

FOCUS

PCSK9, COLESTEROLO E MALATTIA DI ALZHEIMER: QUALI EVIDENZE DALLA RICERCA DI BASE

PCSK9, cholesterol and Alzheimer's disease: evidence from basic research

MARIA PIA ADORNI¹, MASSIMILIANO RUSCICA², NICOLA FERRI³,
FRANCO BERNINI¹, FRANCESCA ZIMETTI¹

¹Dipartimento di Scienze degli Alimenti e del Farmaco, Università di Parma;

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

³Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università degli Studi di Padova

SUMMARY

Alzheimer's disease, as can be seen from numerous studies, is also associated with a dysregulation of cholesterol homeostasis in the brain. Proprotein Convertase Subtilisin / Kexin type 9 (PCSK9), known for its role in the regulation of plasma cholesterol levels, was initially identified in the brain, assuming its possible involvement in neuronal development and apoptosis. However, its precise function in the central nervous system (CNS) and in the pathogenesis of Alzheimer's disease has not yet been fully understood and is currently being studied. In this regard, the data currently available in vitro and in vivo, as well as the results of genetic studies, have led to controversial results. Potential cognitive disorders associated with treatment with anti-PCSK9 antibodies were excluded in light of the results of the EBBINGHAUS trial, a subgroup of the FOURIER study with evolocumab. However, a longer follow-up will be decisive in definitively clarifying this doubt. At the mechanistic level, PCSK9 is able to influence the expression of neuronal receptors involved in cholesterol homeostasis and in neuro-inflammation; moreover, higher concentrations of PCSK9 have been found in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's patients, suggesting its involvement in the pathology. The objective of this review is to critically analyze the state of the art of PCSK9 as a modulator of the mechanisms underlying the pathogenesis of Alzheimer's disease. Furthermore, based on the available literature data, we formulated the hypothesis that the PCSK9 protein can be considered a negative modulator of cerebral cholesterol homeostasis and neuro-inflammation and a potential pharmacological target for the development of new therapeutic approaches to counteract such pathology.

Keywords: *Proprotein convertase subtilisin / kexin type 9 (PCSK9), Alzheimer's disease, cholesterol, apolipoprotein E (apoE), receptors for apoE, neuron.*

Indirizzo per la corrispondenza

Nicola Ferri

Dipartimento di Scienze del Farmaco,

Università degli Studi di Padova

E-mail: nicola.ferri@unipd.it

Introduzione

La proproteina convertasi subtilisina/kexina di tipo 9 (PCSK9) rappresenta uno dei principali regolatori dell'omeostasi del colesterolo, mediando la degradazione dei recettori delle lipoproteine a bassa densità (LDL) a livello epatico (1). È interessante sottolineare come la proteina PCSK9 sia stata inizialmente identificata col nome di NARC-1 (neural apoptosis-regulated convertase-1) proprio nel cervello, in cui la sua espressione, a livello delle cellule embrionali primarie del telencefalo, risultava massima tra il 13° e il 15° giorno del processo di embriogenesi, un periodo gestazionale caratterizzato da un'intensa fase di neurogenesi (2). È stato anche osservato come in un modello di zebrafish, ma non nel modello murino, la delezione del gene PCSK9 induceva una globale disorganizzazione dei neuroni del cervelletto, portando in ultima analisi alla morte embrionale (3).

Alla luce di queste premesse, questa breve rassegna si concentra sul ruolo di PCSK9 a livello cerebrale con particolare attenzione al suo potenziale coinvolgimento nelle funzioni neuronali e nella patogenesi della malattia di Alzheimer. Inoltre, sulla base dei dati presenti in letteratura, è stata criticamente presa in esame la possibilità di considerare PCSK9 come un

modulatore dell'omeostasi del colesterolo e dell'infiammazione a livello cerebrale e quindi come un potenziale bersaglio farmacologico.

Omeostasi del colesterolo cerebrale

Il colesterolo è una delle molecole più importanti nell'ambito della fisiologia del cervello (4): è infatti un componente importante della mielina, è coinvolto nello sviluppo neuronale, nella sinaptogenesi, nello sviluppo dei neuriti e nel mantenimento dell'integrità e nei processi di riparazione delle membrane cellulari (5). Il colesterolo, a differenza dei suoi metaboliti 24S- e 27-idrossicolesterolo, non può passare dal plasma al compartimento centrale attraversando la barriera ematoencefalica (BEE) (6): Il cervello è quindi in grado di provvedere alla sintesi del colesterolo *in situ* (7). Le cellule del sistema nervoso centrale (SNC) sono in grado di sintetizzare autonomamente il colesterolo anche se i neuroni perdono progressivamente questa capacità e necessitano del colesterolo esogeno che viene fornito dagli astrociti per il mantenimento delle funzioni fisiologiche (8, 9). Studi *ex vivo* hanno dimostrato come la deplezione di colesterolo nei neuroni porti ad un'eccessiva fosforilazione della proteina tau, ad alterazioni del metabolismo del peptide β -amiloide ($A\beta$), all'induzione di stress ossidativo a livello neuronale, con conseguente neurodegenerazione (10). Il trasporto di colesterolo dagli astrociti ai neuroni è mediato da peculiari molecole e recettori che cooperano tra loro in modo coordinato. Nello specifico, il colesterolo prodotto dagli astrociti subisce il processo di efflusso di colesterolo verso particelle contenenti l'apolipoproteina E (ApoE). Tale processo è mediato dall'attività di trasportatori di membrana appartenenti alla famiglia ATP binding

Elenco degli argomenti trattati

- Omeostasi del colesterolo cerebrale.
- PCSK9 e patogenesi della malattia di Alzheimer.
- Recettori target di PCSK9 e il loro ruolo nella malattia di Alzheimer.
- PCSK9 e la malattia di Alzheimer: evidenze nell'uomo.
- Effetto degli inibitori di PCSK9 sui disturbi neuro-cognitivi.

cassette (ABC) come ABCA1, ABCG1 e ABCG4 (11). Infine, il colesterolo trasportato da tali particelle, che per composizione e dimensioni assomigliano alle lipoproteine plasmatiche ad alta densità (HDL), viene incorporato nei neuroni attraverso il legame di queste stesse particelle a recettori specifici, come il recettore per le LDL (LDLr), il low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1), il recettore per le VLDL (VLDLr) ed il recettore 2 per ApoE (ApoEr2) (12). Diversi studi documentano come PCSK9 sia in grado di degradare tali recettori (13, 14), mettendo in luce un ruolo di PCSK9 nell'omeostasi del colesterolo a livello cerebrale. Questa ipotesi è supportata da studi *in vivo* che dimostrano come l'espressione di LDLr venga ridotta

da PCSK9 durante lo sviluppo del cervello e dopo ictus ischemico transitorio (15). È quindi ipotizzabile che la degradazione dei recettori neuronali deputati all'uptake di colesterolo mediata da PCSK9, si traduca in una ridotta captazione di colesterolo da parte dei neuroni, con potenziali conseguenze deleterie (10) (Figura 1). Tuttavia, non tutti i dati presenti in letteratura supportano questa ipotesi. Infatti, Liu e collaboratori non hanno osservato alcun effetto significativo da parte di PCSK9 sull'espressione dei recettori LDLr, VLDLr e ApoEr2 a livello cerebrale in un modello murino (16). Queste discrepanze evidenziano la necessità di approfondire il possibile coinvolgimento di PCSK9 nell'omeostasi del colesterolo nel SNC.

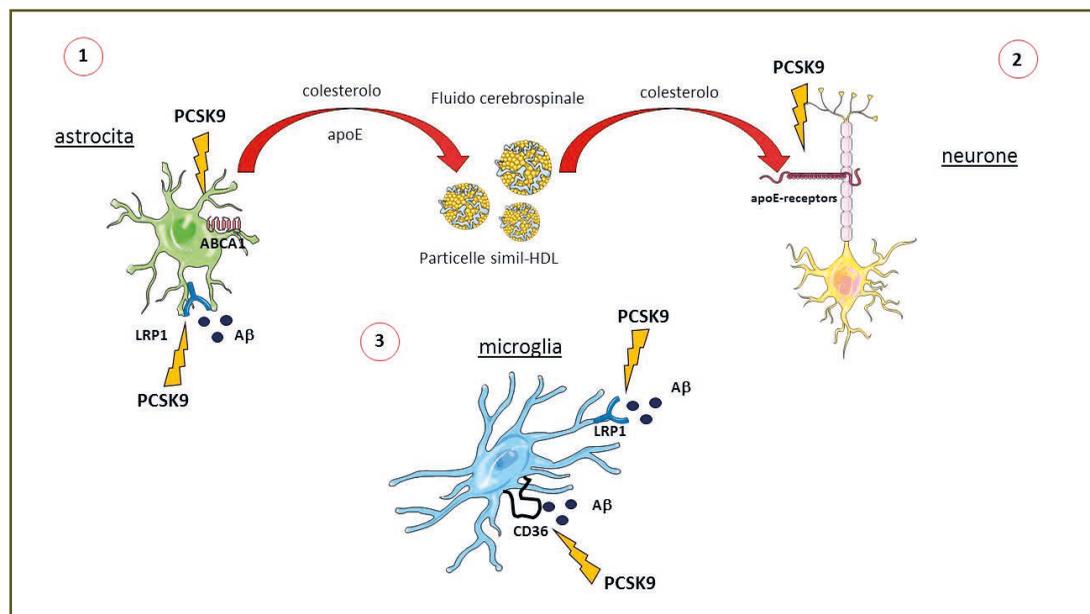


Figura 1 - Potenziale implicazione di PCSK9 nella patogenesi della malattia di Alzheimer a livello astrocitario, neuronale e della microglia.

1) Nell'astrociti PCSK9 degrada il recettore LRP1, riducendo la clearance di Aβ e favorendone la deposizione nelle placche; PCSK9 riduce l'espressione di ABCA1, impedendo così con la lipidazione di ApoE e la generazione di particelle simil-HDL; 2) PCSK9 degrada i recettori neuronali che internalizzano il colesterolo attraverso l'interazione con le lipoproteine contenenti ApoE. Il mancato apporto di colesterolo al neurone ne altera la fisiologia e le funzioni determinando neurodegenerazione. 3) Nella microglia PCSK9 degrada il recettore LRP1, riducendo la clearance di Aβ e favorendone la deposizione nelle placche. Inoltre PCSK9 modula l'espressione di CD36, amplificando la risposta neuroinfiammatoria Aβ-dipendente.

PCSK9 e patogenesi della malattia di Alzheimer

Le patologie neurodegenerative, come la malattia di Alzheimer, sono caratterizzate anche da alterazioni dell'omeostasi del colesterolo nel SNC (17, 18). Per esempio, attraverso uno studio di associazione genome-wide (GWAS), tra i geni correlati alla malattia sono stati identificati diversi loci coinvolti nel metabolismo lipidico. Un esempio è l'allele $\epsilon 4$ del gene APOE che codifica per ApoE, la principale apolipoproteina che media il trasporto di colesterolo nel SNC (19). L'isoforma $\epsilon 4$ è, a sua volta, senza dubbio uno dei fattori più predittivi per l'insorgenza della malattia di Alzheimer (20). Altri geni sono implicati nel metabolismo lipidico e si associano alla patologia, come BIN1, CLU, PICALM, ABCA7, ABCA1, ABCG1 e SORL1 (21, 22). Da un punto di vista molecolare, il colesterolo a livello cerebrale si accumula nei cosiddetti "lipid rafts", cioè microdomini di membrana dove avviene la processazione della proteina precursore dell'amiloide che, a sua volta, favorisce la formazione e la deposizione di frammenti insolubili di beta amiloide ($A\beta$) nel parenchima cerebrale. A questo proposito, è stato dimostrato come il colesterolo promuova l'amiloidogenesi fornendo stabilità strutturale ai lipid rafts localizzati a livello della membrana plasmatica cellulare (23). Di conseguenza, la modulazione del contenuto di colesterolo specificamente a livello dei lipid rafts, è in grado di influenzare la deposizione di $A\beta$.

I dati disponibili in letteratura sul ruolo di PCSK9 nella malattia di Alzheimer sono ancora limitati e controversi e in questa rassegna sono riassunti nella *Tabella 1*. Per quanto riguarda l'apoptosi a livello neuronale, PCSK9 svolge un'attività proapoptotica attraverso un aumento dell'espressione delle caspasi o una riduzione

dei livelli del recettore ApoEr2 (24). In topi knockout per APOE, sottoposti a una dieta ricca di grassi, l'apoptosi neuronale a livello dell'ippocampo risultava essere associata ad un'aumentata espressione di PCSK9 (25). In linea con queste osservazioni, in modelli murini il silenziamento di PCSK9 è coinciso con fenomeni di apoptosi neuronale indotta da ischemia cerebrale riducendo così il danno cerebrale (26). Al contrario, è stata messa in luce un'azione preventiva di PCSK9 sull'apoptosi neuronale che sembra verificarsi attraverso la riduzione della produzione di $A\beta$ (27). Un effetto diretto di PCSK9 sul metabolismo di $A\beta$ non è ancora del tutto chiarito. Topi deficitari della proteina PCSK9 hanno una maggiore espressione del β -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 (BACE1), la proteasi che, nell'Alzheimer, induce la produzione di $A\beta$ tossico che si va ad accumulare nelle placche neuritiche. Questo effetto si traduce in una maggiore deposizione di $A\beta$ a livello cerebrale. Diversamente, una sovra espressione di PCSK9 nei topi riduce i livelli di BACE1 (28). D'altra parte, nei cervelli di ratti nei quali è stato indotto un danno neurologico in seguito a ischemia/riperfusion, la somministrazione di una piccola molecola con attività inibitoria su PCSK9, ha impedito la perdita dendritica a livello della colonna vertebrale mediante una riduzione sia della aggregazione di $A\beta$ che della neuro infiammazione (29). Al contrario, altri studi hanno escluso una modulazione da parte di PCSK9 dei livelli di BACE1 o del metabolismo di APP nel cervello in modelli murini (16, 30). Ad oggi, non vi sono dati disponibili rispetto alla possibile influenza da parte di PCSK9 del processo di fosforilazione di tau, un altro tipico marcatore di malattia.

L'impatto di PCSK9 sulla performance neuro-cognitiva in modelli preclinici è

Tabella I - Studi sul coinvolgimento di PCSK9 nella patogenesi della malattia di Alzheimer (AD).

Studio	Modello sperimentale	Impatto di PCSK9 nell'AD	Effetti sul metabolismo del colesterolo e la neuroinfiammazione
Kysenius K et al. (2012) (24)	Modello cellulare	Promozione dell'apoptosi neuronale	Riduzione dell'espressione di ApoEr2
Wu et al. (2014) (27)	Modello murino	Prevenzione dell'apoptosi neuronale e riduzione della produzione di A β	
Zhao et al. (2017) (25)	Modello murino	Induzione di PCSK9 associata ad aumento dell'espressione di BACE1	Accumulo di lipidi nell'ippocampo
Wang et al. (2018) (26)	Modello murino	Attenuazione di apoptosi neuronale causata dall'inibizione di PCSK9	Riduzione dell'espressione di ApoEr2 nella corteccia e nell'ippocampo
Jonas et al. (2008) (28)	Modello cellulare	L'assenza di PCSK9 induce la produzione di A β , la sua sovraespressione riduce i livelli di BACE1	Riduzione dell'espressione del LDLr
Apaijai et al. (2019) (29)	Modello di ratto	La somministrazione di un inibitore di PCSK9 attenua l'aggregazione di A β e la neuroinfiammazione	Riduzione del numero di cellule CD 11b+/ CD 45+high
Liu et al. (2010) (16)	Modello murino	PCSK9 non ha impatto sui livelli di BACE1 o sul metabolismo di APP	Nessun effetto sull'espressione di LDLr, VLDLr e apoEr2
Fu et al. (2017) (30)	Modello cellulare e murino	PCSK9 non regola il metabolismo di APP	Nessun effetto sull'espressione di LDLr
Reynolds et al. (2010) Shibata et al. (2005) Benn et al. (2017) Mettford et al. (2018) Paquette et al. (2018) (82-86)	Studi genetici sull'uomo	Varianti genetiche di PCSK9 non sono associate al rischio di AD	
Zimetti et al. (2017) (50)	Studio osservazionale sull'uomo	Aumento dei livelli di PCSK9 nel fluido cerebrospinale di pazienti con AD	Correlazione tra livelli di PCSK9 ed apoE4; aumento dei livelli di PCSK9 nei portatori dell'isoforma apoE4
Courtemanche et al. (2018) (90)	Studio osservazionale sull'uomo	Aumento dei livelli di PCSK9 nel fluido cerebrospinale di pazienti con malattie neurodegenerative e correlazione con i marcatori diagnostici	
Picard C et al. (2019) (87)	Studio osservazionale sull'uomo	Aumento dell'espressione di PCSK9 nella corteccia frontale di pazienti con AD; correlazione tra PCSK9 nel fluido cerebrospinale di soggetti a rischio di AD con i livelli di tau e p-tau; Individuazione di due polimorfismi associati a rischio di AD	Aumento dell'mRNA ma non dell'espressione proteica di LDLr; correlazione tra PCSK9 nel fluido cerebrospinale di soggetti a rischio di AD e i livelli di apoE e apoJ

stato indirettamente suggerito dall'osservazione per cui, nel topo, la delezione del recettore LRP1, sensibile all'azione degradante di PCSK9 (13), porta ad una riduzione della clearance di A β e a un deficit cognitivo (31). Coerentemente, topi privi del recettore per le LDL mostrano segni di compromissione della capacità di apprendimento e di memoria (32) e una riduzione della proliferazione cellulare ippocampale e della formazione delle sinapsi (33).

Recettori target di PCSK9 e il loro ruolo nella malattia di Alzheimer

Oltre ad APOE, sono diversi i geni implicati nella modulazione dell'omeostasi del colesterolo e studiati per la loro associazione con la malattia di Alzheimer (34). Alcuni di questi geni codificano per recettori sensibili all'azione degradante di PCSK9 (*Figura 1*). Per esempio LRP1 è uno tra i recettori in grado di interagire con ApoE e, nonostante alcuni risultati in merito alla sua associazione con la patologia nell'uomo siano controversi (35), è stato dimostrato che l'espressione di LRP1 nel cervello e nei capillari cerebrali si riduce progressivamente all'aumentare dell'età e in modo ancor più marcato nell'Alzheimer (36-38). LRP1 media infatti la clearance di A β mediante attraversamento della BEE (39) e la presenza dell'allele APO ϵ 4 si associa ad una sua ridotta clearance tramite questo recettore (40, 41). Consistentemente, la delezione specifica di LRP1 a livello dell'endotelio cerebrale aumenta la deposizione di A β , determinando deficit cognitivo e di memoria in modelli sperimentali murini (31). LRP1 sembra inoltre svolgere un ruolo fondamentale nel metabolismo del complesso ApoE-A β , per cui ApoE può competere con A β per l'interazione con LRP1, causando una ridotta eliminazione del peptide tossico dal cervello

(42). LRP1 è anche coinvolto nella clearance epatica di A β (43). Poiché il recettore LRP1 è espresso in diversi tipi di cellule cerebrali, tra cui neuroni, astrociti e cellule vascolari, i suoi livelli possono essere modificati in modo diversificato e cellula-dipendente nella malattia di Alzheimer (44, 45). In effetti, i livelli di LRP1 risultano ridotti a livello neuronale ma aumentati nelle cellule vascolari o negli astrociti che si trovano in prossimità delle placche amiloidi tipiche della patologia (44-46). PCSK9 può indurre la degradazione di LRP1 in diversi tipi di cellule, inclusi gli epatociti (13) e le cellule vascolari (47, 48). Poiché PCSK9 è espressa sia nei neuroni che nelle cellule vascolari, potrebbe quindi influenzare i livelli di LRP1 in entrambi i tipi cellulari (49). Pertanto, gli aumentati livelli di PCSK9 del liquido cerebrospinale (CSF) di soggetti con la malattia che sono stati osservati dal nostro gruppo di ricerca (50) potrebbero essere associati ad un maggiore turnover di LRP1 nei diversi tipi cellulari, influenzando così l'eliminazione del peptide A β attraverso la BEE.

Il LDLr è un altro importante recettore per l'ApoE espresso a livello cerebrale. Anche in questo caso gli studi genetici volti a identificare il suo legame con l'Alzheimer sono controversi, sebbene una ricerca condotta su un'ampia coorte di soggetti abbia riscontrato un'associazione tra un comune polimorfismo del recettore e la prevalenza di malattia, evidenziabile negli uomini ma non nelle donne (51,52). Inoltre, in un modello animale di Alzheimer, il recettore ha dimostrato un effetto benefico tramite il potenziamento della clearance di A β (53) rinforzandone l'associazione con il rischio e ipoteticamente il coinvolgimento dell'azione degradante di PCSK9. Anche il VLDLr può essere coinvolto nella clearance del complesso ApoE-A β (54). Tuttavia, i risultati di una meta-analisi di

studi genetici condotta su un polimorfismo del VLDLr ha dato risultati contraddittori in quanto ne sarebbe emerso un ruolo protettivo nei confronti della malattia nella popolazione caucasica e un effetto invece deleterio nella popolazione asiatica (55). Inoltre, è stata descritta un'associazione genetica con l'Alzheimer in uno studio ma i risultati non sono stati successivamente confermati (56). Pertanto, l'associazione diretta di VLDLr con la malattia resta da dimostrare.

Il recettore scavenger CD36 è coinvolto nell'attivazione della microglia dipendente da A β e nella conseguente attivazione della risposta immunitaria innata (57-59). È stato dimostrato che PCSK9 determina un aumento dell'espressione di CD36 nei macrofagi e in cellule microglia-like (60), suggerendo un coinvolgimento della proteina sia nella clearance di A β mediata da CD36 (*Figura 1*), che nella risposta innata dell'ospite ad agenti tossici come per esempio lo stesso A β e le LDL-ossidate (oxLDL) nelle cellule cerebrali. In effetti, CD36 funge da co-recettore nell'etero-dimerizzazione dei recettori Toll like (Toll like receptors, TLR), un processo essenziale per l'attivazione di segnali infiammatori intracellulari e per la conseguente induzione della neuro-degenerazione microglia-dipendente (61). Questo dato è consistente con l'effetto pro-infiammatorio di PCSK9 nei macrofagi (62) e con l'osservazione che la somministrazione di un inibitore di PCSK9 determina un'attenuazione della neuro-infiammazione in modelli sperimentali murini (29). Il nostro gruppo di ricerca ha inoltre precedentemente dimostrato che la PCSK9 ricombinante umana inibisce l'efflusso di colesterolo mediato dal trasportatore di membrana ABCA1 nei macrofagi (63). A questo proposito, anche i dati sulla possibile implicazione di ABCA1 nella patologia di Alzheimer sono piuttosto

controversi. Per esempio, i portatori della variante genetica R219K nel gene ABCA1 presentano una riduzione del 33% dei livelli di colesterolo totale nel CSF rispetto ai non portatori. Lo stesso polimorfismo risulterebbe parallelamente associato ad un ritardo medio nell'insorgenza della malattia di 1,7 anni (64). Questi dati suggeriscono che la variabilità genetica di ABCA1 potrebbe favorire lo sviluppo della malattia, probabilmente anche tramite un'interferenza con l'omeostasi del colesterolo nel SNC. Al contrario, la stessa variante R219K del gene ABCA1 in un altro lavoro è stata associata ad un aumentato rischio (65). A dimostrare l'eterogeneità dei risultati in questo ambito, un buon numero di osservazioni ha riportato un'associazione tra varianti genetiche del gene ABCA1 e riduzione o aumento del rischio (66-68). Infine, sono stati pubblicati anche alcuni studi ad esito negativo, in cui non è stata riscontrata alcuna associazione tra polimorfismi del gene ABCA1 (R219K, I883M e R1587K) ed il rischio (69). Il coinvolgimento di ABCA1 nella malattia è stato studiato anche in modelli murini di malattia in cui la proteina ABCA1 è stata deleta. In questi animali, l'assenza di ABCA1 ha determinato una deposizione più accentuata di A β a livello cerebrale (70-72). Altri risultati hanno tuttavia portato a conclusioni opposte, poiché non hanno evidenziato alcun effetto di ABCA1 sulla deposizione di amiloide (73, 74). Poiché ABCA1 è responsabile della secrezione di ApoE a livello degli astrociti e media quindi il primo step del trasferimento del colesterolo verso neuroni (75), il suo potenziale impatto sulla fisiopatologia dell'Alzheimer potrebbe coinvolgere anche PCSK9, che ha dimostrato di modularne l'espressione (*Figura 1*) (63). Coerentemente con questa ipotesi, in modelli murini knock-out per ABCA1 è stata osservata, sia a livello della

corteccia che nel CSF, una marcata riduzione dei livelli di ApoE, che risulta anche essere meno lipidata (75). Inoltre, il CSF di pazienti affetti da patologia di Alzheimer ha una ridotta capacità di promuovere l'efflusso di colesterolo ABCA1-mediato rispetto a soggetti controllo (76, 77). Infine, un ulteriore livello di complessità in questi processi potrebbe essere rappresentato dal possibile legame tra PCSK9 e lipoproteine contenenti ApoE come precedentemente descritto per le LDL (78), la Lipoprotein (a) (79) e le HDL (80, 81).

PCSK9 e la malattia di Alzheimer: evidenze sull'uomo

Gli studi genetici condotti finora sull'uomo (*Tabella 1*) non sono conclusivi rispetto all'impatto delle mutazioni del gene codificante PCSK9 sulla prevalenza o il rischio di sviluppare la malattia di Alzheimer. Sebbene alcuni autori abbiano identificato anche PCSK9 tra i geni implicati nel metabolismo del colesterolo e associati all'Alzheimer (34), in due studi di coorte, giapponese e svedese, non è stata riscontrata alcuna associazione tra polimorfismi di PCSK9 e rischio di insorgenza della patologia (82, 83). Coerentemente, una recente analisi di randomizzazione mendeliana non ha evidenziato nessuna associazione significativa tra la presenza di una mutazione con perdita di funzione a carico di PCSK9 ed il rischio (84), escludendone quindi un impatto sulla patologia. Ad una conclusione negativa sono giunti anche i risultati dello studio genetico REGARDS condotto su una popolazione afroamericana che presentava o meno le varianti C697X o Y142X con perdita di funzione di PCSK9. La presenza di tali varianti non ha avuto alcun impatto sulle performances cognitive, che rappresentavano lo scopo principale dello studio (85). Inoltre, In una

coorte di abitanti del Canada francese e affetti da malattia di Alzheimer, i portatori di mutazione di PCSK9 con perdita di funzione non differivano dai non portatori in termini di prevalenza o età di insorgenza della malattia (86). Al contrario, un recente studio che ha coinvolto soggetti ad alto rischio, ha individuato due polimorfismi di PCSK9 associati ad un aumentato rischio di sviluppare la patologia ed evidenziato questa relazione in modo specifico nelle donne. Nello stesso lavoro gli autori hanno riscontrato un'aumentata espressione di PCSK9 in sezioni autoptiche di corteccia frontale di soggetti affetti dalla malattia (87).

PCSK9 è stata identificata nel fluido cerebrospinale umano anche se ad una concentrazione molto più bassa rispetto a quella plasmatica (88). Le concentrazioni liquorali di PCSK9 sembrerebbero costanti, senza presentare il tipico andamento circadiano che si verifica per PCSK9 nel plasma (89), a suggerire pertanto un meccanismo di regolazione differente nei compartimenti periferico e centrale dell'organismo (88). Sulla base di questa osservazione il nostro gruppo di ricerca ha recentemente dimostrato la presenza di aumentati livelli di PCSK9 nel fluido cerebrospinale di pazienti affetti da morbo di Alzheimer, fenomeno particolarmente evidente nei portatori dell'isoforma APOE4 (50). Questi dati suggeriscono quindi un possibile coinvolgimento della proteina PCSK9 nella fisiopatologia dell'Alzheimer e un link con l'isoforma APOE4 che dovrà essere oggetto di ulteriori approfondimenti. La nostra osservazione è stata successivamente confermata da Courtemanche e collaboratori, che tuttavia dimostrano anche una tendenza all'aumento di PCSK9 nel liquor di pazienti affetti da malattie neurodegenerative non correlate alla malattia, a suggerire un coinvolgimento nei

processi neurodegenerativi non legati ad una specifica patologia (90).

Inibitori di PCSK9 e disturbi neurocognitivi

Il trattamento con inibitori di PCSK9 alirocumab, evolocumab o bococizumab ha determinato il raggiungimento di livelli molto bassi di colesterolo totale plasmatico (concentrazioni medie di 30 mg/dL nello studio FOURIER e 25 mg/dL negli studi ODYSSEY a LUNGO TERMINE e SPIRE) (91-93). Questi dati di elevata efficacia hanno sollevato alcune preoccupazioni in merito ai potenziali effetti collaterali correlabili all'utilizzo clinico degli inibitori di PCSK9. In particolare, alcuni studi hanno evidenziato una potenziale associazione tra il trattamento con anticorpi monoclonali anti-PCSK9 ed eventi cognitivi avversi (92, 94). Bisogna tuttavia ricordare che tali disturbi sono stati spesso riportati dal paziente stesso e si sono verificati in un numero esiguo di soggetti che presentavano specifiche condizioni patologiche preesistenti o altri fattori confondenti, come emerso dai risultati di un'analisi condotta dalla Food and Drug Administration (FDA) (95-96).

Al fine di chiarire meglio questo dubbio, un recente studio ha valutato in modo prospettico l'effetto dell'anticorpo monoclonale anti-PCSK9 evolocumab sulle funzioni cognitive, misurate mediante specifici test neuropsicologici (97). In tale studio, 1.204 soggetti con età media di 65 anni, che non presentavano disturbi neurologici durante il trattamento con evolocumab o placebo, sono stati monitorati per i successivi 1,6 anni senza evidenziare effetti avversi di tipo cognitivo (98). Questo risultato è stato ulteriormente confermato da recenti meta-analisi (99, 100). Tuttavia, un follow-up di durata maggiore, come

quello di 5 anni dello studio FOURIER ancora in corso, fornirà ulteriori indicazioni relative all'impatto a lungo termine degli inibitori di PCSK9 sulle funzioni neurocognitive. D'altra parte, la mancanza di un evidente effetto neuro-cognitivo da parte degli inibitori di PCSK9 è probabilmente spiegabile dalla presenza della BEE, che isola il SNC dal compartimento periferico, con la conseguenza che i livelli plasmatici di colesterolo in periferia non necessariamente riflettono quelli cerebrali (101). A supporto di questo concetto, nello studio con i portatori di varianti genetiche associate a perdita di funzione di PCSK9, un'esposizione a livelli molto bassi di colesterolo LDL (LDL-C) per tutto il corso della vita, non è stata associata all'instaurarsi di disturbi neuro-cognitivi (85,86). Inoltre, la BEE limita l'accesso al SNC sia di PCSK9 (15) e a maggior ragione di molecole a più elevato peso molecolare come gli anticorpi monoclonali alirocumab ed evolocumab. Infatti, in condizioni di integrità di BEE, la presenza delle "tight junctions" impedisce la diffusione transcellulare degli anticorpi attraverso i capillari. In queste condizioni, infatti, la penetrazione di anticorpi nel cervello è stata stimata essere circa lo 0,1%, sia nell'uomo che negli animali (102). D'altra parte, in alcune condizioni patologiche, come il diabete, la BEE potrebbe essere compromessa e risultare più permeabile (103). Nonostante questo, qualche indicazione che esclude la possibilità che gli anticorpi attraversino la BEE anche in queste condizioni è fornita dallo studio EBBINGHAUS, in cui è stata inclusa una buona percentuale di soggetti diabetici (37,2%) e in cui non è stata osservata alcuna variazione delle funzioni cognitive (96). Pertanto, sarebbe di grande interesse valutare l'effetto di piccole molecole attualmente in fase di studio, che sono invece in grado di attraversare la BEE e di inibire PCSK9. A

questo proposito un recente studio ha dimostrato che la somministrazione endovenosa di Pep2-8 trifluoroacetato, molecola in grado di inibire PCSK9, ha determinato una riduzione dell'aggregazione di A β e attenuazione della neuro-infiammazione in modelli murini (29).

Glossario

ABCA1, ABCG1, ABCG4: ATP Binding Cassette transporter A1, G1 e G4. Sono proteine integrali di membrana che utilizzano ATP come fonte di energia per trasportare metaboliti attraverso le membrane. Mediano il processo di efflusso di colesterolo e fosfolipidi cellulari in maniera unidirezionale verso specifici accettori extracellulari.

LRP1: Low density lipoprotein Receptor-related Protein 1. È un recettore posto sulla membrana plasmatica delle cellule, principalmente espresso a livello di cellule muscolari lisce, epatociti e neuroni. Media il processo di endocitosi-recettore mediato e svolge un ruolo chiave nella trasduzione di diversi segnali cellulari regolando vari processi biologici.

CD36: Cluster of Differentiation 36. È una glicoproteina localizzata in microdomini specifici della membrana plasmatica, le caveole. Appartiene alla famiglia degli scavenger receptors di classe B. Insieme a SR-BI è stato identificato come recettore delle LDL ossidate; è coinvolto nell'immunità naturale contro miceti e batteri; è in grado di legare anche le lipoproteine ad alta densità HDL.

TLR: Toll-like receptors. Sono recettori in grado di riconoscere agenti patogeni batterici, virali o fungini con un ruolo determinante nel processo di immunità innata, poiché attraverso l'attivazione di meccanismi di signaling intracellulare, scatenano la produzione di citochine pro-infiammatorie e promuovono la maturazione delle cellule dendritiche.

APP: Amyloid Precursor Protein. È una proteina il cui clivaggio ad opera di enzimi chiamati secretasi dà origine a frammenti di beta-amiloide (A β). A seconda della secretasi coinvolta (α , β o γ), si possono formare peptidi solubili o insolubili e tossici.

BACE1: Beta-site Amyloid precursor protein Cleaving Enzyme 1. Chiamata anche β -secretasi, è l'enzima che induce la proteolisi dell'APP causando la formazione di peptidi di A β insolubili e tossici che aggregano e si accumulano nelle placche cerebrali tipiche dei soggetti affetti da malattia di Alzheimer.

Conclusioni

Sebbene diversi effetti extra epatici di PCSK9, indipendenti da quello più noto sui livelli circolanti di LDL-C siano stati identificati e ben caratterizzati (104), il ruolo di questa proteina nel cervello e il suo potenziale coinvolgimento nelle malattie del SNC sono ancora oggetto di studio. A questo proposito, gli studi di fisiopatologia condotti in modelli animali di malattia di Alzheimer hanno portato a risultati controversi, lasciando aperta la questione della potenziale implicazione di PCSK9 nella patogenesi di questa malattia. Tuttavia, i limitati studi genetici disponibili che si sono concentrati sulle varianti di PCSK9 associate a perdita di funzione della proteina in genere non supportano un'associazione tra PCSK9 e rischio di insorgenza di malattia (85, 86). È importante notare, tuttavia, come in tutti gli studi sono state valutate le concentrazioni plasmatiche di PCSK9, e sappiamo come PCSK9 non sia in grado di attraversare la BEE e la sua regolazione sembri essere differente tra i due compartimenti corporei, centrale e periferico. Sulla base dei dati ottenuti nel nostro laboratorio, che dimostrano aumentati livelli di PCSK9 nel liquido cerebrospinale dei pazienti con la patologia e di dati di letteratura, che evidenziano la capacità di PCSK9 di interferire con il trasporto di colesterolo nel SNC mediante la degradazione dei recettori neuronali per ApoE, responsabili dell'uptake di colesterolo derivante dagli astrociti, pensiamo sia possibile ipotizzare che nella patologia vi sia una generale deplezione neuronale di colesterolo mediata da PCSK9. Le conseguenze di tale effetto includono la perdita delle funzioni fisiologiche dei neuroni e, in ultimo, la neuro-degenerazione. Inoltre, PCSK9 può contribuire ad aggravare la neuro-

infiammazione, eventualmente agendo sui recettori CD36 e TLR4 (61). Queste ipotesi, che stiamo attualmente valutando, possono costituire la base per testare nuovi approcci farmacologici, ad esempio piccole molecole già esistenti e potenzialmente in grado di attraversare la BEE mediante processi di diffusione o attraverso

specifici trasportatori, diversamente dagli anticorpi anti-PCSK9. Queste molecole, ripristinando il trasporto fisiologico del colesterolo dagli astrociti ai neuroni nel cervello, e attenuando la neuro-infiammazione mediante l'inibizione della via CD36-TLR4, potrebbero aprire la strada a potenziali future terapie innovative.

Questionario di auto-apprendimento

1) Il colesterolo presente a livello cerebrale:

- Viene prodotto in situ
- Deriva dalla circolazione periferica mediante l'attraversamento della barriera ematoencefalica.
- Non è ancora nota l'origine del colesterolo cerebrale.

2) Il trasporto di colesterolo tra neurone e astrocita:

- È fondamentale in quanto gli astrociti perdono progressivamente la capacità di sintetizzare autonomamente il colesterolo.
- Coinvolge molecole e specifici recettori di membrana deputati all'efflusso e all'uptake di colesterolo che cooperano in maniera coordinata.
- È mediato dalle lipoproteine a bassa densità LDL.

3) È stato dimostrato che:

- PCSK9 previene l'apoptosi neuronale.
- PCSK9 promuove l'apoptosi neuronale.
- Rispetto all'effetto di PCSK9 sull'apoptosi neuronale i dati sono contrastanti.

4) Il recettore LRP1:

- Dimerizza con il recettore CD36 e promuove l'attivazione di processi pro-infiammatori.
- Appartiene alla famiglia degli apoE-receptors e media l'internalizzazione del colesterolo a livello neuronale.
- È responsabile della lipidazione di apoE

ad opera degli astrociti e favorisce la produzione di particelle simil-HDL.

5) I livelli di PCSK9 nel fluido cerebrospinale:

- Sono più elevati nei soggetti con Alzheimer ed in particolare nei portatori dell'isoforma apoE4.
- Sono più elevati nei soggetti affetti da altre demenze ma non nella patologia di Alzheimer.
- Sono più bassi nei soggetti affetti da Alzheimer e correlano con i neuro-biomarker utilizzati per la diagnosi.

6) Il trial clinico EBBINGHAUS ha dimostrato che

- Il trattamento con l'anticorpo anti-PCSK9 evolocumab è stato associato all'insorgenza di eventi cognitivi avversi correlati al raggiungimento di livelli plasmatici molto bassi di colesterolo.
- Il trattamento con l'anticorpo anti-PCSK9 evolocumab è stato associato all'insorgenza di eventi cognitivi avversi unicamente in un sottogruppo di soggetti diabetici.
- Il trattamento con l'anticorpo anti-PCSK9 evolocumab non è stato associato all'insorgenza di eventi cognitivi avversi.

Risposte corrette:

1A, 2B, 3C, 4B, 5A, 6C

RIASSUNTO

La malattia di Alzheimer come si evince da numerosi studi, è anche associata ad una disregolazione dell'omeostasi del colesterolo a livello cerebrale. La Proproteina Convertasi Subtilisina/Kexina tipo 9 (PCSK9), nota per il suo ruolo nella regolazione dei livelli di colesterolo plasmatico, è stata inizialmente identificata a livello cerebrale, ipotizzandone un eventuale coinvolgimento nello sviluppo neuronale e nell'apoptosi. Tuttavia, la sua precisa funzione nel sistema nervoso centrale (SNC) e nella patogenesi dell'Alzheimer non è ancora stata pienamente compresa ed è attualmente oggetto di studio. A questo proposito, i dati attualmente disponibili *in vitro* ed *in vivo*, così come i risultati di studi genetici, hanno portato a risultati controversi. Potenziali disturbi cognitivi associati al trattamento con anticorpi anti-PCSK9 sono stati esclusi alla luce dei risultati del trial EBBINGHAUS, un sottogruppo dello studio FOURIER con evolocumab. Tuttavia, un follow-up più lungo sarà determinante nel chiarire definitivamente questo dubbio. A livello meccanicistico, PCSK9 è in grado di influenzare l'espressione dei recettori neuronali coinvolti nell'omeostasi del colesterolo e nella neuro infiammazione; inoltre sono state trovate concentrazioni più elevate di PCSK9 nel fluido cerebrospinale di pazienti affetti da Alzheimer, a suggerirne un suo coinvolgimento nella patologia. L'obiettivo di questa rassegna è quello di analizzare criticamente lo stato dell'arte di PCSK9 come modulatore dei meccanismi che stanno alla base della patogenesi della malattia di Alzheimer. Inoltre, sulla base dei dati di letteratura disponibili, abbiamo formulato l'ipotesi per cui la proteina PCSK9 possa essere considerata un modulatore negativo dell'omeostasi del colesterolo cerebrale e della neuro infiammazione e un potenziale bersaglio farmacologico per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici per contrastare tale patologia.

Parole chiave: *Proproteina convertasi subtilisina/kexina di tipo 9 (PCSK9), malattia di Alzheimer, colesterolo, apolipoproteina E (apoE), recettori per apoE, neurone.*

Bibliografia

- Macchi C, Banach M, Corsini A, et al. Changes in circulating pro-protein convertase subtilisin/kexin type 9 levels - experimental and clinical approaches with lipid-lowering agents. *Eur J Prev Cardiol.* 2019; 2047487319831500.
- Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, 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: 928-933.
- Poirier S, Prat A, Marcinkiewicz E, et al. Implication of the proprotein convertase NARC-1/PCSK9 in the development of the nervous system. *J Neurochem.* 2006; 98: 838-850.
- Chang TY, Yamauchi Y, Hasan MT, Chang C. Cellular cholesterol homeostasis and Alzheimer's disease. *J Lipid Res.* 2017; 58: 2239-2254.
- Dietschy JM. Central nervous system: cholesterol turnover, brain development and neurodegeneration. *Biol Chem.* 2009; 390: 287-293.
- Bjorkhem I, Leoni V, Svenningsson P. On the fluxes of side-chain oxidized oxysterols across blood-brain and blood-CSF barriers and origin of these steroids in CSF (Review). *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018.
- Bjorkhem I, Meaney S. Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 806-815.
- Dietschy JM, Turley SD. Thematic review series: brain lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res.* 2004; 45: 1375-1397.
- Saito K, Dubreuil V, Arai Y, Wilsch-Brauninger M, et al. Ablation of cholesterol biosynthesis in neural stem cells increases their VEGF expression and angiogenesis but causes neuron apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 8350-8355.
- Koudinov AR, Koudinova NV. Cholesterol homeostasis failure as a unifying cause of synaptic degeneration. *J Neurol Sci.* 2005; 229-230: 233-240.
- Chen J, Zhang X, Kusumo H, et al. Cholesterol efflux is differentially regulated in neurons and astrocytes: implications for brain cholesterol homeostasis. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1831: 263-275.
- Bu G. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurosci.* 2009; 10: 333-344.
- Canuel M, Sun X, Asselin MC, 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.
14. Poirier S, Mayer G, Benjannet S, 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.
 15. Rousselet E, Marcinkiewicz J, Kriz J, et al. PCSK9 reduces the protein levels of the LDL receptor in mouse brain during development and after ischemic stroke. *J Lipid Res*. 2011; 52: 1383-1391.
 16. Liu M, Wu G, Baysarowich J, et al. PCSK9 is not involved in the degradation of LDL receptors and BACE1 in the adult mouse brain. *J Lipid Res*. 2010; 51: 2611-2618.
 17. Arenas F, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. Intracellular Cholesterol Trafficking and Impact in Neurodegeneration. *Front Mol Neurosci*. 2017; 10: 382.
 18. Sato N, Morishita R. The roles of lipid and glucose metabolism in modulation of beta-amyloid, tau, and neurodegeneration in the pathogenesis of Alzheimer disease. *Front Aging Neurosci*. 2015; 7: 199.
 19. Mahoney-Sanchez L, Belaidi AA, Bush AI, Ayton S. The Complex Role of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease: an Overview and Update. *J Mol Neurosci*. 2016; 60: 325-335.
 20. Liu CC, Liu CC, Kanekiyo T, et al. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol*. 2013; 9: 106-118.
 21. Dong HK, Gim JA, Yeo SH, Kim HS. Integrated late onset Alzheimer's disease (LOAD) susceptibility genes: Cholesterol metabolism and trafficking perspectives. *Gene*. 2017; 597: 10-16.
 22. Picard C, Julien C, Frappier J, et al. Alterations in cholesterol metabolism-related genes in sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2018; 66: 180 e181-180 e189.
 23. Vetrivel KS, Thinakaran G. Membrane rafts in Alzheimer's disease beta-amyloid production. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1801: 860-867.
 24. Kysenius K, Muggalla P, Matlik K, et al. PCSK9 regulates neuronal apoptosis by adjusting ApoER2 levels and signaling. *Cell Mol Life Sci*. 2012; 69: 1903-1916.
 25. Zhao XS, Wu Q, Peng J et al. Hyperlipidemia-induced apoptosis of hippocampal neurons in apoE(-/-) mice may be associated with increased PCSK9 expression. *Mol Med Rep*. 2017; 15: 712-718.
 26. Wang L, Wang Z, Shi J, et al. Inhibition of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 attenuates neuronal apoptosis following focal cerebral ischemia via apolipoprotein E receptor 2 downregulation in hyperlipidemic mice. *Int J Mol Med*. 2018; 42: 2098-2106.
 27. Wu Q, Tang ZH, Peng J, et al. The dual behavior of PCSK9 in the regulation of apoptosis is crucial in Alzheimer's disease progression (Review). *Biomed Rep*. 2014; 2: 167-171.
 28. Jonas MC, Costantini C, Puglielli L. PCSK9 is required for the disposal of non-acetylated intermediates of the nascent membrane protein BACE1. *EMBO Rep*. 2008; 9: 916-922.
 29. Apaijai N, Moisescu DM, Palee S, et al. Pretreatment With PCSK9 Inhibitor Protects the Brain Against Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury Through a Reduction of Neuronal Inflammation and Amyloid Beta Aggregation. *J Am Heart Assoc*. 2019; 8: e010838.
 30. Fu T, Guan Y, Xu J, Wang Y. APP, APLP2 and LRP1 interact with PCSK9 but are not required for PCSK9-mediated degradation of the LDLR in vivo. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2017; 1862: 883-889.
 31. Storck SE, Meister S, Nahrath J, et al. Endothelial LRP1 transports amyloid-beta(1-42) across the blood-brain barrier. *The Journal of clinical investigation*. 2016; 126: 123-136.
 32. Mulder M, Jansen PJ, Janssen BJ, et al. Low-density lipoprotein receptor-knockout mice display impaired spatial memory associated with a decreased synaptic density in the hippocampus. *Neurobiol Dis*. 2004; 16: 212-219.
 33. Mulder M, Koopmans G, Wassink G, et al. LDL receptor deficiency results in decreased cell proliferation and presynaptic bouton density in the murine hippocampus. *Neurosci Res*. 2007; 59: 251-256.
 34. Wollmer MA. Cholesterol-related genes in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1801: 762-773.
 35. Kang DE, Saitoh T, Chen X, et al. Genetic association of the low-density lipoprotein receptor-related protein gene (LRP), an apolipoprotein E receptor, with late-onset Alzheimer's disease. *Neurology*. 1997; 49: 56-61.
 36. Kang DE, Pietrzik CU, Baum L, et al. Modulation of amyloid beta-protein clearance and Alzheimer's disease susceptibility by the LDL receptor-related protein pathway. *The Journal of clinical investigation*. 2000; 106: 1159-1166.
 37. Shibata M, Yamada S, Kumar SR, et al. Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *The Journal of clinical investigation*. 2000; 106: 1489-1499.
 38. Silverberg GD, Messier AA, Miller MC, et al. Amyloid efflux transporter expression at the

- blood-brain barrier declines in normal aging. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2010; 69: 1034-1043.
39. Deane R, Bell RD, Sagare A, Zlokovic BV. Clearance of amyloid-beta peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in Alzheimer's disease. *CNS & neurological disorders drug targets*. 2009; 8: 16-30.
 40. Bell RD, Sagare AP, Friedman AE, et al. Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid beta-peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2007; 27: 909-918.
 41. Deane R, Sagare A, Hamm K, et al. apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain. *The Journal of clinical investigation*. 2008; 118: 4002-4013.
 42. Verghese PB, Castellano JM, Garai K, et al. ApoE influences amyloid-beta (A β) clearance despite minimal apoE/A β association in physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110: E1807-1816.
 43. Sagare A, Deane R, Bell RD, et al. Clearance of amyloid-beta by circulating lipoprotein receptors. *Nat Med*. 2007; 13: 1029-1031.
 44. Donahue JE, Flaherty SL, Johanson CE, et al. RAGE, LRP-1, and amyloid-beta protein in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica*. 2006; 112: 405-415.
 45. Ruzali WA, Kehoe PG, Love S. LRP1 expression in cerebral cortex, choroid plexus and meningeal blood vessels: relationship to cerebral amyloid angiopathy and APOE status. *Neuroscience letters*. 2012; 525: 123-128.
 46. Arelin K, Kinoshita A, Whelan CM et al. LRP and senile plaques in Alzheimer's disease: colocalization with apolipoprotein E and with activated astrocytes. *Brain research Molecular brain research*. 2002; 104: 38-46.
 47. Ferri N, Ruscica M. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and metabolic syndrome: insights on insulin resistance, inflammation, and atherogenic dyslipidemia. *Endocrine*. 2016.
 48. Ferri N, Tibolla G, Pirillo A, et al. Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) secreted by cultured smooth muscle cells reduces macrophages LDLR levels. *Atherosclerosis*. 2012; 220: 381-386.
 49. Poirier S, Mayer G, Poupon V, 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: 28856-28864.
 50. Zimetti F, Caffarra P, Ronda N, et al. Increased PCSK9 Cerebrospinal Fluid Concentrations in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2017; 55: 315-320.
 51. Lendon CL, Talbot CJ, Craddock NJ, et al. Genetic association studies between dementia of the Alzheimer's type and three receptors for apolipoprotein E in a Caucasian population. *Neuroscience letters*. 1997; 222: 187-190.
 52. Zou F, Gopalraj RK, Lok J et al. Sex-dependent association of a common low-density lipoprotein receptor polymorphism with RNA splicing efficiency in the brain and Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*. 2008; 17: 929-935.
 53. Kim J, Castellano JM, Jiang H, et al. Overexpression of low-density lipoprotein receptor in the brain markedly inhibits amyloid deposition and increases extracellular A β clearance. *Neuron*. 2009; 64:632-644.
 54. Helbecque N, Amouyel P. Very low density lipoprotein receptor in Alzheimer disease. *Microscopy research and technique*. 2000; 50: 273-277.
 55. Llorca J, Rodriguez-Rodriguez E, Dierssen-Sotos T et al. Meta-analysis of genetic variability in the beta-amyloid production, aggregation and degradation metabolic pathways and the risk of Alzheimer's disease. *Acta neurologica Scandinavica*. 2008; 117: 1-14.
 56. Taguchi K, Yamagata HD, Zhong W, et al. Identification of hippocampus-related candidate genes for Alzheimer's disease. *Annals of neurology*. 2005; 57: 585-588.
 57. Bamberger ME, Harris ME, McDonald DR, et al. A cell surface receptor complex for fibrillar beta-amyloid mediates microglial activation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2003; 23: 2665-2674.
 58. Coraci IS, Husemann J, Berman JW, et al. CD36, a class B scavenger receptor, is expressed on microglia in Alzheimer's disease brains and can mediate production of reactive oxygen species in response to beta-amyloid fibrils. *The American journal of pathology*. 2002; 160: 101-112.
 59. Moore KJ, El Khoury J, Medeiros LA, et al. A CD36-initiated signaling cascade mediates inflammatory effects of beta-amyloid. *J Biol Chem*. 2002; 277: 47373-47379.
 60. Ding Z, Liu S, Wang X et al. PCSK9 regulates expression of scavenger receptors and ox-LDL uptake in macrophages. *Cardiovasc Res*. 2018; 114: 1145-1153.
 61. Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, et al. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nature immunology*. 2010; 11: 155-161.

62. Ricci C, Ruscica M, Camera M, et al. PCSK9 induces a pro-inflammatory response in macrophages. *Sci Rep*. 2018; 8: 2267.
63. Adorni MP, Cipollari E, Favari E et al. Inhibitory effect of PCSK9 on Abca1 protein expression and cholesterol efflux in macrophages. *Atherosclerosis*. 2017; 256: 1-6.
64. Wollmer MA, Streffer JR, Lutjohann D, et al. ABCA1 modulates CSF cholesterol levels and influences the age at onset of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2003; 24: 421-426.
65. Rodriguez-Rodriguez E, Mateo I, Llorca J, et al. Association of genetic variants of ABCA1 with Alzheimer's disease risk. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2007; 144B: 964-968.
66. Beecham GW, Vardarajan B, Blue E, et al. Rare genetic variation implicated in non-Hispanic white families with Alzheimer disease. *Neurol Genet*. 2018; 4: e286.
67. Katzov H, Chalmers K, Palmgren J, et al. Genetic variants of ABCA1 modify Alzheimer disease risk and quantitative traits related to beta-amyloid metabolism. *Human mutation*. 2004; 23: 358-367.
68. Nordestgaard LT, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG, Frikke-Schmidt R. Loss-of-function mutation in ABCA1 and risk of Alzheimer's disease and cerebrovascular disease. *Alzheimers Dement*. 2015; 11: 1430-1438.
69. Jiang M, Lv L, Wang H, et al. Meta-analysis on association between the ATP-binding cassette transporter A1 gene (ABCA1) and Alzheimer's disease. *Gene*. 2012; 510: 147-153.
70. Koldamova R, Staufienbiel M, Lefterov I. Lack of ABCA1 considerably decreases brain ApoE level and increases amyloid deposition in APP23 mice. *J Biol Chem*. 2005; 280: 43224-43235.
71. Wahrle SE, Jiang H, Parsadanian M et al. Deletion of Abca1 increases Abeta deposition in the PDAPP transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 2005; 280: 43236-43242.
72. Wahrle SE, Jiang H, Parsadanian M, et al. Overexpression of ABCA1 reduces amyloid deposition in the PDAPP mouse model of Alzheimer disease. *The Journal of clinical investigation*. 2008; 118: 671-682.
73. Hirsch-Reinshagen V, Chan JY, Wilkinson A, et al. Physiologically regulated transgenic ABCA1 does not reduce amyloid burden or amyloid-beta peptide levels in vivo. *J Lipid Res*. 2007; 48: 914-923.
74. Hirsch-Reinshagen V, Maia LF, Burgess BL, et al. The absence of ABCA1 decreases soluble ApoE levels but does not diminish amyloid deposition in two murine models of Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 2005; 280: 43243-43256.
75. Wahrle SE, Jiang H, Parsadanian M, et al. ABCA1 is required for normal central nervous system ApoE levels and for lipidation of astrocyte-secreted apoE. *J Biol Chem*. 2004; 279: 40987-40993.
76. Marchi C, Adorni MP, Caffarra P, et al. ABCA1- and ABCG1-mediated cholesterol efflux capacity of cerebrospinal fluid is impaired in Alzheimer's disease. *J Lipid Res*. 2019; 60: 1449-1456.
77. Yassine HN, Feng Q, Chiang J, et al. ABCA1-Mediated Cholesterol Efflux Capacity to Cerebrospinal Fluid Is Reduced in Patients With Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *J Am Heart Assoc*. 2016; 5.
78. Tavori H, Giunzioni I, Linton MF, Fazio S. Loss of plasma proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) after lipoprotein apheresis. *Circ Res*. 2013; 113: 1290-1295.
79. Tavori H, Christian D, Minnier J et al. PCSK9 Association With Lipoprotein(a). *Circ Res*. 2016; 119: 29-35.
80. Ferri N, Marchiano S, Tibolla G, et al. PCSK9 knock-out mice are protected from neointimal formation in response to perivascular carotid collar placement. *Atherosclerosis*. 2016; 253: 214-224.
81. Ruscica M, Simonelli S, Botta M, et al. Plasma PCSK9 levels and lipoprotein distribution are preserved in carriers of genetic HDL disorders. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2018; 1863: 991-997.
82. Reynolds CA, Hong MG, Eriksson UK, et al. Analysis of lipid pathway genes indicates association of sequence variation near SREBF1/TOM1L2/ATPAF2 with dementia risk. *Hum Mol Genet*. 2010; 19: 2068-2078.
83. Shibata N, Ohnuma T, Higashi S, et al. No genetic association between PCSK9 polymorphisms and Alzheimer's disease and plasma cholesterol level in Japanese patients. *Psychiatr Genet*. 2005; 15 :239.
84. Benn M, Nordestgaard BG, Frikke-Schmidt R, Tybjaerg-Hansen A. Low LDL cholesterol, PCSK9 and HMGCR genetic variation, and risk of Alzheimer's disease and Parkinson's disease: Mendelian randomisation study. *BMJ*. 2017; 357: j1648.
85. Mefford MT, Rosenson RS, Cushman M, et al. PCSK9 Variants, Low-Density Lipoprotein Cholesterol, and Neurocognitive Impairment: Reasons for Geographic and Racial Differences in Stroke Study (REGARDS). *Circulation*. 2018; 137: 1260-1269.
86. Paquette M, Saavedra YGL, Poirier J, et al. Loss-of-Function PCSK9 Mutations Are Not Associat-

- ed With Alzheimer Disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 2018; 31: 90-96.
87. Picard C, Poirier A, Belanger S, et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) in Alzheimer's disease: A genetic and proteomic multi-cohort study. *PLoS One* 2019; 14: e0220254.
 88. Chen YQ, Troutt JS, Konrad RJ. PCSK9 is present in human cerebrospinal fluid and is maintained at remarkably constant concentrations throughout the course of the day. *Lipids.* 2014; 49: 445-455.
 89. Persson L, Cao G, Stahle L, 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: 2666-2672.
 90. Courtemanche H, Bigot E, Pichelin M, et al. PCSK9 Concentrations in Cerebrospinal Fluid Are Not Specifically Increased in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 2018; 62:1519-1525
 91. Ridker PM, Revkin J, Amarenco P, et al. Cardiovascular Efficacy and Safety of Bococizumab in High-Risk Patients. *N Engl J Med.* 2017; 376: 1527-1539.
 92. Robinson JG, Farnier M, Krempf M, et al. Efficacy and safety of alirocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2015; 372: 1489-1499.
 93. Sabatine MS, Giugliano RP, Keech AC et al. Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease. *N Engl J Med.* 2017; 376: 1713-1722.
 94. Sabatine MS, Giugliano RP, Wiviott SD, et al. Efficacy and safety of evolocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2015; 372: 1500-1509.
 95. Food and Drug Administration Briefing Document. (2015). The endocrinologic and metabolic drugs advisory committee meeting. Repatha (evolocumab) injections. Available online at: <https://wayback.archiveit.org/7993/20170405215129/https://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/Drugs/EndocrinologicandMetabolicDrugsAdvisoryCommittee/UCM450072.pdf>.
 96. Food and Drug Administration Briefing Document. (2015). The endocrinologic and metabolic drugs advisory committee meeting. Praluent (alirocumab) injection. Available online at: <https://wayback.archiveit.org/7993/20170405215212/https://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/Drugs/EndocrinologicandMetabolicDrugsAdvisoryCommittee/UCM449865.pdf>.
 97. Giugliano RP, Mach F, Zavitz K, et al. Design and rationale of the EBBINGHAUS trial: A phase 3, double-blind, placebo-controlled, multicenter study to assess the effect of evolocumab on cognitive function in patients with clinically evident cardiovascular disease and receiving statin background lipid-lowering therapy-A cognitive study of patients enrolled in the FOURIER trial. *Clin Cardiol.* 2017; 40: 59-65.
 98. Giugliano RP, Sabatine MS, Ott BR. Cognitive Function in a Randomized Trial of Evolocumab. *N Engl J Med.* 2017; 377:1997.
 99. Bajaj NS, Patel N, Kalra R et al. Neurological effects of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 inhibitors: direct comparisons. *Eur Heart J Qual Care Clin Outcomes.* 2018; 4: 132-141.
 100. Harvey PD, Sabbagh MN, Harrison JE et al. No evidence of neurocognitive adverse events associated with alirocumab treatment in 3340 patients from 14 randomized Phase 2 and 3 controlled trials: a meta-analysis of individual patient data. *Eur Heart J.* 2018; 39: 374-381.
 101. Olsson AG, Angelin B, Assmann G et al. Can LDL cholesterol be too low? Possible risks of extremely low levels. *J Intern Med.* 2017; 281: 534-553.
 102. Tabrizi M, Bornstein GG, Suria H. Biodistribution mechanisms of therapeutic monoclonal antibodies in health and disease. *AAPS J.* 2010; 12: 33-43.
 103. Rom S, Zuluaga-Ramirez V, Gajghate S, et al. Hyperglycemia-Driven Neuroinflammation Compromises BBB Leading to Memory Loss in Both Diabetes Mellitus (DM) Type 1 and Type 2 Mouse Models. *Mol Neurobiol.* 2019; 56: 1883-1896.
 104. Stoekenbroek RM, Lambert G, Cariou B, Hovingh GK. Inhibiting PCSK9 - biology beyond LDL control. *Nat Rev Endocrinol.* 2018; 15: 52-62.