces atherosclerosis in mice. *Circulation.* 2012; 125: 894-901.
 51. Giunzioni I, Tavori H, Covarrubias R, Major AS, et al. Local effects of human PCSK9 on the atherosclerotic lesion. *J Pathol.* 2016; 238: 52-62.
 52. Zhou J, Chew M, Ravn HB, Falk E. Plaque pathology and coronary thrombosis in the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Scand J Clin Lab Invest.* 1999; (Suppl.) 230: 3-11.
 53. Davies MJ. Acute coronary thrombosis - the role of plaque disruption and its initiation and prevention. *Eur Heart J.* 1995; 16 (Suppl. L): 3-7.
 54. Overton CD, Yancey PG, Major AS, Linton MF, et al., Deletion of macrophage LDL receptor-related protein increases atherogenesis in the mouse. *Circ Res.* 2007; 100: 670-677.
 55. Chan DC, Pang J, McQuillan BM, Hung J, et al. Plasma Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9 as a Predictor of Carotid Atherosclerosis in Asymptomatic Adults. *Heart Lung Circ.* 2016; 25: 520-525.
 56. Lee CJ, Lee YH, Park SW, Kim KJ, et al. Association of serum proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 with carotid intima media thickness in hypertensive subjects. *Metabolism.* 2013; 62: 845-850.
 57. Huijgen R, Fouchier SW, Denoun M, Hutten BA, et al. Plasma levels of PCSK9 and phenotypic variability in familial hypercholesterolemia. *J Lipid Res.* 2012; 53: 979-983.
 58. Zhu YM, Anderson TJ, Sikdar K, Fung M, et al. Association of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) With Cardiovascular Risk in Primary Prevention. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015; 35: 2254-2259.
 59. Ruscica M, Ferri N, Fogacci F, Rosticci M, et al. Circulating Levels of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 and Arterial Stiffness in a Large Population Sample: Data From the Brisighella Heart Study. *J Am Heart Assoc.* 2017; 6.
 60. Alonso R., Mata P, Muniz O, Fuentes-Jimenez F, et al. PCSK9 and lipoprotein (a) levels are two predictors of coronary artery calcification in asymptomatic patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 2016; 254: 249-253.
 61. Bernelot Moens SJ, Neele AE, Kroon J, van der Valk FM v, et al. PCSK9 monoclonal antibodies reverse the pro-inflammatory profile of monocytes in familial hypercholesterolaemia. *Eur Heart J.* 2017; 38: 1584-1593.
 62. Grune J, Meyborg H, Bezhaeva T, Kappert K, et al. PCSK9 regulates the chemokine recep-

- tor CCR2 on monocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017; 485: 312-318.
63. Cheng JM, Oemrawsingh RM, Garcia-Garcia HM, Boersma E, et al. PCSK9 in relation to coronary plaque inflammation: Results of the ATHEROREMO-IVUS study. *Atherosclerosis.* 2016; 248: 117-122.
 64. Sahebkar A, Di Giosia P, Stamerra CA, Grassi D, et al. Effect of monoclonal antibodies to PCSK9 on high-sensitivity C-reactive protein levels: a meta-analysis of 16 randomized controlled treatment arms. *Br J Clin Pharmacol.* 2016; 81: 1175-1190.
 65. Ridker PM, Revkin J, Amarenco P, Brunell R, et al. Cardiovascular Efficacy and Safety of Bocsuzumab in High-Risk Patients. *N Engl J Med.* 2017; 376: 1527-1539.
 66. Catapano AL, Pirillo A, Norata GD. Vascular inflammation and low-density lipoproteins: is cholesterol the link? A lesson from the clinical trials. *Br J Pharmacol.* 2017.
 67. Xie W, J Liu, Wang W, Wang M, et al. Association between plasma PCSK9 levels and 10-year progression of carotid atherosclerosis beyond LDL-C: A cohort study. *Int J Cardiol.* 2016; 215: 293-298.
 68. Nicholls SJ, Puri R, Anderson T, Ballantyne CM, et al., Effect of Evolocumab on Progression of Coronary Disease in Statin-Treated Patients: The GLAGOV Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2016; 316: 2373-2384.
 69. Baigent C, Blackwell L, Emberson J, Holland LE, et al. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *Lancet.* 2010; 376: 1670-1681.
 70. Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, et al., Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet.* 2005; 366: 1267-1278.
 71. Ference BA, Cannon CP, Landmesser U, Lüscher TF, et al. Reduction of low density lipoprotein-cholesterol and cardiovascular events with proprotein convertase subtilisin-kexin type 9 (PCSK9) inhibitors and statins: an analysis of FOURIER, SPIRE, and the Cholesterol Treatment Trialists Collaboration. *European Heart Journal,* 2017.
 72. Ridker PM, Rifai N, Bradwin G, Rose L. Plasma proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 levels and the risk of first cardiovascular events. *Eur Heart J.* 2016; 37: 554-560.
 73. Leander K, Malarstig A, Van't Hof FM, Hyde C, et al. Circulating Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) Predicts Future Risk of Cardiovascular Events Independently of Established Risk Factors. *Circulation.* 2016; 133: 1230-1239.
 74. Werner C, Hoffmann MM, Winkler K, Böhm M, et al., Risk prediction with proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) in patients with stable coronary disease on statin treatment. *Vascul Pharmacol.* 2014; 62: 94-102.
 75. Li JJ, Li S, Zhang Y, Xu RX, et al. Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9, C-Reactive Protein, Coronary Severity, and Outcomes in Patients With Stable Coronary Artery Disease: A Prospective Observational Cohort Study. *Medicine (Baltimore).* 2015; 94: e2426.
 76. Gencer B, Montecucco F, Nanchen D, Carbone F, et al. Prognostic value of PCSK9 levels in patients with acute coronary syndromes. *Eur Heart J.* 2016; 37: 546-543.
 77. Navarese EP, Kolodziejczak M, Winter MP, Alimohammadi A, et al. Association of PCSK9 with platelet reactivity in patients with acute coronary syndrome treated with prasugrel or ticagrelor: The PCSK9-REACT study. *Int J Cardiol.* 2017; 227: 644-649.
 78. Vlachopoulos C, Terentes-Printzios D, Georgiopoulos G, Skoumas I, et al. Prediction of cardiovascular events with levels of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9: A systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis.* 2016; 252: 50-60.
 79. Benjannet S, Rhainds D, Hamelin J, Nassoury N, et al. The proprotein convertase (PC) PCSK9 is inactivated by furin and/or PC5/6A: functional consequences of natural mutations and post-translational modifications. *J Biol Chem.* 2006; 281: 30561-3072.
 80. 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: 4257-4263.
 81. 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: 1505-1514.
 82. 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: 43482-43891.
 83. Tavori H, Fan D, Blakemore JL, Yancey PG, et al. Serum proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 and cell surface low-density lipoprotein receptor: evidence for a reciprocal regulation. *Circulation.* 2013; 127: 2403-2413.
 84. Kosenko T, Golder M, Leblond G, Weng W, et al. Low density lipoprotein binds to proprotein

- convertase subtilisin/kexin type-9 (PCSK9) in human plasma and inhibits PCSK9-mediated low density lipoprotein receptor degradation. *J Biol Chem.* 2013; 288: 8279-8288.
85. Sabatine MS, Giugliano RP, Keech AC, Honarpour N, et al., Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease. *N Engl J Med.* 2017; 376: 1713-1722.
86. Corsini A, Ferri N, Cortellaro M. Are pleiotropic effects of statins real? *Vasc Health Risk Manag.* 2007; 3: 611-613.
87. Shimada YJ, Cannon CP. PCSK9 (Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) inhibitors: past, present, and the future. *Eur Heart J.* 2015; 36: 2415-2424.
88. Ray KK, Landmesser U, Leiter LA, Kallend D, et al. Inclisiran in Patients at High Cardiovascular Risk with Elevated LDL Cholesterol. *N Engl J Med.* 2017; 376: 1430-1440.
89. Landlinger C, Pouwer MG, Juno C, van der Hoorn JWA, et al. The AT04A vaccine against proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces total cholesterol, vascular inflammation, and atherosclerosis in APOE*3Leiden. CETP mice. *Eur Heart J.* 2017; 38: 2499-2507.
90. Nicholls SJ, Puri R, Anderson T, Ballantyne CM, et al. Effect of Evolocumab on Progression of Coronary Disease in Statin-Treated Patients: The GLAGOV Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2016.