

FISIOPATOLOGIA

LncRNAs COME ATTORI E BIOMARCATORI NELLE PLACCHE ATEROSCLEROTICHE

LncRNAs as players and biomarkers in atherosclerotic plaques

**IOLANDA VENERUSO^{1,2}, MARIA DONATA DI TARANTO^{1,2}, VALERIA D'ARGENIO^{2,3},
GIULIANA FORTUNATO^{1,2}**

¹Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli; ²CEINGE Biotecnologie Avanzate Franco Salvatore, Napoli; ³Dipartimento di Promozione delle Scienze Umane e della Qualità della Vita, Università Telematica San Raffaele Roma

SUMMARY

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease of the arterial wall triggered by pro-inflammatory factors and lipoproteins accumulation. Despite the increasing number of medical treatments, this disease is still a leading cause of mortality worldwide. Thus, the molecular mechanisms of the atherogenic process are under investigation with the aim to identify key molecules allowing for its early diagnosis or the development of novel therapeutic strategies. In this context, long non-coding RNAs (lncRNAs) have caught the attention, even if their role in the development and progression of atherosclerosis requires additional studies. LncRNAs are a class of non-coding RNA, long about 200 bp, and involved in the pathogenesis of an increasing number of diseases. They are regulatory molecules that can act as miRNA sponge, or can interact directly with mRNA, chromatin and proteins. In the last decade, several studies have been carried out with the aim to identify the lncRNAs involved in the atherogenic process and also to explain the molecular mechanisms through which lncRNAs may induce plaque formation and atherosclerosis. Additionally, several lncRNAs were also found in plasma from atherosclerotic patients thus suggesting their irrefutable role as diagnostic and prognostic biomarkers of atherosclerosis. In this review, we aimed to better clarify the role of lncRNAs in the development of atherosclerotic plaque and also the advantages of their use as circulating biomarkers.

Key Words: *RNA-Seq, Atherosclerosis, lncRNAs, biomarkers.*

Introduzione

Le malattie cardiovascolari (CVD) costituiscono un gruppo eterogeneo di patologie che colpiscono il cuore e i vasi sanguigni. Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), le CVD

rappresentano la principale causa di morte nel mondo ed è importante sottolineare che infarti e ictus colpiscono anche soggetti giovani (1).

Nell'ambito delle CVD, di rilevante importanza è la malattia aterosclerotica.

Indirizzo per la corrispondenza

Iolanda Veneruso
venerusoi@ceinge.unina.it

L'aterosclerosi è una patologia infiammatoria cronica della parete arteriosa, caratterizzata dall'accumulo di lipoproteine e da una risposta infiammatoria persistente che porta alla formazione della placca aterosclerotica (2, 3).

La progressione dell'aterosclerosi è un processo multifattoriale che coinvolge alterazioni endoteliali, stress ossidativo, infiammazione e modificazioni del metabolismo lipidico (4-7). L'accumulo di lipoproteine a bassa densità ossidate (ox-LDL) nella parete arteriosa stimola l'attivazione delle cellule endoteliali (ECs), con conseguente aumento dell'espressione di molecole di adesione e il rilascio di citochine pro-infiammatorie (8, 9). Questi segnali promuovono il reclutamento e la migrazione dei monociti nella zona sub-endoteliale, dove si differenziano in macrofagi e, successivamente, in cellule schiumose, a causa dell'ingestione delle ox-LDL (10).

La proliferazione delle cellule muscolari lisce vascolari (VSMC) nell'intima del vaso arterioso è un evento chiave nella progressione della placca aterosclerotica. Le VSMC possono subire una trasformazione fenotipica in cellule pro-infiammatorie che contribuiscono all'instabilità della placca (11-14).

Le placche aterosclerotiche instabili presentano un core lipidico necrotico, un ridotto contenuto di VSMC stabilizzanti e una capsula fibrosa molto sottile. La rottura di tali placche può portare a eventi trombotici acuti, come infarto miocardico e ictus (15) e, nonostante i progressi nelle terapie farmacologiche e interventistiche, l'aterosclerosi rimane ancora oggi una delle principali cause di mortalità cardiovascolare in tutto il mondo (16).

Pertanto, comprendere i meccanismi molecolari alla base di tali patologie è fondamentale per lo sviluppo di nuove strategie preventive e terapeutiche. Negli ultimi anni, l'attenzione della comunità scientifica si è concentrata sugli RNA non codificanti (ncRNAs), che svolgono un ruolo chiave nella regolazione dell'espressione genica. I lncRNAs (long non-coding

RNAs), in particolare, stanno emergendo come importanti regolatori epigenetici e trascrizionali, dal momento che possono influenzare diversi processi biologici rilevanti per le malattie cardiovascolari (17-22).

Diversi studi hanno dimostrato che i lncRNAs sono coinvolti nei meccanismi molecolari che regolano la crescita, la differenziazione e l'apoptosi cellulare, risultando elementi chiave nella patogenesi di numerose malattie, tra cui l'aterosclerosi (23-27). In particolar modo è stato dimostrato che alcuni lncRNAs sono implicati nella regolazione dell'infiammazione, del metabolismo lipidico e della stabilità della placca (28, 29). L'identificazione di specifici lncRNAs associati a una patologia potrebbe portare alla scoperta di nuovi biomarcatori per la diagnosi precoce, per il monitoraggio della progressione della malattia o per la stratificazione del rischio, aprendo anche la strada allo sviluppo di nuove terapie più mirate (30, 31).

L'obiettivo di questa review è analizzare la relazione che esiste tra lncRNAs e aterosclerosi, con una particolare attenzione a descrivere come alcuni di essi sembrano essere "players", e quindi indurre sviluppo di placca e insorgenza di aterosclerosi, mentre altri "biomarkers", quindi marcatori, più o meno precoci, biochimici di presenza di placca e aterosclerosi, associati anche alla severità della malattia.

Gli RNA non codificanti (ncRNA)

Classificazione

Gli RNA non codificanti (ncRNAs) sono una vasta classe di trascritti che non vengono tradotti in proteine, ma svolgono un ruolo essenziale nella regolazione dell'espressione genica, della struttura cromatinica e nella modulazione di numerosi processi biologici, compresi quelli legati alle malattie cardiovascolari come l'aterosclerosi. I ncRNAs sono stati tradizionalmente classificati in RNA costitutivi e RNA regolatori, e ulteriormente suddivisi in base alla loro lunghezza e alla loro funzione biologica (21, 22, 32).

I ncRNAs costitutivi

Questi RNA sono stabilmente espressi nelle cellule e coinvolti nei processi fondamentali della traduzione e del processamento del RNA:

- RNA ribosomali (rRNA): costituiscono la struttura dei ribosomi e partecipano alla sintesi proteica;
- RNA di trasporto (tRNA): trasportano gli amminoacidi ai ribosomi durante la traduzione;
- Small Nuclear RNA (snRNA): coinvolti nello splicing dell'mRNA (RNA messaggeri) e nella maturazione di altri RNA;
- Small Nucleolar RNA (snoRNA): regolano la modificazione chimica degli rRNAs e degli snRNAs.

I ncRNAs regolatori

Gli RNA regolatori sono trascritti funzionali che modulano l'espressione genica a diversi livelli, dal controllo trascrizionale alla regolazione post-trascrizionale. Secondo la classificazione basata sulla loro lunghezza, esistono:

ncRNAs di piccole dimensioni (<200 nucleotidi)

- microRNA (miRNA): brevi sequenze di 18-25 nucleotidi che regolano gli mRNA bersaglio tramite il legame al loro 3'UTR, inibendo la loro traduzione o inducendone la degradazione (33, 34);
- small interfering RNA (siRNA): regolano la degradazione dell'mRNA in modo simile ai miRNA, ma con un'origine solitamente esogena (ad es. RNA virali o RNA di interferenza artificiale) (35);
- Piwi-interacting RNA (piRNA): interagiscono con le proteine della famiglia PIWI per mantenere la stabilità del genoma nelle cellule germinali e reprimere trasposoni mobili (36).

ncRNAs di grandi dimensioni (>200 nucleotidi)

- Long non-coding RNA (lncRNA): trascritti di oltre 200 nucleotidi coinvolti nella regolazione dell'espressione genica attraverso il

rimodellamento della cromatina, la modulazione della trascrizione e il sequestro di miRNA come sponging miRNAs (27, 37);

- Circular RNA (circRNA): formati da trascritti di RNA circolarizzati, stabilizzati dalla loro struttura covalente chiusa, con funzione di regolatori post-trascrizionali e miRNA sponge (38);
- Enhancer RNA (eRNA): trascritti da sequenze enhancer che modulano l'attività dei promotori e l'espressione genica (39);
- Antisense RNA: trascritti dal filamento opposto di un gene codificante che regolano la sua espressione tramite interazioni con il trascritto complementare (40).

Long Non-Coding RNA (lncRNA) e Aterosclerosi

Negli ultimi anni, un numero crescente di studi ha dimostrato che i long non coding RNAs (lncRNAs) svolgono un ruolo chiave nella patogenesi dell'aterosclerosi. Questi trascritti, di lunghezza superiore ai 200 nucleotidi, regolano l'espressione genica attraverso diversi meccanismi, tra cui il rimodellamento della cromatina, la regolazione trascrizionale e l'interferenza con i miRNA. I lncRNAs associati all'aterosclerosi sono stati individuati in cellule coinvolte nel processo aterogenico, come cellule endoteliali (ECs), cellule muscolari lisce vascolari (VSMCs) e macrofagi (17, 37, 41, 42).

I lncRNAs possono agire attraverso quattro principali meccanismi, come illustrato in *Figura 1*:

1. Modulatori della trascrizione e della cromatina (19, 28, 43-46);
2. RNA antisense trascritti in direzione opposta a un gene codificante (19, 47-51);
3. RNA enhancer che regolano promotori distanti (19, 47-49);
4. Competing endogenous RNA (ceRNA), che sequestrano miRNA specifici (19, 52-56).

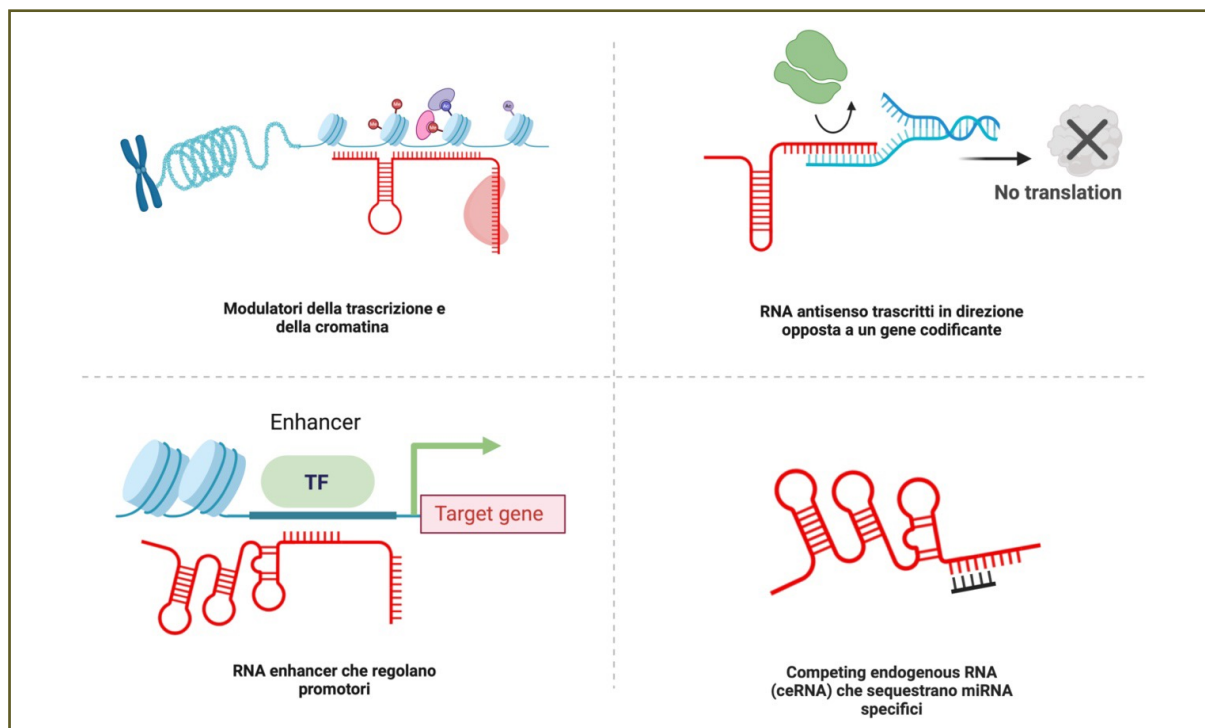


Figura 1 - Meccanismi di azione dei long non-coding RNAs. A. i lncRNAs modulano la struttura della cromatina e la trascrizione. B. i lncRNAs antisenso sono complementari a sequenze geniche e regolano la trascrizione. C. i lncRNAs attivano la trascrizione di promotori. D. i lncRNAs sequestrano miRNAs impedendone l'azione.

LncRNAs come players di aterosclerosi

I lncRNAs coinvolti nella progressione dell'aterosclerosi agiscono modulando diversi processi fisiopatologici tra cui il danno endoteliale, lo stress ossidativo, la proliferazione e la migrazione delle cellule vascolari muscolari lisce (VSMCs) e l'infiammazione (30, 44, 57).

Gli studi in questo ambito sono stati condotti sia in vitro (28, 44), che in vivo, ad esempio su modelli animali come topi ApoE^{-/-} (58).

Ruolo dei lncRNAs nei processi fisiopatologici legati all'aterosclerosi

Alterazione del metabolismo lipidico

Alcuni lncRNAs sono stati implicati nella regolazione del metabolismo lipidico, influenzando la sintesi, l'assorbimento e il trasporto del

colesterolo. Tra essi è importante ricordare i lncRNAs GAS5 (19, 58), ANRIL (30, 43, 59) e KCNQ1OT1 (52), i quali regolano negativamente l'espressione del recettore scavenger CD36, aumentando l'assorbimento delle lipoproteine ossidate da parte dei macrofagi e favorendo la formazione di cellule schiumose. Inoltre, alcuni lncRNAs, come H19 e MALAT1 (60) interferiscono con la via di segnalazione del fattore di trascrizione SREBP-2 (Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2), riducendo l'espressione del recettore delle LDL e aumentando l'accumulo di colesterolo nelle cellule vascolari (61).

Danno endoteliale e infiammazione

Alcuni lncRNAs influenzano direttamente la disfunzione endoteliale regolando l'espressione di geni coinvolti nel mantenimento dell'inte-

grità vascolare, come mostrato in *figura 2*. Tra questi, di rilevante importanza sono i lncRNAs ANRIL, regolatore di geni chiave del metabolismo del glucosio e degli acidi grassi (43, 62), MALAT1, stimolatore di proliferazione di cellule endoteliali (44), e H19, stimolatore di proliferazione cellulare, di infiammazione e inibitore di apoptosi (63, 64). Questi, e altri identificati, sono stati associati ad un aumento dell'espressione di molecole di adesione cellulare, come ICAM-1 e VCAM-1, che facilitano così il reclutamento di monociti e linfociti nelle pareti vascolari. Questo fenomeno promuove l'infiammazione cronica, caratterizzata dalla secrezione di citochine pro-infiammatorie come IL-6, IL-1 β e TNF- α , le quali aggravano ulteriormente il danno endoteliale (28, 65). L'attivazione di questi meccanismi attraverso i lncRNAs suggerisce che questi RNA possano rappresentare

bersagli terapeutici per contrastare l'infiammazione associata all'aterosclerosi.

Stress ossidativo

Lo stress ossidativo gioca un ruolo cruciale nell'aterosclerosi e alcuni lncRNAs, come KCNQ10T1 (52, 66) e COLCA1 (67), sono stati identificati come regolatori dei livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Essi influenzano l'attività di enzimi antiossidanti, come la superossido dismutasi (SOD) e la catalasi (CAT), riducendo la loro espressione e aumentando la produzione di ROS. Questo induce l'ossidazione delle lipoproteine a bassa densità (ox-LDL), che contribuisce all'accumulo lipidico nelle pareti vascolari e promuove la formazione delle cellule schiumose (foam cells). La regolazione di questi meccanismi da parte dei lncRNAs offre una nuova prospettiva terapeutica.

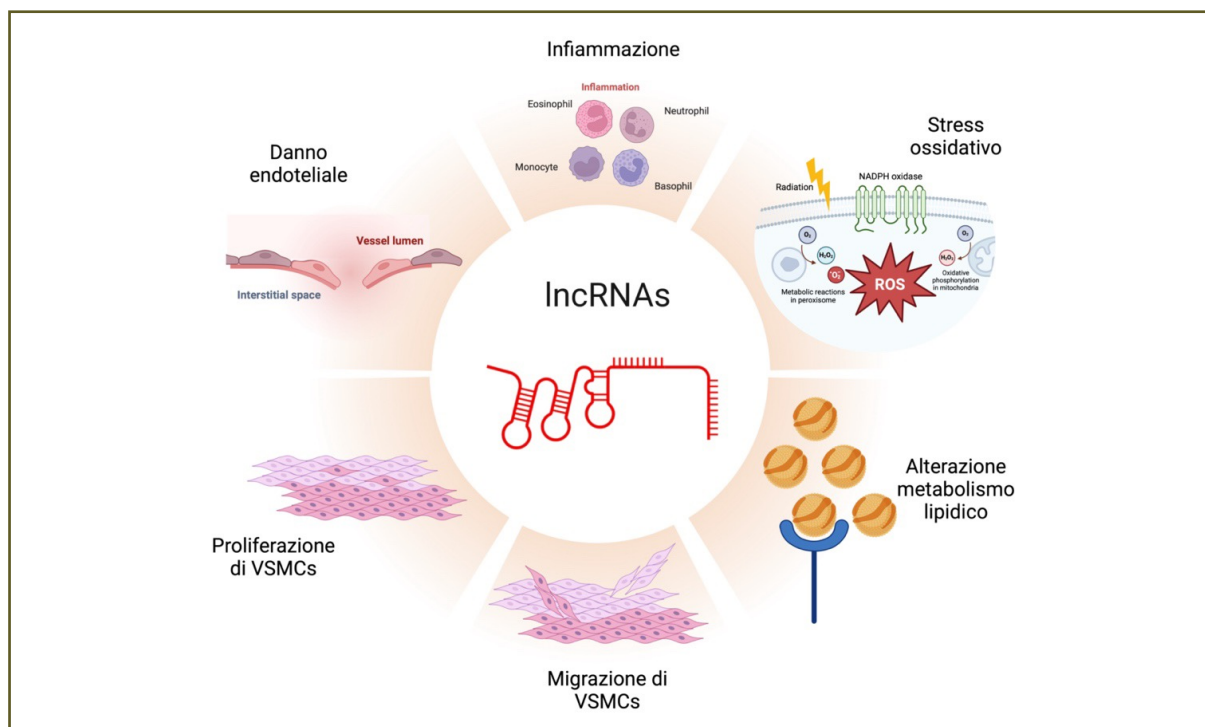


Figura 2 - I processi fisiopatologici dell'aterosclerosi che sono influenzati dai lncRNAs. Essi agiscono nell'ambito del metabolismo lipidico, del danno endoteliale e dell'infiammazione, dello stress ossidativo e della proliferazione e migrazione delle VSMCs.

ca per contrastare lo stress ossidativo nell'aterosclerosi.

Proliferazione e migrazione delle cellule muscolari lisce vascolari (VSMCs)

L'iperproliferazione delle cellule vascolari muscolari lisce è un evento chiave nella progressione dell'aterosclerosi. Diversi studi hanno dimostrato che alcuni lncRNAs, tra i quali di rilevante importanza sono SMILR (19, 68), SNHG8 (69-71) e GAS5 (19, 58), inducono proliferazione di VSMCs e regolano la trascrizione di geni coinvolti nella transizione fenotipica delle VSMCs da uno stato contrattile a uno proliferativo (9, 11, 14, 72, 73). Questo cambiamento è associato all'aumento della deposizione della matrice extracellulare e alla migrazione delle VSMCs nelle lesioni aterosclerotiche, le quali, stimulate da danno meccanico, stress ossidativo e forte stato pro-infiammatorio, vanno incontro a necrosi contribuendo all'aumento dell'infiammazione della placca (45, 56).

lncRNAs come biomarcatori cardiovascolari

I lncRNAs giocano quindi un ruolo attivo nella patogenesi dell'aterosclerosi. Tuttavia, uno degli aspetti più promettenti del loro utilizzo nella medicina molecolare riguarda il loro grande potenziale come biomarcatori diagnostici. La presenza di alcuni lncRNAs sia nel plasma che nelle placche aterosclerotiche offre infatti la possibilità di considerarli ottimi biomarcatori circolanti di malattia e di poterli quindi utilizzare per diagnosticare precocemente la presenza della malattia cardiovascolare, per monitorare la progressione della malattia o per stratificare il rischio dei pazienti, e fare quindi prevenzione primaria, attraverso semplici test ematici (23).

Diversi studi hanno dosato i loro livelli nel sangue sia in modelli animali (74, 75) che in pazienti con diverse tipologie di malattie cardiovascolari (23, 76, 77). La stragrande mag-

gioranza degli studi pubblicati ha utilizzato tecniche traghettate, di quantitative real-time PCR (qRT-PCR), per poter stabilire la presenza/assenza o dosare i livelli di un determinato lncRNA nel plasma dei soggetti in analisi. L'utilizzo di tecniche mirate per il dosaggio di lncRNAs circolanti ha presupposto uno studio precedente di quelli che sono i dati già presenti in letteratura. In molti, infatti, hanno basato la ricerca del loro lncRNA target sulla base dei risultati di analisi di espressione differenziale ottenuti da studi in vitro o in modello animale. Ad oggi, in pochissimi hanno effettuato analisi di trascrittomiche su campioni di tessuto umani estendo poi la ricerca al plasma. Ad ogni modo, studi clinici effettuati su coorti di pazienti con malattia cardiovascolare, in particolare malattia coronarica, e controlli sani hanno identificato specifici lncRNAs come potenziali indicatori per la diagnosi precoce della malattia e per il monitoraggio della sua progressione. Tra i più noti individuati e analizzati troviamo il lncRNA H19, il quale induce la formazione di placca e influenza negativamente la sua stabilizzazione, LIPCAR, che è associato a rischio di sviluppo o presenza di malattia coronarica, e ANRIL, che invece è fortemente implicato nell'insorgenza di malattie coronariche per il suo coinvolgimento nel metabolismo del glucosio e degli acidi grassi (23, 76, 78, 79). Altri studi, sempre su popolazione malata e sana, hanno dimostrato che i livelli di alcuni lncRNAs sono correlati alla gravità della stenosi arteriosa e alla presenza di placche aterosclerotiche instabili (23, 79, 80), offrendo la possibilità di utilizzare il biomarcatore in questione per il monitoraggio della patologia, essendo fortemente associato alla sua severità.

Inoltre, nell'ambito della diagnosi precoce da poter effettuare su pazienti grazie anche e soprattutto a specifiche signatures genetiche, la presenza di alcune varianti genetiche trovate nei geni codificanti per determinati lncRNAs è stata associata a una maggiore suscettibilità alla malattia coronarica, suggerendo che il pro-

filo di espressione di questi RNA potrebbe essere utilizzato per stratificare il rischio nei pazienti (81, 82).

In ogni caso, se da un lato la possibilità di dosare i lncRNAs nel sangue dei pazienti per diagnosticare e monitorare la malattia o stratificare il rischio è importante, dall'altro, la loro sempre più dimostrata implicazione nello sviluppo di quelli che sono gli eventi scatenanti della malattia cardiovascolare, li rende anche più promettenti dal punto di vista terapeutico. Infatti, la modulazione di specifici lncRNAs attraverso strategie di silenziamento genico o di sovraespressione rappresenta una grandissima opportunità per intervenire nei meccanismi patogenetici dell'aterosclerosi. A tal proposito, l'utilizzo di tecnologie come gli oligonucleotidi antisense (ASO), gli small interfering RNA (siRNA) e le terapie basate su CRISPR, potrebbero consentire di correggere le alterazioni dell'espressione di alcuni lncRNAs implicati nella progressione della malattia e, di conseguenza, indurre la remissione. Tuttavia, queste strategie presentano ancora delle sfide, tra cui la necessità di migliorare la stabilità e la specificità dei farmaci a base di RNA, nonché di sviluppare sistemi di veicolazione mirata per garantire un'efficace penetrazione nei tessuti vascolari (83, 84).

Conclusioni e Prospettive Future

Negli ultimi anni, l'identificazione e la caratterizzazione dei long non-coding RNAs (lncR-

NAs) ha aperto nuove prospettive nella comprensione della patogenesi dell'aterosclerosi. I lncRNAs regolano processi chiave come infiammazione, proliferazione e migrazione delle cellule muscolari lisce vascolari (VSMCs), stabilità delle placche aterosclerotiche e metabolismo lipidico, rendendoli potenziali biomarcatori circolanti e bersagli terapeutici innovativi (17, 37).

Grazie all'integrazione degli approcci multiomici (trascrittomica, epigenomica e proteomica) per ottenere un quadro più dettagliato delle interazioni tra i lncRNAs e le vie metaboliche e infiammatorie coinvolte nell'aterosclerosi (85) e l'uso delle tecnologie di Next-Generation Sequencing (NGS), ci sono grandi prospettive di poter individuare nuovi lncRNAs funzionalmente rilevanti, migliorando la nostra comprensione dei loro ruoli specifici nei diversi meccanismi fisiopatologici coinvolti nel processo aterosclerotico (86) e considerandoli sempre di più come strumenti con potenzialità diagnostiche, prognostiche e terapeutiche.

La sfida sarà tradurre i risultati dei più recenti studi scientifici in applicazioni cliniche, sviluppando nuovi strumenti diagnostici, che consentano di poter effettuare una sempre migliore prevenzione primaria, e farmaci specifici e mirati. Il passaggio dalla ricerca di base alla pratica clinica richiederà ulteriori studi preclinici e clinici volti a validare il ruolo dei lncRNAs come target terapeutici e biomarcatori affidabili per l'aterosclerosi e le sue complicanze (87).

RIASSUNTO

L'aterosclerosi è una malattia infiammatoria cronica della parete arteriosa innescata da fattori pro-infiammatori e dall'accumulo di lipoproteine. Nonostante il crescente numero dei trattamenti, questa malattia è ancora una delle principali cause di mortalità in tutto il mondo. Sono, quindi, oggetto di studio i meccanismi molecolari del processo aterogenico al fine di identificare le molecole chiave che consentono una diagnosi precoce o lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche. In questo contesto, i long non-coding RNAs (lncRNAs) hanno attratto l'attenzione dei ricercatori come possibili biomarcatori, anche se il loro ruolo nello sviluppo e nella progressione dell'aterosclerosi richiede ulteriori studi. I lncRNAs sono una classe di RNA non codificante, lunga circa 200 bp e coinvolta nella patogenesi di un numero sempre crescente di malattie. Sono molecole regolatrici che possono fungere da miRNAs sponging, o possono interagire direttamente con mRNA, cromatina e proteine.

Nell'ultimo decennio, sono stati condotti diversi studi con l'obiettivo di identificare i lncRNAs coinvolti nel processo aterogenico e anche per spiegare i meccanismi molecolari attraverso i quali essi possono indurre la formazione della placca e l'aterosclerosi. Inoltre, diversi lncRNAs sono stati trovati anche nel plasma di pazienti affetti da aterosclerosi suggerendo così il loro ruolo inconfutabile come biomarcatori diagnostici e prognostici di aterosclerosi. In questa review, abbiamo cercato di chiarire meglio il ruolo dei lncRNAs nello sviluppo della placca aterosclerotica e anche i vantaggi del loro uso come biomarcatori circolanti.

Parole chiave: *RNA Sequencing, Aterosclerosi, long non-coding RNAs, Biomarcatori.*

Bibliografia

- Mendis S, Puska P, Norrving B, et al. World Health Organization. Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control Joint Publication of the World Health Organization the World Heart Federation and the World Stroke Organization. World Health Organization: Geneva, Switzerland. 2011.
- Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Inflammation in Atherosclerosis. From Pathophysiology to Practice. J Am Coll Cardiol. 2009; 54: 2129-2138.
- Di Taranto MD, Morgante A, Bracale UM, et al. Altered expression of inflammation-related genes in human carotid atherosclerotic plaques. Atherosclerosis. 2012; 220: 93-101.
- Lusis AJ. Atherosclerosis. Nature. 2000; 407: 233-241.
- Christopher Glass AK, Witztum JL. Atherosclerosis: The Road Ahead Review. 2001; Vol 104.
- Gimbrone MA, García-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. Circ Res. 2016; 118: 620-636.
- Fortunato G, Di Taranto MD, Bracale UM, et al. Decreased paraoxonase-2 expression in human carotids during the progression of atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008; 28: 594-600.
- Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. N Engl J Med. 2005; 352: 1685-1695.
- Schultze JL, Schmieder A, Goerdt S. Macrophage activation in human diseases. Semin Immunol. 2015; 27: 249-256.
- Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. Nat Rev Immunol. 2013; 13: 709-721.
- Allahverdian S, Chaabane C, Boukais K, et al. Smooth muscle cell fate and plasticity in atherosclerosis. Cardiovasc Res. 2018; 114: 540-550.
- Orekhov AN, Sukhorukov VN, Nikiforov NG, et al. Signaling Pathways Potentially Responsible for Foam Cell Formation: Cholesterol Accumulation or Inflammatory Response-What is First? Int J Mol Sci. 212020.
- Grootaert MOJ, Moulis M, Roth L, et al. Vascular smooth muscle cell death, autophagy and senescence in atherosclerosis. Cardiovasc Res. 2018; 114: 622-634.
- Zhang X, Bishawi M, Zhang G, et al. Modeling early stage atherosclerosis in a primary human vascular microphysiological system. Nat Commun. 112020.
- Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. N Engl J Med. 1999; 340: 115-126.
- Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. Circulation. 2016; 133: e38-e48.
- Fasolo F, Di Gregoli K, Maegdefessel L, et al. Non-coding RNAs in cardiovascular cell biology and atherosclerosis. Cardiovasc Res. 2019; 115: 1732-1756.
- Fasolo F, Jin H, Winski G, et al. Long Noncoding RNA MIAT Controls Advanced Atherosclerotic Lesion Formation and Plaque Destabilization. Circulation. 2021; 144: 1567-1583.
- Ono K, Horie T, Baba O, et al. Functional non-coding RNAs in vascular diseases. FEBS Journal. 2021; 288: 6315-6330.
- Kazimierczyk M, Kasprzycz MK, Kasprzycz ME, et al. Human long noncoding RNA interactome: Detection, characterization and function. Int J Mol Sci. 2020; 21: 1027.
- Feingold EA, Good PJ, Guyer MS, et al. The ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) Project. Science. 2004; 306: 636-640.
- Derrien T, Johnson R, Bussotti G, et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. Genome Res. 2012; 22: 1775-1789.
- Zhang Z, Gao W, Long QQ, et al. Increased plasma levels of lncRNA H19 and LIPCAR are associated with increased risk of coronary artery disease in a Chinese population. Sci Rep. 2017; 7: 7491.
- Kopp F, Mendell JT. Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs. Cell. 2018; 172: 393-407.
- Hon CC, Ramilowski JA, Harshbarger J, et al. An atlas of human long non-coding RNAs with accurate 5' ends. Nature. 2017; 543: 199-204.
- Constanty F, Shkumatava A. lncRNAs in development and differentiation: from sequence motifs to functional characterization. Development. 2021; 148.
- Quinn JJ, Chang HY. Unique features of long non-cod-

- ing RNA biogenesis and function. *Nat Rev Genet.* 2016; 17: 47-62.
28. Holdt LM, Beutner F, Scholz M, et al. ANRIL expression is associated with atherosclerosis risk at chromosome 9p21. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30: 620-627.
 29. Laffont B, Rayner KJ. MicroRNAs in the Pathobiology and Therapy of Atherosclerosis. *Canadian Journal of Cardiology.* 2017; 33: 313-324.
 30. Holdt LM, Kohlmaier A, Teupser D. Long Noncoding RNAs of the Arterial Wall as Therapeutic Agents and Targets in Atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 2019; 119: 1222-1236.
 31. De Palma FDE, Salvatore F, Pol JG, et al. Circular RNAs as Potential Biomarkers in Breast Cancer. *Bio-medicines.* 2022; 10: 725.
 32. Djebali S, Davis CA, Merkel A, et al. Landscape of transcription in human cells. *Nature.* 2012; 489: 101-108.
 33. Bartel DP. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell.* 2009; 136: 215-233.
 34. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; 15: 509-524.
 35. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 2001; 411: 494-498.
 36. Siomi MC, Sato K, Pezic D, et al. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011; 12: 246-258.
 37. Statello L, Guo CJ, Chen LL, et al. Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021; 22: 96-118.
 38. Kristensen LS, Andersen MS, Stagsted LVW, et al. The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs. *Nat Rev Genet.* 2019; 20: 675-691.
 39. Li W, Notani D, Rosenfeld MG. Enhancers as non-coding RNA transcription units: recent insights and future perspectives. *Nat Rev Genet.* 2016; 17: 207-223.
 40. Pelechano V, Steinmetz LM. Gene regulation by antisense transcription. *Nat Rev Genet.* 2013; 14: 880-893.
 41. Zhang Z, Salisbury D, Sallam Tamer. Long Noncoding RNAs in Atherosclerosis: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol.* 2018; 72: 2380-2390.
 42. Du M, Wang C, Yang L, et al. The role of long noncoding RNA Nron in atherosclerosis development and plaque stability. *iScience.* 2022; 25.
 43. Bochenek G, Häslér R, Mokhtari NE El, et al. The large non-coding RNA ANRIL, which is associated with atherosclerosis, periodontitis and several forms of cancer, regulates ADIPOR1, VAMP3 and C11ORF10. *Hum Mol Genet.* 2013; 22: 4516-4527.
 44. Michalik KM, You X, Manavski Y, et al. Long noncoding RNA MALAT1 regulates endothelial cell function and vessel growth. *Circ Res.* 2014; 114: 1389-1397.
 45. Bai Y, Zhang Q, Su Y, et al. Modulation of the Proliferation/Apoptosis Balance of Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis by lncRNA-MEG3 via Regulation of miR-26a/Smad1 Axis. *Int Heart J.* 2019; 60: 444-450.
 46. Engreitz JM, Haines JE, Perez EM, et al. Local regulation of gene expression by lncRNA promoters, transcription and splicing. *Nature.* 2016; 539: 452-455.
 47. Liao B, Chen R, Lin F, et al. Long noncoding RNA HOTTIP promotes endothelial cell proliferation and migration via activation of the Wnt/ β -catenin pathway. *J Cell Biochem.* 2018; 119: 2797-2805.
 48. Miao Y, Ajami NE, Huang TS, et al. Enhancer-associated long non-coding RNA LEENE regulates endothelial nitric oxide synthase and endothelial function. *Nat Commun.* 2018; 9: 292.
 49. Ballantyne MD, Pinel K, Dakin R, et al. Smooth muscle enriched long noncoding RNA (SMILR) regulates cell proliferation. *Circulation.* 2016; 133: 2050-2065.
 50. Lyu Q, Xu S, Lyu Y, et al. SENCER stabilizes vascular endothelial cell adherens junctions through interaction with CKAP4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019; 116: 546-555.
 51. Jeffrey Man HS, Sukumar AN, Lam GC, et al. Angiogenic patterning by STEEL, an endothelial-enriched long noncoding RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018; 115: 2401-2406.
 52. Wang Y, Liu L, Li J. LncRNA KCNQ1OT1 depletion inhibits the malignant development of atherosclerosis by miR-145-5p. *Microvasc Res.* 2022; 139.
 53. Hennessy EJ, van Solingen C, Scacalossi KR, et al. The long noncoding RNA CHROME regulates cholesterol homeostasis in primate. *Nat Metab.* 2019; 1: 98-110.
 54. Yan B, Yao J, Liu JY, et al. lncRNA-MIAT regulates microvascular dysfunction by functioning as a competing endogenous RNA. *Circ Res.* 2015; 116: 1143-1156.
 55. Zhang L, Cheng H, Yue Y, et al. H19 knockdown suppresses proliferation and induces apoptosis by regulating miR-148b/WNT/ β -catenin in ox-LDL-stimulated vascular smooth muscle cells. *J Biomed Sci.* 2018; 25: 11.
 56. Wu G, Cai J, Han Y, et al. LincRNA-p21 regulates neointima formation, vascular smooth muscle cell proliferation, apoptosis, and atherosclerosis by enhancing p53 activity. *Circulation.* 2014; 130: 1452-1465.
 57. Meng Q, Pu L, Luo X, et al. Regulatory Roles of Related Long Non-coding RNAs in the Process of Atherosclerosis. *Front Physiol.* 2020; 11.
 58. Meng XD, Yao HH, Wang LM, 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.
 59. Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, et al. Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2007; 357: 443-453.
 60. Gluba-Sagr A, Franczyk B, Rysz-Górczyńska A, et al.

- The Role of Selected lncRNAs in Lipid Metabolism and Cardiovascular Disease Risk. *Int J Mol Sci.* 2024; 25: 9244.
61. Han Y, Ma J, Wang J, et al. Silencing of H19 inhibits the adipogenesis and inflammation response in ox-LDL-treated Raw264.7 cells by up-regulating miR-130b. *Mol Immunol.* 2018; 93: 107-114.
62. Cho H, Shen GQ, Wang X, et al. Long noncoding RNA ANRIL regulates endothelial cell activities associated with coronary artery disease by up-regulating CLIP1, EZR, and LYVE1 genes. *Journal of Biological Chemistry.* 2019; 294: 3881-3898.
63. Cao L, Zhang Z, Li Y, et al. LncRNA H19/miR-let-7 axis participates in the regulation of ox-LDL-induced endothelial cell injury via targeting periostin. *Int Immunopharmacol.* 2019; 72: 496-503.
64. Pan J-X. LncRNA H19 Promotes atherosclerosis by Regulating MAPK and NF-KB Signaling Pathway. 2017.
65. Yan Y, Song D, Wu J, et al. Long Non-Coding RNAs Link Oxidized Low-Density Lipoprotein With the Inflammatory Response of Macrophages in Atherogenesis. *Front Immunol.* 2020; 11: 24.
66. Xu C, Chen L, Wang RJ, et al. LncRNA KCNQ1OT1 knockdown inhibits ox-LDL-induced inflammatory response and oxidative stress in THP-1 macrophages through the miR-137/TNFAIP1 axis. *Cytokine.* 2022; 155: 155912.
67. Li MP, Hao ZC, Yan MQ, et al. Possible causes of atherosclerosis: lncRNA COLCA1 induces oxidative stress in human coronary artery endothelial cells and impairs wound healing. *Ann Transl Med.* 2022; 10: 286-286.
68. Mahmoud AD, Ballantyne MD, Miscianinov V, et al. The human-specific and smooth muscle cell-enriched LncRNA SMILR promotes proliferation by regulating mitotic CENPF mRNA and drives cell-cycle progression which can be targeted to limit vascular remodeling. *Circ Res.* 2019; 125: 535-551.
69. Zhuo LA, Wen YT, Wang Y, et al. LncRNA SNHG8 is identified as a key regulator of acute myocardial infarction by RNA-seq analysis. *Lipids Health Dis.* 2019; 18: 201.
70. Zhang Y, Bian Y. Long Non-Coding RNA SNHG8 Plays a Key Role in Myocardial Infarction Through Affecting Hypoxia-Induced Cardiomyocyte Injury. *Med Sci Monit.* 2020; 26: e924016.
71. Wang S, Li J, Chen A, et al. Differentiated expression of long non-coding RNA-small nucleolar RNA host gene 8 in atherosclerosis and its molecular mechanism. *Bioengineered.* 2021; 12: 7167-7176.
72. Zhou Y, Zhang S, Ji W, et al. LncRNA Landscape of Coronary Atherosclerosis Reveals Differentially Expressed LncRNAs in Proliferation and Migration of Coronary Artery Smooth Muscle Cells. *Front Cell Dev Biol.* 2021; 9: 656636.
73. Ni H, Haemmig S, Deng Y, et al. A Smooth Muscle Cell-Enriched Long Noncoding RNA Regulates Cell Plasticity and Atherosclerosis by Interacting With Serum Response Factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021; 41: 2399-2416.
74. Huang SF, Zhao G, Peng XF, et al. The Pathogenic Role of Long Non-coding RNA H19 in Atherosclerosis via the miR-146a-5p/ANGPTL4 Pathway. *Front Cardiovasc Med.* 2021; 8: 770163.
75. Sun H, Jiang Q, Sheng L, et al. Downregulation of lncRNA H19 alleviates atherosclerosis through inducing the apoptosis of vascular smooth muscle cells. *Mol Med Rep.* 2020; 22: 3095-3102.
76. Huang Y, Wang L, Mao Y, et al. Long Noncoding RNA-H19 Contributes to Atherosclerosis and Induces Ischemic Stroke via the Upregulation of Acid Phosphatase 5. *Front Neurol.* 2019; 10: 32.
77. Li ZF, Shu XJ, Chang YW, et al. Effect of lncRNA H19 on the apoptosis of vascular endothelial cells in arteriosclerosis obliterans via the NF- κ B pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019; 23: 4491-4497.
78. Safaei S, Tahmasebi-Birgani M, Bijanzadeh M, et al. Increased Expression Level of Long Noncoding RNA H19 in Plasma of Patients with Myocardial Infarction. *Int J Mol Cell Med.* 2020; 9: 122-129.
79. Jiao Y, Meng F, Ma G, et al. An increase in a long non-coding RNA ANRIL in peripheral plasma is an indicator of stable angina. *Clinics.* 2023; 78: 100289.
80. Lv J, Wang L, Zhang J, et al. Long noncoding RNA H19-derived miR-675 aggravates restenosis by targeting PTEN. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018; 497: 1154-1161.
81. Gao W, Zhu M, Wang H, 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.
82. Fortunato G, Di Taranto MD. Polymorphisms and the expression of genes encoding enzymes involved in cardiovascular diseases. *Clinica Chimica Acta.* 2007; 381: 21-25.
83. Crooke ST, Witztum JL, Bennett CF, et al. RNA-Targeted Therapeutics. *Cell Metab.* 2018; 27: 714-739.
84. Costagliola Di Polidoro A, Grassia A, De Sarno F, et al. Targeting nanostrategies for imaging of atherosclerosis. *Contrast Media Mol Imaging.* 2021; 2021: 6664471.
85. Boon RA, Jaé N, Holdt L, et al. Long Noncoding RNAs: From Clinical Genetics to Therapeutic Targets? *J Am Coll Cardiol.* 2016; 67: 1214-1226.
86. van Solingen C, Scacalossi KR, Moore KJ. Long non-coding RNAs in lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 2018; 29: 224-232.
87. Sarraju A, Nissen SE. Atherosclerotic plaque stabilization and regression: a review of clinical evidence. *Nat Rev Cardiol.* 2024; 21: 487-497.