

# PCSK9 – początek przełomu w zapobieganiu i leczeniu miażdżycy?

PCSK9 – break through in the prevention and treatment of arteriosclerosis?

Bohdan Lewartowski

Zakład Fizjologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

Kardiologia Pol 2009; 67: 782-786

## Wstęp

Cholesterol jest ważnym składnikiem błon komórkowych oraz prekursorem hormonów sterydowych, kwasów żółciowych i witaminy D. Wobec tego musi on być transportowany z wątroby do komórek różnych tkanek. Częsteczki cholesterolu są hydrofobowe, więc nie mogą rozpuszczać się w osoczu – są przenoszone w postaci związanej z transporterem. Zasadniczym transporterem cholesterolu do tkanek są lipoproteiny o niskiej gęstości (ang. *low density lipoproteins*, LDL). Jednostka transportująca LDL jest dość złożona (Rycina 1). Zbudowana jest z kulistej warstwy cząsteczek fosfolipidów, których końce hydrofilne skierowane są na zewnątrz, a hydrofobowe do wewnątrz. Końce hydrofobowe wiążą ok. tysiąca cząsteczek cholesterolu. Na hydrofilnej powierzchni jednostki transportującej zaadsorbowana jest jedna cząsteczka białka apolipoproteiny B (APO B).

Na powierzchni błon komórkowych znajdują się receptory LDL (LDLR), które rozpoznają i wiążą APO B (Rycina 1). Związanie APO B zapoczątkowuje proces endocytozy. Część błony komórkowej zawierająca receptor ulega wgłobieniu, tworząc pęcherzyk otaczający LDLR. Pęcherzyk ten oddziela się od błony komórkowej i zagłębia w cytoplazmie. Niskie pH wnętrza komórki powoduje oddzielenie LDL od receptora, po czym pęcherzyk dzieli się na dwie części. Pęcherzyk zawierający uwolniony LDL łączy się z lizosomem, tworząc wtórny lizosom. Jego enzymy uwalniają cholesterol do cytoplazmy. Pęcherzyk błonowy z uwolnionym receptorem wraca do błony komórkowej, eksponując receptor na jej zewnętrznej powierzchni, gdzie może on ponownie wiązać LDL [1]. Dla recykulacji LDLR niezbędny jest jego fragment zbliżony strukturalnie do nabłonkowego czynnika wzrostu (EGF-A) (Rycina 1).

Jak wynika z danych epidemiologicznych, podwyższone stężenie LDL w osoczu jest istotnym czynnikiem ryzyka rozwoju miażdżycy i jej powikłań. Lipoproteiny o niskiej gęstości wnikają do błony wewnętrznej tętnicy, gdzie są wychwytywane przez makrofagi na drodze endocytozy ich LDLR i receptorów wymiatających (LDL, które podległy oksydacji) oraz endocytozy fazy płynnej. Wychwyt LDL przez makrofagi stanowi wstęp do ich przekształcenia w komórki piankowe odgrywające ważną rolę w procesie tworzenia blaszki miażdżycowej. Odwrotny proces, tj. transport cholesterolu z makrofagów i przez śródbłonek do krwi, dokonuje się z udziałem receptorów HDL. Tak więc proces miażdżycowy zależy od przenikania LDL do błony wewnętrznej tętnicy, a intensywność tego przenikania uwarunkowana jest stanem śródbłonek i stężeniem LDL w osoczu. Stężenie LDL w osoczu zależy od podaży cholesterolu w diecie, jego endogennej syntezy oraz usuwania LDL z krwi do wątroby. Wychwyt LDL przez hepatocyty uwarunkowany jest ilością ich LDLR. Zwiększenie ilości dostępnych wątrobowych LDLR powoduje obniżenie stężenia LDL w osoczu, a zmniejszenie powoduje hipercholesterolemię. Badania kilku ostatnich lat wskazują, że głównym elementem regulacji dostępności wątrobowych LDLR, a tym samym stężenia LDL we krwi, jest białko określane symbolem PCSK9.

## PCSK9

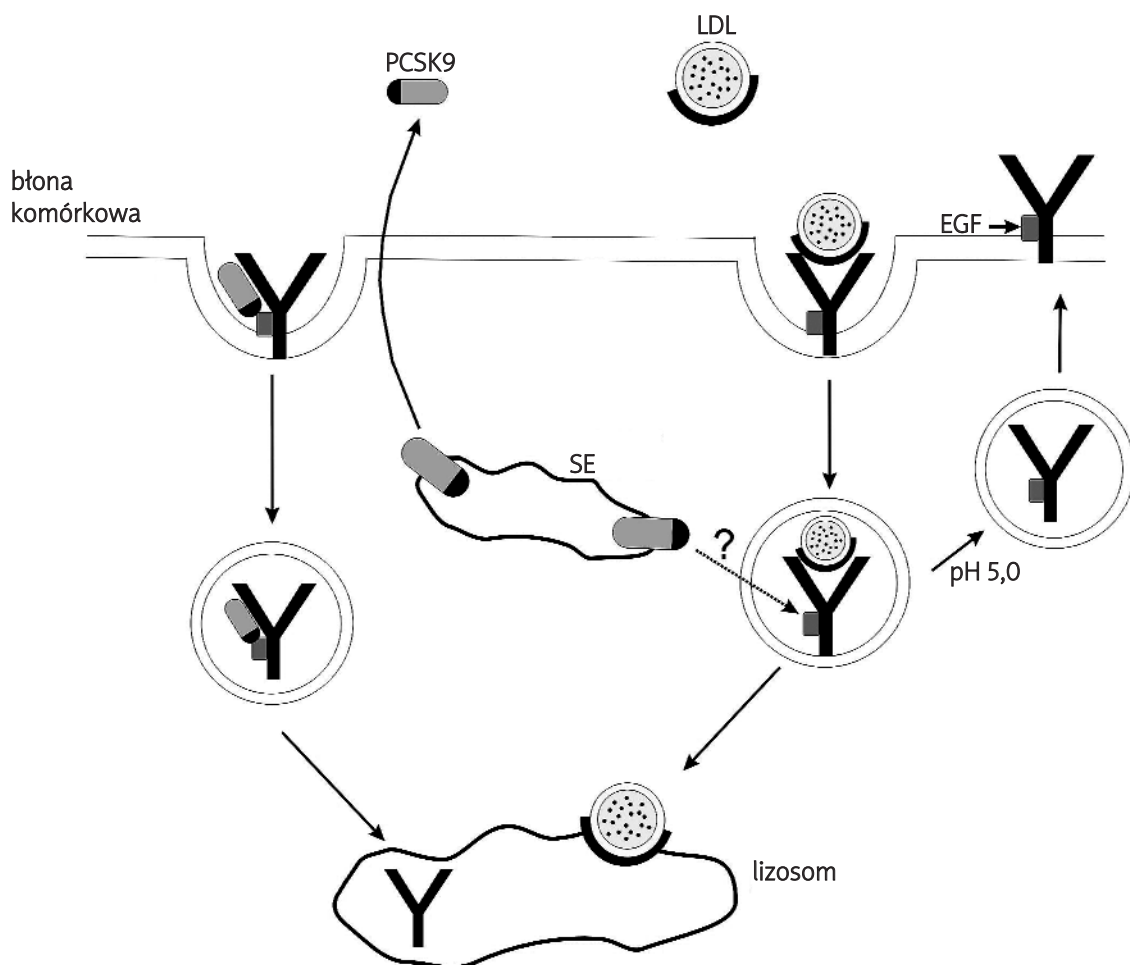
Białko PCSK9 (ang. *proprotein convertase subtilisin kexin 9*) czasem określane jest jako NARC-1 (ang. *neural apoptosis-regulated convertase 1*) [2]. W jego skład wchodzi szereg domen, poczynając od prodomeny N-końca, po której następuje domena katalityczna, a następnie bogata w cysteinę domena C-końca. PCSK9 przechodzi w sia-

---

### Adres do korespondencji:

prof. dr hab. n. med. Bohdan Lewartowski, Zakład Fizjologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, tel.: +48 22 569 38 40, e-mail: blew@cmkp.edu.pl

Praca wpłynęła: 30.03.2009. Zaakceptowana do druku: 01.04.2009.



**Rycina 1.** Obieg receptorów LDL (LDLR) w hepatocycie. Receptory, które związały LDL, ulegają endocytozie, ale po odłączeniu LDL pod wpływem wewnątrzkomórkowego pH = 5,0 powracają do błony komórkowej. Receptory, z którymi związało się PCSK9, ulegają endocytozie i destrukcji w lizosomach

*Y – LDLR, LDL – jednostka transportująca LDL, SE – siateczka endoplazmatyczna, EGF – fragment LDLR podobny strukturalnie do nabłonkowego czynnika wzrostu, niezbędny dla recykulacji LDLR do błony komórkowej i blokowany przez PCSK9*

teczce endoplazmatycznej komórki proces autokatalityczny, w którym prodomena zostaje przez domenę katalityczną oddzielona od cząsteczki PCSK9, ale następnie ponownie się z nią wiąże. To autokatalityczne przekształcenie jest niezbędne dla transportu cząsteczki PCSK9 do przestrzeni zewnątrzkomórkowej i do krwi. Ekspresja PCSK9 zachodzi najintensywniej w hepatocytach, a ponadto w jelicie cienkim i w bardzo małym stopniu w nerkach, płucach, śledzionie i grasicy [2].

Krążące PCSK9 wiąże się z LDLR, przede wszystkim hepatocytów. Nie stwierdzono wiązania z LDLR nadnerczy, w których LDLR obficie występują [3, 4].

PCSK9 wiąże się z fragmentem EGF-A LDLR, co powoduje internalizację receptora, podobnie jak to ma miejsce w przypadku związania LDL [5]. Niskie pH (5) wnętrza komórki powoduje zwiększenie o 150 razy powinowactwa PCSK9 do EGF. Ponieważ fragment EGF-A jest niezbędny dla recykulacji receptora z endosomu do błony komórko-

wej, jego związanie przez PCSK9 zatrzymuje LDLR w komórce, powodując ich redystrybucję do lizosomów, w których ulegają one degradacji [6, 7]. Alternatywną drogą działania PCSK9 jest jego wewnątrzkomórkowe wiązanie się z receptorem, który uległ internalizacji na skutek wiązania z LDL, i związanie go z lizosomem [8] (Rycina 1). W ten sposób PCSK9 powoduje obniżenie gęstości receptorów LDL na powierzchni hepatocytów, a tym samym ogranicza ilość LDL mogących ulec internalizacji i metabolizmu w tych komórkach. Tak więc wzrost ekspresji PCSK9 pociąga za sobą wzrost stężenia LDL w osoczu, a zahamowanie ekspresji – jego spadek.

Zaskakujące jest stwierdzenie, że fragment PCSK9 wiążący się z LDL jest oddalony od centrum katalitycznego enzymu. Stwierdzono ponadto, że nieczynna katalitycznie odmiana PCSK9 oddziałuje z LDLR tak samo jak czynna katalitycznie. Tak więc interakcja PCSK9 – LDLR nie jest wynikiem proteolitycznego działania tego enzymu [9, 10].

Jego autokatalityczne przekształcenie jest natomiast niezbędne dla wydzielenia zsyntetyzowanego PCSK9 z komórki do przestrzeni zewnątrzkomórkowej i osocza.

## Mutacje PCSK9 w populacjach ludzkich

Zainteresowanie PCSK9 zostało rozbudzone odkryciem, że mutacje tego genu (F216L i S127R) są, obok mutacji genów kodujących LDLR i APO B, zaangażowane w rozwój autosomalnej dominującej hipercholesterolemii prowadzącej do przedwczesnego rozwoju miażdżycy [11]. Obecnie znanych jest już wiele mutacji PCSK9 powodujących nasilenie intensywności destrukcji LDLR (ang. *gain of function*, GOF) lub jej spadek (ang. *loss of function*, LOF). Mechanizm tych zmian w wypadku poszczególnych mutacji może być różny. Poszczególne mutanty PCSK9 mogą się różnić stopniem powinowactwa do EGF-A LDLR. Ponadto PCSK9 jest degradowane przez inne proproteinowe konwertazy: PC5/6A oraz furynę (furin). Poszczególne mutanty mogą być przez nie degradowane z różną intensywnością. Wreszcie cząsteczki PCSK9 mogą się łączyć w homodimery i homotrimery o zwiększonej aktywności w degradacji LDLR. Niektóre mutanty PCSK9 wykazują zwiększoną zdolność do tworzenia takich połączeń [1, 12].

W społeczeństwach zachodnich najliczniej występują mutacje typu LOF. U 2,6% Afroamerykanów substytucja aminokwasów Y142X i C679X powoduje 28-procentowy spadek zawartości LDL w osoczu i 88-procentowy spadek ryzyka choroby wieńcowej [13]. Wśród przedstawicieli rasy kaukaskiej występująca w 3,2% mutacja R46L powoduje 15-procentowy spadek zawartości LDL w osoczu i 45-procentowy spadek ryzyka choroby wieńcowej [13] oraz schorzeń tętnic obwodowych [14]. W populacji polskiej substytucję R46L stwierdzono w 2,6%, przy czym osoby będące nosicielami tej mutacji miały zawartość LDL w osoczu o ok. 14% niższą od zawartości u osób nieposiadających tej odmiany PCSK9. W grupie tej stwierdzono zmniejszenie o ok. 50% ryzyka chorobowości w odniesieniu do zawału serca i pozostałych chorób układu sercowo-naczyniowego [15].

W różnych populacjach wykryto ponadto szereg innych mutacji (L253F A433T, Y142X i C679X) związanych z niskim stężeniem LDL i redukcją ryzyka choroby wieńcowej [12]. Ponadto znaleziono osobę, u której stwierdzono 2 inaktywujące mutacje PCSK9, brak tego białka w osoczu oraz niski poziom LDL (14 mg/dl) przy braku jakichkolwiek objawów chorobowych [12].

W różnych populacjach występują również mutacje typu GOF związane z hipercholesterolemią i przedwczesną miażdżycą (S127R, D129G, F216L, D374H). Ciężka forma hipercholesterolemii spowodowana substytucją aminokwasów D374Y występuje względnie często w populacjach Wielkiej Brytanii i Norwegii. U nosicieli tej mutacji miażdżycy i jej powikłania rozwijają się o ok. 10 lat wcześniej niż w całej populacji [16, 17].

Tak więc badania polimorfizmu genu kodującego PCSK9 dostarczyły poważnych argumentów przemawiających

za podstawowym znaczeniem tego białka w regulacji zawartości LDL w osoczu u ludzi. Doświadczenia na zwierzętach oraz *in vitro* na hodowlach komórek zwierzęcych i ludzkich dostarczyły bardziej bezpośrednich dowodów oraz pozwoliły na wyjaśnienie mechanizmów działania PCSK9, które częściowo zostały już powyżej przedstawione.

## Doświadczenia na zwierzętach

Frank-Komenetsky i wsp. [18] stwierdzili, że uciszenie genu PCSK9 u myszy poprzez wstrzyknięcie małego interferującego RNA (siRNA) (5 mg/kg) powodowało 60–70-procentowe zmniejszenie zawartości transkrypty mRNA dla PCSK9 w wątrobie oraz ok. 30-procentowy spadek stężenia PCSK9 w surowicy. U szczurów zabieg ten powodował spadek wątrobowego mRNA dla PCSK9 o 50–60%, spadek stężenia cholesterolu w osoczu o 50–60% oraz 3–5-krotny wzrost ilości wątrobowych LDLR. U małą podanie 5 mg/kg siRNA powodowało po 72 godz. obniżenie zawartości LDL w osoczu o 56% i jego powrót do wyjściowego poziomu po 14 dniach. U małą i myszy stwierdzono spadek stężenia PCSK9 w osoczu. Uciszenie genu PCSK9 nie miało wpływu na HDL i trójglicerydy (TG).

Podobne wyniki uzyskano u myszy z wyłączeniem genu PCSK9 typu knock-out. Zwiększeniu liczby LDLR w wątrobie nie towarzyszyło zwiększenie ich mRNA, co wskazuje, że było ono wynikiem zahamowania ich destrukcji, a nie zwiększenia ekspresji. Ponadto u myszy tych stwierdzono nasilenie działania statyn obniżającego stężenie cholesterolu we krwi [19]. W innym badaniu zahamowanie ekspresji genu PCSK9 antysensowym oligonukleotydem powodowało obniżenie zawartości LDL w osoczu również u myszy z hipercholesterolemią [20].

Transgeniczne myszy z nadekspresją ludzkiego PCSK9 wydzielały do plazmy znaczne ilości tego białka, co powodowało spadek liczby LDLR w hepatocytach oraz wzrost stężenia cholesterolu do poziomu stwierdzanego u myszy z knock-outem LDLR [21]. Podobne wyniki uzyskano u myszy zainfekowanych adenowirusem konstytutywnie powodującym nadekspresję mysiego PCSK9-Ad. U zwierząt tych stwierdzano 5-krotny wzrost stężenia LDL bez zmian HDL oraz prawie całkowite zniknięcie białka LDLR z wątroby [22].

Nadekspresja PCSK9 u myszy transgenicznych powodowała spadek zawartości LDLR również w wątrobie połączonych z nimi krążeniowo myszy normalnych. Stanowi to dowód, że z LDLR wiąże się PCSK9 krążące we krwi [23].

## Regulacja ekspresji i działania PCSK9

### Regulacja ekspresji PCSK9 przez cholesterol

Bezpośrednim aktywatorem ekspresji LDLR i PCSK9 w komórkach jest czynnik transkrypcyjny SREBPS-2 (ang. *sterol regulatory element binding proteins*) [24, 25]. Zsyntetyzowany SREBPS-2 zostaje zakotwiczony w siateczce endoplazmatycznej i w otoczkę jądra komórkowego w kompleksie z białkiem SCAP (ang. *SREBP cleavage activating*

*protein*). SCAP jest właściwym sensorem stężenia cholesterolu w przestrzeni siateczki endoplazmatycznej i jego zawartości w jej błonach. Jeżeli stężenie to jest wyższe niż 5%, SCAP przytrzymuje SREBP w ER, a więc nie może on wpływać na ekspresję genów. Wobec tego ekspresja LDLR się zmniejsza, co chroni komórkę przed przetądowaniem cholesterollem. Co prawda, jednocześnie zmniejsza się również ekspresja PCSK, co zmniejsza destrukcję LDLR (skutek odwrotny do zahamowania ekspresji). Wydaje się jednak, że zahamowanie ekspresji przeważa. Jeżeli stężenie cholesterolu spada do 3%, SCAP transportuje SREBP do aparatu Golgiego, gdzie ulega on przekształceniu umożliwiającemu jego transfer do jądra komórkowego. Tam wiąże się on z promotorami różnych genów, m.in. z PCSK9 oraz LDLR, pobudzając ich ekspresję. A więc znowu mamy dwa przeciwstawne efekty: nasilenie ekspresji LDLR i nasilenie ich destrukcji. W tym wypadku zmiana ekspresji LDLR przeważa, wobec czego gęstość LDLR w błonie komórkowej się zwiększa, co umożliwia nasilenie dokomórkowego transportu cholesterolu. Tak więc regulacja poprzez SREBP ekspresji LDLR stanowi mechanizm komórkowej homeostazy cholesterolowej [26–28].

Nie jest jasne, jaki jest sens biologiczny jednoczesnego pobudzania przez SREBP-2 ekspresji PCSK9 i LDLR. Jedną z możliwości jego wyjaśnienia stwarza fakt, że osłabianie przez PCSK9 efektów zmian ekspresji LDLR dotyczy tylko wątroby, ponieważ PCSK9 nie działa na receptory LDL w innych komórkach. W ten sposób PCSK9 może łagodzić skutki zmian ekspresji LDLR hepatocytów przez ich wewnątrzkomórkowy cholesterol w stosunku do poziomu LDL w osoczu. Na przykład dieta bogata w cholesterol zwiększa jego doptyw do wątroby i wychwyt przez hepatocyty. Prowadzi to do zmniejszenia ekspresji LDLR. Gdyby nie było to buforowane przez jednoczesne zmniejszenie destrukcji LDLR na skutek zahamowania ekspresji PCSK9, prowadziłyby do bardzo znacznego ograniczenia usuwania LDL z krwi, co dodatkowo przyczyniłoby się do bardzo dużych wzrostów zawartości cholesterolu w osoczu. Ten mechanizm mógłby działać odwrotnie np. w głodzeniu, kiedy zachodzi wzrost ekspresji LDLR i PCSK. Tak więc byłby to często występujący w ustroju mechanizm samoograniczenia układu spłaszczający skutki zmian jego aktywności. Inna możliwość to ograniczenie czasu przetrwania receptora LDL przez skrócenie cyklu ekspresji i destrukcji, co mogłoby korzystnie wpływać na jego stan czynnościowy [19].

### Interakcja PCSK9 ze statynami

Statyny aktywują SREBP-2, który pobudza ekspresję zarówno PCSK9, jak i LDLR. Wobec tego statyny pobudzają zarówno tworzenie, jak i destrukcję LDLR. Podobnie jak się to dzieje w wypadku zmniejszenia komórkowej zawartości cholesterolu, pobudzenie ekspresji PCSK9 osłabia efekt pobudzenia ekspresji LDLR i spadku zawartości LDL w osoczu. Wobec tego zahamowanie ekspresji PCSK na-

siła efekt działania statyn, natomiast zwiększenie tej ekspresji może być przyczyną oporności na statyny [19].

### Wpływ stanów zapalnych na ekspresję PCSK9

Infekcje i zapalenia prowadzą do głębokich zaburzeń w metabolizmie lipidów, a w szczególności do obniżonego wychwytu LDL [29]. Wykazano, że infekcja, a nawet jałowe zapalenie, powoduje u myszy wielokrotny wzrost ekspresji PCSK9 w wątrobie i nerkach oraz spadek białka receptorów LDL w wątrobie i wzrost stężenia LDL w osoczu [30]. Wynik ten dostarcza niewątpliwie co najmniej jednego z ogniw łączących procesy zapalne z nasileniem zmian miażdżycowych.

### Regulacja przez fibraty

Ekspresja PCSK9 jest hamowana przez fibraty na poziomie promotora. Ponadto fibraty pobudzają ekspresję dwu innych proproteinowych konwertaz: PCS5/6A oraz furyny, które degradowują PCSK9 [31].

### Blokowanie wiązania PCSK9 z LDLR

Oddziaływanie PCSK9 na stężenie LDL w osoczu uważane jest jego związaniem z domeną EGF-A receptorów LDL. Shan i wsp. [32] otrzymali syntetyczny peptyd EGF-A, który wiązał się z PCSK9, blokując tym samym jego wiązanie z LDLR. W wyniku tego syntetyczny EGF-A zapobiegał degradacji przez PCSK9 receptorów LDL i spadkowi poboru LDL w hodowli hepatocytów HepG2.

### Pleiotropowe działania PCSK9

Zwykle tak bywa, że nowo odkryte czynne białko, po za pierwotnie opisaną funkcją, zaangażowane jest w szereg innych, nieraz licznych zjawisk. Wydaje się, że dotyczy to również PCSK9. Stwierdzono mianowicie, że pobudza ono regenerację hepatocytów w uszkodzonej wątrobie [8] oraz pobudza różnicowanie neuronów [2].

### Podsumowanie

Badania genetyczne populacji ludzkich oraz doświadczenia na zwierzętach i doświadczenia *in vitro* na komórkach ludzkich i zwierzęcych dowodzą, że PCSK9 jest głównym regulatorem stężenia LDL w osoczu krwi ludzi i zwierząt, a tym samym ma istotny wpływ na rozwój miażdżycy i jej powikłań. Regulacja polega na wiązaniu się PCSK9 z domeną EGF-A receptorów LDL wątroby, ich internalizacji i destrukcji w lizosomach. W wyniku tego liczba dostępnych receptorów LDL maleje, a tym samym maleje wychwyt LDL przez wątrobę, co prowadzi do wzrostu ich stężenia w osoczu. PCSK9 osłabia hipolipemizujący efekt działania statyn. Doświadczalnie wykazana możliwość hamowania ekspresji PCSK9 przez uciszanie jego genu lub blokowanie jego destrukcyjnego wpływu na LDLR przez syntetyczny EGF-A otwiera drogę do dalszych badań nad wykorzystaniem roli PCSK9 w metabolizmie LDL w zapobieganiu i leczeniu miażdżycy.

## Piśmiennictwo

1. Costet P, Krempf M, Cariou B. PCSK9 and LDL cholesterol: unraveling the target to design the bullet. *Trends Biochem Sci* 2008; 33: 426-34.
2. Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, et al. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 928-33.
3. Grefhorst A, McNutt MC, Lagace TA, Horton JD. Plasma PCSK9 preferentially reduces liver LDL receptors in mice. *J Lipid Res* 2008; 49: 1303-11.
4. 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.
5. Qian YW, Schmidt RJ, Zhang Y, et al. Secreted PCSK9 downregulates low density lipoprotein receptor through receptor-mediated endocytosis. *J Lipid Res* 2007; 48: 1488-98.
6. Zhang DW, Lagace TA, Garuti R, et al. Binding protein 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: 18602-12.
7. Fisher TS, Lo Surdo P, Pandit S, et al. Effects of pH and low density lipoprotein (LDL) on PCSK9-dependent LDL receptor regulation. *J Biol Chem* 2007; 282: 20502-12.
8. Zaid A, Roubtsova A, Essalmani R, et al. Protein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration. *Hepatology* 2008; 48: 646-54.
9. Li J, Tumanut C, Gavigan JA, et al. Secreted PCSK9 promotes LDL receptor degradation independently of proteolytic activity. *Biochem J* 2007; 406: 203-7.
10. Peterson AS, Fong LG, Young SG. PCSK9 function and physiology. *J Lipid Res* 2008; 49: 1595-9.
11. Abifadel M, Varret M, Rabes JP, et al. C. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet* 2003; 34: 154-6.
12. Pandit S, Wisniewski D, Santoro JC, et al. Functional analysis of sites within PCSK9 responsible for hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 2008; 49: 1333-43.
13. Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH Jr, Hobbs HH. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med* 2006; 354: 1264-72.
14. Folsom AR, Peacock JM, Boerwinkle E. Variation in PCSK9, low LDL cholesterol, and risk of peripheral arterial disease. *Atherosclerosis* 2009; 202: 211-5.
15. Kostrzewa G, Broda G, Kurjata P, et al. Effect of protein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) 46L gene polymorphism on LDL cholesterol concentration in a Polish adult population. *Mol Genet Metab* 2008; 94: 259-62.
16. Naoumova RP, Tosi I, Patel D, et al. Severe hypercholesterolemia in four British families with the D374Y mutations in the PCSK9 gene: long term follow-up and treatment response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 2654-60.
17. Soutar AK, Naoumova RP. Mechanisms of disease: genetic causes of familial hypercholesterolemia. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2007; 4: 214-25.
18. Frank-Kamenetsky M, Grefhorst A, Anderson NN, et al. Therapeutic RNAi targeting PCSK9 acutely lowers plasma cholesterol in rodents and LDL cholesterol in nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 11915-20.
19. Rashid S, Curtis DE, Garuti R, et al. Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 5374-9.
20. Graham MJ, Lemonidis KM, Whipple CP, et al. Antisense inhibition of protein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces serum LDL in hyperlipidemic mice. *J Lipid Res* 2007; 48: 763-7.
21. 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.
22. Maxwell KN, Breslow JL. Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 7100-5.
23. Hammer RE, Horton JD. Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. *J Clin Invest* 2006; 116: 2995-3005.
24. Park SW, Moon YA, Horton JD. Post-transcriptional regulation of low density lipoprotein receptor protein by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a in mouse liver. *J Biol Chem* 2004; 279: 50630-8.
25. Jeong HJ, Lee HS, Kim KS, et al. Sterol-dependent regulation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 expression by sterol-regulatory element binding protein-2. *J Lipid Res* 2008; 49: 399-409.
26. Weber LW, Boll M, Stampfl A. Maintaining cholesterol homeostasis: Sterol regulatory element-binding proteins. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3081-8.
27. Radhakrishnan A, Goldstein JL, McDonald JG, Brown MS. Switch-like control of SREBP-2 transport triggered by small changes in ER cholesterol: a delicate balance. *Cell Metab* 2008; 8: 512-21.
28. Leblond F, Seidah NG, Precourt LP, et al. Regulation of the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296: G805-15.
29. Khovidhunkit W, Kim MS, Memon RA, et al. Effects of infection on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J Lipid Res* 2004; 45: 1169-96.
30. Feingold KR, Moser AH, Shigenaga JK, et al. Inflammation stimulates the expression of PCSK9. *Biochem Biophys Res Comm* 2008; 374: 341-4.
31. Kourimate S, Le May C, Langhi C, et al. Dual mechanisms for the fibrate-mediated repression of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *J Biol Chem* 2008; 283: 9666-73.
32. Shan L, Pang L, Zhang R, et al. PCSK9 binds to multiple receptors and can be functionally inhibited by an EGF-A peptide. *Biochem Biophys Res Comm* 2008; 375: 469-73.