

a cura di Francesco Purrello

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Catania

Long non-coding RNA associati al diabete mellito. Focus sulle complicanze micro e macrovascolari

Stefania Di Mauro, Agnese Filippello, Alessandra Scamporrino, Antonino Di Pino, Francesca Urbano, Salvatore Piro

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Catania

Il diabete mellito rappresenta una patologia complessa che interessa milioni di persone nel mondo. La storia naturale della malattia e la sua lunga durata nel corso della vita determinano danni importanti a carico di ogni apparato dell'organismo umano. Tra le sfide portate avanti dai sistemi sanitari a livello mondiale esiste quella di poter arginare l'avanzamento delle patologie croniche come il diabete; queste patologie ad alta incidenza e prevalenza hanno un impatto negativo sia sulla qualità che sulla durata della vita. Riguardo al diabete mellito quindi sarebbe utile poter disporre di marcatori semplici ed affidabili per poter anticipare la diagnosi clinica e per ridurre lo sviluppo di complicanze legate alla patologia. I long *non-coding* RNA potrebbero rappresentare validi strumenti per effettuare accertamenti precoci di patologia e per diagnosticare e ritardare lo sviluppo di complicanze. La loro semplicità nel dosaggio e la stabilità nei liquidi biologici li rendono dei candidati perfetti per gli obiettivi illustrati. La conoscenza che ne deriverà nei prossimi anni potrebbe apportare avanzamenti culturali utili per le sfide aperte nel campo del diabete per il terzo millennio.

INTRODUZIONE

Il diabete mellito rappresenta una emergenza globale per il pianeta e le sfide per prevenire l'incremento della sua prevalenza costituiscono gli obiettivi principali delle Organizzazioni scientifiche a livello mondiale. Nel nostro periodo storico, ci troviamo di fronte ad una crescita inarrestabile dei casi di diabete mellito, non solo nei paesi sviluppati ma anche in quelli emergenti ed in via di sviluppo. Gli individui affetti dalla malattia nel mondo sono ormai vicini ai 400 milioni e si stima che raggiungano i 600 milioni entro il 2035 (1). Il diabete tipo 2 (T2DM), che rappresenta circa il 90% dei casi in Italia (2), in proporzione è la componente con maggiore rischio di incremento. Questo aspetto dipende principalmente dalle modifiche delle abitudini alimentari e dello stile di vita che hanno condizionato i paesi industrializzati negli ultimi decenni. Siamo tutti consapevoli della complessità della fisiopatologia di questa patologia (non solo insulino-resistenza e deficit insulinico) e nuovi obiettivi di studio hanno preso possesso delle nostre sfide. Tuttavia, nonostante gli sforzi impiegati, la diagnosi clinica spesso avviene tardivamente. Questo ritardo, dall'effettiva insorgenza della malattia alla sua diagnosi, comporta che gravi complicanze vascolari croniche associate alla malattia siano presenti già al momento della diagnosi (3-4). È verosimile, che il rischio di complicanze possa essere ridotto in maniera significativa da una possibile diagnosi precoce. Inoltre, i protocolli terapeutici attuali per T2DM, pur essendo ben consolidati, sono ancora lacunosi nella prognosi della malattia.

Da questi assunti emerge la potenziale necessità di individuare nuovi *biomarker* specifici che possano agire come indicatori diagnostici e prognostici della malattia. L'identificazione di nuovi approcci diagnostici passa naturalmente attraverso l'approfondimento di tutti quei meccanismi molecolari alla base dell'omeostasi glicemica e della fisiopatologia del diabete. Se la stragrande maggioranza dei meccanismi molecolari riguardanti i geni codificanti per proteine è stata ampiamente studiata negli ultimi decenni, gli RNA non codificanti (ncRNA) stanno rivestendo un'attenzione via via maggiore sia in qualità di possibili obiettivi terapeutici che come biomarcatori diagnostici e predittivi specifici. Questa possibilità trova ampio spazio anche per ciò che concerne la loro applicabilità poiché la maggior parte delle variazioni genetiche associate al diabete si trovano in regioni del genoma umano non codificanti per proteine (5). Il genoma umano può essere, infatti, ampiamente trascritto in un grande numero di RNA non codificanti, molti dei quali sono strettamente legati all'insorgenza ed allo sviluppo di patologie.

È proprio in questa dimensione che negli ultimi 10 anni i microRNA (miRNA), piccoli RNA non codificanti di lunghezza uguale o inferiore ai 200 nucleotidi, sono divenuti un argomento caldo per scienziati e clinici alla ricerca di nuovi *target* terapeutici e biomarcatori clinici. Il coinvolgimento dei microRNA nella patogenesi di diverse malattie è stato ampiamente confermato in letteratura (6); in particolare studi su profili di espressione in tessuti provenienti da pazienti con T2DM hanno permesso di individuare molteplici miRNA regolatori nella patologia diabetica (7).

A differenza dei miRNAs, la funzione biologica dei *long non-coding* RNA (lncRNA), classe eterogenea di ncRNA di lunghezza superiore ai 200 nucleotidi, è stata riconosciuta solo in anni recentissimi. Pertanto il ruolo di questi RNA non codificanti nel controllo del metabolismo e dell'omeostasi energetica costituisce oggi un ambiente piuttosto inesplorato. I lncRNA, costituiscono numericamente la maggioranza degli RNA non codificanti all'interno del genoma dei mammiferi. A questa macro-categoria di ncRNA appartiene la sotto-classe dei *circular* RNA (circRNA), un gruppo estremamente interessante di lncRNA che è stato recentemente descritto e che sembrano esercitare un ruolo critico nel modulare la connessione tra genotipo e fenotipo molecolare (8).

Come verrà descritto nel corso di questo articolo, i meccanismi di regolazione dell'espressione genica dei lncRNA non sono stati del tutto spiegati ed inoltre sembrano essere molto più complicati del semplice meccanismo riguardante il legame dei miRNA a sequenze complementari a livello del 3'UTR di specifici mRNA *target*. Questi coinvolgono, infatti, meccanismi di regolazione della trascrizione a livello epigenetico, di processamento per RNA messaggeri e di controllo dell'attività proteica.

Per il loro carattere innovativo ed in parte inesplorato crediamo sia interessante riassumere i più recenti avanzamenti culturali sul ruolo dei lncRNA nel diabete con particolare attenzione alle complicanze vascolari ad esso associate.

SCOPERTA E CLASSIFICAZIONE DEI NON CODING RNA

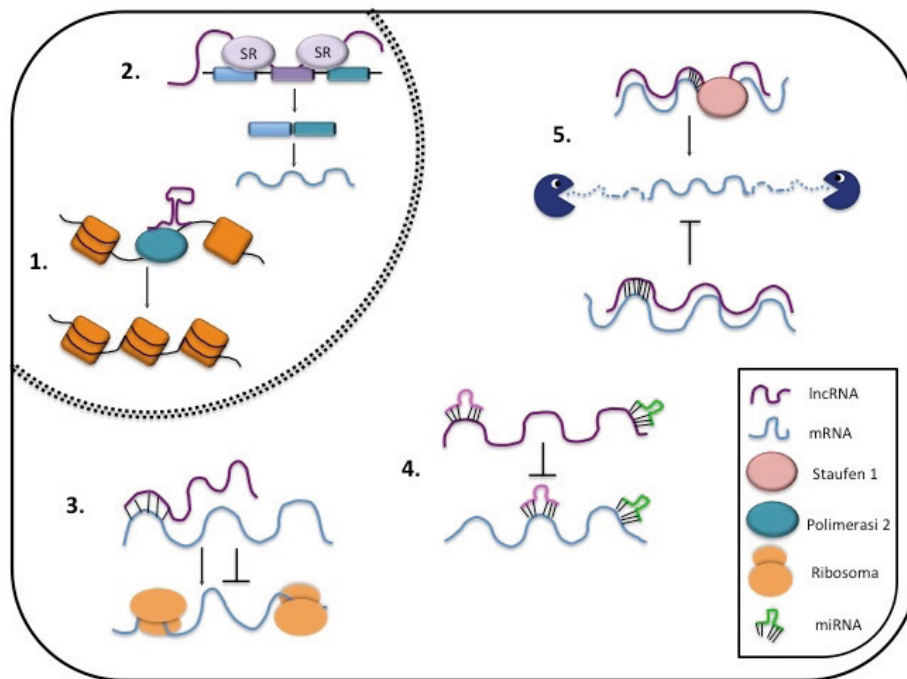
Nel 1990 un consorzio internazionale, costituito da Stati Uniti d'America, Regno Unito, Francia, Australia e Cina avviò il Progetto Genoma Umano (HGP *Human Genome Project*), con lo scopo di identificare la sequenza dei geni della specie umana e la loro posizione sui vari cromosomi, costruendo così una mappa del genoma. All'avvio del Progetto Genoma Umano i ricercatori ipotizzarono che il nostro genoma comprendesse circa 100.000 geni codificanti per proteine (9), tuttavia nel corso degli anni questa stima è stata costantemente rivalutata. Nel 2001, il consorzio internazionale pubblicò una prima bozza della sequenza del genoma umano che comprendeva circa 30.000-35.000 geni codificanti per proteine, circa un terzo di quelli indicati nelle prime stime (10). Nel 2004, quando è stata pubblicata la versione finale del Progetto Genoma Umano, questa stima è stata ulteriormente ridotta a 24.500 (11); nel 2007 un'ulteriore analisi ha stabilito che il genoma umano comprendeva circa 20.500 geni codificanti per proteine (12). Infine nuovi studi hanno aggiornato il numero di geni codificanti a 19.000 (13). Sulla base dei risultati ottenuti dal Progetto Genoma Umano è emerso che meno del 2% dell'intero genoma umano codifica per proteine ed il rimanente 98% fu informalmente denominato "*junk DNA*", in quanto veniva considerato erroneamente privo di funzione. Nell'ultimo decennio, al fine di comprendere il reale significato di queste scoperte, sono state avviate due importanti iniziative scientifiche sostenute dall'Istituto Nazionale di Sanità degli Stati Uniti, i progetti ENCODE e *Roadmap Epigenomics* allo scopo di comprendere

il ruolo del “*junk DNA*” (14-15). I risultati mostrarono che circa l’80% del genoma umano è pervasivamente trascritto ma non tradotto in proteine; per quanto noto quindi queste molecole di RNA sono state denominate *non-coding RNA*. Da studi di genomica comparativa è emerso inoltre che la porzione di DNA non codificante, rispetto a quella che codifica per proteine aumenta in funzione della complessità evolutiva degli organismi superiori (16). Negli organismi complessi, l’aumento di trascritti non codificanti per proteine ha portato a considerare l’ipotesi che i *non-coding RNA* (ncRNA) rappresentino i componenti di un sistema di regolazione parallelo a quello mediato dalle proteine ma molto più sofisticato. L’RNA è una molecola versatile adatta a svolgere molteplici funzioni regolatorie. La multifunzionalità dell’RNA deriva da diverse proprietà chimico-fisiche uniche della molecola. L’RNA mediante semplice appaiamento di basi può riconoscere e legare molecole *target* sia di DNA che di RNA in modo molto specifico e regolarne in questo modo la trascrizione, il processamento, l’editing, la traduzione o la degradazione. Le molecole di RNA possono ripiegarsi in complesse strutture tridimensionali fornendo superfici di riconoscimento per numerosi *target* molecolari (incluse le proteine) a cui l’RNA può legarsi con elevata specificità ed affinità; il legame di specifici ligandi può inoltre innescare modifiche conformazionali nella struttura terziaria dell’RNA. Una caratteristica importante delle molecole di RNA è data dalla loro elevata dinamicità; a differenza delle proteine, l’RNA può essere rapidamente trascritto e degradato e questo rende l’RNA una molecola estremamente dinamica in grado di andare incontro a rapida attivazione o inattivazione (17). La classificazione più comune dei *non-coding RNA* è basata sulla loro dimensione. In base a questo parametro i *non-coding RNA* vengono suddivisi in due categorie principali: (1) i *long non-coding RNA* (lncRNA) che presentano una lunghezza superiore ai 200 nucleotidi; (2) gli *small non-coding RNA* che hanno dimensioni uguali o inferiori ai 200 nucleotidi; quest’ultima classe comprende gli *small nuclear RNA* (snRNA o U-RNA), gli *small nucleolar RNA* (snoRNA), i *PIWI-interacting RNA* (piRNA), i *transfer RNA* (tRNA) ed i *microRNA* (miRNA) (18). Un altro metodo di classificazione si basa sull’attività funzionale dei *non-coding RNA*. Sulla base di questa classificazione i ncRNA vengono distinti in ncRNA *housekeeping*, espressi costitutivamente, necessari per le normali funzioni e per la sopravvivenza della cellula ed i ncRNA regolatori espressi solo in specifici stadi dello sviluppo, del differenziamento cellulare o in risposta a stimoli esterni (19). Alla prima classe appartengono i tRNA, rRNA (*ribosomal RNA*), snRNA, snoRNA, *telomerase RNA*, mentre alla seconda classe i miRNA, siRNA, i lncRNA, piRNA (20).

lncRNA: LONG NON-CODING RNA

I lncRNA rappresentano la classe più eterogenea di RNA non codificanti, con una lunghezza che va da 200 nucleotidi (nt) a 100 kilo-basi (kb). Tali trascritti sono considerati non codificanti per l’assenza di lunghe ORF (*Open Reading Frame*) (più di 100 codoni), tuttavia è stato recentemente dimostrato che alcuni lncRNA possono codificare per piccoli peptidi ed in questo caso possono agire in maniera bifunzionale sia da trascritti codificanti che non codificanti (es. lncRNA SRA) (21-22). I lncRNA mostrano numerose caratteristiche comuni ai trascritti codificanti per proteine: essi sono trascritti dall’RNA polimerasi II, presentano spesso il cap al 5’, siti canonici di *splicing* e sono poliadenilati. Tuttavia a differenza dei geni codificanti per proteine i lncRNA presentano bassi livelli di espressione, sono meno conservati dal punto di vista evolutivo, sono di dimensioni inferiori e solitamente costituiti da 1-2 esoni (23). Attualmente, LNCipedia 4.0 registra più di 118.000 lncRNA umani (24), ed il numero totale dei lncRNA identificati continua ad aumentare, grazie alla maggiore sensibilità delle tecniche di sequenziamento ed al miglioramento delle tecniche di predizione computazionali. La maggior parte dei lncRNA presenta meccanismi di azione sconosciuti; solo per poche molecole è noto il preciso meccanismo d’azione e la lista dei lncRNA caratterizzati dal punto di vista funzionale è attualmente in continua crescita. I lncRNA sono in grado di regolare l’espressione genica a diversi livelli: epigenetico, trascrizionale, post-trascrizionale, traduzionale, post-traduzionale (25). A livello epigenetico, i lncRNA possono regolare gli stati di compattamento della cromatina mediante il reclutamento di complessi di rimodellamento della cromatina sia in *loci* genomici che si trovano in prossimità del loro sito di trascrizione (regolazione in *cis*) o in *loci* genomici distanti (regolazione in *trans*). Degli esempi di queste modalità di regolazione sono dati rispettivamente dal lncRNA ANRIL (*lncRNA Antisense Noncoding RNA in the INK4 Locus*) e da HOTAIR (*HOX Transcript Antisense RNA*). ANRIL è il lncRNA antisense del gene

Figura 1 ◆ Principali meccanismi d'azione dei lncRNA



1. Regolazione epigenetica: i lncRNA sono in grado di reclutare i complessi di rimodellamento della cromatina attivando o reprimendo l'espressione genica
2. *Splicing* alternativo: legandosi agli mRNA target, i lncRNA sono in grado di modulare gli eventi di *splicing*; SR: *Splicing Region*
3. Regolazione della traduzione: i lncRNA sono capaci di controllare il tasso di traduzione, favorendo o inibendo il caricamento degli mRNA sui polisomi
4. Azione da spugna per i miRNA: agendo da "miRNA-sponge", i lncRNA possono sequestrare i miRNA e inibirne l'attività sugli mRNA target
5. Incremento o inibizione della degradazione delle molecole di mRNA: i lncRNA sono in grado di regolare positivamente o negativamente (mediante il coinvolgimento della proteina Staufen 1) la stabilità degli mRNA

che codifica per INK4A, questo lncRNA viene trascritto in prossimità del locus genomico che codifica per INK4A, interagisce con i componenti del *Polycomb Repressive Complex 1* (PRC1) determinando il silenziamento del gene INK4A (26). Il lncRNA HOTAIR, trascritto a livello del locus HOXC, reprime l'espressione genica del locus HOXD che si trova a 40 kb di distanza mediante l'interazione con il *Polycomb Repressive Complex 2* (PR2) (27). A livello trascrizionale, i lncRNA mediante il legame a livello del proprio promotore, possono impedire l'accesso a fattori di trascrizione inibendo la trascrizione di specifici geni (ad esempio il lncRNA DHFR *DiHydroFolate Reductase*) (28-29). A livello post-trascrizionale, i lncRNA possono regolare il processamento dei pre-mRNA e la stabilità/degradazione degli mRNA. I lncRNA antisense grazie alla loro complementarità di sequenza possono formare duplex RNA-RNA con l'RNA senso corrispondente interferendo con il riconoscimento dei siti di *splicing* e con il reclutamento dei componenti dello *spliceosoma* (es. trascritto antisense di N-myc) (30-32). I lncRNA sono in grado di regolare positivamente o negativamente la stabilità degli mRNA. Un esempio di regolazione positiva della stabilità dell'mRNA è dato dal lncRNA BACE1AS (B-site APP Cleaving Enzyme 1 Antisense Strand), la formazione del duplex RNA-RNA aumenta la stabilità dell'mRNA mediante il mascheramento dei siti di riconoscimento del miR-485-5p inibendo la repressione trascrizionale indotta dal miRNA. Per quanto riguarda la regolazione negativa della stabilità degli mRNA, alcuni lncRNA contenenti ripetizioni Alu, denominati *1/2-STAU1-binding site RNA*, sono in grado di legare mRNA contenenti elementi Alu complementari al 3' e di attivare la *Stau1 Mediated Decay* (SMD) (33). Infine l'interazione tra lncRNA antisense e mRNA senso può avere effetto a livello traduzionale; un esempio è dato dal lncRNA antisense del gene Uchl1 (*Ubiquitin Carboxyl-terminal Hydrolase isozyme L1*); l'interazione tra il lncRNA e l'RNA senso corrispondente può attivare i polisomi determinando un incremento della traduzione dell'mRNA (34).

I lncRNA sono anche in grado di agire da *scaffold* molecolari per collegare due o più proteine in complessi funzionali, possono regolare la localizzazione di complessi proteici in determinati compartimenti cellulari e possono regolare l'attività funzionale di proteine (35). Infine è stato riportato che i lncRNA sono in grado di interagire con i microRNA riducendo la loro attività regolatoria sugli RNA messaggeri (mRNA) *target* (36). Diversi studi recenti hanno dimostrato che i lncRNA sono coinvolti nella regolazione di una vasta gamma di processi biologici, come la regolazione del ciclo cellulare, la pluripotenza, il differenziamento e la morte cellulare (37-40). Alcune evidenze sperimentali inoltre suggeriscono il ruolo fondamentale dei lncRNA nella regolazione del differenziamento e della funzione di tessuti associati a funzioni metaboliche, è stato infatti recentemente riportato che i lncRNA sono coinvolti nella regolazione dell'adipogenesi (41), nel differenziamento e nel mantenimento della funzionalità β -cellulare (42) e nella regolazione del metabolismo lipidico e glucidico (43). Quanto fin qui esposto rende ragione dell'importanza di questi avanzamenti scientifici e culturali nel campo del diabete. Questi nuovi marcatori molecolari potranno servire in futuro per la diagnosi precoce e per la gestione clinica del paziente diabetico e delle sue complicanze.

circRNA: CIRCULAR RNA

Una classe particolare di lncRNA scoperta molto di recente è rappresentata dai *circular RNA*. I circRNA presentano una struttura circolare determinata dalla presenza di un legame covalente che unisce le estremità 3' e 5' (41). La mancanza di estremità libere conferisce ai *circular RNA* un'elevata stabilità nei confronti della degradazione da parte delle esonucleasi. Anche se l'esistenza di RNA circolari era nota già alla fine degli anni Settanta (44-45), queste molecole di RNA per lungo tempo sono state considerate dei sottoprodotti del processamento dei pre-mRNA derivanti da errori di *splicing* (44). I circRNA sono prodotti a partire dai precursori di geni codificanti per proteine mediante un fenomeno denominato *back-splicing*, questo processo molecolare differisce dallo *splicing* canonico delle molecole lineari di RNA ma si avvale dello stesso macchinario dello *spliceosoma* (46). La biogenesi dei circRNA può avvenire sia a partire dagli esoni (circRNA esonici) che dagli introni (circRNA intronici, ciRNA) dei pre-mRNA (47). Dal momento che la maggior parte dei circRNA sono costituiti esclusivamente da esoni (in genere 2-3) (48), probabilmente queste molecole vanno in contro a fenomeni di *splicing* prima o dopo la loro circolarizzazione che determinano la rimozione di eventuali introni (49). Tuttavia molto recentemente è stata identificata una classe di circRNA denominata EICiRNA (*exon-intron-circRNA*), caratterizzata dalla presenza di introni non rimossi all'interno della loro struttura, questa classe è inoltre caratterizzata dall'aver una specifica localizzazione a livello nucleare. Attualmente sono stati annotati circa 35.000 circRNA nel *database* circBase (50). È stato stimato che i circRNA costituiscano l'1-10% dell'intero trascrittoma della cellula, nella maggior parte dei casi presentano bassi livelli di espressione rispetto alla loro isoforma lineare, sebbene in alcuni casi l'espressione della forma circolare superi quella lineare, inoltre è stato riportato che i circRNA vengono espressi in maniera tessuto specifica (46). Per la maggior parte dei circRNA non sono noti i meccanismi molecolari d'azione e i processi biologici in cui sono coinvolti. In alcuni casi i circRNA agiscono da "spugne molecolari" in grado di sequestrare i microRNA (51). La presenza di siti di legame multipli per uno specifico microRNA e la resistenza alla degradazione indotta dai microRNA dovuta all'assenza del cap al 5' e della coda di poli A al 3', permettono al circRNA di competere con gli mRNA target di uno specifico microRNA inibendone l'azione biologica (49). Degli esempi sono rappresentati dal ciRS-7 (*circular sponge for miR-7*), preferenzialmente espresso a livello cerebrale, che contiene più di 70 siti di legame conservati per il miR-7 e dal circSRY (*circ Sex-determining Region Y*), preferenzialmente espresso a livello dei testicoli, che contiene 16 siti di legame per il miR-138 (49). Oltre ad agire da "miRNA sponge" i circRNA sono in grado d'interagire con RNA *binding protein* (RBP), come ad esempio circ-Foxo3 (52) e circ-MBL (*muscleblind*) (53). Le sottoclassi rappresentate dai ciRNA e EICiRNA, preferenzialmente espressi a livello nucleare, sembrano agire da regolatori positivi dell'espressione genica. È stato infatti riportato che i EICiRNA sono in grado di interagire con la *small nuclear ribonucleoprotein U1*. Il complesso *ELcircRNA-snRNP U1* si lega al promotore del gene parentale e ne incrementa l'espressione genica mediata dalla RNA polimerasi II (46). È stato riportato che alcuni circRNA intronici, come ad esempio ci-ankrd52 e ci-sirt7 sono in grado di regolare l'espressione genica mediante l'interazione con l'RNA polimerasi II (54). Studi molto recenti suggeriscono che la deregolazione dei

circRNA sia associata all'insorgenza ed alla progressione di diversi tipi di patologie oncologiche (54), neurodegenerative e metaboliche e tra questi il diabete mellito (55-56). Per esempio Xi Jin et al hanno identificato uno specifico *pattern* di espressione dei circRNA in modelli murini di NASH rispetto ai controlli sani, ed hanno identificato quattro network circRNA-miRNA-mRNA potenzialmente associate alla patogenesi dell'accumulo di grasso nel fegato ed allo sviluppo della NASH (57).

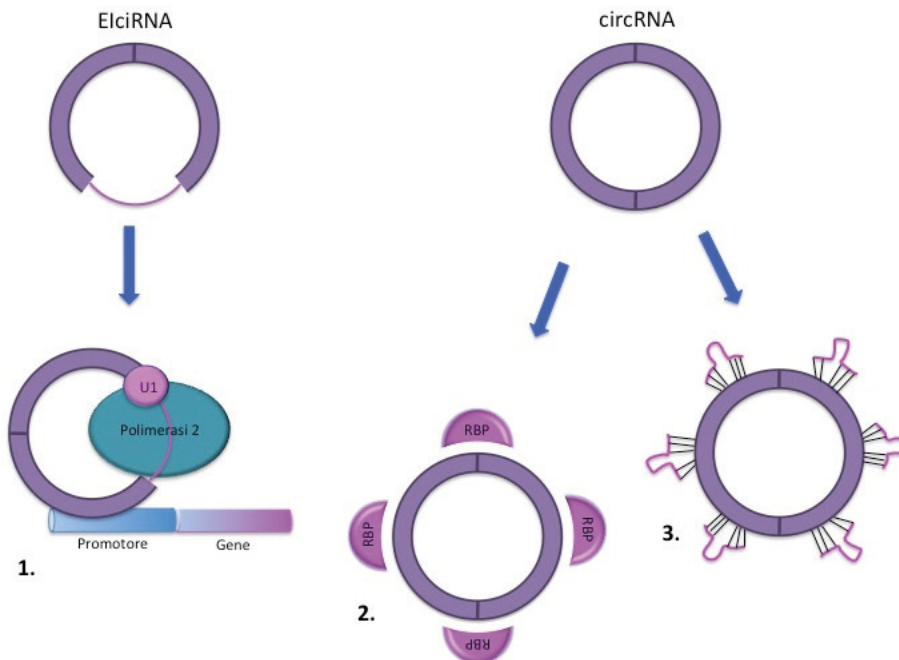
MECCANISMI REGOLATORI DEI LONG NON-CODING RNA NEL DIABETE DI TIPO 2

Long non-coding RNA e isola pancreatica

Come già riportato, il diabete di tipo 2 rappresenta una patologia complessa, caratterizzata da iperglicemia cronica derivante da uno stato di insulino-resistenza tissutale accompagnato da progressivo deterioramento della funzione beta-cellulare.

In qualità di tessuto chiave, responsabile della regolazione del metabolismo sistemico del glucosio, l'isola pancreatica continua ad essere un *focus* importante nelle ricerche attuali per comprendere la fisiopatologia del diabete (58). Nel tentativo di identificare lncRNA implicati nella regolazione dello sviluppo e della funzione dell'isola, diversi gruppi di ricerca hanno eseguito analisi di *profiling* di lncRNA in isole pancreatiche. Moran e collaboratori per primi, nel 2012, identificavano 1.128 lncRNA altamente specifici a livello delle isole pancreatiche umane, molti dei quali risultavano deregolati in corso di diabete, suggerendone un ruolo fisiopatologico (42). Tra questi lncRNA, in particolare, il lncRNA KCNQ1 ed il HI-LNC45 erano rispettivamente modulati positivamente e negativamente in isole provenienti da pazienti diabetici rispetto alle isole di controllo (42).

Figura 2 ◆ Meccanismi d'azione dei circular RNA



1. Il complesso ElciRNA-U1 (Exon Intron ciRNA - small nuclear ribonucleoprotein U1) è responsabile del reclutamento del RNA Polimerasi 2 sul promotore del gene ospite, attivandone la trascrizione
2. I circRNA sono in grado di agire da spugne per le proteine RBP (RNA binding Protein) inibendone l'interazione con i trascritti lineari
3. I circRNA, contenenti siti di legame per i miRNA, sono capaci di sequestrare i complessi AGO-miRNA inibendone l'azione sulle molecole di mRNA bersaglio

Altamente specifico a livello dell'isola pancreatica il lncRNA-HI-LNC25 pare regolare l'espressione di GLIS3, un fattore di trascrizione coinvolto nell'insorgenza del diabete di tipo 2 (42, 59-61).

Per quanto riguarda i circRNA, è stato recentemente dimostrato che la sovra-espressione del CirS-7 sia capace di incrementare la sintesi e la secrezione insulinica in beta cellule murine mediante l'inibizione del mir-7 (62), il circRNA-CDR1, invece, sembra responsabile del controllo della secrezione insulinica e del rinnovamento β -cellulare ed inoltre, analisi mediante *microarray*, condotte su campioni di sangue periferico provenienti da individui sani e diabetici, hanno permesso di individuare 489 circRNA differenzialmente espressi e tra questi, il hsa_circ_0054633 presentava ottime capacità diagnostiche come *biomarker* di pre-diabete e diabete di tipo 2 (63).

I dati finora ottenuti dimostrano che i lncRNA sono a tutti gli effetti componenti integrali del programma di differenziamento e di maturazione delle cellule beta pancreatiche e pertanto, un'espressione anormale di lncRNA distintivi dell'isola potrebbe essere responsabile di alterazioni metaboliche importanti ed influenzare la fisiopatologia del diabete.

Long non-coding RNA e sensibilità all'insulina

Per quanto riguarda il ruolo dei lncRNA nella modulazione dell'attività dell'insulina a livello periferico, gli studi condotti sono molto scarsi ed i risultati non conclusivi. Xu et al hanno osservato come negli adipociti, il lncRNA SRA (*Steroid Receptor RNA Activator*) migliori la sensibilità all'insulina e l'assorbimento del glucosio insulino-stimolato (62); i meccanismi alla base sembrano parzialmente dovuti alla capacità di SRA di regolare l'espressione di vari fattori che influenzano la sensibilità all'insulina: sembrerebbe infatti che tale *long non-coding RNA* possa essere capace di sopprimere l'espressione di fattori regolatori negativi della sensibilità come SOCS-1 e -3 e di promuovere parallelamente l'espressione di regolatori positivi come Sorbs1 (62). Gli stessi autori hanno inoltre dimostrato come SRA sia in grado di potenziare il *signaling* insulinico e il trasporto del glucosio attraverso la *pathway* di Akt e FOXO1; lo spegnimento selettivo di SRA mediante trasfezione causa, infatti, l'inibizione della fosforilazione di Akt e FOXO1 e la riduzione dell'assorbimento del glucosio insulino-mediato (62).

Recentemente, Gao e collaboratori, effettuando esperimenti di *profiling* su biopsie di muscolo scheletrico, hanno osservato come il lnc H19 possa essere regolato positivamente in campioni provenienti da soggetti diabetici rispetto ai controlli sani, suggerendo un ruolo significativo di questo ncRNA nel segnale insulinico a livello muscolare (64).

Benché il fegato venga considerato l'organo chiave, responsabile dell'omeostasi del glucosio *in vivo*, finora sono davvero pochissimi gli studi che hanno identificato lncRNA implicati nella regolazione del metabolismo glucidico a livello epatico. Li et al, nel 2015, hanno osservato come topi con deplezione specifica del ncRNA lncLSTR presentino una maggiore *clearance* dei trigliceridi dipendente dalla modulazione dell'espressione di apoC2 (65).

RUOLO DEI LONG NON-CODING RNA NELLE COMPLICANZE VASCOLARI DEL DIABETE DI TIPO 2

Complicanze microvascolari

È noto che il diabete induce danni a livello macro e microvascolare in vari organi e tessuti, determinando così l'insorgenza di complicanze macrovascolari (aterosclerosi, ipertensione ed ictus) e microvascolari (retinopatia diabetica, nefropatia diabetica e neuropatia diabetica) (66-67).

Nel corso di questi anni si è cercato di studiare il ruolo dei lncRNA e dei circRNA sia nei meccanismi molecolari associati all'insorgenza delle complicanze correlate al diabete sia come biomarcatori di danno precoce di tali complicanze. Per quanto riguarda le complicanze microvascolari, ad oggi le evidenze scientifiche riguardano solo il coinvolgimento dei lncRNA.

La retinopatia diabetica (RD) è caratterizzata da una progressiva disfunzione dei vasi retinici e rappresenta la principale causa di perdita della vista negli adulti (68-69). Uno dei primi studi riguardante il ruolo dei lncRNA nell'insorgenza della RD, è stato pubblicato nel 2014 dal gruppo di Yan (70) ed ha identificato, tramite analisi di *microarray*, 303 lncRNA

che avevano un'alterata espressione (214 sotto-espressi e 89 sovra-espressi) nella retina di topi resi diabetici dopo iniezione di streptozotocina; questi lcnRNA erano correlati a varie *pathway* come quella di orientamento assonale che era essenziale per l'angiogenesi retinica. In questi studi in particolare è stato individuato il lncRNA MALAT1 (*Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1*) altamente espresso anche nell'umor acqueo e nelle membrane fibrovascolari di pazienti con RD e l'analisi bioinformatica ha dimostrato che MALAT1 poteva interagire con NF- κ B. Altre evidenze sperimentali hanno dimostrato che questo lncRNA aveva un ruolo importante nella disfunzione dei vasi retinici indotta dal diabete. Infatti il silenziamento di MALAT1 determinava una riduzione della vascolarizzazione retinica, del *leakage* vascolare e dell'infiammazione retinica e causava, inoltre, una inibizione della proliferazione e migrazione delle cellule endoteliali con un miglioramento della funzionalità retinica; inoltre l'iniezione intraoculare di un shRNA (*Short Hairpin RNA*) per MALAT1 promuoveva l'attività retinica e riduceva l'apoptosi delle cellule retiniche (71). Un altro lncRNA MIAT (*Myocardial Infarction Associated Transcript*) è stato trovato altamente espresso nei precursori delle cellule retiniche (72); inoltre sempre da Yan et al (73) è stato dimostrato che la sovra-espressione di MIAT promuoveva la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali in seguito ad iperglicemia, determinando così la disfunzione microvascolare, mentre il silenziamento di MIAT inibiva la risposta infiammatoria a livello endoteliale. Il meccanismo molecolare proposto dagli autori di questo lavoro è stato il seguente: MIAT potrebbe agire come un ceRNA (*Competing Endogenous RNA*) nella regolazione dei livelli di VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) inibendo ad esempio l'attività di quei microRNA che hanno come bersaglio il gene codificante il VEGF (73-74). Recentemente un altro lncRNA, ANRIL (*CDKN2B Antisense RNA 1*) è stato trovato sovra-espresso in colture di cellule endoteliali retiniche trattate con alto glucosio ed è stato dimostrato che l'espressione di ANRIL era responsabile dell'alterata espressione e funzione di VEGF in corso di RD (75). Oltre al coinvolgimento nel danno retinico, queste molecole sono state dimostrate implicate nel danno renale. La nefropatia diabetica (ND) è una malattia renale cronica caratterizzata da albuminuria, declino del filtrato glomerulare ed ipertensione arteriosa e se non trattata può evolvere in insufficienza renale terminale (ESRD) (76-77). Le cause che determinano l'insorgenza della ND sono ancora non del tutto note. Uno dei primi lncRNA che è stato associato alla ND è stato PVT1 (*Plasmacytoma Variant Translocation 1*); tramite analisi di *genome-wide* sono stati trovati polimorfismi a singolo nucleotide che indicavano PVT1 come *locus* di suscettibilità all'insorgenza della ND e della successiva ESRD (78); inoltre nelle cellule mesangiali trattate con alto glucosio vi era un aumento dell'espressione di PVT1 e delle proteine che compongono la matrice extracellulare. Il silenziamento di PVT1 attenuava l'espressione di queste proteine (79-80). L'espressione di MALAT1 era aumentata nei reni di topi diabetici ed era in grado di attivare vari mediatori dell'infiammazione con danno a livello endoteliale (81). Altri lncRNA sono stati identificati in queste condizioni; tra questi si citano ENSMUST00000147869 e CYP4B1-PS1-001 che sembrano regolare la proliferazione delle cellule mesangiali e la fibrosi indotta dalla ND (82-83); MIAT sembra invece coinvolto nel danneggiamento dell'epitelio del tubulo renale indotto dall'iperglicemia (84). Recentemente tramite *RNA sequencing* sono stati evidenziati 14 lncRNA differenzialmente espressi nel tessuto renale di topi diabetici con ND; tra questi è stato analizzato il meccanismo molecolare di un nuovo lncRNA, Gm4419. Questo lncRNA è stato trovato sovra-espresso nelle cellule mesangiali in condizioni di iperglicemia determinando un aumento dell'infiammazione, della fibrosi e della proliferazione di queste cellule. Gli autori hanno inoltre dimostrato che Gm4419, in condizioni di iperglicemia, attiva NF- κ B che a sua volta promuove l'induzione dei geni che fanno parte della *pathway* dell'inflammasoma, determinando così l'insorgenza dell'infiammazione, della fibrosi e della proliferazione delle cellule mesangiali in corso di ND (85).

Evidenze esistono anche per le complicanze a carico dei nervi. La neuropatia diabetica causa danni delle fibre nervose distali o prossimali sia a livello del sistema nervoso periferico che centrale (86). Anche se il ruolo dei lncRNA nella neuropatia diabetica è stato studiato solo recentemente, il loro coinvolgimento anche per questo tipo di complicanza sembra certo e documentato. Il lncRNA NONRAT021972 per esempio è stato trovato sovra-espresso nelle cellule PC12 (cellule di feocromocitoma di ratto) indotte al differenziamento in neuroni simpatetici tramite trattamento con NGF (*Nerve Growth Factor*) e successivamente esposte ad iperglicemia ed iperlipidemia. Gli autori del lavoro hanno dimostrato che NONRAT021972 attivava l'espressione del recettore P2X7 (*Purinergic Receptor P2X 7*) mediata dalla *pathway* della proteina p38; il silenziamento di NONRAT021972 determinava una riduzione dell'espressione di P2X7 e della neuro-

Tabella 1 ◆ lncRNA coinvolti nell'insorgenza di complicanze vascolari associate al diabete di tipo 2

COMPLICANZE	lncRNA
Retinopatia	MALAT1, MIAT, ANRIL
Nefropatia	PVT1, MALAT1, ENSMUST00000147869, CYP4B1-PS-001, MIAT, Gm4419
Neuropatia	NONRATT021972
Macroangiopatia	SENCR, p21, Ang362, HAS2-AS1, Carmn, MALAT1, circANRIL, circZNF292

infiammazione indotta (aumento di TNF- α) dall'attività di questo recettore con un aumento della vitalità cellulare (87). In seguito, gli stessi autori hanno dimostrato che l'espressione di NONRATT021972 era aumentata anche nel ganglio cervicale superiore di ratti diabetici. Questa alterazione determinava un incremento della produzione di TNF- α che a sua volta induceva la fosforilazione in serina di IRS-1 con una riduzione dell'espressione di IRS-1 totale e con la conseguente alterazione del *signaling* insulinico neuronale. Il silenziamento di NONRATT021972 portava ad una riduzione della produzione di TNF- α ed al ripristino del segnale insulinico intracellulare (88). Più recentemente tramite analisi di *microarray* sono stati trovati 373 lncRNA differenzialmente espressi a livello del ganglio cervicale superiore e del ganglio stellato di ratti diabetici. Questi lncRNA sembrano regolare mRNA coinvolti in *pathway* infiammatorie come quella delle chemochine, della risposta immunitaria e di difesa (89).

Lo studio dei lncRNA consente quindi di chiarire meglio la funzione delle *pathway* e dei meccanismi molecolari coinvolti nelle complicanze microvascolari del diabete, in questo modo alcuni lncRNA potrebbero essere utilizzati come marcatori molecolari di queste patologie.

COMPLICANZE MACROVASCOLARI

Come è noto le persone con diabete hanno una maggiore suscettibilità alle malattie cardiovascolari; l'iperglicemia determina un'alterazione a livello dei grossi vasi sanguigni e lo sviluppo di macroangiopatia diabetica (90-91).

I meccanismi molecolari alla base delle alterazioni macrovascolari indotte dall'iperglicemia non sono ancora ben conosciuti; per questo motivo, nel corso di questi anni, anche per questo aspetto della fisiopatologia del diabete sono stati indagati i lncRNA con risultati assolutamente promettenti (92-93). Il lncRNA SENCN (*Smooth Muscle and Endothelial Cell Enriched Migration/Differentiation-Associated*) è stato il primo ad essere identificato nelle cellule muscolari lisce dell'arteria coronarica umana (94). SENCN stabilizza le contrazioni delle cellule muscolari lisce vascolari (VSMC) e reprime la loro migrazione. Dal momento che l'iperglicemia induce la crescita delle cellule VSMC, SENCN potrebbe avere un ruolo in questo processo (94-95). Il lncRNA-p21 potrebbe essere anche coinvolto nelle complicanze vascolari e nell'infiammazione. Infatti, questo lncRNA sembra reprimere la proliferazione e stimolare l'apoptosi delle cellule VSMC e dei macrofagi regolando la *pathway* di p53. Inoltre è stato documentato sotto-espresso a livello della placca aterosclerotica in topi *knockout* per il gene ApoE e la sua inibizione promuoveva l'iperplasia neointimale a livello della carotide murina (96). È stato riportato che l'angiotensina II influenza l'espressione dei lncRNA a livello delle cellule VSMC; in particolare è stato dimostrato che il silenziamento del lncRNA Ang362 riduce la proliferazione delle cellule VSMC (97). È noto come l'accumulo di acido ialuronico a livello delle pareti delle arterie sia associato alle complicanze vascolari del diabete. Per valutare questo specifico aspetto della patogenesi delle complicanze è stato dimostrato che la sintesi di acido ialuronico è regolata dal lncRNA HAS2-AS1 (*HAS2 Antisense RNA 1*) espresso a livello delle cellule muscolari lisce dell'aorta umana con un meccanismo mediato dalla glicosilazione delle proteine; come è noto quest'ultima condizione ha un ruolo fondamentale nella calcificazione vascolare in corso di diabete (98-99). Il lncRNA Carmn (*Cardiac Mesoderm Enhancer-Associated Non-Coding RNA*) o E330013Po6 è stato dimostrato essere espresso nei macrofagi di soggetti diabetici

e potrebbe regolare l'espressione di geni pro-infiammatori e la formazione delle "foam cell", lesioni tipiche dell'aterosclerosi (100). Infine MALAT1, di cui è noto il coinvolgimento nelle complicanze microvascolari, sembra svolgere un ruolo importante anche in quelle macrovascolari. Questo fattore appare essere sovra-espresso nelle cellule endoteliali esposte ad alte concentrazioni di glucosio, dove sembra attivare l'espressione delle proteine infiammatorie (SAA3, IL-6, TNF- α) aumentando così il rischio cardiovascolare (81).

Tutte le evidenze sin qui descritte, indicano che i lncRNA svolgono un ruolo importante nella regolazione dei processi patologici associati all'alterata omeostasi del glucosio che s'instaurano a livello cardiovascolare e potrebbero essere utilizzati come *target* terapeutici per il trattamento delle disfunzioni endoteliali nelle complicanze macrovascolari.

Ad oggi, invece, sono ancora pochi gli studi effettuati sui circRNA nelle complicanze macrovascolari del diabete; tuttavia è auspicabile che anche queste classi meno studiate fino alla data attuale potranno aggiungere informazioni utili sulla fisiopatologia delle complicanze. Ad esempio il circANRIL sembra regolare l'espressione del locus genico INK4/ARF associato alla proliferazione vascolare ed allo sviluppo dell'aterosclerosi (101). Il circZNF292 (*Zinc Finger Protein 292*) invece appare espresso a livello delle cellule endoteliali e sembra svolgere attività pro-angiogenica; il suo silenziamento riduce l'angiogenesi e la proliferazione delle cellule endoteliali (102).

Nel corso di questi ultimi anni sono stati identificati numerosi *non coding* RNA coinvolti nelle complicanze micro e macrovascolari del diabete, anche se le loro funzioni ed i meccanismi di azione devono essere ulteriormente approfonditi. I risultati ottenuti hanno dimostrato che i lncRNA svolgono un ruolo fondamentale e potrebbero rappresentare nuovi *marker* diagnostici e *target* terapeutici per il trattamento del diabete e delle sue complicanze.

CONCLUSIONI

I *non-coding* RNA negli ultimi anni hanno rivoluzionato la medicina moderna. Questa classe di molecole ha permesso di comprendere nel dettaglio aspetti sconosciuti della biologia molecolare. Questi nuovi aspetti molecolari di conseguenza hanno determinato progressi in ogni singolo aspetto della biologia e della medicina. Oltre a rappresentare il reale significato della "medicina traslazionale", dal bancone di laboratorio alla vita reale del paziente, rappresentano orizzonti che mancavano alla visione della biologia. Tutto era stato concentrato sul significato dei geni e delle proteine, ma la loro descrizione con il Progetto Genoma Umano aveva lasciato il sistema orfano di reali significati e spiegazioni. Troppo DNA era stato considerato "junk" e per certo la natura non ha l'abitudine di fare sprechi. Aver compreso che dentro la parte non codificante del DNA si nascondano i *non-coding* RNA ha apportato respiro, speranza e conoscenza. Questo è avvenuto per la medicina e per il diabete in particolare. La comprensione più fine di questi meccanismi ci accompagnerà nei prossimi anni nei nostri sforzi per la ricerca di base e nella gestione clinica dei pazienti. Queste molecole, infatti, potranno servire come biomarcatori per la diagnosi precoce di diabete e per la valutazione della predisposizione sia allo sviluppo della patologia che per la predisposizione alle complicanze. Per questo, tutto quello che deriverà da questi campi di ricerca sarà ben accetto ed apprezzato.

BIBLIOGRAFIA

1. Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes research and clinical practice* 103: 137-149, 2014.
2. Muggeo M, Verlato G, Bonora E, Bressan F, Girotto S, Corbellini M, Gemma ML, Moghetti P, Zenere M, Cacciatori V, et al. The Verona diabetes study: a population-based survey on known diabetes mellitus prevalence and 5-year all-cause mortality. *Diabetologia* 38: 318-325, 1995.
3. Harris MI, Klein R, Welborn TA, Knudman MW. Onset of NIDDM occurs at least 4-7 yr before clinical diagnosis. *Diabetes Care* 15: 815-819, 1992.
4. Samuels TA, Cohen D, Brancati FL, Coresh J, Kao WH. Delayed diagnosis of incident type 2 diabetes mellitus in the ARIC study. *The American journal of managed care* 12: 717-724, 2006.

5. Cebola I, Pasquali L. Non-coding genome functions in diabetes. *Journal of molecular endocrinology* 56: R1-R20, 2016.
6. Liu B, Li J, Cairns MJ. Identifying miRNAs, targets and functions. *Briefings in bioinformatics* 15: 1-19, 2014.
7. Feng J, Xing W, Xie L. Regulatory Roles of MicroRNAs in Diabetes. *International journal of molecular sciences* 17, 2016.
8. Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, Torti F, Krueger J, Rybak A, Maier L, Mackowiak SD, Gregersen LH, Munschauer M, Loewer A, Ziebold U, Landthaler M, Kocks C, le Noble F, Rajewsky N. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature* 495: 333-338, 2013.
9. Nowak R. Mining treasures from 'junk DNA'. *Science* 263: 608-610, 1994.
10. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczyk J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann Y, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissoe SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglu S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowki J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RE, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ, Szustakowki J, International Human Genome Sequencing C. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921, 2001.
11. International Human Genome Sequencing C. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431: 931-945, 2004.
12. Clamp M, Fry B, Kamal M, Xie X, Cuff J, Lin MF, Kellis M, Lindblad-Toh K, Lander ES. Distinguishing protein-coding and noncoding genes in the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 19428-19433, 2007.
13. Ezkurdia I, Juan D, Rodriguez JM, Frankish A, Diekhans M, Harrow J, Vazquez J, Valencia A, Tress ML. Multiple evidence strands suggest that there may be as few as 19,000 human protein-coding genes. *Human molecular genetics* 23: 5866-5878, 2014.
14. Bernstein BE, Stamatoyannopoulos JA, Costello JF, Ren B, Milosavljevic A, Meissner A, Kellis M, Marra MA, Beaudet AL, Ecker JR, Farnham PJ, Hirst M, Lander ES, Mikkelsen TS, Thomson JA. The NIH Roadmap Epigenomics Mapping Consortium. *Nature biotechnology* 28: 1045-1048, 2010.
15. Consortium EP, Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, Guigo R, Gingeras TR, Margulies EH, Weng Z, Snyder M, Dermitzakis ET, Thurman RE, Kuehn MS, Taylor CM, Neph S, Koch CM, Asthana S, Malhotra A, Adzhubei I, Greenbaum

- JA, Andrews RM, Flicek P, Boyle PJ, Cao H, Carter NP, Clelland GK, Davis S, Day N, Dhamsi P, Dillon SC, Dorschner MO, Fiegler H, Giresi PG, Goldy J, Hawrylycz M, Haydock A, Humbert R, James KD, Johnson BE, Johnson EM, Frum TT, Rosenzweig ER, Karnani N, Lee K, Lefebvre GC, Navas PA, Neri F, Parker SC, Sabo PJ, Sandstrom R, Shafer A, Vetric D, Weaver M, Wilcox S, Yu M, Collins FS, Dekker J, Lieb JD, Tullius TD, Crawford GE, Sunyaev S, Noble WS, Dunham I, Denoeud F, Raymond A, Kapranov P, Rozowsky J, Zheng D, Castelo R, Frankish A, Harrow J, Ghosh S, Sandelin A, Hofacker IL, Baertsch R, Keefe D, Dike S, Cheng J, Hirsch HA, Sekinger EA, Lagarde J, Abril JE, Shahab A, Flamm C, Fried C, Hackermuller J, Hertel J, Lindemeyer M, Missal K, Tanzer A, Washietl S, Korbelt J, Emanuelsson O, Pedersen JS, Holroyd N, Taylor R, Swarbreck D, Matthews N, Dickson MC, Thomas DJ, Weirauch MT, Gilbert J, Drenkow J, Bell I, Zhao X, Srinivasan KG, Sung WK, Ooi HS, Chiu KP, Foissac S, Alioto T, Brent M, Pachter L, Tress ML, Valencia A, Choo SW, Choo CY, Ucla C, Manzano C, Wyss C, Cheung E, Clark TG, Brown JB, Ganesh M, Patel S, Tammanna H, Chrast J, Henrichsen CN, Kai C, Kawai J, Nagalakshmi U, Wu J, Lian Z, Lian J, Newburger P, Zhang X, Bickel P, Mattick JS, Carninci P, Hayashizaki Y, Weissman S, Hubbard T, Myers RM, Rogers J, Stadler PF, Lowe TM, Wei CL, Ruan Y, Struhl K, Gerstein M, Antonarakis SE, Fu Y, Green ED, Karaoz U, Siepel A, Taylor J, Liefer LA, Wetterstrand KA, Good PJ, Feingold EA, Guyer MS, Cooper GM, Asimenos G, Dewey CN, Hou M, Nikolaev S, Montoya-Burgos JI, Loytynoja A, Whelan S, Pardi F, Massingham T, Huang H, Zhang NR, Holmes I, Mullikin JC, Ureta-Vidal A, Paten B, Seringhaus M, Church D, Rosenbloom K, Kent WJ, Stone EA, Program NCS, Baylor College of Medicine Human Genome Sequencing C, Washington University Genome Sequencing C, Broad I, Children's Hospital Oakland Research I, Batzoglou S, Goldman N, Hardison RC, Haussler D, Miller W, Sidow A, Trinklein ND, Zhang ZD, Barrera L, Stuart R, King DC, Ameer A, Enroth S, Bieda MC, Kim J, Bhinge AA, Jiang N, Liu J, Yao F, Vega VB, Lee CW, Ng P, Shahab A, Yang A, Moqtaderi Z, Zhu Z, Xu X, Squazzo S, Oberley MJ, Inman D, Singer MA, Richmond TA, Munn KJ, Rada-Iglesias A, Wallerman O, Komorowski J, Fowler JC, Couttet P, Bruce AW, Dovey OM, Ellis PD, Langford CF, Nix DA, Euskirchen G, Hartman S, Urban AE, Kraus P, Van Calcar S, Heintzman N, Kim TH, Wang K, Qu C, Hon G, Luna R, Glass CK, Rosenfeld MG, Aldred SF, Cooper SJ, Halees A, Lin JM, Shulha HP, Zhang X, Xu M, Haidar JN, Yu Y, Ruan Y, Iyer VR, Green RD, Wadelius C, Farnham PJ, Ren B, Harte RA, Hinrichs AS, Trumbower H, Clawson H, Hillman-Jackson J, Zweig AS, Smith K, Thakkapallayil A, Barber G, Kuhn RM, Karolchik D, Armengol L, Bird CP, de Bakker PI, Kern AD, Lopez-Bigas N, Martin JD, Stranger BE, Woodroffe A, Davydov E, Dimas A, Eyas E, Hallgrimsdottir IB, Huppert J, Zody MC, Abecasis GR, Estivill X, Bouffard GG, Guan X, Hansen NF, Idol JR, Maduro VV, Maskeri B, McDowell JC, Park M, Thomas PJ, Young AC, Blakesley RW, Muzny DM, Sodergren E, Wheeler DA, Worley KC, Jiang H, Weinstock GM, Gibbs RA, Graves T, Fulton R, Mardis ER, Wilson RK, Clamp M, Cuff J, Gnerre S, Jaffe DB, Chang JL, Lindblad-Toh K, Lander ES, Koriabine M, Nefedov M, Osoegawa K, Yoshinaga Y, Zhu B, de Jong PJ. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 447: 799-816, 2007.
16. Sana J, Faltejskova P, Svoboda M, Slaby O. Novel classes of non-coding RNAs and cancer. *Journal of translational medicine* 10: 103, 2012.
 17. Geisler S, Collier J. RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts. *Nature reviews Molecular cell biology* 14: 699-712, 2013.
 18. Ragusa M, Barbagallo C, Statello L, Condorelli AG, Battaglia R, Tamburello L, Barbagallo D, Di Pietro C, Purrello M. Non-coding landscapes of colorectal cancer. *World journal of gastroenterology* 21: 11709-11739, 2015.
 19. Szymanski M, Barciszewski J. Beyond the proteome: non-coding regulatory RNAs. *Genome biology* 3: reviews0005, 2002.
 20. Ragusa M, Brex D, Caponnetto A, Cirnigliaro M, Battaglia R, Barbagallo D, Di Pietro C, and Purrello M. Molecular Cross-talking among Noncoding RNAs: A New Network Layer of Genome Regulation in Cancer. *International Journal of Genomics*: 17, 2017.
 21. Morris KV, Mattick JS. The rise of regulatory RNA. *Nature reviews Genetics* 15: 423-437, 2014.
 22. Nam JW, Choi SW, You BH. Incredible RNA: Dual Functions of Coding and Noncoding. *Molecules and cells* 39: 367-374, 2016.
 23. Quinn JJ, Chang HY. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nature reviews Genetics* 17: 47-62, 2016.

24. Volders PJ, Helsens K, Wang X, Menten B, Martens L, Gevaert K, Vandesompele J, Mestdagh P. LNCipedia: a database for annotated human lncRNA transcript sequences and structures. *Nucleic acids research* 41: D246-251, 2013.
25. Gomes AQ, Nolasco S, Soares H. Non-coding RNAs: multi-tasking molecules in the cell. *International journal of molecular sciences* 14: 16010-16039, 2013.
26. Yap KL, Li S, Munoz-Cabello AM, Raguz S, Zeng L, Mujtaba S, Gil J, Walsh MJ, Zhou MM. Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Molecular cell* 38: 662-674, 2010.
27. Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Bruggmann SA, Goodnough LH, Helms JA, Farnham PJ, Segal E, Chang HY. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* 129: 1311-1323, 2007.
28. Martianov I, Ramadass A, Serra Barros A, Chow N, Akoulitchev A. Repression of the human dihydrofolate reductase gene by a non-coding interfering transcript. *Nature* 445: 666-670, 2007.
29. Nie L, Wu HJ, Hsu JM, Chang SS, Labaff AM, Li CW, Wang Y, Hsu JL, Hung MC. Long non-coding RNAs: versatile master regulators of gene expression and crucial players in cancer. *American journal of translational research* 4: 127-150, 2012.
30. Boon RA, Jae N, Holdt L, Dimmeler S. Long Noncoding RNAs: From Clinical Genetics to Therapeutic Targets? *Journal of the American College of Cardiology* 67: 1214-1226, 2016.
31. Krystal GW, Armstrong BC, Battey JF. N-myc mRNA forms an RNA-RNA duplex with endogenous antisense transcripts. *Molecular and cellular biology* 10: 4180-4191, 1990.
32. Faghihi MA, Wahlestedt C. Regulatory roles of natural antisense transcripts. *Nature reviews Molecular cell biology* 10: 637-643, 2009.
33. Gong C, Maquat LE. lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements. *Nature* 470: 284-288, 2011.
34. Villegas VE, Zaphiropoulos PG. Neighboring gene regulation by antisense long non-coding RNAs. *International journal of molecular sciences* 16: 3251-3266, 2015.
35. Engreitz JM, Ollikainen N, Guttman M. Long non-coding RNAs: spatial amplifiers that control nuclear structure and gene expression. *Nature reviews Molecular cell biology* 17: 756-770, 2016.
36. Paraskevopoulou MD, Hatzigeorgiou AG. Analyzing MiRNA-LncRNA Interactions. *Methods in molecular biology* 1402: 271-286, 2016.
37. Fatica A, Bozzoni I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nature reviews Genetics* 15: 7-21, 2014.
38. Kitagawa M, Kitagawa K, Kotake Y, Niida H, Ohhata T. Cell cycle regulation by long non-coding RNAs. *Cellular and molecular life sciences* 70: 4785-4794, 2013.
39. Rosa A, Ballarino M. Long Noncoding RNA Regulation of Pluripotency. *Stem cells international* 2016: 1797692, 2016.
40. Su Y, Wu H, Pavlosky A, Zou LL, Deng X, Zhang ZX, Jevnikar AM. Regulatory non-coding RNA: new instruments in the orchestration of cell death. *Cell death & disease* 7: e2333, 2016.
41. Sun L, Goff LA, Trapnell C, Alexander R, Lo KA, Hacisuleyman E, Sauvageau M, Tazon-Vega B, Kelley DR, Hendrickson DG, Yuan B, Kellis M, Lodish HF, Rinn JL. Long noncoding RNAs regulate adipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 3387-3392, 2013.
42. Moran I, Akerman I, van de Bunt M, Xie R, Benazra M, Nammo T, Arnes L, Nakic N, Garcia-Hurtado J, Rodriguez-Segui S, Pasquali L, Sauty-Colace C, Beucher A, Scharfmann R, van Arensbergen J, Johnson PR, Berry A, Lee C, Harkins T, Gmyr V, Pattou F, Kerr-Conte J, Piemonti L, Berney T, Hanley N, Gloyn AL, Sussel L, Langman L, Brayman KL, Sander M, McCarthy MI, Ravassard P, Ferrer J. Human beta cell transcriptome analysis uncovers lncRNAs that are tissue-specific, dynamically regulated, and abnormally expressed in type 2 diabetes. *Cell metabolism* 16: 435-448, 2012.
43. Chen G, Yu D, Nian X, Liu J, Koenig RJ, Xu B, Sheng L. LncRNA SRA promotes hepatic steatosis through repressing the expression of adipose triglyceride lipase (ATGL). *Scientific reports* 6: 35531, 2016.

44. Cocquerelle C, Mascrez B, Hetuin D, Bailleul B. Mis-splicing yields circular RNA molecules. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 7: 155-160, 1993.
45. Sanger HL, Klotz G, Riesner D, Gross HJ, Kleinschmidt AK. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73: 3852-3856, 1976.
46. Chen LL. The biogenesis and emerging roles of circular RNAs. *Nature reviews Molecular cell biology* 17: 205-211, 2016.
47. Chen I, Chen CY, Chuang TJ. Biogenesis, identification, and function of exonic circular RNAs. *Wiley interdisciplinary reviews RNA* 6: 563-579, 2015.
48. Zhang XO, Wang HB, Zhang Y, Lu X, Chen LL, Yang L. Complementary sequence-mediated exon circularization. *Cell* 159: 134-147, 2014.
49. Ebbesen KK, Kjems J, Hansen TB. Circular RNAs: Identification, biogenesis and function. *Biochimica et biophysica acta* 1859: 163-168, 2016.
50. Glazar P, Papavasileiou P, Rajewsky N. circBase: a database for circular RNAs. *Rna* 20: 1666-1670, 2014.
51. Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, Bramsen JB, Finsen B, Damgaard CK, Kjems J. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature* 495: 384-388, 2013.
52. Du WW, Yang W, Liu E, Yang Z, Dhaliwal P, Yang BB. Foxo3 circular RNA retards cell cycle progression via forming ternary complexes with p21 and CDK2. *Nucleic acids research* 44: 2846-2858, 2016.
53. Ashwal-Fluss R, Meyer M, Pamudurti NR, Ivanov A, Bartok O, Hanan M, Evantal N, Memczak S, Rajewsky N, Kadener S. circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing. *Molecular cell* 56: 55-66, 2014.
54. Meng S, Zhou H, Feng Z, Xu Z, Tang Y, Li P, Wu M. CircRNA: functions and properties of a novel potential biomarker for cancer. *Molecular cancer* 16: 94, 2017.
55. Kumar L, Shamsuzzama, Haque R, Baghel T, Nazir A. Circular RNAs: the Emerging Class of Non-coding RNAs and Their Potential Role in Human Neurodegenerative Diseases. *Molecular neurobiology* 2016.
56. Shao Y, Chen Y. Roles of Circular RNAs in Neurologic Disease. *Frontiers in molecular neuroscience* 9: 25, 2016.
57. Jin X, Feng CY, Xiang Z, Chen YP, Li YM. CircRNA expression pattern and circRNA-miRNA-mRNA network in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Oncotarget* 7: 66455-66467, 2016.
58. Guay C, Jacovetti C, Nesca V, Motterle A, Tugay K, Regazzi R. Emerging roles of non-coding RNAs in pancreatic beta-cell function and dysfunction. *Diabetes, obesity & metabolism* 14(Suppl 3): 12-21, 2012.
59. Barrett JC, Clayton DG, Concannon P, Akolkar B, Cooper JD, Erlich HA, Julier C, Morahan G, Nerup J, Nierras C, Plagnol V, Pociot F, Schuilenburg H, Smyth DJ, Stevens H, Todd JA, Walker NM, Rich SS. Type 1 Diabetes Genetics C: Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nature genetics* 41: 703-707, 2009.
60. Cho YS, Chen CH, Hu C, Long J, Ong RT, Sim X, Takeuchi F, Wu Y, Go MJ, Yamauchi T, Chang YC, Kwak SH, Ma RC, Yamamoto K, Adair LS, Aung T, Cai Q, Chang LC, Chen YT, Gao Y, Hu FB, Kim HL, Kim S, Kim YJ, Lee JJ, Lee NR, Li Y, Liu JJ, Lu W, Nakamura J, Nakashima E, Ng DP, Tay WT, Tsai FJ, Wong TY, Yokota M, Zheng W, Zhang R, Wang C, So WY, Ohnaka K, Ikegami H, Hara K, Cho YM, Cho NH, Chang TJ, Bao Y, Hedman AK, Morris AP, McCarthy MI, Consortium D, Mu TC, Takayanagi R, Park KS, Jia W, Chuang LM, Chan JC, Maeda S, Kadowaki T, Lee JY, Wu JY, Teo YY, Tai ES, Shu XO, Mohlke KL, Kato N, Han BG, Seielstad M. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies eight new loci for type 2 diabetes in east Asians. *Nature genetics* 44: 67-72, 2011.
61. Dupuis J, Langenberg C, Prokopenko I, Saxena R, Soranzo N, Jackson AU, Wheeler E, Glazer NL, Bouatia-Naji N, Gloyn AL, Lindgren CM, Magi R, Morris AP, Randall J, Johnson T, Elliott P, Rybin D, Thorleifsson G, Steinthorsdottir V, Henneman P, Grallert H, Dehghan A, Hottenga JJ, Franklin CS, Navarro P, Song K, Goel A, Perry JR, Egan JM, Lajunen T, Grarup N, Sparso T, Doney A, Voight BF, Stringham HM, Li M, Kanoni S, Shrader P, Cavalcanti-Proenca C, Kumari M, Qi L, Timpson NJ, Gieger C, Zabena C, Rocheleau G, Ingelsson E, An P, O'Connell J, Luan J, Elliott A, McCarroll SA, Payne F, Roccascella RM, Pattou F, Sethupathy P, Ardlie K, Ariyurek Y, Balkau B, Barter P, Beilby JP, Ben-Shlomo Y, Benediktsson R, Bennett AJ, Bergmann S, Bochud M, Boerwinkle E, Bonnefond A, Bonnycastle LL, Borch-Johnsen K, Bottcher Y, Brunner E, Bumpstead SJ, Charpentier G, Chen YD, Chines P, Clarke R, Coin LJ, Cooper MN, Cornelis M, Crawford G, Crisponi

- L, Day IN, de Geus EJ, Delplanque J, Dina C, Erdos MR, Fedson AC, Fischer-Rosinsky A, Forouhi NG, Fox CS, Frants R, Franzosi MG, Galan P, Goodarzi MO, Graessler J, Groves CJ, Grundy S, Gwilliam R, Gyllensten U, Hadjadj S, Hallmans G, Hammond N, Han X, Hartikainen AL, Hassanali N, Hayward C, Heath SC, Hercberg S, Herder C, Hicks AA, Hillman DR, Hingorani AD, Hofman A, Hui J, Hung J, Isomaa B, Johnson PR, Jorgensen T, Jula A, Kaakinen M, Kaprio J, Kesaniemi YA, Kivimaki M, Knight B, Koskinen S, Kovacs P, Kyvik KO, Lathrop GM, Lawlor DA, Le Bacquer O, Lecoeur C, Li Y, Lyssenko V, Mahley R, Mangino M, Manning AK, Martinez-Larrad MT, McAteer JB, McCulloch LJ, McPherson R, Meisinger C, Melzer D, Meyre D, Mitchell BD, Morken MA, Mukherjee S, Naitza S, Narisu N, Neville MJ, Oostra BA, Orru M, Pakyz R, Palmer CN, Paolisso G, Pattaro C, Pearson D, Peden JF, Pedersen NL, Perola M, Pfeiffer AF, Pichler I, Polasek O, Posthuma D, Potter SC, Pouta A, Province MA, Psaty BM, Rathmann W, Rayner NW, Rice K, Ripatti S, Rivadeneira F, Roden M, Rolandsson O, Sandbaek A, Sandhu M, Sanna S, Sayer AA, Scheet P, Scott LJ, Seedorf U, Sharp SJ, Shields B, Sigurdsson G, Sijbrands EJ, Silveira A, Simpson L, Singleton A, Smith NL, Sovio U, Swift A, Syddall H, Syvanen AC, Tanaka T, Thorand B, Tichet J, Tonjes A, Tuomi T, Uitterlinden AG, van Dijk KW, van Hoek M, Varma D, Visvikis-Siest S, Vitart V, Vogelzangs N, Waeber G, Wagner PJ, Walley A, Walters GB, Ward KL, Watkins H, Weedon MN, Wild SH, Willemssen G, Witteman JC, Yarnell JW, Zeggini E, Zelenika D, Zethelius B, Zhai G, Zhao JH, Zillikens MC, Consortium D, Consortium G, Global BC, Borecki IB, Loos RJ, Meneton P, Magnusson PK, Nathan DM, Williams GH, Hattersley AT, Silander K, Salomaa V, Smith GD, Bornstein SR, Schwarz P, Spranger J, Karpe F, Shuldiner AR, Cooper C, Dedoussis GV, Serrano-Rios M, Morris AD, Lind L, Palmer LJ, Hu FB, Franks PW, Ebrahim S, Marmot M, Kao WH, Pankow JS, Sampson MJ, Kuusisto J, Laakso M, Hansen T, Pedersen O, Pramstaller PP, Wichmann HE, Illig T, Rudan I, Wright AF, Stumvoll M, Campbell H, Wilson JF, Anders Hamsten on behalf of Procardis C, investigators M, Bergman RN, Buchanan TA, Collins FS, Mohlke KL, Tuomilehto J, Valle TT, Altshuler D, Rotter JI, Siscovick DS, Penninx BW, Boomsma DI, Deloukas P, Spector TD, Frayling TM, Ferrucci L, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K, van Duijn CM, Aulchenko YS, Cao A, Scuteri A, Schlessinger D, Uda M, Ruukonen A, Jarvelin MR, Waterworth DM, Vollenweider P, Peltonen L, Mooser V, Abecasis GR, Wareham NJ, Sladek R, Froguel P, Watanabe RM, Meigs JB, Groop L, Boehnke M, McCarthy MI, Florez JC, Barroso I. New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. *Nature genetics* 42: 105-116, 2010.
62. Xu B, Gerin I, Miao H, Vu-Phan D, Johnson CN, Xu R, Chen XW, Cawthorn WP, MacDougald OA, Koenig RJ. Multiple roles for the non-coding RNA SRA in regulation of adipogenesis and insulin sensitivity. *PLoS one* 5: e14199, 2010.
63. Zhao Z, Li X, Jian D, Hao P, Rao L, Li M. Hsa_circ_0054633 in peripheral blood can be used as a diagnostic biomarker of pre-diabetes and type 2 diabetes mellitus. *Acta diabetologica* 54: 237-245, 2017.
64. Gao Y, Wu F, Zhou J, Yan L, Jurczak MJ, Lee HY, Yang L, Mueller M, Zhou XB, Dandolo L, Szendroedi J, Roden M, Flannery C, Taylor H, Carmichael GG, Shulman GI, Huang Y. The H19/let-7 double-negative feedback loop contributes to glucose metabolism in muscle cells. *Nucleic acids research* 42: 13799-13811, 2014.
65. Li P, Ruan X, Yang L, Kiesewetter K, Zhao Y, Luo H, Chen Y, Gucek M, Zhu J, Cao H. A liver-enriched long non-coding RNA, lncLSTR, regulates systemic lipid metabolism in mice. *Cell metabolism* 21: 455-467, 2015.
66. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiological reviews* 93: 137-188, 2013.
67. Rahman S, Rahman T, Ismail AA, Rashid AR. Diabetes-associated macrovasculopathy: pathophysiology and pathogenesis. *Diabetes, obesity & metabolism* 9: 767-780, 2007.
68. Li F, Wen X, Zhang H, Fan X. Novel Insights into the Role of Long Noncoding RNA in Ocular Diseases. *International journal of molecular sciences* 17: 478, 2016.
69. Yau JW, Rogers SL, Kawasaki R, Lamoureux EL, Kowalski JW, Bek T, Chen SJ, Dekker JM, Fletcher A, Grauslund J, Haffner S, Hamman RF, Ikram MK, Kayama T, Klein BE, Klein R, Krishnaiah S, Mayurasakorn K, O'Hare JP, Orchard TJ, Porta M, Rema M, Roy MS, Sharma T, Shaw J, Taylor H, Tielsch JM, Varma R, Wang JJ, Wang N, West S, Xu L, Yasuda M, Zhang X, Mitchell P, Wong TY. Meta-Analysis for Eye Disease Study G: Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 35: 556-564, 2012.
70. Yan B, Tao ZF, Li XM, Zhang H, Yao J, Jiang Q. Aberrant expression of long noncoding RNAs in early diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science* 2014;55:941-951.

71. Liu JY, Yao J, Li XM, Song YC, Wang XQ, Li YJ, Yan B, Jiang Q. Pathogenic role of lncRNA-MALAT1 in endothelial cell dysfunction in diabetes mellitus. *Cell death & disease* 5: e1506, 2014.
72. Blackshaw S, Harpavat S, Trimarchi J, Cai L, Huang H, Kuo WP, Weber G, Lee K, Fraioli RE, Cho SH, Yung R, Asch E, Ohno-Machado L, Wong WH, Cepko CL. Genomic analysis of mouse retinal development. *PLoS biology* 2: E247, 2004.
73. Yan B, Yao J, Liu JY, Li XM, Wang XQ, Li YJ, Tao ZF, Song YC, Chen Q, Jiang Q. lncRNA-MIAT regulates microvascular dysfunction by functioning as a competing endogenous RNA. *Circulation research* 116: 1143-1156, 2015.
74. Jae N, Dimmeler S. Long noncoding RNAs in diabetic retinopathy. *Circulation research* 116: 1104-1106, 2015.
75. Thomas AA, Feng B, Chakrabarti S. ANRIL: A Regulator of VEGF in Diabetic Retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science* 58: 470-480, 2017.
76. Bichu P, Nistala R, Khan A, Sowers JR, Whaley-Connell A. Angiotensin receptor blockers for the reduction of proteinuria in diabetic patients with overt nephropathy: results from the AMADEO study. *Vascular health and risk management* 5: 129-140, 2009.
77. Himmelfarb J, Tuttle KR. New therapies for diabetic kidney disease. *The New England journal of medicine* 369: 2549-2550, 2013.
78. Hanson RL, Craig DW, Millis MP, Yeatts KA, Kobes S, Pearson JV, Lee AM, Knowler WC, Nelson RG, Wolford JK. Identification of PVT1 as a candidate gene for end-stage renal disease in type 2 diabetes using a pooling-based genome-wide single nucleotide polymorphism association study. *Diabetes* 56: 975-983, 2007.
79. Alvarez ML, DiStefano JK. Functional characterization of the plasmacytoma variant translocation 1 gene (PVT1) in diabetic nephropathy. *PloS one* 6: e18671, 2011.
80. Alvarez ML, Distefano JK. The role of non-coding RNAs in diabetic nephropathy: potential applications as biomarkers for disease development and progression. *Diabetes research and clinical practice* 99: 1-11, 2013.
81. Puthanveetil P, Chen S, Feng B, Gautam A, Chakrabarti S. Long non-coding RNA MALAT1 regulates hyperglycaemia induced inflammatory process in the endothelial cells. *Journal of cellular and molecular medicine* 19: 1418-1425, 2015.
82. Wang M, Wang S, Yao D, Yan Q, Lu W. A novel long non-coding RNA CYP4B1-PS1-001 regulates proliferation and fibrosis in diabetic nephropathy. *Molecular and cellular endocrinology* 426: 136-145, 2016.
83. Wang M, Yao D, Wang S, Yan Q, Lu W. Long non-coding RNA ENSMUST00000147869 protects mesangial cells from proliferation and fibrosis induced by diabetic nephropathy. *Endocrine* 54: 81-92, 2016.
84. Zhou L, Xu DY, Sha WG, Shen L, Lu GY, Yin X. Long non-coding MIAT mediates high glucose-induced renal tubular epithelial injury. *Biochemical and biophysical research communications* 468: 726-732, 2015.
85. Yi H, Peng R, Zhang LY, Sun Y, Peng HM, Liu HD, Yu LJ, Li AL, Zhang YJ, Jiang WH, Zhang Z. LincRNA-Gm4419 knock-down ameliorates NF-kappaB/NLRP3 inflammasome-mediated inflammation in diabetic nephropathy. *Cell death & disease* 8: e2583, 2017.
86. Feldman EL, Nave KA, Jensen TS, Bennett DL. New Horizons in Diabetic Neuropathy: Mechanisms, Bioenergetics, and Pain. *Neuron* 93: 1296-1313, 2017.
87. Xu H, He L, Liu C, Tang L, Xu Y, Xiong M, Yang M, Fan Y, Hu F, Liu X, Ding L, Gao Y, Xu C, Li G, Liu S, Wu B, Zou L, Liang S. LncRNA NONRAT021972 siRNA attenuates P2X7 receptor expression and inflammatory cytokine production induced by combined high glucose and free fatty acids in PC12 cells. *Purinergic signalling* 12: 259-268, 2016.
88. Wu B, Zhang C, Zou L, Ma Y, Huang K, Lv Q, Zhang X, Wang S, Xue Y, Yi Z, Jia T, Zhao S, Liu S, Xu H, Li G, Liang S. LncRNA uc.48+ siRNA improved diabetic sympathetic neuropathy in type 2 diabetic rats mediated by P2X7 receptor in SCG. *Autonomic neuroscience: basic & clinical* 197: 14-18, 2016.
89. Li G, Sheng X, Xu Y, Jiang H, Zheng C, Guo J, Sun S, Yi Z, Qin S, Liu S, Gao Y, Zhang C, Xu H, Wu B, Zou L, Liang S, Zhu G. Co-expression changes of lncRNAs and mRNAs in the cervical sympathetic ganglia in diabetic cardiac autonomic neuropathic rats. *Journal of neuroscience research* 95: 1690-1699, 2017.
90. Fendler W, Rizzo M, Borowiec M, Malachowska B, Antosik K, Szadkowska A, Banach M, Urbanska-Kosinska M, Szopa M, Malecki M, Mlynarski W. Less but better: cardioprotective lipid profile of patients with GCK-MODY despite lower HDL cholesterol level. *Acta diabetologica* 51: 625-632, 2014.

91. Sun HJ, Hou B, Wang X, Zhu XX, Li KX, Qiu LY. Endothelial dysfunction and cardiometabolic diseases: Role of long non-coding RNAs. *Life sciences* 167: 6-11, 2016.
92. Beltrami C, Angelini TG, Emanuelli C. Noncoding RNAs in diabetes vascular complications. *Journal of molecular and cellular cardiology* 89: 42-50, 2015.
93. Mazidi M, Penson P, Gluba-Brzozka A, Rysz J, Banach M. Relationship between long noncoding RNAs and physiological risk factors of cardiovascular disease. *Journal of clinical lipidology* 11: 617-623, 2017.
94. Bell RD, Long X, Lin M, Bergmann JH, Nanda V, Cowan SL, Zhou Q, Han Y, Spector DL, Zheng D, Miano JM. Identification and initial functional characterization of a human vascular cell-enriched long noncoding RNA. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 34: 1249-1259, 2014.
95. Feng SD, Yang JH, Yao CH, Yang SS, Zhu ZM, Wu D, Ling HY, Zhang L. Potential regulatory mechanisms of lncRNA in diabetes and its complications. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 95: 361-367, 2017.
96. Wu G, Cai J, Han Y, Chen J, Huang ZP, Chen C, Cai Y, Huang H, Yang Y, Liu Y, Xu Z, He D, Zhang X, Hu X, Pinello L, Zhong D, He F, Yuan GC, Wang DZ, Zeng C. LincRNA-p21 regulates neointima formation, vascular smooth muscle cell proliferation, apoptosis, and atherosclerosis by enhancing p53 activity. *Circulation* 130: 1452-1465, 2014.
97. Leung A, Trac C, Jin W, Lanting L, Akbany A, Saetrom P, Schones DE, Natarajan R. Novel long noncoding RNAs are regulated by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Circulation research* 113: 266-278, 2013.
98. Heath JM, Sun Y, Yuan K, Bradley WE, Litovsky S, Dell'Italia LJ, Chatham JC, Wu H, Chen Y. Activation of AKT by O-linked N-acetylglucosamine induces vascular calcification in diabetes mellitus. *Circulation research* 114: 1094-1102, 2014.
99. Vigetti D, Deleonibus S, Moretto P, Bowen T, Fischer JW, Grandoch M, Oberhuber A, Love DC, Hanover JA, Cinquetti R, Karousou E, Viola M, D'Angelo ML, Hascall VC, De Luca G, Passi A. Natural antisense transcript for hyaluronan synthase 2 (HAS2-AS1) induces transcription of HAS2 via protein O-GlcNAcylation. *The Journal of biological chemistry* 289: 28816-28826, 2014.
100. Reddy MA, Chen Z, Park JT, Wang M, Lanting L, Zhang Q, Bhatt K, Leung A, Wu X, Putta S, Saetrom P, Devaraj S, Natarajan R. Regulation of inflammatory phenotype in macrophages by a diabetes-induced long noncoding RNA. *Diabetes* 63: 4249-4261, 2014.
101. Burd CE, Jeck WR, Liu Y, Sanoff HK, Wang Z, Sharpless NE. Expression of linear and novel circular forms of an INK4/ARF-associated non-coding RNA correlates with atherosclerosis risk. *PLoS genetics* 6: e1001233, 2010.
102. Boeckel JN, Jae N, Heumuller AW, Chen W, Boon RA, Stellos K, Zeiher AM, John D, Uchida S, Dimmeler S. Identification and Characterization of Hypoxia-Regulated Endothelial Circular RNA. *Circulation research* 117: 884-890, 2015.