

MECCANISMI DI MALATTIA

LONG NON-CODING RNA E ATEROSCLEROSI

Long non-coding RNAs and atherosclerosis

**BIANCA PAPOTTI, CINZIA MARCHI, MARCELLA PALUMBO,
FRANCO BERNINI, NICOLETTA RONDA**

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

SUMMARY

The recent discovery that only about 1-2% of the human genome encodes proteins has paved the way, thanks to the development of sequencing technologies, to the identification of non-coding transcripts, starting a new era in RNA biology. Among non-coding transcripts, long non-coding RNAs (lncRNAs) represent a heterogeneous group of non-protein-coding RNA, although the molecular mechanisms by which lncRNAs control gene expression and cell signalling pathways are still under investigation. Recently findings highlighted the potential regulatory function of some lncRNAs in various processes related to atherosclerosis, such as endothelial dysfunction, vascular damage, immune response and lipid metabolism. For example, some lncRNAs have been implicated in endothelial dysfunction by regulating endothelial cell proliferation and migration (H19, MALAT1) or angiogenesis (MANTIS, MEG3). Other lncRNAs have been involved in modulating vascular smooth muscle cells proliferation, differentiation and vascular remodeling (e.g. ANRIL, linc-p21, MYOSLID, SENCER, SMILR). Finally, further lncRNAs are involved in immune response and inflammation (linc00305, lincRNA-Cox2, THRIL), while others regulate macrophages polarization (GAS5) and lipid metabolism (LeXis, LncHR1, ApoA4-AS). The objective of the present review is to recapitulate recent developments on the expression, function and mechanism of action of lncRNAs implicated in atherosclerosis, obtained from animal models and in humans. The knowledge of the biological activity of the lncRNAs involved in the pathogenesis and progression of the atherosclerotic lesion could be crucial not only for the identification of novel biomarkers related to atherosclerosis but also to find out innovative therapeutic targets.

Key words: *LncRNA; Non-coding RNAs; RNA biology; Atherosclerosis; Vascular biology.*

Introduzione

La porzione non codificante del genoma rappresenta un campo di indagine estremamente complesso e solo in parte cono-

sciuto. Già dalla metà del secolo scorso, infatti, era noto che solo una piccolissima porzione dell'intero genoma umano viene trascritta in RNA messaggero, poi tradotto in proteine, e che determinate porzioni genomiche sono trascritte in RNA con funzione non codificante, ma strutturale o funzionale, quali RNA ribosomiale e RNA transfer. Solo recentemente, grazie a progetti di sequenziamento di RNA su larga scala, sono stati identificati centinaia di

Indirizzo per la corrispondenza

Cinzia Marchi
Dipartimento di Scienze degli Alimenti
e del Farmaco, Università di Parma
E-mail: cinzia.marchi2@studenti.unipr.it

RNA non codificanti (non-coding RNAs - ncRNAs), suggerendo che solo l'1-2% dei trascritti codifica per proteine (1). La maggior parte dei ncRNA per i quali è nota l'attività biologica è rappresentata dai long non-coding RNAs (lncRNAs). Si tratta di una famiglia di RNA estremamente eterogenea e ancora scarsamente caratterizzata, i cui componenti hanno più di 200 nucleotidi e una complessa struttura secondaria. I lncRNA hanno alcune caratteristiche simili agli mRNA codificanti: vengono, infatti, trascritti dalla RNA polimerasi II e presentano il rivestimento sull'estremità 5', mentre l'estremità 3' è poliadenilata; inoltre, in seguito a trascrizione, lo splicing permette la formazione di diversi lncRNA maturi. A seconda della localizzazione genomica, i lncRNA vengono classificati in lncRNA senso, antisenso, intronici, intergenici ed enhancers (2).

La maggior parte degli lncRNA ad oggi noti ha una sequenza scarsamente conservata, a differenza di trascritti codificanti che, invece, sono caratterizzati da un elevato livello di conservazione (3). L'espressione dei lncRNA è specifica per la tipologia cellulare e per lo stadio di sviluppo, svolgendo un ruolo chiave nella regolazione di svariate funzioni cellulari. I lncRNA, grazie alla particolare stabilità che li caratterizza, sono considerati potenti regolatori di diversi processi biologici, la cui funzione è differente a seconda della loro localizzazione cellulare. I lncRNA localizzati nel nucleo sono infatti responsabili di una fine regolazione del processo trascrizionale. Sono in grado, ad esempio, di sequestrare fattori di trascrizione (TFs) o di guidarli verso il sito di attivazione trascrizionale. Inoltre, i lncRNA nucleari guidano i complessi di rimodellamento della cromatina nelle porzioni cromosomiche corrette, inducendo modificazioni istoniche o fungendo da RNA enhancer (eRNA). Infine, spe-

Elenco degli argomenti trattati

- Biologia dei lncRNA
- LncRNA e disfunzione endoteliale
- LncRNA e danno vascolare
- LncRNA nell'infiammazione e nel metabolismo lipidico
- LncRNAs come biomarcatori e target terapeutici

cifici lncRNA nucleari sono in grado di promuovere il trasporto nucleocitoplasmatico di determinati fattori di trascrizione e di regolare lo splicing alternativo dei pre-mRNA. Al contrario, i lncRNA localizzati nel citoplasma agiscono regolando la stabilità degli mRNA e interferendo con i processi traduzionali, fungendo da scaffold per svariati complessi proteici. Altre funzioni regolatorie dei lncRNA citoplasmatici includono la stabilizzazione dei complessi ribonucleoproteici (RNP), la fosforilazione e l'attivazione di vie di segnale intracellulari. Inoltre, determinati lncRNA, in seguito a splicing, possono diventare circolari (circular lncRNAs) e sequestrare miRNA o regolare la maturazione del RNA ribosomiale (4). Infine, alcuni lncRNA sono rilasciati in esosomi o microvescicole e sembrano essere coinvolti nella comunicazione intercellulare (5) (*Figura 1*).

Ad oggi, solo circa 200 lncRNA identificati nell'uomo sono stati caratterizzati dal punto di vista funzionale. Inoltre, il numero dei lncRNA identificati continua ad aumentare e, sulla base di quanto previsto dalla banca dati NONCODE (<http://www.noncode.org/>), si stima che nel genoma umano potrebbero essere presenti più di 100.000 geni codificanti per lncRNA.

Le prime osservazioni a suggerire una potenziale funzione regolatrice dei lncRNA nell'aterosclerosi derivano da studi di Ge-

nome Wild Association Studies (GWAS) e RNA sequencing. Pur essendo un ambito solo parzialmente esplorato, le prime evidenze sperimentali hanno messo in luce una potenziale funzione regolatoria di alcuni lncRNA in svariati processi correlati all'aterosclerosi, quali la disfunzione endoteliale, il danno vascolare, la risposta im-

munitaria ed il metabolismo lipidico (*Figura 2*). La conoscenza dell'attività biologica dei lncRNA implicati nella patogenesi e progressione della lesione aterosclerotica potrebbe quindi rivelarsi fondamentale per l'identificazione di biomarcatori legati alla patologia, oltre che per individuare nuovi bersagli terapeutici.

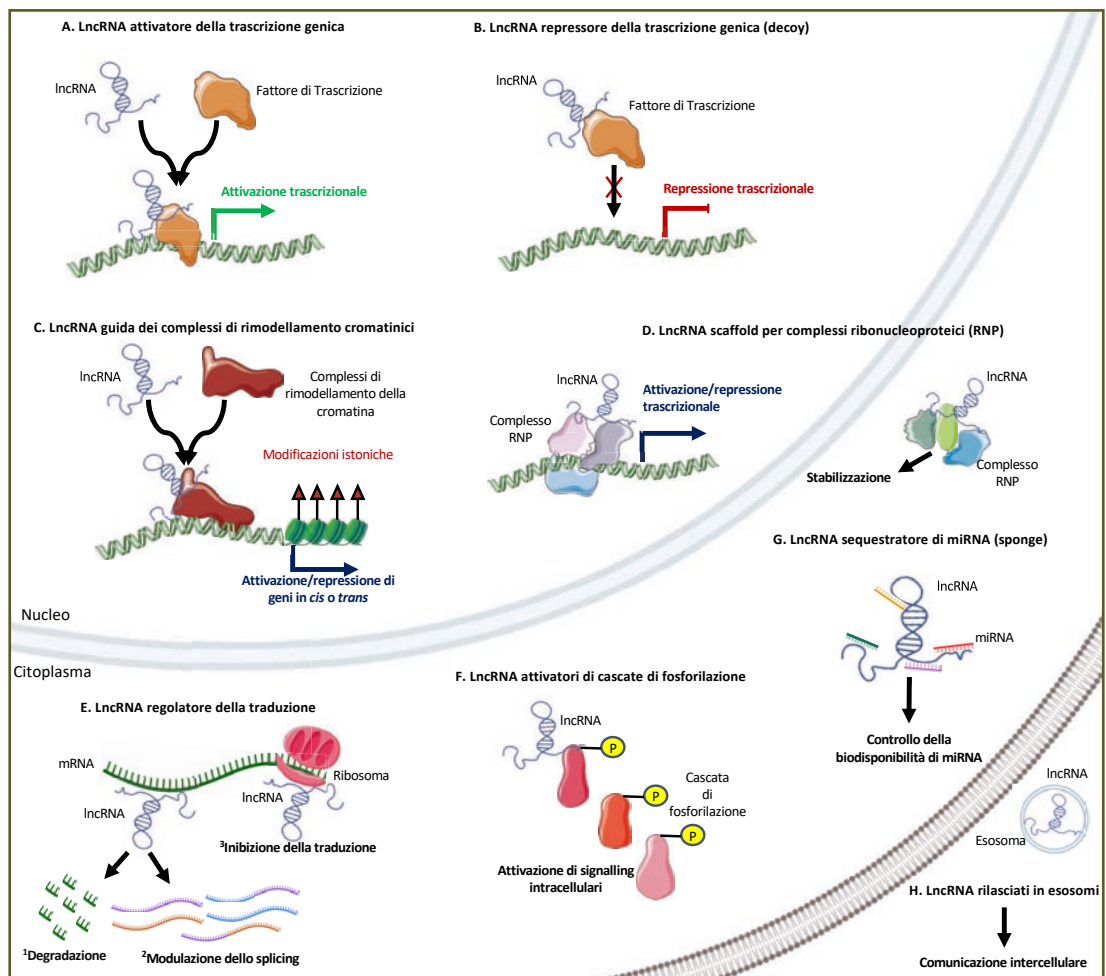


Figura 1 - Funzioni cellulari dei lncRNA. **A.** Reclutamento di fattori di trascrizione (TFs) verso la sequenza genica del promotore e attivazione della trascrizione genica; **B.** Sequestro di fattori di trascrizione e repressione della trascrizione genica; **C.** Guida di complessi di rimodellamento della cromatina e induzione di modificazioni istoniche con conseguente attivazione o repressione trascrizionale; **D.** Stabilizzazione di complessi ribonucleoproteici nucleari o citoplasmatici; **E.** Regolazione della traduzione di mRNA tramite la degradazione, splicing o inibizione del processo traduzionale; **F.** Regolazione della fosforilazione di proteine e attivazione di pathways intracellulari; **G.** Sequestro di miRNA e controllo della loro biodisponibilità; **H.** Rilascio in esosomi e partecipazione alla comunicazione intercellulare.

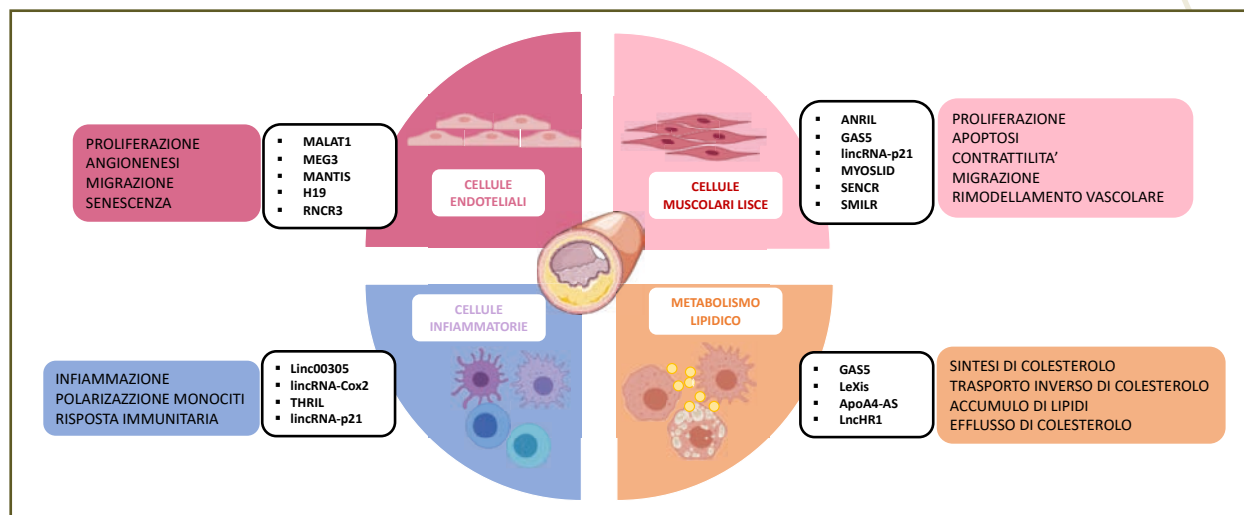


Figura 2 - *LncRNA implicati nell'aterosclerosi*. Focus sui principali lncRNA coinvolti nella disfunzione endoteliale, nel danno vascolare, nell'infiammazione e nel metabolismo lipidico.

LncRNA e disfunzione endoteliale

La disfunzione endoteliale è presente in varie condizioni infiammatorie sia acute che croniche. L'attivazione endoteliale è tra i primi processi coinvolti nella genesi della lesione aterosclerotica, in risposta sia a stimoli biochimici (come IL-1 β , LDL modificate) che biomeccanici (alterazione del flusso sanguigno). Conseguentemente, l'espressione di molecole di adesione (come VCAM-1 e E-Selectina), così come la secrezione di chemochine (MCP-1) facilitano il reclutamento di sottopopolazioni leucocitarie nella parete del vaso. La disfunzione endoteliale cronica può portare alla perdita di integrità dell'endotelio che predispone all'infiammazione vascolare e all'aterosclerosi (6). In questo contesto, studi recenti hanno evidenziato un potenziale ruolo emergente per i lncRNA nella regolazione della disfunzione endoteliale (Tabella 1).

MALAT1 (Metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1), identificato per la prima volta come biomarcatore nell'adenocarcinoma polmonare associato

a metastasi, sarebbe implicato nello sviluppo di diverse neoplasie. Tuttavia, esso è marcatamente espresso anche nelle cellule endoteliali normali (ECs) sia nella macro che nella microvascolatura. Il silenziamento di MALAT1 porta a una riduzione della proliferazione delle ECs, inibendo la progressione del ciclo cellulare, attraverso la riduzione del numero di cellule in fase S e la diminuzione di alcune cicline di fase S come CCNB1, CCNB2 e CCNA2, mentre aumenta l'espressione dei geni inibitori del ciclo cellulare come p21 e p27Kip1 (7).

In vivo, i topi Malat1^{-/-} hanno mostrato una significativa riduzione della vascolarizzazione della retina neonatale causata da un'alterata proliferazione delle cellule endoteliali. La funzione pro-proliferativa e pro-angiogenica di MALAT1 è stata confermata da ulteriori studi che dimostrano che il silenziamento di MALAT1 può migliorare la retinopatia diabetica (8, 9). Il silenziamento di MALAT1 ha anche ridotto i livelli di p38 fosforilata nelle ECs retiniche e l'up-regolazione indotta dal glucosio di IL-6 e TNF α attraverso l'attivazione di SAA3

Tabella I - Principali lncRNA implicati nella disfunzione endoteliale e meccanismo d'azione.

lncRNA	Modelli sperimentali	Localizzazione subcellulare	Effetti cellulari	Meccanismi d'azione	Ref.
H19	Uomo ECs VSMCs	Nucleare Citoplasmatico	Fattore di rischio indipendente per CAD; aumento della proliferazione e diminuzione dell'apoptosi	Host gene per il miR-675; attivazione delle vie di segnale di p38-MAPK e NF- κ B	(17-21)
MALAT1	ECs Topo	Nucleare	Controllo della proliferazione e del ciclo cellulare delle ECs; inibizione dell'apoptosi; protezione dell'endotelio dalla disfunzione indotta da ox-LDL; controllo dell'omeostasi vascolare nei ratti diabetici e nei topi sottoposti a ischemia degli arti posteriori	Sequestrante per il miR-22-3p; controllo della fosforilazione di p38 e AKT e delle loro vie di segnale	(7-12)
MANTIS	ECs	Nucleare	Controllo della migrazione delle ECs, dell'angiogenesi e della formazione di nuovi vasi	Interazione con Brg1 e controllo su SMAD6, COUP-TFII e SOX18	(16)
MEG3	ECs Topo	Nucleare	Controllo della vascolarizzazione, angiogenesi, proliferazione delle ECs e senescenza	Sequestrante per il miR-9; attivazione della via di segnale PI3K/AKT	(13-15)
RNCR3	ECs VSMCs Topo	Nucleare Esosomiale	Proaterogeno: controllo della proliferazione e della migrazione delle ECs	ceRNA per il miR-185 e de-repressione di KLF2	(22-23)

ECs: cellule endoteliali; VSMCs: cellule muscolari lisce vascolari; CAD: malattia coronarica; oxLDL: LDL ossidate; ceRNA: RNA competitore endogeno.

nelle ECs (8). In un altro studio, a seguito della deprivazione di ossigeno e glucosio e successiva riossigenazione nelle ECs microvascolari cerebrali, la mancanza di MALAT1 ha ridotto l'attività di PI3K e l'attivazione della fosforilazione di AKT e ha aumentato l'apoptosi cellulare e l'attività della caspasi 3, suggerendo un potenziale ruolo di MALAT1 nell'ischemia cerebrale da riperfusione (10). In linea con le osservazioni *in vitro*, l'inibizione farmacologica di MALAT1 nei topi sottoposti a ischemia degli arti posteriori ha portato a una riduzione del recupero del flusso sanguigno e della densità capillare, confermando gli studi che descrivono come MALAT1 controlli la proliferazione delle ECs e l'angiogenesi *in vitro* e *in vivo* (7). Inoltre, MALAT1 è in grado di proteggere l'endotelio dal danno indotto dalle ox-LDL attraverso

la sovraespressione del miR-22-3p, target dei geni CXCR2 e AKT, agendo come un sequestrante di miRNA (11).

Mentre i meccanismi molecolari che mediano gli effetti angiogenici di MALAT1 non sono stati ancora chiariti, uno studio recente ha indicato che MALAT1 potrebbe agire come sequestrante endogeno per miR-26b, regolando l'autofagia e la sopravvivenza delle ECs (12). Complessivamente, questi studi evidenziano il rilevante ruolo di MALAT1 nel regolare l'omeostasi delle EC, l'angiogenesi e l'infiammazione vascolare.

MEG3 (Maternally Expressed Gene 3) è un lncRNA inizialmente identificato come oncosoppressore, down-regolato in diversi tumori. Ulteriori ricerche hanno dimostrato che MEG3 è significativamente sovraespresso durante l'invecchiamento delle cellule endoteliali.

Il silenziamento di questo lncRNA promuove l'angiogenesi, aumentando la riperfusione dopo ischemia degli arti posteriori nei topi anziani e ripristinando la funzione delle cellule endoteliali, compromessa nell'invecchiamento (13). Inoltre, topi deficienti per MEG3 hanno mostrato un'aumentata espressione di geni angiogenetici come VEGF (14). Il silenziamento di MEG3 *in vivo* peggiora la disfunzione dei vasi retinici, come indicato dall'aumento della perdita della microvascolatura, dalla grave degenerazione capillare e dall'infiammazione. Nelle ECs retiniche, il deficit di MEG3 porta ad aumento della proliferazione, migrazione e capacità di formazione di vasi attivando la via di segnale PI3K/AKT. Riguardo al meccanismo d'azione, MEG3 agisce come sequestrante di miRNA nelle ECs vascolari regolando negativamente miR-9, un attore chiave nell'angiogenesi e nella proliferazione (15).

MANTIS (lncRNA n342419) è un lncRNA a ridotta espressione nei pazienti con ipertensione arteriosa polmonare idiopatica (IPAH) e in un modello animale di ipertensione arteriosa polmonare (PAH). Al contrario, questo lncRNA è sovraespresso in ECs isolate da pazienti con glioblastoma umano e nelle carotidi in una specie di *Macaco* sottoposto a dieta antiaterogena (16). MANTIS è localizzato nel nucleo e la sua espressione è controllata dall'istone demetilasi JARID1B, per cui si pensa abbia una funzione regolatrice della cromatina. Il silenziamento funzionale di MANTIS attraverso vettori oligonucleotidici, o la delezione mediata da CRISPR/Cas9 inibisce la migrazione delle ECs, l'angiogenesi e la formazione di nuovi vasi *in vitro* e *in vivo* in topi cui erano somministrate cellule endoteliali di vene ombelicali (HUVEC). Relativamente al meccanismo, MANTIS interagisce anche con Brg1 e regola SMAD6,

COUP-TFII e SOX18, tutti implicati nella modulazione angiogenica.

Alcuni polimorfismi nell'lncRNA H19 sono stati inizialmente associati al rischio e alla severità della malattia aterosclerotica in una popolazione cinese (17). Studi recenti hanno dimostrato che i livelli plasmatici di H19 possono essere predittori indipendenti per la malattia aterosclerotica anche dopo correzione per i tradizionali fattori di rischio (18). Si è osservato che i livelli plasmatici di H19 sono significativamente maggiori in pazienti con aterosclerosi rispetto a volontari sani. È stata dimostrata la presenza di H19 nelle placche aterosclerotiche di topi deficienti per ApoE (19). La sovraespressione di H19 nelle HUVEC ne aumenta la proliferazione, mentre diminuisce l'apoptosi regolando le vie di segnale di p38-MAPK e NF- κ B (19). Al contrario, l'inibizione di H19 riduce la crescita delle HUVEC, inducendone l'accumulo nella fase G1 del ciclo cellulare, aumentando l'espressione di p21 (CDKN1A) (20). Recentemente, è stato osservato che H19 ha un ruolo nella restenosi arteriosa, poiché è sovraespresso nella neointima delle arterie danneggiate (21). Siccome H19 è un host gene per miR-675, studi sui polimorfismi con guadagno di funzione hanno evidenziato che la sovraespressione di H19 aumenta il tasso di proliferazione delle cellule muscolari lisce vascolari (VSMC) interagendo con PTEN in modo dipendente da miR-675 (21). I futuri studi di silenziamento in modelli di malattia aterosclerotica saranno importanti per verificare il potenziale terapeutico del lncRNA H19.

L'RNA3 non codificante della retina (**RNCR3**), noto anche come **LINC00599**, è un lncRNA recentemente identificato e coinvolto nei processi patogenetici sia dell'aterosclerosi che del diabete mellito (22, 23). Aumentati livelli di RNCR3 sono

stati osservati nelle lesioni aterosclerotiche aortiche umane e murine. È stato osservato che la delezione di RNCR3 nei topi ApoE^{-/-} accelera lo sviluppo dell'aterosclerosi, aggravando l'ipercolesterolemia e la risposta infiammatoria (22).

Il silenziamento di RNCR3 ha anche ridotto la proliferazione e la migrazione, e accelerato l'apoptosi, delle cellule endoteliali e delle cellule muscolari lisce *in vitro*, suggerendo che l'inibizione di RNCR3 potrebbe compromettere la rigenerazione delle cellule endoteliali nelle arterie danneggiate (22).

Relativamente al meccanismo, è stato suggerito che RNCR3 agisce come un RNA competitore endogeno (ceRNA) modulando la concentrazione e le funzioni biologiche di alcuni miRNA. È stato osservato che RNCR3 comunica e co-regola il fattore 2 Kruppel-like (KLF2) competendo per l'associazione a miR-185-5p. Nella patologia aterosclerotica, l'RNCR3 è significativamente sovraregolato, diminuendo l'effetto repressivo di miR-185-5p, aumentando così il livello del gene bersaglio di miR-185-5p, KLF2. Questo circuito regolatorio mantiene un equilibrio nella funzione endoteliale come risposta allo stress proaterogenico.

LncRNA e danno vascolare

Il danno vascolare ricopre un ruolo di primaria importanza nell'infiammazione cronica tipica dell'aterosclerosi. Infatti, in risposta a un danno meccanico della parete muscolare, cellule endoteliali, piastrine e leucociti rilasciano svariati fattori di crescita (es: PDGF-BB, TGF- β 1), citochine (es: IL-1, IL-6, IL-8), chemochine (es: MCP-1), metalloproteasi (es: MMP-9) e mediatori pro-trombotici (es: trombina). Questi contribuiscono a stimolare la proliferazione delle cellule muscolari lisce vascolari (VSMCs) nella tonaca media delle arterie,

formando una significativa componente nella neointima del vaso danneggiato, con conseguente riduzione del lume del vaso, stenosi o completa occlusione del vaso sanguigno. Recentemente, inoltre, è stato messo in luce come le VSMCs, in un contesto aterosclerotico, subiscano una transizione verso un fenotipo simil-macrofagico, con perdita dei marker tipici muscolari (24), tanto che fino al 50% delle cellule schiumose della placca sarebbe di origine muscolare liscia (25).

Un numero sempre maggiore di evidenze sperimentali ha sottolineato il coinvolgimento dei lncRNA nella biologia delle VSMCs, mettendo in luce il loro ruolo nella fine regolazione dei processi aterogenici e come potenziali target terapeutici (Tabella 2).

ANRIL (antisense ncRNA in the INK4 locus) è un lncNA anti-senso localizzato nel locus INK4 sul cromosoma 9 (9p21.3), noto per essere correlato ad una elevata suscettibilità genetica per le patologie vascolari, inclusa l'aterosclerosi. ANRIL, in seguito a trascrizione, subisce splicing alternativo. Ad oggi ne sono note 21 isoforme, espresse in svariati tipi cellulari tra cui VSMCs, ECs e cellule immunitarie (26). La prima evidenza sperimentale di una correlazione tra elevati livelli di ANRIL e aterosclerosi è stata fornita da Holdt et al., che hanno evidenziato come l'espressione di due isoforme di ANRIL, EU741058 e NR_003529, risulti aumentata sia nelle placche aterosclerotiche carotidee, aortiche e femorali, sia in cellule mononucleari circolanti di soggetti con diagnosi di aterosclerosi rispetto a controlli sani (27). Infatti, diverse varianti di splicing di ANRIL sono responsabili di diversi effetti biologici. Il silenziamento degli esoni 1 o 19 in HAVSMCs (cellule muscolari lisce aortiche coronariche umane) interferisce con vari meccanismi patogenetici dell'atero-

sclerosi, inclusa la riduzione della vitalità cellulare e la proliferazione delle HAVSMCs (28). Per quanto riguarda il meccanismo, ANRIL agisce sul silenziamento epigenetico legandosi a CBX7 e SUZ12, componenti rispettivamente del Polycomb Repression Complex-1 (PRC-1) e -2 (PRC-2), inibendo il legame di PRC-1 e PRC-2 al locus INK4. Questo comporta una riduzione della tri-

metilazione della lisina 27 dell'istone H3, con conseguente riduzione della trascrizione di p15INK4b e p16INK4A e promozione della proliferazione cellulare (29). Recentemente, inoltre, è stata individuata una variante circolare di ANRIL (circANRIL), che sembra essere associata ad ateroprotezione. CircANRIL, infatti, si lega a PES1 (Pescadillo Ribosomal Biogenesis Factor

Tabella 2 - Principali lncRNA implicati nel danno vascolare e loro meccanismo d'azione.

lncRNA	Modello sperimentale	Localizzazione subcellulare	Effetti cellulari	Meccanismi d'azione	Ref.
ANRIL	HAVSMCs	Nucleare	Fattore di rischio indipendente per CAD: Controllo della proliferazione di HAVSMCs	Legame con CBX e SUZ2, componenti rispettivamente di PRC-1 e PRC-2	(26-29)
circANRIL	VSMCs	Non nota	Ateroprotezione: interferenza con la biogenesi ribosomiale, inibizione della proliferazione e induzione di apoptosi	Legame con PES1 e stimolazione dell'attivazione di p53	(30)
GAS5	VSMCs	Nucleare Citoplasmatica	Regolazione del rimodellamento vascolare; promozione della proliferazione e migrazione, riduzione del differenziamento	Regolazione dell'Annessina A2, riduzione dei livelli di miR-21 e aumento di PTEN	(34-37)
LincRNA-p21	VSMCs	Citoplasmatica	Promozione dell'apoptosi e riduzione della proliferazione	Legame con MDM2 e de-repressione di p53 e trascrizione dei geni target	(38)
MYOSLID	CASMCs	Citoplasmatica	Promuove il differenziamento di CASMCs e inibisce la proliferazione; promuove la formazione di fibre da stress	Inibizione la fosforilazione di SMAD2 indotta da TGF- β 1; modulazione della traslocazione nucleare di MLK1	(39)
SENCR	VSMCs	Citoplasmatica	Aumento della contrattilità, inibizione della migrazione	Regolazione della miocardina; diminuzione dell'espressione di FoxO1; aumento dell'espressione di TRPC6	(31-33)
SMILR	VSMCs	Nucleare Citoplasmatica	Regolazione della proliferazione	Riduzione dell'espressione di HAS2	(40)

HAVSMCs: cellule muscolari lisce aortiche umane; VSMCs: cellule muscolari lisce vascolari; CASMCs cellule muscolari lisce coronariche; CAD: malattia coronarica.

1), fondamentale per l'assemblaggio della subunità 60S dei ribosomi, interferendo con la biogenesi ribosomiale in VSMCs, con conseguente attivazione della proteina p53, riduzione della proliferazione e apoptosi cellulare (30). Questo suggerisce che ANRIL possa svolgere funzioni differenti a seconda dell'isoforma che si genera in seguito a splicing alternativo.

SENCR (smooth muscle and EC-enriched migration/differentiation-associated lncRNA) è stato uno dei primi lncRNA identificati nelle cellule muscolari lisce. Si tratta di un lncRNA trascritto antisenso rispetto alla porzione 5' del gene che codifica per il fattore di trascrizione FLI1 (11q24.3), presente sotto forma di 2 varianti localizzate prevalentemente nel citoplasma. La riduzione dell'espressione di SENCNCR in cellule HAVSMCs si associa a una ridotta espressione della miocardina (MYOCD), responsabile della regolazione di svariati geni codificanti per proteine contrattili, mentre l'espressione di geni pro-migratori è risultata aumentata, suggerendo che SENCNCR sia un inibitore della migrazione di VSMCs (31). In un ulteriore studio, Zou et al. hanno dimostrato che sia in VSMCs murine che in un modello *in vivo* di diabete di tipo 2, l'espressione di SENCNCR è risultata ridotta, con conseguente aumento dell'espressione del fattore di trascrizione Forkhead box O1 (FoxO1), fondamentale per la migrazione e proliferazione delle VSMCs. Inoltre, SENCNCR sembra essere coinvolto nell'aumento dell'espressione di TRPC6, probabilmente mediatore dell'influsso di Ca^{2+} , fondamentale per la contrattilità di VSMCs (32). Infine, in uno studio condotto su pazienti con diagnosi di diabete di tipo 2, è stata riscontrata una associazione tra i livelli di SENCNCR plasmatici e il rapporto tra la massa ventricolare sinistra e il volume telediastolico, marker di rimodellamento cardiaco (33). Queste evidenze

suggeriscono che SENCNCR può essere considerato un fattore di rischio indipendente per le complicanze vascolari riscontrate spesso in pazienti con diabete di tipo 2.

GAS5 (Growth arrest-specific 5) è un lncRNA coinvolto nella regolazione di diversi processi biologici quali apoptosi, proliferazione e differenziamento cellulare. Recentemente è stato dimostrato il suo coinvolgimento nel rimodellamento vascolare in un modello sperimentale di ipertensione nei ratti. Inoltre, il silenziamento *in vitro* di GAS5 modula il de-differenziamento in VSMCs aortiche umane, promuovendone quindi la proliferazione e la migrazione, e riducendo l'espressione di proteine contrattili quali α -SMA (α -smooth muscle actin) e calponina attraverso la regolazione della traslocazione nucleare della β -catenina (34). In un secondo studio, Li et al. hanno dimostrato che GAS5 regola la proliferazione e la migrazione in SMCs umane. GAS5 è legato dall'Annessina A2 in maniera Ca^{2+} dipendente, ma i meccanismi molecolari alla base di questa interazione rimangono ancora da chiarire (35). Inoltre, GAS5 si lega in modo competitivo con SMAD3, inibendone il legame con i promotori dei geni coinvolti nell'attività di TGF- β /SMAD3, riducendo quindi il differenziamento delle VSMCs (36). Infine, l'espressione di GAS5 è risultata ridotta in un modello sperimentale di fibrosi cardiaca mentre la sovraespressione di GAS5 inibisce la proliferazione dei fibroblasti cardiaci riducendo l'espressione di miR-21, regolando quindi indirettamente uno dei suoi target, PTEN. Questo suggerisce l'importanza di GAS5 nel rimodellamento cardiaco e vascolare (37).

LincRNA-p21 è un lncRNA rilevato in VSMCs la cui funzione biologica è legata alla patogenesi e alla progressione aterosclerotica. I livelli di lincRNA-p21 sono ridotti nelle placche aortiche di topi ApoE^{-/-} rispetto ai topi C57BL/6. Anche nell'uomo,

il tessuto arterioso prelevato da pazienti con malattia cardiovascolare presenta minor espressione di lincRNA-p21 rispetto a quello di pazienti controllo. LincRNA-p21 riduce la proliferazione e promuove l'apoptosi: il silenziamento *in vivo* di lincRNA-p21 è correlato ad una maggior incidenza di malattia coronarica e iperplasia neointimale. LincRNAp21 si lega a MDM2 (Mouse double minute 2), il principale inibitore della proteina p53, che risulta de-repressa e interagisce quindi con la proteina p300. Questa, a sua volta, promuove la trascrizione di geni che inducono apoptosi e inibiscono la proliferazione cellulare (38).

MYOSLID (Myocardin-induced Mmooth muscle LncRNA, Inducer of Differentiation) è un lincRNA identificato tramite RNAseq in VSMCs, nelle quali promuove il differenziamento e inibisce la proliferazione. Il silenziamento di MYOSLID, infatti, è correlato a una mancata fosforilazione di SMAD2 indotta da TGF- β 1, fondamentale per il processo di differenziamento. MYOSLID, inoltre, promuove il fenotipo contrattile: il suo silenziamento, infatti, riduce la formazione di fibre da stress e inibisce la traslocazione nucleare del fattore di trascrizione di MRTFA (MYOCD-related transcription factor A) (39), capace di controllare l'espressione di geni coinvolti nella regolazione delle modificazioni del citoscheletro durante il differenziamento e migrazione cellulare.

SMILR (Smooth muscle-induced lncRNA enhanced replication) è stato identificato tramite RNAseq selettivamente in VSMCs umane. In seguito a stimolazione delle cellule con IL-1 α e PDGF furono rilevati elevati livelli nel nucleo, citoplasma e medium di coltura. SMILR è in grado di stimolare la proliferazione cellulare promuovendo l'espressione del gene adiacente HAS2 (hyaluronan synthase 2), coinvolto nella sintesi di acido ialuronico, i cui livelli

sono correlati ad una aumentata proliferazione delle VSMCs. In accordo con questa osservazione, il silenziamento di SMILR riduce significativamente la proliferazione delle VSMCs. Inoltre, l'espressione di SMILR è risultata aumentata sia nel plasma che nelle placche ateromasiche di pazienti con elevati livelli di proteina C reattiva e lesione aterosclerotica instabile rispetto a pazienti sani (40).

lincRNA nell'infiammazione e nel metabolismo lipidico

Il genoma non codificante dell'RNA offre l'opportunità di identificare nuovi mediatori coinvolti sia nell'immunità innata che adattiva e nella progressione della malattia aterosclerotica. Le prime osservazioni che suggeriscono come i lincRNA possano essere importanti regolatori dell'aterosclerosi derivano dagli studi di GWAS, che mostrano una forte associazione di alcuni SNP nei geni non codificanti legati a pathways infiammatori e ad alterazioni del metabolismo lipidico, fortemente coinvolti nella patologia aterosclerotica (*Tabella 3*).

Tra i lincRNA collegati a processi infiammatori, è stato identificato **linc00305**, la cui espressione è significativamente aumentata nelle placche aterosclerotiche. Inoltre, linc00305 è presente in quantità più elevate nelle cellule mononucleari del sangue periferico (PBMCs) di soggetti affetti da aterosclerosi rispetto a individui sani, e nella linea cellulare monocitica THP-1 rispetto alle ECs e VSMCs. L'espressione di linc00305 è indotta dalla stimolazione con lipopolisaccaride (LPS), ma rimane tutt'ora sconosciuto il meccanismo attraverso il quale linc00305 è coinvolto nella polarizzazione dei monociti. A seguito dello studio eseguito da Zhang et al. è emerso che linc00305 è coinvolto nell'induzione di numerosi pathways dell'infiammazione

Tabella 3: Principali lncRNA implicati nell'infiammazione e nel metabolismo lipidico, e loro meccanismo d'azione.

lncRNA	Modelli sperimentali	Localizzazione subcellulare	Effetti cellulari	Meccanismi d'azione	Ref.
ApoA4-As	Hepa 1-6	Citoplasmatica	Stabilizzazione dell'mRNA di ApoA4	Legame con la proteina HuR	(48)
Gas5	BMDM; THP-1	Nucleare	Riduzione del trasporto inverso di colesterolo; promozione dell'accumulo di lipidi intracellulari	Legame con EZH2 e inibizione dell'espressione di ABCA1	(47)
LeXis	Hepa 1-6	Nucleare	Regolazione della sintesi di colesterolo	Legame con RALY	(46)
Linc00305	PBMCs, THP-1	Nucleare	Promozione dell'attivazione e polarizzazione di monociti	Legame con LIMR e attivazione di NF-KB attraverso la via di segnale di AHRR	(41)
LincRNA-Cox2	THP-1, Cellule dendritiche, BMDM	Nucleare Citoplasmatica	Mediazione della risposta immunitaria; promozione dell'infiammazione nei macrofagi	Interazione con Mi-2/NuRD	(42-43)
LincRNA-p21	PBMCs	Citoplasmatica	Coinvolgimento nell'infiammazione cronica	Legame con mRNA di RelA e regolazione di NF-kB	(45)
LncHR1	PBMCs	Nucleare Citoplasmatica	Riduzione della sintesi degli acidi grassi	Inibizione della trascrizione di SREBP-1c	(49)
THRIL	THP-1	Nucleare	Controllo trascrizionale di TNF α : ruolo nel quadro clinico della Sindrome di Kawasaki	Formazione un complesso con hnRNPL	(44)

PBMCs: cellule mononucleari del sangue periferico; THP-1 linea cellulare monocitica umana; Hepa 1-6: linea cellulare di epatoma murino; BMDM: macrofagi derivati dal midollo osseo.

in modo NF- κ B- dipendente, anche se il meccanismo d'azione non è stato ancora del tutto chiarito. È stato inoltre osservato che linc00305 si lega al recettore LIMR (lipocalin-interacting membrane receptor), promuovendo la traslocazione nucleare di AHRR (aryl hydrocarbon receptor repressor) e determinando la trascrizione di geni coinvolti nel differenziamento dei linfociti T e nelle funzioni delle cellule presentanti l'antigene (APC). Queste osservazioni suggeriscono un potenziale ruolo di linc00305 nel processo infiammatorio coinvolto nella progressione dell'aterosclerosi, sebbene solo ulteriori studi permetteranno di defi-

nire con precisione i meccanismi molecolari (41).

LincRNA-Cox2 (long intergenic non-coding RNA lincRNA-Cox2) è stato individuato in prossimità del locus genico di Cox2 (42). LincRNA-Cox2 è considerato un lncRNA chiave per la regolazione della risposta immunitaria, dal momento che è emersa in diversi studi la sua capacità di mediare sia l'attivazione che la repressione di diverse classi di geni legate alla risposta immunitaria (42). È stato infatti dimostrato che lincRNA-Cox2, in cellule dendritiche e in macrofagi del midollo osseo (BMDM), viene trascritto a seguito dell'interazione

con LPS attraverso TLR7/8 (42). Il silenziamento di lincRNA-Cox2 aumenta in modo significativo l'espressione di geni pro-infiammatori come Irf7 e CCL5, mentre attenua l'espressione di TLR1 e IL-6 indotta da Pam3CSK4, un ligando di TLR2 (42).

Recentemente, è infine emerso che lincRNA-Cox2 modula la trascrizione del gene IL-12 β indotta da TNF α , attraverso l'interazione con Mi-2/NuRD (43).

THRIL (TNF α and hnRNPL-related immunoregulatory lincRNA) è stato identificato tramite microarray nella linea cellulare monocitica umana (THP-1) e successivamente in diversi tessuti umani. THRIL è necessario per l'espressione di molte citochine e geni coinvolti nella risposta immunitaria, tra i quali TNF α gioca un ruolo di primaria importanza (44). THRIL è infatti in grado di formare un complesso con hnRNPL, che a sua volta regola la trascrizione di TNF α legandosi al suo promotore e riducendone l'espressione. Dal punto di vista clinico, l'espressione di THRIL è stata correlata a un quadro clinico più severo in pazienti affetti da malattia di Kawasaki (44).

Il già citato **lincRNA-p21** è coinvolto anche nei processi infiammatori di alcune patologie croniche. È stato osservato infatti che i livelli di lincRNA-p21 sono ridotti in pazienti con artrite reumatoide rispetto ai livelli dei soggetti sani (45). Questi stessi pazienti manifestano inoltre elevati livelli di p65 fosforilata (RelA), un noto marker di attivazione di NF- κ B (45). Il trattamento di questi pazienti con metotressato (MTX) porta ad una riduzione dell'infiammazione tramite inibizione di NF- κ B, insieme ad un aumento dei livelli di lincRNA-p21 (45).

Tra i lincRNA coinvolti nella regolazione del metabolismo lipidico, il lincRNA **LeXis** (Liver-expressed LXR-induced sequence), identificato da Sallam et al., sem-

bra essere in grado di regolare la sintesi del colesterolo mediata da LXR. LeXis agisce attraverso il legame con RALY, una ribonucleoproteina eterogenea. RALY è associata ai promotori dei geni responsabili della biosintesi del colesterolo e manifesta una ridotta attività quando è in presenza di LeXis, che ne inibisce il legame con il DNA (46). A ulteriore conferma del ruolo di LeXis, la sua sovraespressione in un modello murino si associa ad una riduzione sostanziale della colesterolemia (46). Il locus del gene LeXis si trova nelle immediate vicinanze di uno dei principali geni regolati da LXR, ABCA1. Dall'analisi della cromatina di epatociti primari murini, è emerso che le due sequenze geniche appartengono a geni distinti con promotori separati e la loro espressione è indotta da LXR e dagli agonisti di RXR (46).

Il già citato **GAS5** (Growth Arrest-Specific 5) sembra essere coinvolto anche nella regolazione del metabolismo lipidico. Recentemente, Meng et al. hanno descritto un possibile coinvolgimento nel trasporto inverso di colesterolo e nell'accumulo lipidico intracellulare. GAS5 è infatti localizzato principalmente a livello nucleare ed è altamente espresso nella linea cellulare monocitica umana THP-1 (47), nella quale promuove l'accumulo di lipidi e inibisce l'efflusso di colesterolo. GAS5 infatti inibisce il trasportatore ABCA1, legandosi all'enhancer di Zeste Homolog 2 (EZH2). L'overespressione di EZH2 riduce l'efflusso di colesterolo e l'espressione di ABCA1, promuovendo la tripla metilazione della lisina 27 (H3K27) nella regione promotrice di ABCA1 (47). Il silenziamento di GAS5 *in vivo* rallenta la progressione dell'aterosclerosi in topi apoE^{-/-}, con una riduzione dei livelli di colesterolo totale, TG e LDL (47). Complessivamente, il silenziamento di GAS5 mediato dall'asse EZH2-ABCA1, può po-

tenzialmente promuovere il trasporto inverso del colesterolo e inibire l'accumulo di lipidi intracellulari, prevenendo la progressione dell'aterosclerosi.

ApoA4-AS è un lncRNA identificato per la prima volta nel fegato di topi obesi ob/ob, oltre che in campioni epatici di pazienti affetti da steatosi epatica (48). I livelli circolanti di ApoA4-AS sono stati correlati ai livelli plasmatici di HDL. ApoA4-AS stabilizza l'mRNA di ApoA4 interagendo direttamente con Hur, una proteina che lega l'RNA ed è in grado di controllare la stabilità di molti mRNA (48). *In vivo*, il silenziamento di ApoA4-AS non influisce sul contenuto epatico di trigliceridi (TG), dei quali riduce invece la concentrazione plasmatica, come per il colesterolo. Tuttavia, non è noto il meccanismo attraverso il quale ApoA4-AS regola la concentrazione dei lipidi circolanti. È stato ipotizzato che ApoA4-AS influenzi la secrezione delle VLDL, ma ulteriori studi dovranno chiarire il suo ruolo nel metabolismo lipidico (48).

LncHR1 (long non-coding RNA HCV regulated 1) è stato identificato nelle cellule di epatoma inoculate con il virus dell'epatite C. LncHR1 si colloca sia a livello nucleare che citoplasmatico e sopprime l'attività del promotore di SREBP-1c, responsabile della sintesi dei TG (49). La sovraespressione di LncHR1 attenua l'espressione di SREBP-1c e, conseguentemente, riduce la sintesi degli acidi grassi (FA) e promuove l'accumulo dei lipidi nelle cellule epatiche. Infatti, SREBP-1c regola numerosi enzimi coinvolti in vari passaggi della sintesi dei FA e dei TG, nei quali l'enzima sintasi degli acidi grassi (FAS) gioca un ruolo predominante (49). *In vivo*, topi transgenici sovraespressanti LncHR1 hanno mostrato una ridotta espressione epatica non solo di SREBP-1c, ma anche di FAS, Acetyl-CoA carboxylase α (ACC α), e una minore con-

centrazione epatica e plasmatica di TG a seguito di una dieta ad alto contenuto di grassi (49).

Prospettive future e conclusioni

I lncRNA sembrano svolgere un ruolo fondamentale nella regolazione di diversi processi biologici. Queste molecole, inizialmente considerate come trascritti "spazzatura", potrebbero in realtà costituire interessanti basi genetiche di alcune patologie, tra cui l'aterosclerosi. Dalle evidenze sempre crescenti emerge l'enorme potenzialità dei lncRNA sia come biomarcatori che come target terapeutici (50). Alcuni importanti aspetti, tuttavia, rimangono ancora da chiarire. In primo luogo, infatti, la precisa comprensione del meccanismo di interazione di ciascun lncRNA con RNA, DNA e proteine, in contesto fisiologico e nell'ambito dei processi patologici sarà fondamentale per chiarire la loro funzione biologica. In quest'ottica, metodiche innovative quali l'isolamento della cromatina su domini specifici tramite purificazione di RNA (dChIRP), la purificazione di RNA antisenso (RAP) e l'immunoprecipitazione di RNA (RIP) (51) sono di primaria importanza. La caratterizzazione funzionale degli lncRNA è ancora maggiormente complicata dall'enorme variabilità di ciascun trascritto dovuta a splicing alternativo e alla ridotta conservazione dei trascritti, la cui sequenza è generalmente primate-specifica. L'utilizzo di modelli sperimentali convenzionali, quali topi o ratti, potrebbe quindi non essere sufficiente per chiarire il potenziale traslazionale dei risultati ottenuti (3). Infine, l'espressione dei lncRNA è generalmente molto bassa se confrontata ai mRNA: questo profilo d'espressione rende necessario l'utilizzo di tecnologie estremamente sensibili per la loro rilevazione, quali RNA-sequencing e la tecnologia del microarray.

Ad oggi, la Food and Drug Administration ha regolamentato l'uso di alcune terapie a base di RNA nell'ambito cardiovascolare. Quindi, comprendere la funzione biologica dei lncRNA coinvolti nella patogenesi aterosclerotica potrebbe rivelarsi fondamentale nell'ottica di individuare nuovi bersagli terapeutici, sfruttando tecnologie di silenziamento genico, o per promuovere una determinata funzione biologica mancante in condizioni patologiche. Le tecnologie maggiormente utilizzate per silenziare o ridurre l'espressione genica sono rappresentate da oligonucleotidi antisense (ASO), come ad esempio Mipomersen, un ASO approvato per il trattamento dell'ipercolesterolemia familiare che, legandosi all'mRNA dell'apolipoproteina B, ne media la degradazione, LNA (locked nucleic acid), aptameri o shRNA/siRNA, come Inclisiran. Queste promettenti tecnologie di silenziamento genico hanno mostrato negli ultimi anni notevoli miglioramenti in termini di stabilità, tollerabilità, ridotta immunogenicità ed effetti off-target (52).

Al contrario, per aumentare l'espressione genica, i lncRNA possono essere veicolati da vettori virali, come i Lentivirus (il cui uso tuttavia comporta un rischio di immunogenicità a lungo termine), oppure da vettori non virali come le nanoparticelle polimeriche o lipidiche, per le quali vi sono grandi aspettative relativamente al loro utilizzo in studi clinici (53). Le principali difficoltà di questo approccio sono date dalla necessità di veicolare i lncRNA in modo tessuto-specifico e con un'elevata efficienza. Queste problematiche possono essere superate usando modifiche chimiche e/o nanoparticelle mirate a ligandi specifici, ad esempio sovraespressi dalle cellule vascolari in risposta a determinati stimoli. Infine, nuovi strumenti di editing genico come CRISPR possono essere usati con successo per manipolare l'espressione di lncRNA con conseguente perdita o

guadagno di funzione a grande specificità ed efficienza, almeno *in vitro*.

In conclusione, i lncRNA sono regolatori chiave nei processi biologici e patologici correlati all'aterosclerosi. Dato il crescente numero di lncRNA identificati nei mammiferi, le correlazioni con gli studi GWAS e i loro diversi meccanismi d'azione a livello del nucleo, del citoplasma o degli esosomi, saranno necessari ulteriori studi per chiarire in modo preciso le modalità di espressione dei lncRNA, la loro funzione e le reciproche interazioni. Infine, lo studio delle interazioni tra lncRNA, DNA, trascritti codificanti, non codificanti e proteine, permetterà di comprendere a fondo molti degli eventi biologici che prendono parte alla fine regolazione della biologia vascolare in condizioni fisiologiche e patologiche.

Glossario

- ASO:** antisense oligonucleotide
BMDMs: bone marrow derived macrophages
CASMCs: coronary artery smooth muscle cells
ceRNA: competing endogenous RNA
circRNA: circular RNA
dCHIRP: domain-specific chromatin isolation by RNA purification
ECs: endothelial cells
eRNA: RNA enhancer
GWAS: genome-wide association study
HAVSMCs: human aortic vascular smooth muscle cells
HUVEC: human umbilical vein endothelial cells
LNA: locked nucleic acid
lncRNA: long non-coding RNA
miRNA: microRNA
mRNA: messenger RNA
ncRNA: non-coding RNA
PBMCs: peripheral blood mononuclear cells
RAP: RNA antisense purification
RIP: RNA immunoprecipitation
RNAseq: RNA sequencing
siRNA: short/small interfering RNA or silencing RNA
shRNA: short hairpin RNA
TF: transcriptional factor
VEGF: vascular endothelial growth factor
VSMCs: vascular smooth muscle cells

Questionario di auto-apprendimento

1) Quali caratteristiche strutturali sono tipiche dei lncRNA?

- Struttura secondaria estremamente semplice.
- Struttura secondaria simile a quella dei mRNA.
- Non esiste nessuna differenza.

2) Qual è il meccanismo d'azione dei lncRNA?

- Regolano il processo trascrizionale, guidano i complessi di rimodellamento della cromatina nelle porzioni cromosomiche corrette, promuovono il trasporto nucleocitoplasmatico di determinati fattori di trascrizione e regolano lo splicing alternativo dei pre-mRNA.
- Regolano la stabilità degli mRNA, agiscono come scaffold per svariati complessi proteici, regolano la stabilizzazione dei complessi ribonucleoproteici (RNP), la fosforilazione e l'attivazione di pathway di segnale intracellulari, e se circolarizzano possono sequestrare miRNA o regolare la maturazione del RNA ribosomiale.
- Tutte le risposte precedenti.

3) In che compartimento subcellulare si localizzano i lncRNA?

- Nel nucleo e nel citoplasma.
- Nella membrana cellulare.
- Nel mitocondrio.

4) Quali sono i principali lncRNA coinvolti nella disfunzione endoteliale?

- ANRIL, SENCN, GAS5, lincRNA-p21, MYOSLID, SMILR.
- linc00305, lincRNA-Cox2, THRIL, lincRNA-p21, Lexis, ApoA4-AS, LncHR1.
- MALAT1, MEG3, MANTIS, H19, RNCR3.

5) Qual è il lncRNA implicato nella regolazione della sintesi del colesterolo?

- ApoA4-AS.
- Lexis.
- LncHR1.

Risposte corrette:
1B, 2C, 3A, 4C, 5B

RIASSUNTO

La recente scoperta che solo l'1-2% del genoma umano ha funzione codificante ha spianato la strada, grazie all'utilizzo di tecnologie di sequenziamento avanzate, all'identificazione di trascritti non codificanti, inaugurando una nuova era nella biologia degli RNA. Tra i trascritti non codificanti, i long non-coding RNAs (lncRNAs) rappresentano una classe di non-coding RNA estremamente eterogenea, sebbene i meccanismi molecolari attraverso i quali i lncRNA controllano l'espressione genica e i pathways di segnalazione sono ancora oggi oggetto di studio. Recenti evidenze sperimentali hanno evidenziato la potenziale funzione regolatoria di alcuni lncRNA in numerosi processi correlati all'aterosclerosi, quali la disfunzione endoteliale, il danno vascolare, la risposta immunitaria ed il metabolismo lipidico. Ad esempio, alcuni lncRNA sono coinvolti nella disfunzione endoteliale, regolando la proliferazione e migrazione (H19, MALAT1), e l'angiogenesi (MANTIS, MEG3). Altri lncRNA sono coinvolti nella modulazione della proliferazione e differenziamento di cellule muscolari lisce vascolari, oltre che nel rimodellamento vascolare (ANRIL, linc-p21, MYOSLID, SENCN, SMILR). Infine, alcuni lncRNA sono coinvolti nella risposta immunitaria e nei processi infiammatori (linc00305,

lincRNA-Cox2, THRIL), mentre altri regolano la polarizzazione macrofagica (GAS5) e il metabolismo lipidico (LeXis, LncHR1, ApoA4-AS). Questo lavoro ha lo scopo di analizzare espressione, funzione e meccanismo d'azione dei principali lincRNA ad oggi noti, che sembrano essere coinvolti nella patologia aterosclerotica. La conoscenza dell'attività biologica dei lincRNA che prendono parte alla patogenesi e progressione della lesione aterosclerotica potrebbe infatti rivelarsi cruciale non solo per identificare nuovi biomarcatori legati all'aterosclerosi, ma anche per identificare nuovi possibili bersagli terapeutici.

Parole chiave: *LncRNA; RNA non codificanti; Biologia degli RNA; Aterosclerosi; Biologia vascolare.*

Bibliografia

- Bhat SA, et al. Long non-coding RNAs: Mechanism of action and functional utility. *Non-coding RNA Res.* 2016; 1: 43-50.
- Kok FO, Baker AH. The function of long non-coding RNAs in vascular biology and disease. *Vascul. Pharmacol.* 2019; 114: 23-30.
- Ulitsky I, Shkumatava A, Jan CH, Sive H, Bartel DP. Conserved function of lincRNAs in vertebrate embryonic development despite rapid sequence evolution. *Cell.* 2011; 147: 1537-1550.
- Simion V, Haemmig S, Feinberg MW. LncRNAs in vascular biology and disease. *Vascul. Pharmacol.* 2019; 114: 145-156.
- Ahadi A, Brennan S, Kennedy PJ, Hutvagner G, Tran N. Long non-coding RNAs harboring miRNA seed regions are enriched in prostate cancer exosomes. *Sci. Rep.* 2016; 6: 1-14.
- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2012; 32: 2045-2051.
- Michalik KM, et al. Long noncoding RNA MALAT1 regulates endothelial cell function and vessel growth. *Circ. Res.* 2014; 114: 1389-1397.
- Puthanveetil P, Chen S, Feng B, Gautam A, Chakrabarti S. Long non-coding RNA MALAT1 regulates hyperglycaemia induced inflammatory process in the endothelial cells. *J. Cell. Mol. Med.* 2015; 19: 1418-1425.
- Liu J-Y, et al. Pathogenic role of lincRNA-MALAT1 in endothelial cell dysfunction in diabetes mellitus. *Cell Death Dis.* 2014; 5: e1506.
- Xin J-W, Jiang Y-G. Long noncoding RNA MALAT1 inhibits apoptosis induced by oxygen-glucose deprivation and reoxygenation in human brain microvascular endothelial cells. *Exp. Ther. Med.* 2017; 13: 1225-1234.
- Tang Y, et al. The lincRNA MALAT1 protects the endothelium against ox-LDL-induced dysfunction via upregulating the expression of the miR-22-3p target genes CXCR2 and AKT. *FEBS Lett.* 2015; 589: 3189-3196.
- Li Z, Li J, Tang N. Long noncoding RNA Malat1 is a potent autophagy inducer protecting brain microvascular endothelial cells against oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced injury by sponging miR-26b and upregulating ULK2 expression. *Neuroscience.* 2017; 354: 1-10.
- Boon RA, et al. Long Noncoding RNA Meg3 Controls Endothelial Cell Aging and Function: Implications for Regenerative Angiogenesis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2016; 68: 2589-2591.
- Gordon FE, et al. Increased expression of angiogenic genes in the brains of mouse meg3-null embryos. *Endocrinology.* 2010; 151: 2443-2452.
- He C, et al. Long Noncoding RNA MEG3 Negatively Regulates Proliferation and Angiogenesis in Vascular Endothelial Cells. *DNA Cell Biol.* 2017; 36: 475-481.
- Leisegang MS, et al. Long Noncoding RNA MANTIS Facilitates Endothelial Angiogenic Function. *Circulation.* 2017; 136: 65-79.
- Gao W, et al. Association of polymorphisms in long non-coding RNA H19 with coronary artery disease risk in a Chinese population. *Mutat. Res.* 2015; 772: 15-22.
- Zhang Z, et al. Increased plasma levels of lincRNA H19 and LIPCAR are associated with increased risk of coronary artery disease in a Chinese population. *Sci. Rep.* 2017; 7: 7491.
- Pan J-X. LncRNA H19 promotes atherosclerosis by regulating MAPK and NF- κ B signaling pathway. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2017; 21: 322-328.
- Voellenkle C, et al. Implication of Long noncoding RNAs in the endothelial cell response to hypoxia revealed by RNA-sequencing. *Sci. Rep.* 2016; 6: 24141.
- Lv J, et al. Long noncoding RNA H19-derived miR-675 aggravates restenosis by targeting PTEN. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018; 497: 1154-1161.
- Shan K, et al. Role of long non-coding RNA-RNCR3 in atherosclerosis-related vascular dysfunction. *Cell Death Dis.* 2016; 7: e2248.
- Shan K, Li C-P, Liu C, Liu X, Yan B. RNCR3: A regulator of diabetes mellitus-related retinal microvascular dysfunction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017; 482: 777-783.

24. Gomez D, Swiatlowska P, Owens GK. Epigenetic control of SMC identity and lineage memory HHS Public Access. *Arter. Thromb Vasc Biol.* 2015; 35: 2508-2516.
25. Allahverdian S, Chehroudi AC, McManus BM, Abraham T, Francis GA. Contribution of intimal smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis. *Circulation.* 2014; 129: 1551-1559.
26. Hung J, Miscianinov V, Sluimer JC, Newby DE, Baker AH. Targeting Non-coding RNA in Vascular Biology and Disease. *Front. Physiol.* 2018; 9: 1-16.
27. Holdt LM, et al. ANRIL expression is associated with atherosclerosis risk at chromosome 9p21. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010; 30: 620-627.
28. Congrains A, et al. CVD-associated non-coding RNA, ANRIL, modulates expression of atherogenic pathways in VSMC. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012; 419: 612-616.
29. Yap KL, et al. Molecular Interplay of the Noncoding RNA ANRIL and Methylated Histone H3 Lysine 27 by Polycomb CBX7 in Transcriptional Silencing of INK4a. *Mol. Cell.* 2010; 38: 662-674.
30. Holdt LM, et al. Circular non-coding RNA ANRIL modulates ribosomal RNA maturation and atherosclerosis in humans. *Nat. Commun.* 2016; 7.
31. Bell RD, et al. Identification and Initial Functional Characterization of a Human Vascular Cell Enriched Long Non-Coding RNA. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2014; 34: 11249-1259.
32. Zou Z qing, Xu J, Li L, Han Y. shan. Down-regulation of SENCER promotes smooth muscle cells proliferation and migration in db/db mice through up-regulation of FoxO1 and TRPC6. *Biomed. Pharmacother.* 2015; 74: 35-41.
33. De Gonzalo-Calvo D, et al. Circulating long-non coding RNAs as biomarkers of left ventricular diastolic function and remodelling in patients with well-controlled type 2 diabetes. *Sci. Rep.* 2016; 6: 1-12.
34. Wang YNZ, et al. Long noncoding RNA-GAS5. *Hypertension.* 2016; 68: 736-748.
35. Li L, et al. Low expression of lncRNA-GAS5 is implicated in human primary varicose great saphenous veins. *PLoS One.* 2015; 10: 1-16.
36. Tang R, Zhang G, Wang YC, Mei X, Chen SY. The long non-coding RNA GAS5 regulates transforming growth factor β (TGF- β)-induced smooth muscle cell differentiation via RNA Smad-binding elements. *J. Biol. Chem.* 2017; 292: 14270-14278.
37. Tao H, et al. LncRNA GAS5 controls cardiac fibroblast activation and fibrosis by targeting miR-21 via PTEN/MMP-2 signaling pathway. *Toxicology.* 2017; 386: 11-18.
38. Wu G, et al. LincRNA-p21 regulates neointima formation, vascular smooth muscle cell proliferation, apoptosis, and atherosclerosis by enhancing p53 activity. *Circulation.* 2014; 130: 1452-1465.
39. Zhao J, et al. MYOSLID is a novel serum response factor-dependent long noncoding RNA that amplifies the vascular smooth muscle differentiation program. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2016; 36: 2088-2099.
40. Ballantyne MD, et al. Smooth muscle enriched long noncoding RNA (SMILR) regulates cell proliferation. *Circulation.* 2016; 133: 2050-2065.
41. Zhang DD, et al. Long noncoding RNA LINC00305 promotes inflammation by activating the AHRR-NF- κ B pathway in human monocytes. *Sci. Rep.* 2017; 7: 1-12.
42. Carpenter S, et al. A long noncoding RNA mediates both activation and repression of immune response genes. *Science.* 2013; 341: 789-792.
43. Tong Q, et al. LincRNA-Cox2 modulates TNF- α -induced transcription of Il12b gene in intestinal epithelial cells through regulation of Mi-2/NuRD-mediated epigenetic histone modifications. *FASEB J.* 2016; 30: 1187-1197.
44. Li Z, et al. The long noncoding RNA THRIL regulates TNF α expression through its interaction with hnRNPL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014; 111: 1002-1007.
45. Spurlock CF, Tossberg JT, Matlock BK, Olsen NJ, Aune TM. Methotrexate inhibits NF- κ B activity via lincRNA-p21 induction. *Arthritis Rheumatol.* 2014; 66: 2947-2957.
46. Sallam T, et al. Feedback modulation of cholesterol metabolism by the lipid-responsive non-coding RNA LeXis. *Nature.* 2016; 534: 124-128.
47. Meng X-D, et al. Knockdown of GAS5 Inhibits Atherosclerosis Progression via Reducing EZH2-Mediated ABCA1 Transcription in ApoE(-/-) Mice. *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2020; 19: 84-96.
48. Qin W, et al. A long non-coding RNA, APOA4-AS, regulates APOA4 expression depending on HuR in mice. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44: 6423-6433.
49. Li D, et al. Identification of a novel human long non-coding RNA that regulates hepatic lipid metabolism by inhibiting SREBP-1c. *Int. J. Biol. Sci.* 2017; 13: 349-357.
50. Hrdlickova B, et al. Human Disease-Associated Genetic Variation Impacts Large Intergenic Non-Coding RNA Expression. 2013; 9.
51. Haemmig S, Feinberg MW. HHS Public Access. 2018; 120: 620-623.
52. Khvorova A, Watts JK. The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. *Nat. Biotechnol.* 2017; 35: 238-248.
53. Reichmut AM, Oberli MA. mRNA vaccine delivery using lipid nanoparticles. *Ther. Deliv.* 2016; 7: 319-334.