

FISIOPATOLOGIA DELL'ATEROSCLEROSI

PCSK9 OLTRE IL FEGATO: FOCUS SU PANCREAS, CUORE E SISTEMA NERVOSO

PCSK9 beyond the liver: focus on Pancreas, Heart and Nervous System

LORENZO DA DALT¹, GIUSEPPE DANILÒ NORATA^{1,2}¹Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy;²Centro SISA per lo studio dell'Aterosclerosi, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo, Italy

SUMMARY

“Proprotein convertase subtilisin Kexin type 9” (PCSK9) is a 692 amino acid glycoprotein that belongs to the proprotein convertase family. PCSK9 is mainly produced by the liver and secreted into the bloodstream. PCSK9 interacts with several LDL family receptors, including VLDLr, LRP1 but also with CD36, and drives their lysosomal degradation. The observation that PCSK9 can also be produced by extrahepatic tissues has drawn attention to the possibility that its deficiency is associated with an increase in the expression of the LDLr family receptors, contributing to an increase in the accumulation of lipids in extrahepatic tissues and a change in cellular metabolism.

Key words: PCSK9, LDLR, CD36, lipoproteins, lipid metabolism, extrahepatic tissues.

PCSK9 come funziona e come viene regolata

PCSK9 è stata scoperta nel 2003 a livello neuronale e per questo inizialmente chiamata *neural apoptosis-regulated convertase* (NARC-1) e appartiene a un gruppo di proteasi seriniche che portano all'idrolizzazio-

ne dei legami peptidici. PCSK9 viene sintetizzata come proPCSK9 del peso di 75 kDa ed è composta da diverse sub-unità: un peptide segnale, un prodominio, un dominio catalitico, una regione cerniera esposta e un dominio C-terminale arricchito in cisteina e istidina (1). Il peptide segnale funziona da guida per PCSK9 e la indirizza al reticolo endoplasmatico dove proPCSK9 subisce una scissione autocatalitica necessaria per il suo ripiegamento e la conseguente secrezione (*Figura 1*). Una volta tagliato, il peptide segnale, grazie al legame idrogeno, rimane attaccato al dominio catalitico di

Indirizzo per la corrispondenza

Lorenzo Da Dalt
Dipartimento di Scienze Farmacologiche
e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano
Via Balzaretti 9, 20133 Milano
E-mail: lorenzo.dadalt@unimi.it

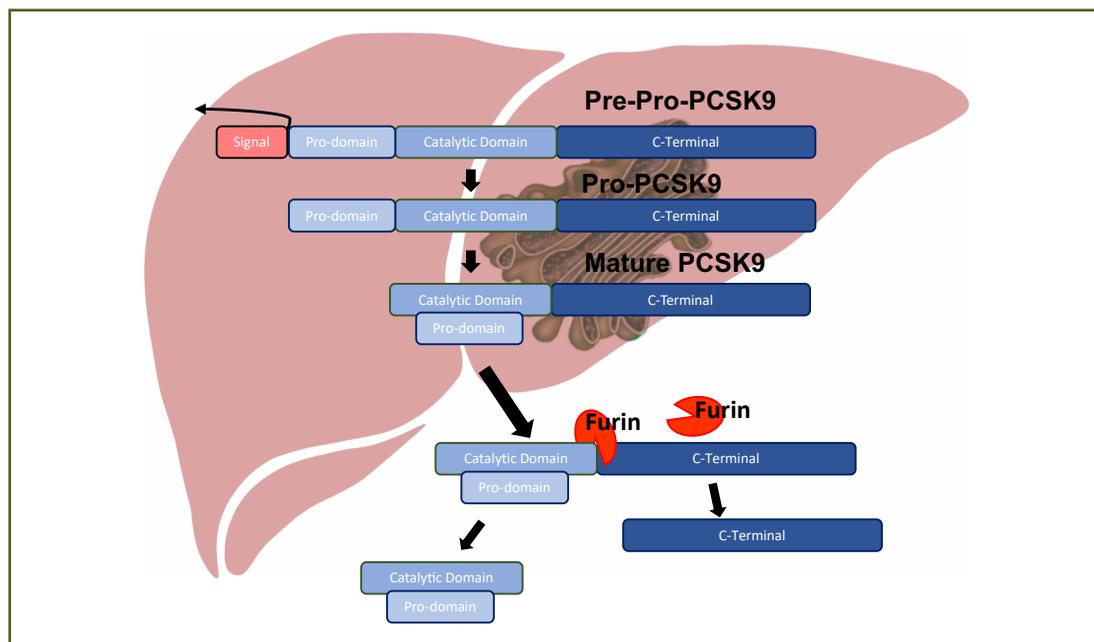


Figura 1 - PCSK9 viene prodotto principalmente a livello epatico come pre-pro proteina che presenta un dominio c-terminale, un dominio catalitico, un prodominio e una sequenza segnale che lo indirizza a livello del reticolo endoplasmatico. Qui la sequenza segnale viene rimossa e la pro-proteina PCSK9 va in contro a una scissione autocatalitica che permette il distacco del pro-domain segnale che si posiziona sopra PCSK9 maturo per proteggerlo da altre modifiche post-trascrizionali. La proteina viene quindi rilasciata nel plasma dove può subire il taglio da parte della furina mantenendo comunque la sua attività.

PCSK9 inibendo l'interazione laterale con altri substrati finché la proteina si trova a livello cellulare. Una volta matura PCSK9 viene impacchettata in vescicole a livello dell'apparato di Golgi e quindi secreta (1). Il riconoscimento del *target* da parte di PCSK9 avviene attraverso il legame del dominio catalitico con la sequenza simile al fattore di crescita epidermico A (EGF-A) presente nei recettori che appartengono alla famiglia dell'LDLr. Una volta legato al dominio EGF-A, il complesso PCSK9-LDLr viene internalizzato per endocitosi mediata da clatrina (2). Il pH acido caratteristico dell'endosoma tardivo rafforza il legame tra PCSK9 ed EGF-A e questa forte interazione impedisce la dissociazione e il riciclo del recettore sulla membrana cellulare, portando a una degradazione del complesso (3). Di

conseguenza, osserviamo una ridotta espressione di LDLr, una diminuzione del catabolismo delle LDL e un aumento dei livelli plasmatici di colesterolo LDL (LDL-C) (4). Accanto a LDLr, altri recettori, inclusi altri membri della stessa famiglia, come il recettore per le lipoproteine a densità molto bassa (VLDLr) e ApoER2 oppure gli *scavenger receptors* come CD36 sono target di PCSK9. Come avviene per l'LDLr, PCSK9 media la degradazione del CD36 guidando il recettore direttamente ai lisosomi; infatti, è stato dimostrato e come l'espressione di CD36 risulti aumentata sia in modelli in vitro che in vivo con delezione di PCSK9 (5).

È stato anche proposto un ruolo intracellulare per PCSK9 nella regolazione del metabolismo del colesterolo. Infatti, è stato visto come in soggetti con ipercolesterolemia

autosomica recessiva (ARH), dove la proteina ARH, coinvolta nell'internalizzazione dell'LDLR, risulta mancante, PCSK9 porti a una ridotta espressione dell'LDLR e come il trattamento con Evolocumab sia funzionale nella riduzione dei livelli di colesterolo (6-8). PCSK9 è quindi una proteina chiave nella regolazione del metabolismo del colesterolo e, a sua volta, può essere regolata a diversi livelli. Una volta rilasciata in circolo, PCSK9 è soggetta a modificazioni post-traduzionali: ad esempio, la furina scinde PCSK9 matura producendo una proteina troncata di circa 55 kDa con una minore abilità nel legare l'LDLR rispetto alla forma completa (9) (*Figura 1*). A conferma di questa osservazione, è stato visto che PCSK9 può circolare libero, e quindi più suscettibile al taglio furinico, o legarsi alle lipoproteine a bassa densità LDL, mantenendo la sua forma integrale e quindi la massima capacità di legare il suo bersaglio (10).

PCSK9 circolante è quasi interamente prodotto e rilasciato dal fegato. Tra i fattori che influenzano l'espressione di PCSK9 troviamo il ritmo circadiano, gli ormoni, la dieta, l'esercizio fisico, i livelli di colesterolo cellulare nel fegato. Anche i farmaci ipocolesterolemizzanti, come le statine, diminuendo la biosintesi di colesterolo nel fegato attivano una risposta cellulare che aumenta la produzione di PCSK9.

Il suo promotore, infatti, contiene diversi elementi regolatori tra i cui il *sterol regulatory element* (SRE), il fattore epatico nucleare-1 (HNF-1) (11), il fattore di trascrizione *specificity protein 1* (SP1) e l'*insulin-response element* (IRE). Proprio per la presenza di questi siti regolatori, l'espressione di PCSK9 è sensibile ai livelli intracellulari di colesterolo che, modulando l'attivazione delle *sterol regulatory binding protein* (SREBP), possono attivarne la trascrizione legandosi ai siti SRE. Proprio per questo stretto legame tra PCSK9 e i livelli di cole-

sterolo i principali regolatori della sua espressione sono le isoforme 2 e 1c della famiglia delle SREBP. In particolare, l'espressione di PCSK9 è aumentata nelle condizioni di mancanza di colesterolo intracellulare e come conseguenza del trattamento con statine. Il secondo regolatore chiave dell'espressione di PCSK9 è HNF1 la cui sequenza si trova a livello del promotore di PCSK9 vicino alla sequenza SRE. Quindi l'attivazione di HNF1, collaborando con SREBP2, aumenta l'espressione di PCSK9 in situazioni di bassi livelli di colesterolo intracellulare. Vicino alla sequenza del promotore di PCSK9, ci sono anche molti siti di legame per il co-attivatore che possono aumentare la trascrizione genica. Uno di questi è il sito di legame per il fattore nucleare dell'istone H4 (HINFP) che promuove quindi la produzione PCSK9. Essendo l'acetilazione dell'istone H4 un regolatore positivo dell'espressione di PCSK9, la mancanza di istone deacetilasi Sirtuin 6 (SIRT6) e Sirtuin 1 (SIRT1) è stata vista essere associata ad un aumento della produzione di PCSK9. Il fattore di trascrizione *forkhead-box protein O3* (FOX3), svolge il ruolo opposto e, portando alla deacetilazione dell'istone H3 e promuovendo l'attività di SIRT6, porta all'inattivazione di SREBP2 e HNF1 e alla conseguente inibizione della trascrizione di PCSK9 (4, 12).

In che modo l'inibizione di PCSK9 influenza la funzionalità epatica e quella di altri tessuti?

PCSK9 è diventato un candidato particolarmente interessante a livello farmacologico da quando sono state scoperte delle varianti genetiche con perdita di funzione (LOF) che si associavano a variazioni nei livelli plasmatici di LDL-C (13). In particolare, individui con varianti LOF mostravano un ridotto rischio cardiovascolare. Questa os-

servazione ha portato velocemente a sviluppare delle strategie volte ad inibire PCSK9 come gli anticorpi monoclonali o le strategie di silenziamento genico. A livello epatico, l'inibizione di PCSK9 aumenta l'espressione dell'LDL-R sulla superficie delle cellule aumentando il catabolismo delle LDL.

Questo *pathway* è particolarmente efficiente e fa sì che il fegato controlli l'eccesso di colesterolo in circolo veicolandolo nel fegato ed eventualmente eliminandolo attraverso la via degli acidi biliari o rimpacchettandolo nelle lipoproteine.

Altri tessuti, tuttavia, non hanno la stessa capacità del fegato nel gestire l'eccesso di colesterolo e per questo motivo un eccessivo *uptake* porta a lipotossicità, o tossicità da lipidi. Questa comprende una serie di manifestazioni che si verificano in particolare a livello dei tessuti che dipendono in maniera sostanziale dagli acidi grassi per la produzione di energia tra i quali, cuore, arterie, muscoli, pancreas e reni. La lipotossicità è causata dall'alterazione del metabolismo lipidico e dall'accumulo di intermedi lipidici, con conseguente compromissione metabolica e funzionale degli organi danneggiati. Il termine è stato utilizzato per la prima volta negli anni '90 da Roger Unger, che per primo ipotizzò che l'eccesso di lipidi fosse collegato allo sviluppo del diabete e della cardiomiopatia (14). Anche se ad oggi sono stati fatti molti studi, la tossicità mediata dall'accumulo di lipidi rimane poco conosciuta e non è chiaro se la causa scatenante sia l'eccessiva produzione di lipidi, oppure il ridotto utilizzo come intermedi metabolici e quindi l'inadeguata rimozione degli intermedi lipidici tossici.

Alterazione della funzionalità pancreatica e PCSK9

Il metabolismo lipidico svolge un ruolo chiave nella funzionalità delle cellule β pan-

creatiche, la loro disfunzione e lo sviluppo di disordini metabolici, incluso il diabete di tipo 2, è stata associata anche alla presenza di lipotossicità (*Figura 2*). L'accumulo di ceramidi, sfingolipidi e colesterolo sembrano essere particolarmente importanti nell'indurre lipotossicità; i ceramidi, in particolare promuovono l'apoptosi delle cellule β . Anche il colesterolo è importante nel metabolismo delle cellule β e contribuisce al controllo delle proprietà strutturali delle membrane, influenzando la localizzazione e la funzionalità di tutte quelle proteine che si localizzano a livello della membrana, nonché la formazione e la fusione delle vescicole di insulina. L'accumulo di colesterolo cellulare può influenzare il movimento dei granuli tra reticolo endoplasmatico, i mitocondri e membrana cellulare ed in ultima analisi influenzare il rilascio di insulina (15). In particolare, il colesterolo accumulandosi sul reticolo endoplasmatico può alterare l'omeostasi del calcio portando all'esaurimento delle riserve cellulari necessarie per il rilascio di insulina (16). Come componente chiave dei *lipid rafts*, microdomini della membrana plasmatica presenti in tutte le cellule, il colesterolo, accumulandosi, può portare ad alterazione della funzione delle proteine SNARE e SNAP25, nonché dell'ATP K^+ e del canale Ca_2^+ voltaggio-dipendente, contribuendo ad un'alterazione nel rilascio di insulina (17).

È importante notare che l'accumulo di colesterolo non interessa solo l'alterazione strutturale delle β -cellule pancreatiche ma modula anche il metabolismo energetico cellulare. Il colesterolo in eccesso può mantenere in forma dimerica e ancorato a livello dei *lipid droplets* l'enzima nNOS impedendo così l'attivazione della glucochinasi e la conseguente inibizione del flusso glicolitico (15). Inoltre, il colesterolo, aumentando la rigidità della membrana mitocondriale può portare ad un'alterazione

della catena di trasporto degli elettroni (ETC) e ad un ridotto efflusso di protoni; aspetti che influiscono sulla capacità dei mitocondri delle β -cellule di produrre ATP con conseguente riduzione del traffico di vescicole. Proprio per l'importanza del colesterolo nella modulazione della funzionalità pancreaticata e nel rilascio di insulina, diversi studi hanno dimostrato l'impatto della modulazione del metabolismo del colesterolo sulla comparsa di diabete nell'uomo. Studi di randomizzazione mendeliana e metanalisi hanno osservato come la modulazione di geni coinvolti nel metabolismo del colesterolo, come HMGCoA riduttasi, NPC1L1 e PCSK9, siano associati ad un aumentato rischio di sviluppare disfun-

zione pancreaticata e diabete (18, 19). Anche a livello farmacologico, le statine aumentano il rischio di sviluppare diabete (18), anche se il beneficio in termini di riduzione degli eventi cardiovascolari è maggiore del rischio associato alla comparsa di nuovi casi di diabete.

Anche per PCSK9, studi di randomizzazione mendeliana mostrano come varianti LOF di PCSK9 si associno ad aumentato rischio di sviluppare diabete. Tuttavia, gli studi con PCSK9i non hanno confermato un aumento del rischio di insorgenza di diabete e alterazioni nei livelli di glicemia (19).

Per questo motivo abbiamo indagato i meccanismi molecolari che legano PCSK9 alla funzionalità pancreaticata. Abbiamo no-

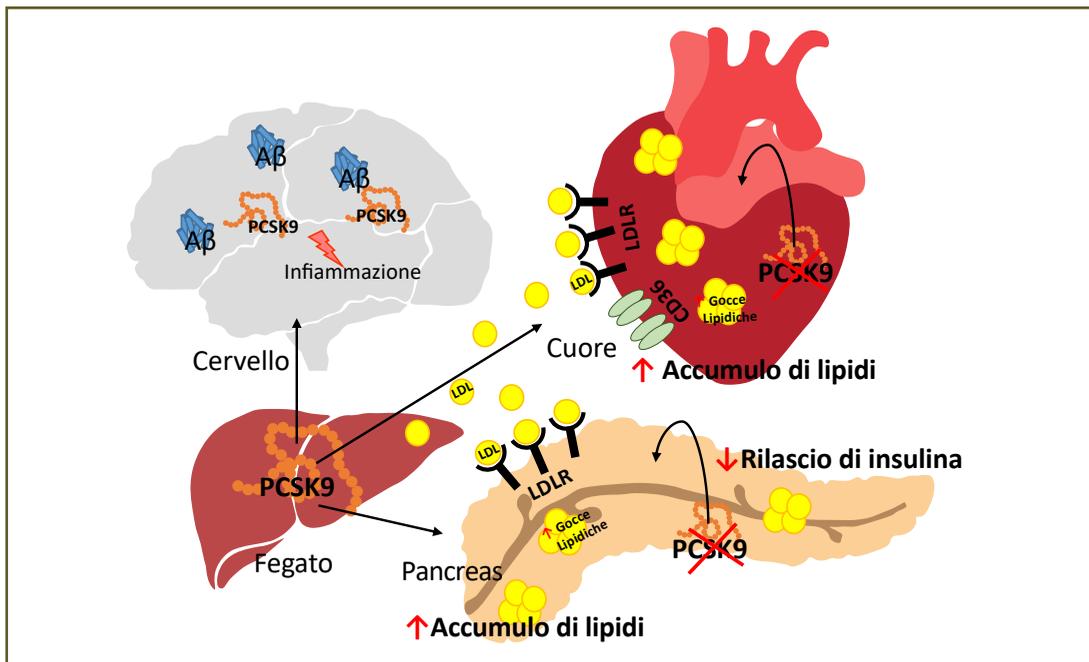


Figura 2 - PCSK9 circolante viene prodotto principalmente a livello epatico e rilasciato nel circolo sanguigno. PCSK9 viene prodotto anche da molti altri tessuti quali il cuore, il cervello e il pancreas. Dati sperimentali suggeriscono come PCSK9 prodotto localmente a livello pancreatico e cardiaco, attraverso la degradazione del recettore delle LDL e CD36, possa contribuire a mantenere la corretta omeostasi lipidica e limitare l'accumulo di lipidi cellulari. La deficienza di PCSK9, pertanto, potrebbe portare ad accumulo di lipidi cellulari, a un ridotto rilascio di insulina a livello pancreatico ed a cardioplipotossicità. A livello cerebrale è stato visto come PCSK9 svolga un ruolo nella modulazione dell'infiammazione post-ischemica e come, attraverso la modulazione di CD36, sia coinvolto nella clearance dei residui di beta amiloide (A β).

tato come la mancanza di PCSK9 si associ ad un aumento dei livelli di colesterolo nelle cellule beta pancreatiche e ad un ridotto rilascio di insulina nel circolo sanguigno. Il ridotto rilascio di insulina non era dovuto però a una ridotta produzione, ma a un ridotto rilascio dalle vescicole che si accumulavano a livello citoplasmatico. Queste osservazioni hanno confermato come PCSK9 abbia un impatto sul metabolismo pancreatico (*Figura 2*). Inoltre, è stato visto come la mancanza di PCSK9, ma solamente la componente locale e non quella circolante, fosse in grado di modulare l'espressione dell'LDLR nelle β -cellule portando all'accumulo di colesterolo e allo sviluppo di diabete di tipo 2 (20).

PCSK9 e funzionalità cardiaca

Il cuore tra tutti gli organi del corpo umano è uno tra quelli che richiede più energia; per questo motivo il metabolismo aerobico svolge un ruolo cruciale nel fornire i substrati necessari per la produzione di adenosina trifosfato (ATP). Le principali vie di generazione dell'ATP a livello cardiaco in un individuo sano sono la glicolisi e l'ossidazione degli acidi grassi. In particolare, il cuore utilizza principalmente acidi grassi come substrato energetico per la fosforilazione ossidativa, infatti oltre il 70% dell'ATP è generata dall'ossidazione degli acidi grassi (22). A differenza del fegato, il cuore non è capace di sintetizzare acidi grassi partendo dal glucosio e dagli amminoacidi, quindi il fabbisogno energetico è principalmente alimentato dai lipidi provenienti dal circolo sanguigno. I recettori per le lipoproteine, grazie alla lipolisi delle lipoproteine a bassissima densità mediata dalla lipoproteinlipasi (LPL), svolgono un ruolo chiave nell'assorbimento di acidi grassi derivati dai trigliceridi (TG), mentre CD36 media l'assorbimento di acidi grassi non

esterificati, trasportati principalmente dall'albumina (23, 24).

Il metabolismo lipidico del cuore è finemente bilanciato tra l'assorbimento dei lipidi e l'ossidazione mitocondriale per prevenire l'accumulo di lipidi in eccesso nel cardiomiocita. L'accumulo di lipidi a livello cardiaco e la conseguente lipotossicità, oltre a generare complicanze metaboliche cardiovascolari e quindi lo sviluppo di patologie quali il diabete mellito e la sindrome metabolica, è associato allo sviluppo di disfunzione cardiaca e insufficienza cardiaca nell'uomo ed in modelli sperimentali.

La lipotossicità è un parametro comune in differenti patologie cardiache come ad esempio in seguito ad un'ischemia al miocardio dove l'espressione di VLDLr, aumenta l'endocitosi delle lipoproteine ricche di trigliceridi (25, 26). L'accumulo di lipidi nei cardiomiociti può quindi portare a disfunzione e scompenso cardiaco. L'insufficienza cardiaca (HF) in particolare, è una condizione patologica in cui il cuore non è più in grado di pompare il sangue in misura sufficiente per sostenere le richieste dell'organismo. Questa malattia è caratterizzata da esaurimento energetico dovuto all'aumento dello stress ossidativo e ai cambiamenti metabolici nel substrato utilizzato per la produzione di energia (21). Tra i fattori associati a questi cambiamenti metabolici è stata riscontrata la disfunzione mitocondriale che compromette l'efficacia della fosforilazione ossidativa e la generazione di ATP. Proprio in questo contesto PCSK9 attraverso la capacità di modulare VLDLr² e CD36⁵ svolge un ruolo chiave nella modulazione della funzionalità cardiaca. È stato osservato come la mancanza di PCSK9 a livello cardiaco si associ ad un aumentato accumulo di colesterolo sotto forma di gocce lipidiche e che questo, causando danno mitocondriale, porti a deplezione energetica a livello cardiaco. Come conseguenza di que-

ste alterazioni, modelli sperimentali privi di PCSK9 sviluppano insufficienza cardiaca con preservata frazione di eiezione (28) (*Figura 2*).

PCSK9 e funzionalità neuronale

PCSK9 è stato inizialmente scoperto nel cervello come convertasi-1 regolata dall'apoptosi neurale (NARC-1) in quanto la sua espressione risulta bassa in condizioni fisiologiche ma aumenta durante l'apoptosi. PCSK9 ha mostrato la capacità di promuovere eventi apoptotici nei neuroni dei granuli cerebellari (CGN) attraverso la via JNK (29) e l'attivazione di vie apoptotiche estrinseche e intrinseche.

PCSK9 a livello cerebrale è principalmente prodotto localmente. La regolazione dei lipidi a livello cerebrale svolge un ruolo chiave in quanto sia i neuroni, per mantenere le strutture di membrana degli assoni, che la guaina mielinica contengono elevati livelli di colesterolo (30). È interessante notare come PCSK9 sia altamente espresso da cellule in rapida proliferazione sia nel cervello adulto che durante le fasi di sviluppo neurologico a livello del telencefalo e del cervelletto (31). Come attore principale nella regolazione del metabolismo lipidico e dell'infiammazione, il ruolo di PCSK9 è stato studiato in diverse neuropatologie, inclusa la malattia di Alzheimer (32). Nel modello murino è stato osservato che, modulando l'espressione di LRP1 e CD36, PCSK9, può essere un mediatore nella clearance di β -Amiloide ($A\beta$) e quindi coinvolto nel controllo della patologia. Per supportare ulteriormente questo ruolo di PCSK9 nell'eliminazione di $A\beta$ (*Figura 2*), è stato visto come CD36, uno dei suoi target principali, è espresso ad alte concentrazioni a livello delle cellule microgliali dove ne regola il turnover, supportando un possibile ruolo di PCSK9 nella progressione della patolo-

gia (33). Ulteriori studi hanno anche collegato PCSK9 a neuroinfiammazione e, in particolare in un modello di lesione ischemica, l'inibizione di PCSK9 ha limitato l'attivazione di NF κ B (34), l'attivazione e la proliferazione della microglia e degli astrociti. Questi dati suggeriscono la necessità di chiarire ulteriormente il ruolo di PCSK9 nel sistema nervoso.

Conclusioni

Dopo la scoperta dell'associazione di mutazioni con guadagno di funzione di PCSK9 con ipercolesterolemia familiare, l'attenzione si è focalizzata sullo studio dei meccanismi molecolari responsabili ed in particolare sulla capacità di PCSK9 di regolare i livelli di recettore LDL a livello epatico. Contemporaneamente lo studio di inibitori di PCSK9 ha portato all'approvazione degli anticorpi monoclonali anti-PCSK9 e più di recente dell'approccio di silenziamento genico per il trattamento dei pazienti ad altissimo rischio cardiovascolare con livelli di colesterolo LDL difficilmente controllabili con le altre terapie disponibili.

È interessante notare come questi farmaci bloccano essenzialmente l'attività di PCSK9 di origine epatica ed in questo modo migliorano l'efficienza della ricaptazione di LDL a livello epatico. Tuttavia, PCSK9 è espresso anche in altri tessuti e la caratterizzazione di soggetti con mutazioni con perdita di funzione di PCSK9 ha permesso di studiare gli effetti della mancanza della proteina in altri tessuti. Per esempio, pazienti LOF per PCSK9 presentano un aumentato rischio di sviluppare diabete di tipo 2, un effetto che non si osserva nei soggetti trattati con inibitori di PCSK9. Questa apparente discrepanza è stata spiegata attraverso lo studio di modelli sperimentali privi di PCSK9 che hanno permesso di capire come solo la protei-

na prodotta localmente nel pancreas regola la funzionalità della cellula beta ed influenzi il rilascio di insulina. Analogamente PCSK9 prodotta a livello cardiaco contribuisce a controllare l'eccessivo *uptake* di lipidi a livello del cardiomiocita attraverso la regolazione di recettori differenti da LDL-R. Nuovamente questo effetto è indipendente da PCSK9 circolante escluden-

do un impatto degli inibitori di PCSK9 sul metabolismo lipidico a livello del cardiomiocita. Studi con PCSK9i hanno escluso un ruolo per questi farmaci nell'alterare la funzionalità cerebrale, tuttavia, l'osservazione che PCSK9 risulti altamente espresso a livello del sistema nervoso centrale lascia ancora aperta la domanda sul suo ruolo in questa sede.

RIASSUNTO

La proteasi "Proprotein convertasi subtilisin Kexin tipo 9" (PCSK9) è una glicoproteina di 692 aminoacidi che appartiene alla famiglia delle proprotein convertasi. È prodotta principalmente dal fegato, e secreta nel circolo sanguigno. PCSK9 interagisce con diversi recettori della famiglia LDLr, inclusi VLDLr, LRP1 ma anche con CD36, e guida la loro degradazione lisosomiale. L'osservazione che PCSK9 possa essere prodotta anche da tessuti extraepatici ha posto l'attenzione sulla possibilità che un suo deficit si associ ad un aumento dell'espressione dei recettori della famiglia LDLr contribuendo ad un aumento dell'accumulo di lipidi nei tessuti extraepatici ed un cambiamento nel metabolismo cellulare.

Parole chiave: PCSK9, LDLR, CD36, lipoproteine, metabolismo lipidico, tessuti extraepatici.

Referenze

1. Canuel M, Sun X, Asselin MC, Paramithiotis E, Prat A, Seidah NG. Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) Can Mediate Degradation of the Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 (LRP-1). *PLoS One*. 2013.
2. Poirier S, Mayer G, Benjannet S, Bergeron E, Marcinkiewicz J, Nassoury N, Mayer H, Nimpf J, Prat A, Seidah NG. 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.
3. Benjannet S, Saavedra YGL, Hamelin J, Asselin M-C, Essalmani R, Pasquato A, Lemaire P, Duke G, Miao B, Duclos F, Parker R, Mayer G, Seidah NG. Effects of the prosegment and pH on the activity of PCSK9: evidence for additional processing events. *J Biol Chem*. 2010; 285: 40965-40978.
4. Lipari MT, Li W, Moran P, Kong-Beltran M, Sai T, Lai J, Lin SJ, Kolumam G, Zavala-Solorio J, Izrael-Tomasevic A, Arnott D, Wang J, Peterson AS, Kirchhofer D. 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: 43482-43491.
5. Demers A, Samami S, Lauzier B, Rosiers C Des, Sock ETN, Ong H, Mayer G. 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.
6. Park SW, Moon Y-A, Horton JD. Post-transcriptional regulation of low density lipoprotein receptor protein by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a in mouse liver. *J Biol Chem United States*. 2004; 279: 50630-50638.
7. Rodríguez-Jiménez C, Gómez-Coronado D, Frías Vargas M, Cerrato F, Lahoz C, Saban-Ruiz J, González-Nieto D, Lasunción MA, Mostaza JM, Rodríguez-Nóvoa S. A new variant (c.1A>G) in LDLRAP1 causing autosomal recessive hypercholesterolemia: Characterization of the defect and response to PCSK9 inhibition. *Atherosclerosis Ireland*. 2019; 284: 223-229.
8. Fahy EF, McCarthy E, Steinhagen-Thiessen E, Vaughan CJ. A case of autosomal recessive hypercholesterolemia responsive to proprotein convertase subtilisin/kexin 9 inhibition. *J Clin Lipidol United States*. 2017; 11: 287-288.
9. Benjannet S, Rhainds D, Hamelin J, Nassoury N, Seidah NG. 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 United States*. 2006; 281: 30561-30572.
10. Kosenko T, Golder M, Leblond G, Weng W, Lagace TA. Low density lipoprotein binds to pro-protein 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.
 11. Dong B, Singh AB, Shende VR, Liu J. Hepatic HNF1 transcription factors control the induction of PCSK9 mediated by rosuvastatin in normolipidemic hamsters. *Int J Mol Med Greece*. 2017; 39: 749-756.
 12. Tao R, Xiong X, DePinho RA, Deng C-X, Dong XC. FoxO3 transcription factor and Sirt6 deacetylase regulate low density lipoprotein (LDL)-cholesterol homeostasis via control of the pro-protein convertase subtilisin/kexin type 9 (Pcsk9) gene expression. *J Biol Chem*. 2013; 288: 29252-29259.
 13. Chaudhary R, Garg J, Shah N, Sumner A. PCSK9 inhibitors: A new era of lipid lowering therapy. *World J Cardiol*. 2017; 9: 76-91.
 14. Nishi H, Higashihara T, Inagi R. Lipotoxicity in Kidney, Heart, and Skeletal Muscle Dysfunction. *Nutrients*. 2019; 11.
 15. Perego C, Da Dalt L, Pirillo A, Galli A, Catapano AL, Norata GD. Cholesterol metabolism, pancreatic β -cell function and diabetes. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis*. 2019.
 16. Cnop M, Landchild MJ, Vidal J, Havel PJ, Knowles NG, Carr DR, Wang F, Hull RL, Boyko EJ, Retzlaff BM, Walden CE, Knopp RH, Kahn SE. The concurrent accumulation of intra-abdominal and subcutaneous fat explains the association between insulin resistance and plasma leptin concentrations: distinct metabolic effects of two fat compartments. *Diabetes United States*; 2002; 51: 1005-1015.
 17. Xia F, Gao X, Kwan E, Lam PPL, Chan L, Sy K, Sheu L, Wheeler MB, Gaisano HY, Tsushima RG. Disruption of pancreatic beta-cell lipid rafts modifies Kv2.1 channel gating and insulin exocytosis. *J Biol Chem United States*; 2004; 279: 24685-24691.
 18. Ference BA, Robinson JG, Brook RD, Catapano AL, Chapman MJ, Neff DR, Voros S, Giugliano RP, Davey Smith G, Fazio S, Sabatine MS. Variation in PCSK9 and HMGCR and Risk of Cardiovascular Disease and Diabetes. *N Engl J Med*. 2016.
 19. Lotta LA, Sharp SJ, Burgess S, Perry JRB, Stewart ID, Willems SM, Luan J, Ardanaz E, Arriola L, Balkau B, Boeing H, Deloukas P, Forouhi NG, Franks PW, Grióni S, Kaaks R, Key TJ, Navarro C, Nilsson PM, Overvad K, Palli D, Panico S, Quirós JR, Riboli E, Rolandsson O, Sacerdote C, Salamanca-Fernandez E, Slimani N, Spijkerman AMW, Tjønneland A, et al. Association between low-density lipoprotein cholesterol-lowering genetic variants and risk of type 2 diabetes: A meta-analysis. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2016.
 20. Schwartz GG, Steg PG, Szarek M, Bhatt DL, Bitner VA, Diaz R, Edelberg JM, Goodman SG, Hanotin C, Harrington RA, Jukema JW, Lecorps G, Mahaffey KW, Moryusef A, Pordy R, Quintero K, Roe MT, Sasiela WJ, Tamby J-F, Tricoci P, White HD, Zeiher AM. Alirocumab and Cardiovascular Outcomes after Acute Coronary Syndrome. *N Engl J Med United States*. 2018; 379: 2097-2107.
 21. Da Dalt L, Ruscica M, Bonacina F, Balzarotti G, Dhyani A, Cairano E Di, Baragetti A, Arnaboldi L, Metrio S De, Pellegatta F, Grigore L, Botta M, Macchi C, Uboldi P, Perego C, Catapano AL, Norata GD. PCSK9 deficiency reduces insulin secretion and promotes glucose intolerance: the role of the low-density lipoprotein receptor. *Eur Heart J*. 2018.
 22. Schulze PC, Drosatos K, Goldberg IJ. Lipid use and misuse by the heart. *Circ Res*. 2016.
 23. Bharadwaj KG, Hiyama Y, Hu Y, Huggins LA, Ramakrishnan R, Abumrad NA, Shulman GI, Blaner WS, Goldberg IJ. Chylomicron- and VLDL-derived lipids enter the heart through different pathways: In vivo evidence for receptor- and non-receptor-mediated fatty acid uptake. *J Biol Chem*. 2010.
 24. Carley AN, Bi J, Wang X, Banke NH, Dyck JRB, O'Donnell JM, Lewandowski ED. Multiphasic triacylglycerol dynamics in the intact heart during acute in vivo overexpression of CD36. *J Lipid Res* 2013; 54: 97-106.
 25. Schneider WJ, Nimpf J. LDL receptor relatives at the crossroad of endocytosis and signaling. *Cell. Mol. Life Sci*. 2003.
 26. Takahashi S, Sakai J, Fujino T, Hattori H, Zenimaru Y, Suzuki J, Miyamori I, Yamamoto TT. The very low-density lipoprotein (VLDL) receptor: characterization and functions as a peripheral lipoprotein receptor. *J. Atheroscler. Thromb*. 2004.
 27. Neubauer S. The failing heart—an engine out of fuel. *N Engl J Med United States*. 2007; 356: 1140-1151.
 28. Da Dalt L, Castiglioni L, Baragetti A, Audano M, Svecla M, Bonacina F, Pedretti S, Uboldi P, Benzoni P, Giannetti F, Barbuti A, Pellegatta F, Indino S, Donetti E, Sironi L, Mitro N, Catapano AL, Norata GD. PCSK9 deficiency rewires heart metabolism and drives heart failure with preserved ejection fraction. *Eur Heart J*. 2021; 42: 3078-3090.

29. Kysenius K, Muggalla P, Mätlik K, Arumäe U, Huttunen HJ. PCSK9 regulates neuronal apoptosis by adjusting ApoER2 levels and signaling. *Cell Mol Life Sci Switzerland*. 2012; 69: 1903-1916.
30. Dietschy JM. Central nervous system: cholesterol turnover, brain development and neurodegeneration. *Biol Chem*. 2009; 390: 287-293.
31. Seidah NG, Mayer G, Zaid A, Rousselet E, Nasoury N, Poirier S, Essalmani R, Prat A. The activation and physiological functions of the proprotein convertases. *Int J Biochem Cell Biol Netherlands*. 2008; 40: 1111-1125.
32. Adorni MP, Ruscica M, Ferri N, Bernini F, Zimetti F. Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9, Brain Cholesterol Homeostasis and Potential Implication for Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci*. 2019; 11: 120.
33. Hickman SE, Allison EK, Khoury J El. Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *J Neurosci*. 2008; 28: 8354-8360.
34. Apajai N, Moisescu DM, Palee S, McSweeney CM, Saiyasit N, Maneechote C, Boonnag C, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. 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.