



PCSK9: estructura y función. PCSK9 y receptor de lipoproteínas de baja densidad. Mutaciones y cambios derivados de estas

Juan Pedro-Botet^{a,*} y Lina Badimón^b

^a Unitat de Lípids, Hospital del Mar, Barcelona, Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España

^b Cardiovascular Research Center (CSIC-ICCC), Institut Català de Ciències Cardiovasculars (ICCC), Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, España

PALABRAS CLAVE

cLDL;
Metabolismo LDL;
PCSK9;
Lipoproteína(a);
Receptor LDL

KEYWORDS

cLDL;
LDL metabolism;
PCSK9;
Lipoprotein(a);
LDL receptor

Resumen

La proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9) se une al receptor de lipoproteínas de baja densidad (rLDL), lo acompaña al lisosoma para su destrucción y de este modo evita la recirculación del rLDL a la superficie celular de los hepatocitos. En consecuencia, el número de rLDL disminuye y el aclaramiento del colesterol unido a LDL (cLDL) se reduce. Se han descrito mutaciones con ganancia de función en PCSK9 que cursan con un notable incremento en la concentración de cLDL y mutaciones con pérdida de función, que se acompañan de modestas reducciones de cLDL y bajas tasas de enfermedad cardíaca coronaria. La PCSK9 se ha convertido en una prometedora diana terapéutica para disminuir la colesterolemia. En esta revisión se aportan los últimos y principales datos sobre la regulación de PCSK9 y su función molecular en la homeostasis del colesterol.

© 2016 Sociedad Española de Arteriosclerosis. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

PCSK9: Structure and function. PCSK9 and low-density lipoprotein receptor. Mutations and their effects

Abstract

Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) binds to the low-density lipoprotein receptor (LDLr) and then targets it for *lysosomal* degradation in cells, thus preventing LDLr from recycling back to the hepatocyte surface, with a consequent decrease in LDLr density and clearance of LDL-cholesterol (LDLc). There have been reports of both gain-of-function mutations in the PCSK9 gene that cause a marked increase in LDLc concentrations and loss-of-function muta-

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: 86620@parcdesalutmar.cat (J. Pedro-Botet).

tions, which lead to modest reductions in LDLc and low rates of coronary heart disease. The PCSK9 gene has become a promising therapeutic target to reduce blood cholesterol levels. This review discusses the most interesting recent data on PCSK9 regulation and its molecular function in cholesterol homeostasis.

© 2016 Sociedad Española de Arteriosclerosis. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

De las líneas de investigación derivadas del estudio de la estructura y función de las proteínas de la familia de proteín-serinas, denominadas proteín-convertasas, y de las líneas de investigación de las variables genéticas de hipercolesterolemia familiar, ha surgido una nueva clase de fármacos para reducir la concentración del colesterol unido a las lipoproteínas de baja densidad (cLDL) conocidos como inhibidores de la proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9)¹. Este nombre proviene de la complejidad del descubrimiento de la proteína vinculada a la subtilisina (proteína encontrada en *Bacillus subtilis*) y la kexina (proteína de las levaduras) y de la proteín-serina 9 secretora. En 2001, científicos de Millennium Pharmaceuticals descubrieron la PCSK9 en estudios de apoptosis de neuronas del cerebelo². En paralelo, y de forma independiente, la French Network for Autosomal Dominant Hypercholesterolemia³ y la Universidad de Utah⁴ identificaron un tercer locus genético para la hipercolesterolemia familiar —las primeras 2 mutaciones estaban localizadas en el gen del receptor de LDL (rLDL) y de la apolipoproteína (apo) B—. En 2003, Abifadel et al⁵ describieron por primera vez las mutaciones en el gen PCSK9 como causantes de hipercolesterolemia familiar, y estudios posteriores realizados en familias de Utah⁶, Noruega⁷ y Reino Unido⁸ confirmaron dichos hallazgos.

PCSK9 en la regulación del metabolismo del receptor de las lipoproteínas de baja densidad

La función principal de PCSK9 es la maduración proteolítica de las proteínas secretadas, como hormonas, citocinas, factores de crecimiento y receptores de la superficie celular⁹. La PCSK9 es una proteína de 692 aminoácidos con un peso molecular de 72 kDa, que consta de una región prodominio, un dominio catalítico y un dominio rico en histidina y cisteína C-terminal¹⁰ (fig. 1), que se expresa principalmente en el hígado, el intestino, el riñón y el sistema nervioso central¹¹.

La función mejor caracterizada de PCSK9 hace referencia a su unión con los rLDL en los hepatocitos. La pro-PCSK9 (72 kDa) se sintetiza en el retículo endoplásmico al igual que el precursor del rLDL (120 kDa), y la unión de ambos facilita el transporte del receptor desde el retículo endoplásmico al complejo de Golgi, donde adquiere sus residuos de carbohidratos maduros (160 kDa)¹². El tráfico de pro-PCSK9 al aparato de Golgi depende de la presencia de la proteína Sec24A¹³. En el aparato de Golgi, la región prodominio de la pro-PCSK9 se escinde autocatalíticamente, pero continúa unida de forma no covalente a la PCSK9 madura para facilitar el plegamiento de la proteína y el bloqueo de su actividad catalítica. La unión de pro-PCSK9 a la forma precursora del rLDL promueve la escisión autocatalítica de PCSK9¹⁴.

La principal vía de eliminación del cLDL circulante es a nivel hepático por endocitosis, proceso mediado por la unión del cLDL al rLDL en la membrana celular de los hepatocitos (fig. 2). Dado que la vida media del rLDL es de unas 20 h y que en el reciclado se emplean de 10 a 15 min, el rLDL es capaz de recircular de nuevo a la superficie celular hasta 150 veces, desempeñando la PCSK9 un papel fundamental en el metabolismo del rLDL. La subunidad catalítica de PCSK9 se une al dominio homólogo al factor de crecimiento epidérmico del rLDL y a continuación acompaña al receptor a su degradación dentro del lisosoma.

Además de actuar como transportador de la forma precursora del rLDL desde el retículo endoplásmico, la PCSK9 intracelular juega un papel en la regulación de la expresión del rLDL maduro mediante la inducción de la degradación intracelular del rLDL previamente a su transporte a la membrana de la superficie celular. Teniendo en cuenta que el rLDL maduro y la PCSK9 se encuentran en el complejo de Golgi, es probable que el efecto degradante del rLDL por PCSK9 se produzca o se inicie en el aparato de Golgi o trans-Golgi¹⁵. El mecanismo de la degradación del rLDL posretículo endoplásmico requiere la actividad catalítica de PCSK9¹⁶.

Si el rLDL no es degradado intracelularmente se transporta a la superficie celular, en las fosillas recubiertas de clatrina, gracias a su interacción con la proteína adaptadora 1 del rLDL, que puede ser causante de hipercolesterolemia auto-

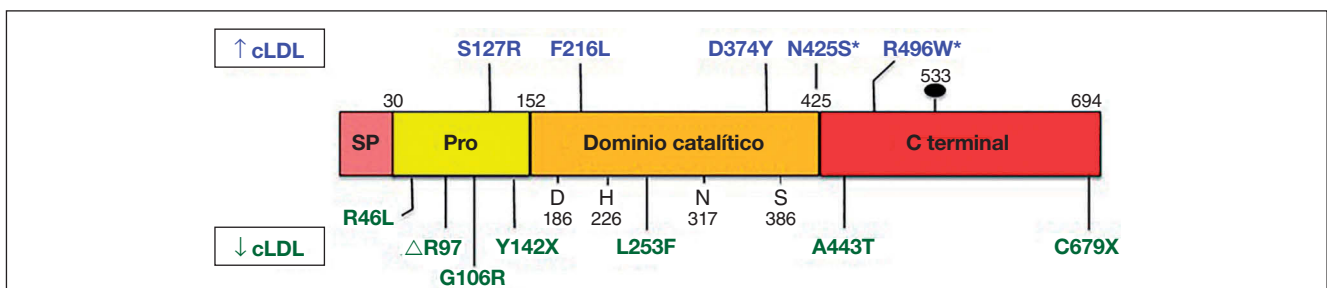


Figura 1 Estructura de PCSK9. Las mutaciones asociadas con concentraciones elevadas de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL) están representadas en la parte superior y las mutaciones conducentes a la reducción del cLDL, en la parte inferior.

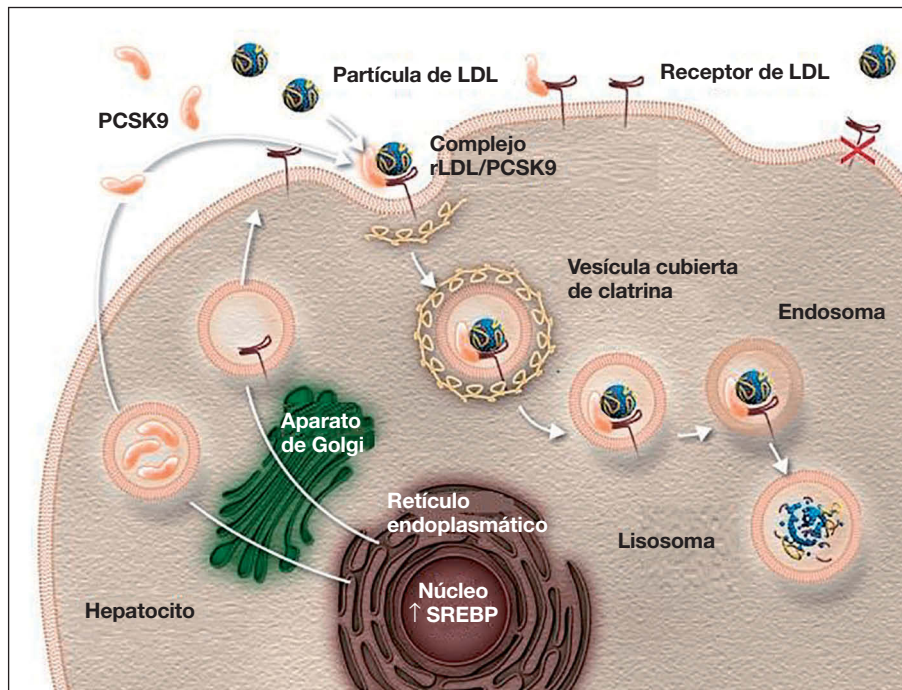


Figura 2 Papel de PCSK9 en la degradación de los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL).

sómica recesiva. El rLDL sufre endocitosis en presencia o ausencia de su ligando, entrando así en el compartimiento de reciclado. El cambio en el pH dentro de este compartimiento permite la disociación del rLDL de su ligando, que luego se degrada en el lisosoma, mientras que el rLDL se recicla.

El papel principal de la PCSK9 extracelular secretada es la regulación postranslacional del número de rLDL en la superficie celular. La PCSK9 secretada se une a la región homóloga al factor de crecimiento epidérmico A del rLDL^{13,17}. Para dicha unión, no se requiere la actividad catalítica de PCSK9^{18,19}, pero los cambios de pH y en las cargas positivas²⁰ o negativas²¹ de los epitopos de PCSK9 afectan su afinidad de unión al rLDL²². El complejo formado por PCSK9-rLDL se internaliza de nuevo por endocitosis mediada por clatrina²³ y el complejo se dirige al endosoma/lisosoma a través de un mecanismo que no requiere ubiquitinación²⁴, pero podría implicar interacción de la cola citosólica de PCSK9 con el análogo de la proteína precursora amiloidea²⁵. A pH ácido en el endosoma/lisosoma tiene lugar la interacción adicional entre el dominio de unión al ligando del rLDL y el dominio C-terminal de PCSK9^{26,27}; como consecuencia, la PCSK9 permanece unida al rLDL y el rLDL no adopta la configuración cerrada requerida para el reciclaje del rLDL. Por lo tanto, mediante la unión al rLDL, la PCSK9 interrumpe el reciclado del rLDL y lo conduce a su degradación, hecho que comporta una disminución del número de rLDL disponibles.

La PCSK9, mediante un proceso de autoensamblaje, forma dímeros o trímeros de PCSK9, que tienen la mayor actividad degradante del rLDL. En este sentido, una de las mutaciones con ganancia de función de PCSK9 (D374Y) se caracteriza por un autoensamblaje intensificado²⁸. La principal vía de eliminación de PCSK9 es a través de su unión al rLDL²⁹, aunque deben existir mecanismos independientes del rLDL³⁰.

La PCSK9 es escindida por furina, así como por las proteínas convertasas 5/6¹⁶ entre los aminoácidos Arg 218 y Gln 219³¹, y ambas formas de PCSK9 se pueden cuantificar en el plasma³². La fracción de PCSK9 escindida por furina (55 kDa) sigue activa y se une al rLDL, pero con una actividad reducida a la mitad. De hecho, la inyección en ratones de PCSK9 escindida por furina se sigue de un aumento del cLDL, al estar el rLDLR regulado a la baja³³.

Además de su unión al rLDL, la PCSK9 también interactúa con otros receptores como el rLDL³⁴, la proteína 1 relacionada con el rLDL³⁵, el receptor de la apo E³⁶, así como del CD81 en los hepatocitos (receptor del virus de la hepatitis C)³⁷ y CD36 en los macrófagos³⁸.

Regulación de la expresión génica de PCSK9

Varios factores de transcripción o cofactores regulan la expresión del gen PCSK9, incluyendo las proteínas de unión al elemento regulador de los esteroides (SREBP-1/2). Dado que el gen PCSK9 está regulado por los esteroides a través de SREBP2, las dietas con bajo contenido en colesterol suprimen potentemente sus valores de expresión y disminuyen la concentración de PCSK9 durante el ayuno y, por el contrario, aumentan en situación posprandial³⁹. SREBP2 también controla la expresión del rLDL.

La expresión de SREBP1 en los hepatocitos se incrementa por la insulina y, en consecuencia, hay un aumento de la expresión de PCSK9⁴⁰. Sin embargo, la insulina también puede activar en los mamíferos la diana complejo rapamicina 1 (mTORC1)/vía δ proteincinasa inhibiendo así el factor nuclear 1 α de los hepatocitos (HNF1 α) y la consiguiente menor expresión de PCSK9 en los hepatocitos⁴¹. De hecho, en las células HepG2, la hiperinsulinemia disminuye la expresión de PCSK9, un efecto que también se ha observado en muje-

res obesas menopáusicas⁴². Por el contrario, en varones sanos la hiperinsulinemia mantenida durante 24 h no alteró las concentraciones de PCSK9¹⁷ y la expresión de PCSK9 fue similar en pacientes sanos, prediabéticos y diabéticos⁴³. Por lo tanto, el efecto global de la insulina sobre la expresión de PCSK9 parece ser neutro.

El receptor activado de proliferación de los peroxisomas (PPAR) regula la expresión de PCSK9; los PPAR α reducen la actividad del promotor de PCSK9; de esta manera atenúan la expresión de PCSK9, mientras que al mismo tiempo los PPAR α incrementan la expresión de furina/PC5/6, que comporta un aumento de la escisión de PCSK9⁴⁴. Por el contrario, los PPAR γ aumentan la expresión de PCSK9 en los hepatocitos⁴⁵.

Otros factores de transcripción o factores como el FXR (receptor X farnesoide), activado por los ácidos biliares, reducen la expresión de PCSK9⁴⁶, mientras que el receptor X hepático (LXR) activado por oxiesteroles y el HINFP (factor nuclear histona P) aumentan la expresión de PCSK9^{40,47,48}.

También, las sirtuinas 1 y 6 (SIRT1/6), desacetilasas de histona NAD-dependientes, reprimen el gen PCSK9⁴⁹, reducen la secreción de PCSK9 y aumentan la expresión del rLDL en los hepatocitos⁵⁰, modificando así la homeostasis del cLDL. Por último, la adipocina resistina procedente del tejido adiposo incrementa la expresión de PCSK9 y reduce la expresión del rLDL en los hepatocitos⁵¹.

En el proceso de internalización y degradación del rLDL, el degradador inducible del rLDL (Idol) es otra proteína involucrada⁵². El Idol se une a la región C-terminal del rLDL^{53,54} y estimula la endocitosis no clatrina dependiente del rLDL⁵⁵. Idol se activa a través de la LXR empleando el complejo endosomal necesario para el transporte del rLDL a los lisosomas⁵⁶. Asimismo, puede estimular los SREBP2 aumentando así la expresión de PCSK9 y reduciendo de nuevo la expresión de rLDL. Es de destacar que los portadores de una mutación Idol (pArg266X) presentan una pérdida completa de la función Idol y bajas concentraciones de cLDL⁵⁷.

Mutaciones PCSK9 y concentración colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad

Los descubrimientos iniciales de las mutaciones en PCSK9 con ganancia de función como causa de hipercolesterolemia, fueron seguidos por la descripción de mutaciones en PCSK9 con pérdida de función acompañadas de una reducción del colesterol⁵⁸. El descenso de la concentración de cLDL, aunque modesto (del 15 al 28%), es para toda la vida y confiere una protección cardiovascular considerable⁵⁹.

Dado el papel contrarregulador de la PCSK9, las mutaciones con ganancia de función en PCSK9 y su correspondiente sobreexpresión comportan un menor número de rLDL funcionantes y mayores concentraciones de cLDL. Por el contrario, las mutaciones con pérdida de función en PCSK9 dan lugar a valores más bajos de cLDL (tabla 1; fig. 1).

Las mutaciones con ganancia de función en PCSK9 conducen a la hipercolesterolemia y algunas son responsables de esta forma de hipercolesterolemia familiar, incluyendo la forma autosómica dominante^{15,53,54,60}. Estas mutaciones, a veces están relacionadas con la reducción de escisión de furina de PCSK9³¹, mientras que las mutaciones con pérdida

Tabla 1 Mutaciones del gen PCSK9

| Mutaciones con ganancia de función | Mutaciones con pérdida de función |
|---|---|
| ↑ Función de PCSK9 | ↓ Función de PCSK9 |
| ↑ Degradación de los rLDL | ↓ Degradación de los rLDL |
| ↓ Número de rLDL | ↑ Número de rLDL |
| ↓ Absorción de partículas LDL por el hepatocito | ↑ Absorción de partículas LDL por el hepatocito |
| ↑ Concentración cLDL | ↓ Concentración cLDL |

cLDL: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad; rLDL: receptor de las lipoproteínas de baja densidad.

de función están relacionadas con la falta de fosforilación PCSK9 y posterior aumento de la proteólisis⁶¹⁻⁶³.

Lipoproteína(a)

Un reciente metaanálisis de los estudios clínicos con inhibidores de PCSK9 ha demostrado que estos reducen de forma considerable la concentración de la lipoproteína(a) [Lp(a)]⁶⁴, reconocido factor de riesgo cardiovascular. En la actualidad, no se dispone de tratamiento farmacológico para disminuir la Lp(a), a excepción del ácido nicotínico. Es de destacar que la inhibición de PCSK9 reduce la Lp(a) en pacientes con hipercolesterolemia familiar homocigota, a pesar de la ausencia de rLDL⁶⁵. Por lo tanto se plantea la cuestión de si la regulación de la Lp(a) por PCSK9 puede ser independiente del rLDL. Con esta perspectiva, la modulación del receptor de lipoproteínas de muy baja densidad por PCSK9 puede ser de gran interés, ya que el aclaramiento de la Lp(a) por los hepatocitos parece depender de la expresión de dichos receptores⁶⁶. Por lo tanto, la reducción de la expresión de PCSK9 o la actividad de unión al receptor podría mediar la reducción de Lp(a). Aunque el mecanismo molecular subyacente no está completamente establecido, entre las diferentes vías que pueden estar involucradas cabe citar la disminución de la síntesis de apo(a), la reducción de apo B o de su ensamblaje, y el incremento de la eliminación de la Lp(a) en el riñón, el hígado y los tejidos periféricos.

Conclusión

El descubrimiento de PCSK9 ha cambiado nuestra visión del metabolismo del colesterol, desde un proceso regulado completamente a través de mecanismos intracelulares a un proceso autocrino/paracrino, que puede ser controlado por componentes plasmáticos. Similar a las LDL, la PCSK9 sirve de ligando al rLDL; por lo tanto, este último es el principal determinante de los valores circulantes de PCSK9. Los portadores de mutaciones con pérdida de función de PCSK9 tienen bajas concentraciones de cLDL; incluso pequeñas reducciones de cLDL secundarias a mutaciones comunes en PCSK9 pueden acompañarse de una reducción de episodios cardiovasculares.

A pesar de que los anticuerpos monoclonales anti-PCSK9 se están investigando ampliamente en ensayos clínicos de fase III y se han convertido en prometedores fármacos hipolipemiantes, es importante recordar que su mecanismo de acción es relativamente nuevo, y todavía existen lagunas en la cinética, dinámica y función fisiológica completa de PCSK9.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Giugliano RP, Sabatine MS. Are PCSK9 inhibitors the next breakthrough in the cardiovascular field? *J Am Coll Cardiol*. 2015;65:2638-51.
- Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, Marcinkiewicz J, Jasmin SB, Stifani S, et al. The secretory proprotein convertase neural apoptosis regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:928-33.
- Varret M, Rabès JP, Saint-Jore B, Cenarro A, Marinoni JC, Civeira F, et al. A third major locus for autosomal dominant hypercholesterolemia maps to 1p34.1-p32. *Am J Hum Genet*. 1999;64:1378-87.
- Hunt SC, Hopkins PN, Bulka K, McDermott MT, Thorne TL, Wardell BB, et al. Genetic localization to chromosome 1p32 of the third locus for familial hypercholesterolemia in a Utah kindred. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:1089-93.
- Abifadel M, Varret M, Rabès JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet*. 2003;34:154-6.
- Timms KM, Wagner S, Samuels ME, Forbey K, Goldfine H, Jammulapati S, et al. A mutation in PCSK9 causing autosomal-dominant hypercholesterolemia in a Utah pedigree. *Hum Genet*. 2004;114:349-53.
- Leren TP. Mutations in the PCSK9 gene in Norwegian subjects with autosomal dominant hypercholesterolemia. *Clin Genet*. 2004;65:419-22.
- Sun XM, Eden ER, Tosi I, Neuwirth CK, Wile D, Naoumova RP, et al. Evidence for effect of mutant PCSK9 on apolipoprotein B secretion as the cause of unusually severe dominant hypercholesterolemia. *Hum Mol Genet*. 2005;14:1161-9.
- Seidah NG. The proprotein convertases, 20 years later. *Methods Mol Biol*. 2011;768:23-57.
- Denis M, Marcinkiewicz J, Zaid A, Gauthier D, Poirier S, Lazure C, et al. Gene inactivation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces atherosclerosis in mice. *Circulation*. 2012;125:894-901.
- Norata GD, Tibolla G, Catapano AL. Targeting PCSK9 for hypercholesterolemia. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2014;54:273-93.
- Strom TB, Tveten K, Leren TP. PCSK9 acts as a chaperone for the LDL receptor in the endoplasmic reticulum. *Biochem J*. 2014;457:99-105.
- Chen XW, Wang H, Bajaj K, Zhang P, Meng ZX, Ma D, et al. SE-C24A deficiency lowers plasma cholesterol through reduced PCSK9 secretion. *Elife*. 2013;2:e00444.
- Grozdanov PN, Petkov PM, Karagoyozov LK, Dabeva MD. Expression and localization of PCSK9 in rat hepatic cells. *Biochem Cell Biol*. 2006;84:80-92.
- Maxwell KN, Fisher EA, Breslow JL. Overexpression of PCSK9 accelerates the degradation of the LDLR in a postendoplasmic reticulum compartment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:2069-74.
- Benjannet S, Saavedra YG, Hamelin J, Asselin MC, Essalmani R, Pasquato A, et al. Effects of the prosegment and pH on the activity of PCSK9: evidence for additional processing events. *J Biol Chem*. 2010;285:40965-78.
- Bottomley MJ, Cirillo A, Orsatti L, Ruggeri L, Fisher TS, Santoro JC, et al. Structural and biochemical characterization of the wild type PCSK9-EGF(AB) complex and natural familial hypercholesterolemia mutants. *J Biol Chem*. 2009;284:1313-23.
- Li J, Tumanut C, Gavigan JA, Huang WJ, Hampton EN, Tumanut R, et al. Secreted PCSK9 promotes LDL receptor degradation independently of proteolytic activity. *Biochem J*. 2007;406:203-7.
- McNutt MC, Lagace TA, Horton JD. Catalytic activity is not required for secreted PCSK9 to reduce low density lipoprotein receptors in HepG2 cells. *J Biol Chem*. 2007;282:20799-803.
- Holla OL, Cameron J, Tveten K, Strom TB, Berge KE, Laerdahl JK, et al. Role of the C-terminal domain of PCSK9 in degradation of the LDL receptors. *J Lipid Res*. 2011;52:1787-94.
- Holla OL, Laerdahl JK, Strom TB, Tveten K, Cameron J, Berge KE, et al. Removal of acidic residues of the prodomain of PCSK9 increases its activity towards the LDL receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;406:234-8.
- Gu HM, Adijiang A, Mah M, Zhang DW. Characterization of the role of EGF-A of low density lipoprotein receptor in PCSK9 binding. *J Lipid Res*. 2013;54:3345-57.
- Qian YW, Schmidt RJ, Zhang Y, Chu S, Lin A, Wang H, et al. Secreted PCSK9 downregulates low density lipoprotein receptor through receptor-mediated endocytosis. *J Lipid Res*. 2007;48:1488-98.
- Wang Y, Huang Y, Hobbs HH, Cohen JC. Molecular characterization of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9-mediated degradation of the LDLR. *J Lipid Res*. 2012;53:1932-43.
- DeVay RM, Shelton DL, Liang H. Characterization of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) trafficking reveals a novel lysosomal targeting mechanism via amyloid precursor-like protein 2 (APLP2). *J Biol Chem*. 2013;288:10805-18.
- Du F, Hui Y, Zhang M, Linton MF, Fazio S, Fan D. Novel domain interaction regulates secretion of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) protein. *J Biol Chem*. 2011;286:43054-61.
- Saavedra YG, Day R, Seidah NG. The M2 module of the Cys-His-rich domain (CHRD) of PCSK9 protein is needed for the extracellular low-density lipoprotein receptor (LDLR) degradation pathway. *J Biol Chem*. 2012;287:43492-501.
- Fan D, Yancey PG, Qiu S, Ding L, Weeber EJ, Linton MF, et al. Self-association of human PCSK9 correlates with its LDLR-degrading activity. *Biochemistry*. 2008;47:1631-9.
- Tavori H, Fan D, Blakemore JL, Yancey PG, Ding L, Linton MF, et al. Serum proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 and cell surface low-density lipoprotein receptor: evidence for a reciprocal regulation. *Circulation*. 2013;127:2403-13.
- Cameron J, Bogsrud MP, Tveten K, Strom TB, Holven K, Berge KE, et al. Serum levels of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 in subjects with familial hypercholesterolemia indicate that proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 is cleared from plasma by low-density lipoprotein receptor independent pathways. *Transl Res*. 2012;160:125-30.
- Essalmani R, Susan-Resiga D, Chamberland A, Abifadel M, Creemers JW, Boileau C, et al. In vivo evidence that furin from hepatocytes inactivates PCSK9. *J Biol Chem*. 2011;286:4257-63.
- Han B, Eacho PI, Knierman MD, Troutt JS, Konrad RJ, Yu X, et al. Isolation and characterization of the circulating truncated form of PCSK9. *J Lipid Res*. 2014;55:1505-14.
- Lipari MT, Li W, Moran P, Kong-Beltran M, Sai T, Lai J, et al. Furin-cleaved proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) is active and modulates low density lipoprotein receptor and serum cholesterol levels. *J Biol Chem*. 2012;287:43482-91.

34. Kysenius K, Muggalla P, Matlik K, Arumae U, Huttunen HJ. PCSK9 regulates neuronal apoptosis by adjusting ApoER2 levels and signaling. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69:1903-16.
35. Poirier S, Mayer G, Benjannet S, Bergeron E, Marcinkiewicz J, Nassoury N, 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;283:2363-72.
36. 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;8:e64145.
37. Labonte P, Begley S, Guevin C, Asselin MC, Nassoury N, Mayer G, et al. PCSK9 impedes hepatitis C virus infection in vitro and modulates liver CD81 expression. *Hepatology.* 2009;50:17-24.
38. Shen L, Peng HC, Nees SN, Zhao SP, Xu DY. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 potentially influences cholesterol uptake in macrophages and reverse cholesterol transport. *FEBS Lett.* 2013;587:1271-4.
39. Browning JD, Horton JD. Fasting reduces plasma proprotein convertase, subtilisin/kexin type 9 and cholesterol biosynthesis in humans. *J Lipid Res.* 2010;51:3359-63.
40. Costet P, Cariou B, Lambert G, Lalanne F, Lardeux B, Jarnoux AL, et al. Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c. *J Biol Chem.* 2006;281:6211-8.
41. Ai D, Chen C, Han S, Ganda A, Murphy AJ, Haeusler R, et al. Regulation of hepatic LDL receptors by mTORC1 and PCSK9 in mice. *J Clin Invest.* 2012;122:1262-70.
42. Blom DJ, Hala T, Bolognese M, Lillestol MJ, Toth PD, Burgess L, et al. A 52-week placebo-controlled trial of evolocumab in hyperlipidemia. *N Engl J Med.* 2014;370:1809-19.
43. Brouwers MC, Troutt JS, Van Greevenbroek MM, Ferreira I, Feskens EJ, Van der Kallen CJ, et al. Plasma proprotein convertase subtilisin kexin type 9 is not altered in subjects with impaired glucose metabolism and type 2 diabetes mellitus, but its relationship with non-HDL cholesterol and apolipoprotein B may be modified by type 2 diabetes mellitus: the CODAM study. *Atherosclerosis.* 2011;217:263-7.
44. Kourimate S, Le MC, Langhi C, Jarnoux AL, Ouguerram K, Zair Y, et al. Dual mechanisms for the fibrate-mediated repression of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *J Biol Chem.* 2008;283:9666-73.
45. Duan Y, Chen Y, Hu W, Li X, Yang X, Zhou X, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation by ligands and dephosphorylation induces proprotein convertase subtilisin kexin type 9 and low density lipoprotein receptor expression. *J Biol Chem.* 2012;287:23667-77.
46. Langhi C, Le MC, Kourimate S, Caron S, Staels B, Krempf M, et al. Activation of the farnesoid X receptor represses PCSK9 expression in human hepatocytes. *FEBS Lett.* 2008;582:949-55.
47. Schroeder CI, Swedberg JE, Withka JM, Rosengren KJ, Akcan M, Clayton DJ, et al. Design and synthesis of truncated EGF-A peptides that restore LDL-R recycling in the presence of PCSK9 in vitro. *Chem Biol.* 2014;21:284-94.
48. Li H, Liu J. The novel function of HINFP as a co-activator in sterol-regulated transcription of PCSK9 in HepG2 cells. *Biochem J.* 2012;443:757-68.
49. Tao R, Xiong X, DePinho RA, Deng CX, Dong XC. FoxO3 transcription factor and Sirt6 deacetylase regulate low density lipoprotein (LDL)-cholesterol homeostasis via control of the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (Pcsk9) gene expression. *J Biol Chem.* 2013;288:29252-9.
50. Miranda MX, Van Tits LJ, Lohmann C, Arsiwala T, Winnik S, Tailleux A, et al. The Sirt1 activator SRT3025 provides atheroprotection in ApoE^{-/-} mice by reducing hepatic Pcsk9 secretion and enhancing Ldlr expression. *Eur Heart J.* 2015;36:51-9.
51. Melone M, Wilsie L, Palyha O, Strack A, Rashid S. Discovery of a new role of human resistin in hepatocyte low density lipoprotein receptor suppression mediated in part by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *J Am Coll Cardiol.* 2012;59:1697-705.
52. Sasaki M, Terao Y, Ayaori M, Uto-Kondo H, Iizuka M, Yogo M, et al. Hepatic overexpression of idol increases circulating protein convertase subtilisin/kexin type 9 in mice and hamsters via dual mechanisms: sterol regulatory element-binding protein 2 and low-density lipoprotein receptor dependent pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34:1171-8.
53. Homer VM, Marais AD, Charlton F, Laurie AD, Hurdell N, Scott R, et al. Identification and characterization of two non-secreted PCSK9 mutants associated with familial hypercholesterolemia in cohorts from New Zealand and South Africa. *Atherosclerosis.* 2008;196:659-66.
54. Mabuchi H, Nohara A, Noguchi T, Kobayashi J, Kawashiri MA, Inoue T, et al. Genotypic and phenotypic features in homozygous familial hypercholesterolemia caused by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) gain-of-function mutation. *Atherosclerosis.* 2014;236:54-61.
55. Scotti E, Calamai M, Goulbourne CN, Zhang L, Hong C, Lin RR, et al. IDOL stimulates clathrin-independent endocytosis and multivesicular body-mediated lysosomal degradation of the low-density lipoprotein receptor. *Mol Cell Biol.* 2013;33:1503-14.
56. Scotti E, Hong C, Yoshinaga Y, Tu Y, Hu Y, Zelcer N, et al. Targeted disruption of the idol gene alters cellular regulation of the low-density lipoprotein receptor by sterols and liver X receptor agonists. *Mol Cell Biol.* 2011;31:1885-93.
57. Sorrentino V, Fouchier SW, Motazacker MM, Nelson JK, Defesche JC, Dallinga-Thie GM, et al. Identification of a loss-of-function inducible degrader of the low-density lipoprotein receptor variant in individuals with low circulating low-density lipoprotein. *Eur Heart J.* 2013;34:1292-7.
58. Cohen J, Pertsemlidis A, Kotowski IK, Graham R, Garcia CK, Hobbs HH. Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat Genet.* 2005;37:161-5.
59. Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH, Hobbs HH. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med.* 2006;354:1264-72.
60. Abifadel M, Rabès JP, Boileau C, Varret M. After the LDL receptor and apolipoprotein B, autosomal dominant hypercholesterolemia reveals its third protagonist: PCSK9. *Ann Endocrinol (Paris).* 2007;68:138-46.
61. Dewpura T, Raymond A, Hamelin J, Seidah NG, Mbikay M, Chretien M, et al. PCSK9 is phosphorylated by a Golgi casein kinase-like kinase ex vivo and circulates as a phosphoprotein in humans. *FEBS J.* 2008;275:3480-93.
62. Benn M, Nordestgaard BG, Grande P, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A. PCSK9 R46L, low-density lipoprotein cholesterol levels, and risk of ischemic heart disease: 3 independent studies and meta-analyses. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55:2833-42.
63. Chernogubova E, Strawbridge R, Mahdessian H, Malarstig A, Kravtsov S, Gigante B, et al. Common and low-frequency genetic variants in the PCSK9 locus influence circulating PCSK9 levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:1526-34.
64. Li C, Lin L, Zhang W, Zhou L, Wang H, Luo X, et al. Efficiency and safety of proprotein convertase subtilisin/kexin 9 monoclonal antibody on hypercholesterolemia: a meta-analysis of 20 randomized controlled trials. *J Am Heart Assoc.* 2015;4:e001937.
65. Stein EA, Honarpour N, Wasserman SM, Xu F, Scott R, Raal FJ. Effect of the proprotein convertase subtilisin/kexin 9 monoclonal antibody, AMG 145, in homozygous familial hypercholesterolemia. *Circulation.* 2013;128:2113-20.
66. Hoover-Plow J, Huang M. Lipoprotein(a) metabolism: potential sites for therapeutic targets. *Metabolism.* 2013;62:479-91.