

Пропропротеин конвертаза субтилизин/кексин типа 9 (PCSK9) – регулятор экспрессии рецепторов липопротеинов низкой плотности

В. В. Кухарчук, С. С. Бажан*
ФГБУ РКНПК МЗ РФ; * ООО «Амджен»»

Абстракт

В течение последних десяти лет появились новые данные о регуляции экспрессии на поверхности гепатоцита рецепторов к липопротеинам низкой плотности (Р-ЛПНП), которые обеспечивают клиренс частиц ЛПНП из кровотока. Была идентифицирована молекула – пропротеин конвертаза субтилизин/кексин типа 9 (proprotein convertase subtilisin/kexin 9, PCSK9). Показано, что она играет ключевую роль в разрушении Р-ЛПНП, что приводит к снижению захвата и дальнейшего катаболизма циркулирующих липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), и как результат к повышению их содержания в сыворотке крови. Настоящий обзор посвящен PCSK9, механизму ее участия в разрушении Р-ЛПНП, регуляции экспрессии самой PCSK9 и ее физиологической роли.

Ключевые слова: пропротеин конвертаза субтилизин/кексин типа 9, рецептор ЛПНП, гиперлипидемия.

Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) – control the expression of low density lipoprotein receptor

V. V. Kukharchuk, S. S. Bajaj
Russian Cardiology Research Complex. * Amgen

Abstract

New data became available during last decade about the regulation of expression of hepatic low density lipoprotein receptor (LDL-R) which supplies clearance of LDL particles from the blood. Proprotein convertase subtilisin kexin 9 (PCSK9) was identified and it has been shown that this molecule plays a key role in degradation of LDL-Rs. This leads to a lower uptake and further catabolism of circulating LDL, as result the concentration of LDL in the serum raises. Current review is devoted to the discovery of PCSK9, its role in LDL-R degradation, regulation of PCSK9 expression and to its physiological role.

Keywords: proprotein convertase subtilisin/kexin 9, receptor LDL, hyperlipidemia.

Введение.

В 1985 г. Нобелевская премия по медицине и физиологии была присуждена двум американским ученым М. Брауну и Д. Голдштейну за открытие Р-ЛПНП и установления причин развития семейной гиперхолестеринемии (СГХС). Стало понятным, что ЛПНП удаляются из кровотока через рецептор опосредованный путь, и что экспрессия новых Р-ЛПНП регулируется внутриклеточным содержанием холестерина по механизму отрицательной обратной связи [1]. Однако механизмы разрушения уже существующих Р-ЛПНП долгое время оставались неясными, пока в 2003 г. не была определена ответственная за этот процесс пропротеин конвертаза, относящаяся к семейству сериновых протеаз, получившая название PCSK9.

Показано, что синтезированная в печени PCSK9 секретируется в кровотоки и образует комплекс с Р-ЛПНП на поверхности гепатоцита. Не проявляя протеолитической активности, PCSK9 способствует разрушению рецептора после интернализации образовавшегося комплекса внутрь клетки [2, 3]. Кроме того, было выявлено, что молекулярные механизмы, регулирующие синтез PCSK9 и Р-ЛПНП, во многом пересекаются, что может обуславливать снижение эффективности таких препаратов как статины [4, 5].

К настоящему моменту идентифицированы мутации в гене PCSK9, приводящие как к повышению, так и снижению способности конвертазы разрушать Р-ЛПНП. В первом случае имеет место снижение плотности Р-ЛПНП на гепатоците. Это состояние описано, как третий тип аутосомно-доминантной

СГХС, при которой резко повышается риск возникновения ИБС [6]. Во втором случае, напротив, происходит повышение экспрессии Р-ЛПНП, снижение уровня ЛПНП и риска развития коронарной болезни сердца [7].

Эти открытия дали понимание того, что снижение активности PCSK9 может стать дополнительной терапевтической мишенью в лечении пациентов с гиперхолестеринемией, что позволило бы не только изолированно снижать уровень ЛПНП, но и повышать эффективность действия статинов.

Открытие PCSK9.

Впервые PCSK9 была выявлена при скрининге генов, которые активируются при апоптозе нейронов и сначала получила название конвертазы 1 типа, регулирующей апоптоз нейронов [8]. Примерно в это же время М. Abifadel и соавт. провели анализ ДНК пациентов из двух французских семей с подозрением на СГХС, у которых были исключены известные мутации генов Р-ЛПНП и АроВ. Было показано наличие двух миссенс-мутаций (S127R и F216L) в гене, кодирующем PCSK9, ассоциированных с развитием гиперхолестеринемии [6]. Позже удалось определить еще одну миссенс-мутацию гена PCSK9 (D374Y), связанную с развитием выраженной гиперхолестеринемии и резким повышением риска ИБС, превосходящим таковой для пациентов с мутациями в гене Р-ЛПНП [9]. Таким образом, ген PCSK9 стал третьим геном после Р-ЛПНП и АроВ, мутации в котором приводят к развитию аутосомно-доминантной СГХС. Однако механизм влияния PCSK9 на уровень липопротеинов на тот момент оставался не определенным.

Трансляция и процессинг PCSK9.

Анализ матричной РНК PCSK9 различных тканей показал, что наиболее высокий уровень ее экспрессии обнаруживается в печени и меньший в других органах, таких как нервная система, кишечник, почки, легкие, селезенка, яички и тимус [4, 8, 10]. Значимость печеночной фракции PCSK9 была продемонстрирована в исследовании, в котором у мышей, с избирательно «выключенным» синтезом PCSK9 в печени, уровень фермента был ниже порога определения и соответствовал таковому у мышей полностью нокаутированных по PCSK9 [10].

В эндоплазматическом ретикулуме гепатоцита происходит трансляция матричной РНК PCSK9, в результате синтезируется предшественник PCSK9, состоящий из 692 аминокислот, и включающий сигнальный пептид (1-30 аминокислотный остаток), N-концевой про-домен (31-152 остаток), каталитический домен (153-449 остаток), C-концевой цистеин и гистидин богатый домен (450-692) [11]. В ходе процессинга происходит отщепление

сигнального пептида, а затем про-домена, который сразу не связывается ковалентно с каталитическим доменом, блокируя его энзиматическую активность. В аппарате Гольджи не происходит, как в случае других сериновых протеаз, отщепления про-домена. В результате PCSK9 секретируется во внеклеточное пространство в виде про-домен содержащей, каталитически неактивной молекулы весом 62 кДа [12, 13].

Механизм регуляции PCSK9 экспрессии рецепторов к ЛПНП на гепатоцитах.

Как известно, печень является основным органом, отвечающим за клиренс и катаболизм сывороточных ЛПНП. Гепатоциты регулируют уровень ЛПНП, экспрессируя Р-ЛПНП, которые связывают ЛПНП и удаляют их из плазмы [1]. Комплекс ЛПНП/Р-ЛПНП интернализуется в гепатоцит в составе клатриновых пузырьков, которые затем сливаются с эндосомами. Кислая среда внутри эндосом способствует диссоциации комплекса ЛПНП/Р-ЛПНП. После диссоциации свободные Р-ЛПНП повторно возвращаются на поверхность гепатоцита, где они связывают и выводят из кровотока новые частицы ЛПНП (Рис. 1) [14].

Было показано, что на поверхности гепатоцита происходит кальций зависимое взаимодействие между каталитическим доменом PCSK9 и повтором А EGFP домена рецептора ЛПНП. После того, как ЛПНП связывается с таким рецептором, весь комплекс – ЛПНП/Р-ЛПНП/PCSK9 перемещается в клетку в составе клатринового пузырька [2, 3]. В дальнейшем, кислая среда эндосомы, с одной стороны, способствует отделению ЛПНП от комплекса, а с другой стороны, приводит к повышению аффинности взаимодействия PCSK9 с Р-ЛПНП за счет формирования дополнительных ионных связей между про-доменом PCSK9 и Р-ЛПНП [15, 16]. В результате PCSK9, не проявляя протеолитической активности, удерживает, как распорка, Р-ЛПНП в открытом положении, не давая ему принять закрытую конформацию, необходимую для повторного возвращения на поверхность клетки [16]. Это ведет к тому, что количество экспрессированных на гепатоците рецепторов снижается, и соответственно уменьшается клиренс ЛПНП из плазмы [2, 3]. Таким образом, PCSK9 играет важную роль в регуляции уровня холестерина ЛПНП (Рис.2).

Регуляция экспрессии PCSK9.

При снижении внутриклеточного уровня холестерина в результате его низкого биосинтеза или уменьшения захвата из кровотока происходит активация белка, связывающего стерол-регулирующий элемент – 2 (SREBP-2), который является фактором, стимулирующим транскрипцию гена Р-ЛПНП. В результате увеличивается образование de novo

Рисунок 1. Рецепторы ЛПНП играют ключевую роль в регулировании уровня ЛПНП плазмы.

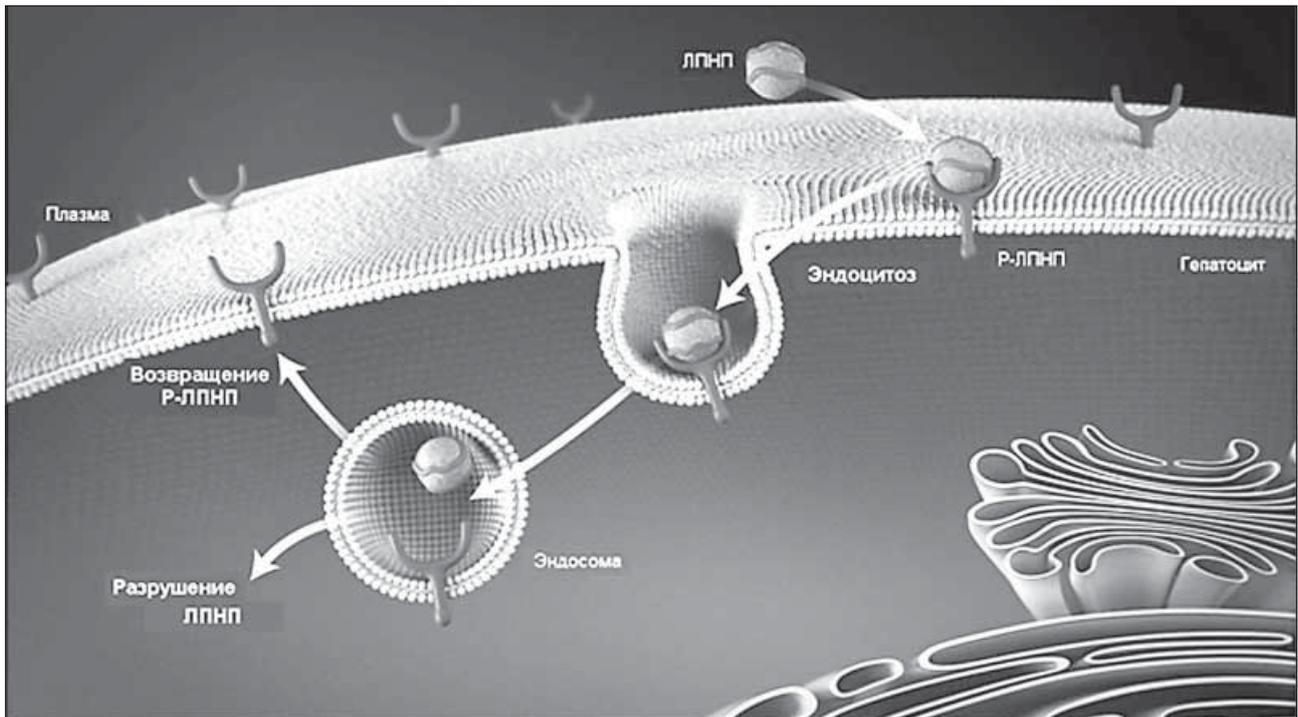
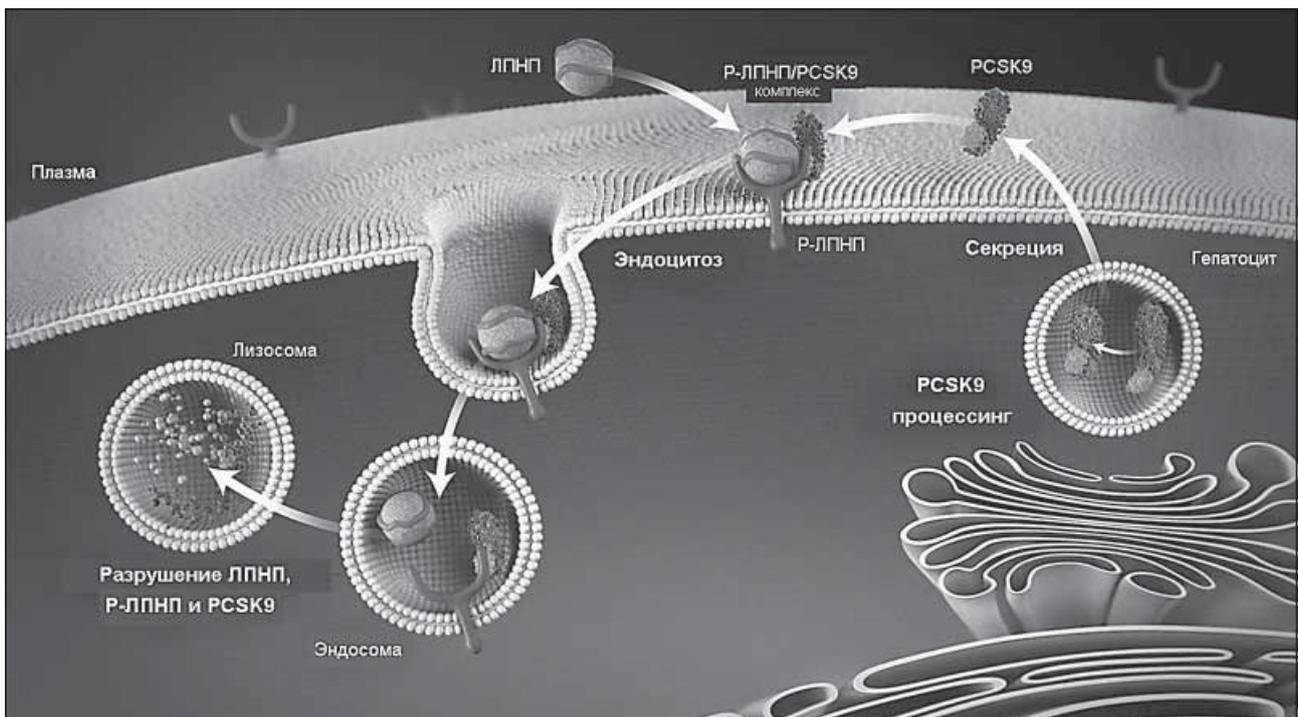
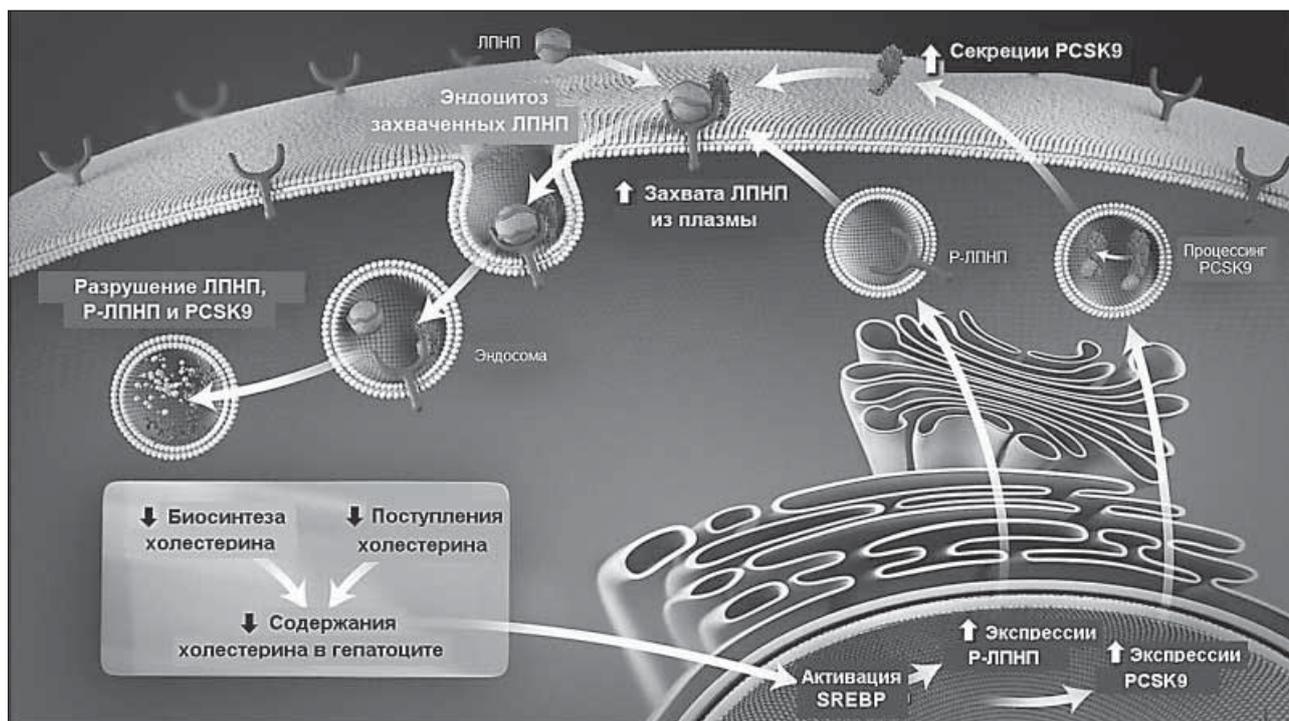


Рисунок 2. Механизм регуляции PCSK9 экспрессии Р-ЛПНП на гепатоците.



рецепторов ЛПНП и их последующая экспрессия на поверхности гепатоцита [17]. Именно через такой механизм, за счет снижения внутриклеточного синтеза холестерина и активации образования новых Р-ЛПНП, как известно, реализуется действие статинов.

Было показано, что SREBP-2 выступает как транскрипционный фактор не только для гена Р-ЛПНП, но для гена PCSK9. В результате одновременно с повышением экспрессии рецепторов ЛПНП происходит усиление синтеза и PCSK9, что приводит к разрушению рецепторов ЛПНП и снижению

Рисунок 3. Экспрессия Р-ЛПНП и PCSK9 активируется при снижении уровня внутриклеточного холестерина.

клиренса ЛПНП из крови [5]. Так реализуется своего рода механизм противовеса, который может ослаблять действие статинов, что было подтверждено в ряде клинических исследований (Рис. 3).

Действительно было показано, что применение аторвостатина в дозе 40 мг [18] в течение 16 недель у пациентов с дислипидемией и в дозе 80 мг у лиц без нарушений липидного обмена и ИБС [19] приводит к повышению уровня PCSK9 на 34 % и 47 %, соответственно. В рамках исследования JUPITER также проводился субанализ влияния терапии розувастатином 20 мг на уровень PCSK9. Было показано, что назначение розувастатина приводит к повышению содержания PCSK9 на 28 % у мужчин и 35 % у женщин [20]. По всей видимости, именно сопутствующее повышение образования PCSK9 на фоне терапии статинами является фактором, ослабляющим их эффективность, и, вероятно, является одной из причин того, что у трети пациентов, находящихся на максимальных дозах статинов, не удается достичь целевого значения ЛПНП [21]. В этой связи разработка методов терапии, направленных на блокирование PCSK9, потенциально может повысить эффективность статинов.

Инактивация и катаболизм PCSK9.

В плазме крови PCSK9 обнаруживается в виде зрелой (62 кДа) и процессированной (урезанной) функционально неактивной формы (55 кДа) [22, 23]. Выявлена мутация PCSK9, приводящая к развитию аутосомно-доминантной СГХС и связанная с заменой аргинина на сирина в 218 положении, что приводит к нарушению ферментативного

расщепления PCSK9 в этом участке и повышению уровня ЛПНП плазмы за счет увеличения содержания в ней полноценной PCSK9 [24]. Вопрос катаболизма PCSK9 остается не до конца выясненным. С одной стороны показано, что рецептор опосредованный путь является основным для элиминации циркулирующей PCSK9, а именно, пропротеин – конвертаза, связавшись с Р-ЛПНП на поверхности гепатоцита, разрушается вместе с ним после интернализации в лизосомальном аппарате клетки. И действительно, через 15 минут после внутривенного введения радиоактивной меченой PCSK9 мышам до 90 % ее количества детектируется в печени, что соответствует периоду полураспада, равному 5 минутам, и свидетельствует о ключевой роли печени в элиминации PCSK9. С другой стороны, в исследовании с мышами, нокаутированными по Р-ЛПНП, было продемонстрировано, что и в этом случае время полураспада PCSK9 составляет немногим больше 15 минут [25]. Данное обстоятельство свидетельствует о возможности наличия независимого от Р-ЛПНП механизма клиренса PCSK9. Однако пока такой альтернативный механизм не определен.

Взаимодействие PCSK9 с внепеченочными рецепторами ЛПНП.

Известно, что Р-ЛПНП находятся не только на клетках печени, поэтому закономерен вопрос о влиянии PCSK9 на экспрессию Р-ЛПНП в других тканях. С одной стороны, было показано, что внутривенное введение мышам PCSK9 приводит как к резкому снижению уровня Р-ЛПНП в печени, так и к пусть

не столь выраженному, но значимому уменьшению плотности данных рецепторов в жировой ткани, легких, почках [26]. С другой стороны, выявлено отсутствие значимого влияния PCSK9 на Р-ЛПНП, расположенные в надпочечниках [25]. Высказано предположение о возможном существовании определенных тканевых специфических факторов, наличие которых могло бы по разному модулировать активность PCSK9 в разных тканях. К примеру, было показано, что ассоциированный с клеточной мембраной белок анексин А2, взаимодействуя с С-концевым доменом PCSK9, препятствует ее связыванию с Р-ЛПНП. При этом в печени уровень экспрессии анексина А2, ниже чем в остальных тканях. Таким образом, создаются предпосылки того, что одна и та же молекула PCSK9 будет более эффективно разрушать Р-ЛПНП на гепатоцитах, нежели на других клетках [27, 28]. Все это является подтверждением того, что постсекреторная активность PCSK9 может регулироваться различными факторами, поиск которых продолжается.

Влияние голодания, гормонов и пола на уровень PCSK9.

При голодании экспрессия PCSK9 и ее уровень в плазме крови снижаются, также как и синтез холестерина, определяемый по уровню латостерола [29]. Это связано с тем, что при голодании содержание холестерина в гепатоците увеличивается, и соответственно уменьшается активность SREBP-2. Кроме того, установлено наличие суточного ритма концентрации PCSK9 (с максимумом в ночные и минимумом в дневные часы), который соотносится с ритмом биосинтеза холестерина в организме человека, и, по всей видимости, также регулируется изменениями в активности SREBP-2 [30]. Таким образом, для корректного сравнения уровня PCSK9 между людьми или просто в динамике необходимо проводить его измерение в одно и то же время суток, утром натощак. Вероятно, из-за того, что оба процесса – образование PCSK9 и холестерина – регулируются через SREBP-2, они уравнивают друг друга, в результате чего уровень общего холестерина и ЛПНП при голодании и в течение суток практически не изменяется.

В исследованиях на грызунах, показано, что введение глюкагона и высоких доз эстрогенов приводит к понижению, а инсулина и соматотропного гормона к повышению экспрессии гена PCSK9 [31]. Между тем известно, что у людей и грызунов имеются отличия в действии гормонов на метаболизм холестерина. В частности, при введении соматотропного гормона людям отмечалось понижение содержания PCSK9 в крови [30]. Это говорит о необходимости исследовать у людей влияние других гормонов, изменяющих свою активность при голодании, прежде всего инсулина и глюкагона, на образование PCSK9.

Существующие данные о половых различиях в уровне PCSK9 малочисленны. В одном из исследований показано, что в подростковом возрасте уровень PCSK9 возрастает у девочек и снижается у мальчиков [33]. Кроме того, в ряде работ продемонстрировано, что у взрослых концентрация PCSK9 выше у женщин, чем у мужчин, и у женщин в постменопаузе по сравнению с предменопаузой. Однако, однозначного ответа об особенностях влияния эндогенных эстрогенов на уровень PCSK9 пока нет [34, 35].

Влияние PCSK9 на экспрессию других рецепторов.

Данные, полученные в исследованиях *in vitro*, свидетельствуют о том, что PCSK9 может в той или иной мере подавлять экспрессию рецепторов ЛПОНП, ApoE2 (LRP8) и LRP1 [36, 37]. Однако существование подобных взаимодействий в *in vivo* системах и их возможное влияние на физиологические процессы организма еще не изучено.

Помимо семейства рецепторов ЛПНП было показано влияние PCSK9 и на другие рецепторы. В частности в одной работ, выполненной на линии клеток HuH7 (гепатоцеллюлярная карцинома), было показано, что PCSK9 может снижать экспрессию рецептора CD81, наличие которого необходимо для инфицирования клетки вирусом гепатита с [38].

Физиологическая роль PCSK9.

Наиболее очевидной функцией PCSK9 является ее участие в регуляции экспрессии Р-ЛПНП на гепатоцитах, и, как результат, в контроле уровня холестерина ЛПНП крови. Кроме того, снижая плотность Р-ЛПНП на клетках печени, PCSK9 участвует в предотвращении обратного захвата ими вновь синтезированных и секретированных из гепатоцитов ЛПОНП, позволяя данным частицам достичь периферических тканей [25]. Принимая во внимание наличие взаимодействия с другими рецепторами, необходимо рассматривать PCSK9, как молекулу, обладающую потенциально более широким спектром физиологических активностей, чем нам представляется сегодня. Данных о роли PCSK9 в апоптозе нервных клеток, при изучении, которого она была открыта, довольно мало [39]. В исследовании на мышах продемонстрировано, что наиболее высокая экспрессия PCSK9 в нейронах мозжечка регистрируется в постнатальном периоде, а также после ишемического инсульта [40]. Предполагается, что PCSK9 уменьшает экспрессию ApoE2 рецептора на поверхности нейрона по механизму аналогичному снижению Р-ЛПНП на гепатоците. Это ведет к подавлению сигнальных анти-апоптогенных внутриклеточных путей, реализующихся через ApoE2 рецептор, в результате

чего запускается процесс апоптоза клетки [41]. Тем не менее, значимость опосредованного PCSK9 апоптоза нейронов окончательно не понятна. Так у мышей, нокаутированных по гену PCSK9, кроме значительно сниженного уровня холестерина, не было выявлено других фенотипических отличий от мышей дикого типа [4], в том числе не обнаружено значимых дефектов развития центральной нервной системы [36]. Кроме того, описаны несколько случаев полного отсутствия функционально активной PCSK9 у взрослых людей в результате гомо- или гетерозиготных мутаций в обоих аллелях соответствующего гена [42, 43, 44]. И наконец, имеются данные, свидетельствующие о том, что наличие гетерозиготных мутаций, обуславливающих снижение активности PCSK9, ассоциируется только с уменьшением уровня ЛПНП и не приводит к повышению риска онкологических заболеваний по сравнению с общей популяцией [44].

Заключение.

За прошедшие десять лет стало возможным определить функцию, строение и механизм действия PCSK9 – молекулы, синтезируемой в основном гепатоцитами, и принимающей участие в обмене холестерина, через регуляцию уровня экспрессии Р-ЛПНП. Стало понятно не только, каким образом PCSK9 участвует в разрушении Р-ЛПНП, но и какие факторы влияют на образование самой PCSK9. Было показано, что снижение уровня холестерина внутри клетки активирует SREBP-2 – белок, являющийся транскрипционным фактором как для Р-ЛПНП, так и для PCSK9. В результате, часть вновь экспрессированных на поверхности гепатоцита Р-ЛПНП оказывается разрушенной за счет конкурентного образования PCSK9. Открытие этого явления позволило понять одну из причин, почему

при увеличении дозы статинов не происходит соответствующего снижения ЛПНП и почему у части пациентов, даже на фоне терапии статинами в максимальной дозировке, не удается достичь целевых значений холестерина ЛПНП. Результаты популяционных исследований показали, что при наличии мутаций, обуславливающих повышение или же понижение функциональной активности PCSK9, развивается гиперхолестеринемия или понижение уровня холестерина ЛПНП соответственно, что находит свое отражение в увеличении или уменьшении риска развития ИБС. Учитывая важную роль, которую PCSK9 играет в метаболизме холестерина, не удивительно, что данная молекула стала активно изучаться, как мишень для терапевтического воздействия, в коррекции дислипидемии [45]. Важность разработки новых терапевтических подходов обусловлена тем, что, несмотря на весь арсенал имеющихся средств, дислипидемия по-прежнему является актуальной медицинской проблемой.

Между тем остается ряд нерешенных вопросов, ответы на которые возможно будут получены из последующих исследований. К примеру, почему, несмотря на то, что уровень экспрессии PCSK9 меняется на разных этапах развития организма, ее фармакологическое блокирование или генетически обусловленное отсутствие не приводит к отклонениям в онтогенезе млекопитающих. Также остаются не до конца изученными молекулярные механизмы разрушения Р-ЛПНП внутри гепатоцита. Принимая во внимание данные о возможном участии других рецепторов во внутрипеченочном клиренсе PCSK9, идентификация этих рецепторов имеет безусловный интерес. И наконец, для уточнения физиологической роли PCSK9, необходимо оценить эффекты, связанные с возможным регулированием экспрессии PCSK9 другими рецепторами помимо Р-ЛПНП.

Список литературы.

1. Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:431-438.
2. Qian YW, Schmidt RJ, Zhang Y, et al. Secreted PCSK9 downregulates low density lipoprotein receptor through receptor-mediated endocytosis. *J Lipid Res.* 2007;48:1488-1498.
3. Zhang DW, Lagace TA, Garuti R, et al. Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J Biol Chem.* 2007;282:18602-18612.
4. Rashid S, DE Curtis, R Garuti NN et al. Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking PCSK9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005;102:5374-5379.
5. Dubuc G, Chamberland A, Wassef H, et al. Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1454-1459.
6. Abifadel M, Varret M, Rabes JP et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet.* 2003;34:154-156.
7. Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH et al. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med.* 2006;354:1264-1272.
8. 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 U S A.* 2003; 100: 928-933.
9. Naumova RP, Tosi I, Patel D, et al. Severe hypercholesterolemia in four British families with the D374Y mutation in the PCSK9 gene: long-term follow-up and treatment response. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005; 25: 2654-2660.
10. Zaid A, Roubtsova A, Essalmani R et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration. *Hepatology.* 2008; 48: 646-654.
11. Benjannet, S, Rbainds D, Essalmani R, et al. NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 48865-48875.
12. Cumberham D, Danley DE, Geoghegan KF, et al. Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2007; 14: 413-419.
13. Piper DE, Jackson S, Liu Q, et al. The crystal structure of PCSK9: a regulator of plasma LDL cholesterol. *Structure.* 2007; 15: 545-552.
14. Brown MS, Goldstein JL. Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL. *J Lipid Res.* 2009;50(suppl):S15-S27.
15. Bottomley MJ, Cirillo A, Orsatti L, et al. Structural and biochemical characterization of the wild type PCSK9-EGF(AB) complex and natural familial hypercholesterolemia mutants. *J. Biol. Chem.* 284: 2009;1313-1323.
16. Surdo, P. L., M. J. Bottomley, A. Calzetta, et al. Mechanistic implications for LDL receptor degradation from the PCSK9/LDLR structure at neutral pH. *EMBO Rep.* 2011;12:300-1305
17. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest.* 2002; 109: 1125-1131.
18. Careskey HE, Davis RA, Alborn WE, et al. Atorvastatin increases human serum levels of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *J. Lipid Res.* 2008;49: 394-398.
19. Welder GI, Zineh MA, Pacanowski JS, et al. High-dose atorvastatin causes a rapid sustained increase in human serum PCSK9 and disrupts its correlation with LDL cholesterol. *J. Lipid Res.* 2010;51: 2714-2721.
20. Awan ZN, Seidah G, MacFadyen JG, et al. Rosuvastatin, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 concentrations, and LDL cholesterol response: the JUPITER trial. *Clin. Chem.* 2012;58:183-189.
21. Ballantyne CM, Abate N, Yuan Z, et al. Dose-comparison study of the combination of ezetimibe and simvastatin versus atorvastatin in patients with hypercholesterolemia: the Vytorin Versus Atorvastatin (VYVA) study. *Am Heart J.* 2005;149:464-473.
22. Essalmani R, Susan-Resiga D, Chamberland A, et al. In vivo evidence that furin from hepatocytes inactivates PCSK9. *J. Biol. Chem.* 2011;286: 4257-4263.
23. Benjannet S, Rbainds D, Hamelin J, et al. 2006. 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.* 30561-30572.
24. Allard D, Amsellem S, Abifadel M, et al. Novel mutations of the PCSK9 gene cause variable phenotype of autosomal dominant hypercholesterolemia. *Hum. Mutat.* 2005;26: 497-503.
25. Grefhorst A, McNutt MC, Lagace TA, et al. Plasma PCSK9 preferentially reduces liver LDL receptors in mice. *J Lipid Res.* 2008; 49: 1303-1311.
26. Schmidt RJ, Beyer TP, Bensch WR et al. Secreted proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces both hepatic and extra-hepatic low-density lipoprotein receptors in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 370: 634-640.
27. Mayer G, Poirier S, Seidah NG. Annexin A2 is a C-terminal PCSK9-binding protein that regulates endogenous low density lipoprotein receptor levels. *J Biol Chem.* 2008; 283: 31791-83101.
28. Michaely P, Li WP, Anderson RG, et al. The modular adaptor protein ARH is required for low density lipoprotein (LDL) binding and internalization but not for LDL receptor clustering in coated pits. *J Biol Chem.* 2004; 279: 34023-34031.
29. Browning JD, Horton JD. Fasting reduces plasma proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 and cholesterol biosynthesis in humans. *J Lipid Res.* 2010;51: 3359-3363.

30. Persson L, Cao G, Stable L, et al. Circulating proprotein convertase subtilisin kexin type 9 has a diurnalrhythm synchronous with cholesterol synthesis and is reduced by fasting in humans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010;30: 2666-2672.
31. Persson L, Galman C, Angelin B, Rudling M. Importance of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 in the hormonal and dietary regulation of rat liver low-density lipoprotein receptors. *Endocrinology.* 2009;150: 1140-1146.
32. Costet P, Cariou B, Lambert G, et al. Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c. *J Biol Chem.* 2006;281:6211-6218.
33. Baass A, Dubuc G, Tremblay M, et al. Plasma PCSK9 is associated with age, sex, and multiple metabolic markers in a population-based sample of children and adolescents. *Clin.Chem.* 2009;55: 1637-1645.
34. Lakoski SG, Lagace TA, Coben JC, et al. Genetic and metabolic determinants of plasma PCSK9 levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009;94: 2537-2543.
35. Persson L, Henriksson P, Westerlund E, et al. Endogenous Estrogens Lower Plasma PCSK9 and LDL Cholesterol But Not Lp(a) or Bile Acid Synthesis in Women. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2012;32: 810-814.
36. Poirier S, Mayer G, Benjamet 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.
37. Lagace TA, Curtis DE, Garuti R et al. Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. *J Clin Invest.* 2006; 116: 2995-3005.
38. Labonte P, Begley S, Guevin C et al. PCSK9 impedes hepatitis C virus infection in vitro and modulates liver CD81 expression. *Hepatology.* 2009; 50: 17-24.
39. Bingham B, Shen R, Kotnis S, et al. Proapoptotic effects of NARC 1 (=PCSK9), the gene encoding a novel serine proteinase. *Cytometry A.* 2006;69:1123-1131.
40. 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.
41. Kysenius K, Muggalla P, M tlik K, et al. PCSK9 regulates neuronal apoptosis by adjusting ApoER2 levels and signaling. *Cell Mol Life. Sci.* 2012 Jun;69(11):1903-1916.
42. Zhao Z, Tuakli-Wosornu Y, Lagace TA et al. Molecular characterization of loss-of-function mutations in PCSK9 and identification of a compound heterozygote. *Am J Hum Genet.* 2006; 79:514-523.
43. Hooper AJ, Marais AD, Tanyanyiwa DM, et al. The C679X mutation in PCSK9 is present and lowers blood cholesterol in a Southern African population. *Atherosclerosis.* 2007;193: 445-448.
44. Folsom AR, Peacock JM, Boerwinkle E. Sequence variation in proprotein convertase subtilisin / kexin type 9 serine protease gene, low LDL cholesterol, and cancer incidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007; 16: 2455-2458.
45. Lambert G, Sjouke B, Choque B, et al. The PCSK9 decade. *J Lipid Res.* 2012;53:2515-2524.