

**Untersuchung des miRNA-Spektrums in einer humanen Endothelzelllinie
unter Zytokinstimulation und Supplementierung mehrfach ungesättigter
Fettsäuren: Korrelation mit Sepsis-assoziierten Genen**

Dissertation

zum Erlangen des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.) für das Fachgebiet Anästhesiologie

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Daniel Maucher

Betreuerin:

apl. Prof. Dr. Julia Schumann

Gutachter*innen:

Prof. Dr. Dr. Claudia Grossmann, Halle (Saale)

apl. Prof. Dr. Christoph Raspé, Fürth

Datum der Verteidigung: 05.02.2024

Referat

Im klinischen Alltag stellt die Sepsis trotz intensiver Forschung eine lebensbedrohliche Erkrankung dar. Daher ist es unabdingbar zu verstehen, welche pathophysiologischen Effekte bei einer Sepsis ablaufen. Ein zentrales Problem stellt die exzessive Ausschüttung von Zytokinen dar, welche mit einer Störung der endothelialen Barrierefunktion einhergeht. Um diese Vorgänge genauer zu untersuchen, wurden humane Endothelzellen (Zelllinie TIME) in An- und Abwesenheit der Zytokine IL-1 β , TNF- α und IFN- γ kultiviert und mittels Next Generation Sequencing (NGS) die mRNA-Expression der Zellen analysiert. Es zeigte sich, dass die Expression von mRNAs, welche für die homophilen Zell-Zell-Adhäsion kodieren, signifikant herunterreguliert waren. Die Zytokin-induzierte Störung der Zell-Zell-Adhäsion war auch in der Zellkultur mittels Impedanzmessung nachweisbar, wobei sowohl der Verlust als auch die Wiederherstellung der Integrität der Endothelschicht innerhalb weniger Stunden erfolgte. Dies deutet auf eine Beteiligung eines schnellen, posttranskriptionellen Mechanismus hin. Vor diesem Hintergrund wurden mittels NGS und ddPCR die miRNAs identifiziert, welche unter Zytokinstimulation eine signifikant veränderte Expression zeigten: miR-29a-3p, miR-29b-3p und miR-155-5p. Die *in silico*-Analyse der Zielgene dieser miRNAs belegte, dass zentrale Mediatoren endothelialer Zell-Zell-Kontakte wie Claudin 1, β -Catenin, p120-Catenin und Eplin durch miR-29a-3p, miR-29b-3p und miR-155-5p beeinflusst sind. Dies liefert einen klaren Hinweis darauf, dass der Verlust der endothelialen Barrierefunktion im entzündlichen Milieu zumindest teilweise auf einen posttranskriptionellen Mechanismus zurückzuführen ist. Weitergehende Untersuchungen ergaben, dass proinflammatorische Signalkaskaden, wie der NF κ B-, der MAPK- und der JAK-STAT-Signalweg, welche die miRNA-Expression modulieren, nicht nur durch Zytokine sondern auch durch Fettsäuren beeinflusst werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Zytokin-induzierte Aufregulierung von miR-29a-3p durch die Anreicherung von Endothelzellen mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) blockiert wird. miR-29a-3p hat die mRNAs von PAI-1, TF, vWF, IL-1 β , IL-6 und IL-8 als Ziel. Die PUFA-Anreicherung der Endothelzellen führte zu einer verminderten Expression der genannten mRNAs. Dies demonstriert, dass die PUFA-Supplementierung dem entzündlichen Milieu entgegenwirkt. Interessanterweise lässt sich dieser antiinflammatorische Effekt sowohl für ω 3 als auch bei ω 6 Fettsäuren beobachten. Intensivpatienten kommen regelhaft mit PUFA als Medikamentenbestandteile in Kontakt. Die vorliegenden Ergebnisse liefern schlüssige Hinweise, dass die verabreichten PUFA das Potential besitzen im Körper bisher nicht vollständig verstandene Effekte zu entfalten und geben Anlass zur weiteren Forschung.

Maucher, Daniel: Untersuchung des miRNA-Spektrums in einer humanen Endothelzelllinie unter Zytokinstimulation und Supplementierung mehrfach ungesättigter Fettsäuren: Korrelation mit Sepsis-assoziierten Genen, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss. 67 Seiten, 2023

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	
Abbildungsverzeichnis.....	
Tabellenverzeichnis.....	
Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole	
1 Einleitung	1
1.1 Sepsis.....	1
1.1.1 Definition.....	1
1.1.2 Pathophysiologie.....	1
1.1.3 Diagnostik und Therapie	2
1.2 Lipide.....	4
1.2.1 Klinische Anwendung von Lipiden	4
1.2.2 Physiologische Effekte von Lipiden	4
1.2.3 Fettsäuren	5
1.3 miRNA	7
1.3.1 Allgemeines und Nomenklatur	7
1.3.2 Aufbau, Synthese und Mechanismus der Genregulation	8
1.3.3 Sepsis, miRNAs, PUFA	9
2 Zielstellung	11
3 Diskussion.....	12
4 Literaturverzeichnis.....	20
5 Thesen.....	28
6 Publikationsteil.....	29
6.1 Publikation 1	30
6.2 Publikation 2	43
7 Erklärungen	
8 Danksagung.....	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beeinflussung der zellulären Genexpression durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA)	7
Abbildung 2: miRNA-Nomenklatur am Beispiel hsa-miR-29b-3p.....	8

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: SIRS-Kriterien	2
Tabelle 2: Transkriptionsfaktoren, welche die Expression von miR-29a-3p, miR-29b-3p und miR-155-5p beeinflussen	14

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

%	Prozent
°C	Grad Celsius
AA	Arachidonsäure
Ago2	Agonautenprotein 2
AJs	adherens junctions
AP-1	Activator protein 1
ATF	Gen kodiert Activating Transcription Factor
BATF	Gen kodiert Basic Leucine Zipper ATF-Like Transcription Factor
Ca.	Circa
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
CD14	Cluster Of Differentiation 14
CDH5	Gen kodiert VE-Cadherin
CEBPA	Gen kodiert CCAAT Enhancer Binding Protein alpha
CEBPB	Gen kodiert CCAAT Enhancer Binding Protein beta
CEBPG	Gen kodiert CCAAT Enhancer Binding Protein gamma
CI	cell index
CLDN1	Gen kodiert Claudin 1
CLDN5	Gen kodiert Claudin 5
CREB1	Gen kodiert CAMP Responsive Element Binding Protein 1
CTNNA1	Gen kodiert α -Catenin
CTNNB1	Gen kodiert β -Catenin
CTNND1	Gen kodiert p120-Catenin

CXCL8	C-X-C Motif Chemokine Ligand 8, Gen kodiert Interleukin 8
ddPCR	digital droplet polymerase chain reaction
DGCR8	DiGeorge Syndrom Cirtical Region 8
DHA	Dokosahexaensäure
DNA	deoxyribonucleic acid
EPA	Eikosapentaensäure
F11R	Gen kodiert F11 Receptor
F3	Coagulation Factor III, Gen kodiert Tissue Factor
FOS	Gen kodiert Fos Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit
FOSL2	Gen kodiert FOS Like 2, AP-1 Transcription Factor Subunit
g	Gramm
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GO	Gene Ontology
Gorilla	Gene Ontology enRIchment analysis and visualizAtion tool
GPR120	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 120
GSEA	Gene-Set-Enrichment-Analysis
HEK	Human Embryonic Kidney
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IFN- γ	Interferon γ
IL-10	Interleukin 10
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8

IRF	Gen kodiert Interferon Regulatory Factor
ITS	Intensivstation
JAK	Januskinase
JAM2	Gen kodiert junktionales Adhäsionsmolekül B
JAM3	Gen kodiert junktionalem Adhäsionsmolekül C
JUN	Gen kodiert Transcription factor Jun
JUNB	Gen kodiert Transcription factor Jun B
JUND	Gen kodiert Transcription factor Jun D
JUP	Gen kodiert γ -Catenin
kg	Kilogramm
kPa	Kilopascal
l	Liter
LA	Linolsäure
LIMA1	Gen kodiert Eplin
LNA	α -Linolensäure
MAP	mean arterial pressure - mittleren arteriellen Blutdruck
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCP-1	monocyte chemotactic protein 1
min	Minute
miRNA	micro ribonucleic acid
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol

mRNA	messenger ribonucleic acid
ncRNA	non-coding ribonucleic acid
NFKBIZ	NF-kappa-B inhibitor zeta Gen
NFκB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NGS	Next Generation Sequencing
OCLN	Gen kodiert Occludin
p65	Transcription factor p65
PaCO ₂	Partialdruck Kohlendioxid
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PCR	polymerase chain reaction
PPARγ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma
PUFA	polyunsaturated fatty acids
qSOFA-Score	quick Sequential (Sepsis-Related) Organ Failure Assesment Score
RELA	Reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A, Gen kodiert für p65
RELB	Reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B, Gen kodiert für RelB
RISC	RNA-induced silencing complex
SERPINE1	serpin family E member 1, Gen kodiert Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1
SIRS	systemic inflammatory response syndrom
SOFA-Score	Sequential (Sepsis-Related) Organ Failure Assesment Score
SSC	Surviving Sepsis Campain
STAT	Signal Tranducer and Activator of Transcription
STAT3	Gen kodiert Signal Transducer And Activator Of Transcription 3

STAT5A	Gen kodiert Signal Transducer And Activator Of Transcription 5A
TF	Tissue Factor
TIME	Telomerase-Immortalized Human Microvascular Endothelial cells
TJP1	Gen kodiert Zona Occludens 1
TJP2	Gen kodiert Zona Occludens 2
TJs	tight junctions
TLR4	Toll-like Rezeptor 4
TNF-R	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
v/v	Volumenprozent
VCAM-1	Vascular cell adhesion protein 1
VCL	Gen kodiert Vinculin
vWF	von-Willebrandfaktor

1 Einleitung

1.1 Sepsis

1.1.1 Definition

Eine Sepsis ist ein lebensbedrohlicher Zustand, der auf eine inadäquate Reaktion des Organismus auf eine Infektion zurückzuführen ist, in deren Folge körpereigene Gewebe geschädigt und Organfunktionen eingeschränkt werden [1].

Die Inzidenz der Sepsis wird weltweit auf 48,9 Millionen Erkrankte pro Jahr geschätzt. Auf einer Intensivstation (ITS) ist die Sepsis ein täglich präsenten Krankheitsbild, von dem ca. 18% der Patienten betroffen sind [2]. Es wird angenommen, dass 20% aller Sterbefälle mit einer Sepsis assoziiert sind [2]. Betrachtet man die Sepsis als isolierte Diagnose wird die Mortalität mit 25-30% angegeben. Liegt ein septischer Schock vor steigt die Mortalität bis auf 50% [3].

1.1.2 Pathophysiologie

Grundlage einer Sepsis ist eine Infektion. Auslöser sind häufig Bakterien, doch können auch Pilze, Vieren oder Parasiten Ursache einer Sepsis sein [4]. Die zunächst lokal begrenzte Infektion wird durch das Immunsystem bekämpft. Zellen der angeborenen Immunabwehr, wie Makrophagen oder neutrophile Granulozyten, erkennen mittels Mustererkennungsrezeptoren (englisch: *pathogen-associated molecular patterns - PAMPs*) pathogenspezifische Strukturen und leiten eine Immunantwort ein. Kennzeichnend ist die Ausschüttung immunologischer Botenstoffe (u.a. Zytokine, Prostaglandine, NO), welche auf umliegende Zellen und Gewebe Einfluss nehmen [5]. Über den Aufbau eines Zytokingradienten werden weitere Immunzellen angelockt, die aus dem Blut in das infizierte Gewebe auswandern um dort die Erreger zu eliminieren. Voraussetzung für diesen als Diapedese bezeichneten Prozess ist die Überwindung der endothelialen Barriere durch die Immunzellen [6].

Die Zell-Zell Adhäsion des Endothels wird durch *tight junctions* (TJs) und *adherens junctions* (AJs) gewährleistet. TJs dienen direkt der Abdichtung des parazellulären Raums. AJs vermitteln mechanische Festigkeit zwischen den Endothelzellen. Die Zell-Zell-Adhäsion muss präzise gesteuert werden, da einerseits Diffusionsprozesse aus dem Gefäß ermöglicht werden müssen, andererseits kein unkontrollierter Übertritt von Wasser, niedermolekularen Substanzen oder Proteinen in das paravasale Gewebe eintreten darf [7, 8]. Im Rahmen der Diapedese kommt es vermittelt durch Zytokine zu einer Reorganisation der Bindungsmoleküle, wodurch die endotheliale Barrierefunktion herabgesetzt wird [7, 9, 10]. Durch die verminderte Barrierefunktion wird der Übertritt von Immunzellen in das Gewebe überhaupt erst ermöglicht. Gleichzeitig kommt es auch zum Austritt von Wasser und zur Ödembildung.

Bei unzureichender Immunantwort ist eine Ausbreitung der zunächst lokal begrenzten Infektion auf den gesamten Organismus möglich. Diese geht mit einer systemischen Immunreaktion und generalisierten Schädigung des Endothels einher. Es kommt im gesamten Organismus zum Versagen der Barrierefunktion (*endothelial leakage*) [8, 10-12]. Durch die Schädigung des Endothels sowie prokoagulatorische Mediatoren aus den Granulozyten wird die Gerinnung aktiviert [13]. Weitere durch die Immunzellen freigesetzte Mediatoren (Prostaglandine und Stickstoffderivate) wirken direkt auf die glatten Muskelzellen der Tunica Media der Gefäße ein und induzieren eine Vasodilatation [14, 15]. Die Folge sind die Ausbildung von Mikrothromben, eine unzureichende Durchblutung und eine Schädigung von Endorganen. Durch die Volumenverschiebung von intravasal nach extravasal kommt es zudem zur Bildung von Gewebsödemen und zur Kreislaufstörung [16]. Anhand des beschriebenen Pathomechanismus lassen sich klinisch fassbare Phänomene ableiten, die für die Diagnose und zur Beurteilung der Erkrankungsschwere entscheidend sind.

1.1.3 Diagnostik und Therapie

Die Sepsis selbst hat keine Kardinalssymptome. Dies macht die Diagnose Sepsis ausgesprochen schwierig. Anhand des Pathomechanismus lassen sich allerdings Allgemeinsymptome wie Fieber, Leukozytose und Kreislaufstörungen ableiten.

Aufgrund der unspezifischen Symptomatik wird bereits seit mehreren Jahrzehnten an einer Sepsisdefinition gearbeitet. Maßgebliche Konsensuskonferenzen fanden 1991 und 2001 [17, 18] statt. Im Rahmen dieser Konferenzen wurde die Sepsis als das *systemic inflammatory response syndrom* (SIRS) durch eine Infektion definiert [17, 18]. Die Diagnose Sepsis konnte demnach bei Vorliegen von zwei der vier SIRS Kriterien (Tabelle 1) in Kombination mit einem mikrobiellen Nachweis gestellt werden. Bei der Einteilung des Schweregrads wurde zwischen Sepsis (ohne Organdysfunktion), schwerer Sepsis (mit Organdysfunktion) und septischen Schock (arterieller Blutdruck <90mmHg, Laktat > 2mmol/l) unterschieden.

Tabelle 1: SIRS-Kriterien

Körpertemperatur über 38 °C oder unter 36 °C
Herzfrequenz über 90 /min
Atemfrequenz über 20/min oder PaCO ₂ <32mmHg (4,3kPa)
Leukozytose (≥ 12 000/μl) oder Leukopenie (≤ 4000/μl) oder Linksverschiebung (>10% unreife Granulozyten im Differenzialblutbild)

Ein mikrobieller Nachweis gelingt nur in 30% der Fälle [1]. Es gibt also einen großen Anteil an Patienten mit einem klinisch hochgradigen Sepsisverdacht, bei denen aber kein Keimnachweis vorliegt. Dieser Definitionslücke rechnertragend fand 2014 eine weitere Konsensuskonferenz statt (Sepsis-3) [1]. Konsens dieser Konferenz war, dass die Trennung von SIRS und Sepsis aufgehoben wurde. Der Begriff schwere Sepsis wurde verlassen, da nach dem aktuellen Verständnis eine derart strikte Trennung nach Vorliegen eines Organversagens nicht möglich ist. Der sepsisdefinierende Infektnachweis ist nach Sepsis-3 für eine Diagnosestellung nicht mehr notwendig. Ziel der aktuellen Definition ist es bereits milde infektassoziierte Organfunktionsstörungen zu erkennen und damit eine frühzeitige Sepsistherapie zu ermöglichen. Zur systematischen Beurteilung der Organsysteme wurde bereits im Jahr 1996 der *Sequential (Sepsis-Related) Organ Failure Assessment Score (SOFA-Score)* veröffentlicht [1, 19]. Als Novum wurde 2014 nun der *qSOFA-Score (quick Sequential (Sepsis-Related) Organ Failure Assessment Score)* zur bettseitigen Beurteilung empfohlen. Im qSOFA-Score werden drei Vitalparameter beurteilt: Atemfrequenz $>22/\text{min}$, Veränderung der Bewusstseinslage und systolischer Blutdruck $<100\text{mmHg}$. Sind zwei dieser Items pathologisch verändert, kann bereits von einer Organfunktionsstörung ausgegangen werden [1].

Eine Sepsis stellt einen medizinischen Notfall dar. Ein zügiger Behandlungsbeginn ist für das Überleben essentiell. Im Rahmen der *Surviving Sepsis Campaign (SSC)* wird eine sofortige intensivmedizinische Behandlung empfohlen [20]. Zur initialen Stabilisierung des Kreislaufs sollen 30ml/kg Körpergewicht balancierte Vollelektrolytinfusion binnen 3 Stunden verabreicht werden [20, 21]. Ist dies nicht ausreichend um einen mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) von $>65\text{mmHg}$ zu gewährleisten, wird als Katecholamin primär Noradrenalin empfohlen. Entscheidend für das Überleben ist aber die zügige kalkulierte antibiotische Therapie. Das bedeutet, dass der Patient innerhalb der ersten Stunde nach Diagnosestellung eine antiinfektive Therapie erhalten soll [20, 21]. Kommt es im Rahmen der Sepsis zur invasiven Beatmung werden zur Sedierung Hypnotika wie Propofol empfohlen. Dieses Medikament enthält relevante Mengen an Sojaöl als pharmazeutischen Hilfsstoff [22].

Ebenfalls ist im Rahmen einer Intensivbehandlung eine kalorisch ausreichende und verträgliche Ernährung notwendig. Die verwendeten Präparate können enteral oder parenteral verabreicht werden. Die enterale Applikation ist jedoch zu bevorzugen [20]. Auch diese Präparate enthalten Fette und sind zum Teil zusätzlich mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren (englisch: *polyunsaturated fatty acids - PUFA*) angereichert.

1.2 Lipide

1.2.1 Klinische Anwendung von Lipiden

An einer Sepsis Erkrankte stellen ein heterogenes Patientenkollektiv dar, für welche individuell eine bedarfsgerechte Ernährung gefunden werden muss. Eine physiologische Zusammensetzung der Nährstoffe ist unerlässlich [23, 24]. Aus diesem Grund ist bei jeder Applikationsform der Ernährung auf eine geeignete Zusammensetzung von Kohlenhydraten, Aminosäuren und Lipiden zu achten. Vor allem Fette stellen einen günstigen Energieträger dar um das Kalorienziel des Patienten zu erreichen. Durch diese zusätzliche Energiequelle lassen sich Hyperglykämien vermeiden und der Bedarf an essentiellen Fettsäuren wird gedeckt [23].

Bei einer Sepsis kommt es zur Veränderung des Fettstoffwechsels und zu einer veränderten Lipidtoleranz. Insbesondere stellen Hepatozyten, Myokard und Skelettmuskeln bevorzugt auf Lipide als Substrat um [23, 25]. Empfohlen wird eine Höchstdosis an Lipiden von 1,5 g/kg Körpergewicht/Tag nicht zu überschreiten [23]. Um eine Überalimentation zu vermeiden sollte regelmäßig die Konzentration an Triglyzeriden im Serum bestimmt werden [25]. Auch sollte bei der Kalorienberechnung berücksichtigt werden, dass pharmakologische Hilfsstoffe ebenfalls einen Brennwert haben und in die Kalorienbilanz einfließen [23]. Ein häufig genutztes Medikament auf einer Intensivstation ist Propofol. Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit des Wirkstoffs wird Propofol in einer Sojaöl-Wasseremulsion gelöst. Der Öl-Anteil macht dabei bis zu 10% v/v des Gesamtvolumens aus [26]. Geht man davon aus, dass ein Patient eine tiefe Sedierung benötigt, ist es durchaus möglich, dass die gesamte Tagesdosis an Lipiden bereits im Rahmen der Sedierung verabreicht wurde [23, 26]. In diesem Kontext stellt sich die Frage, wie sich die verabreichten Fette auf die Physiologie eines kritisch kranken Patienten auswirken.

1.2.2 Physiologische Effekte von Lipiden

Die verabreichten Öle und Fette stellen ein komplexes Gemisch dar, dessen Inhaltsstoffe teils stark variieren. Bereits die Definition von Fetten umfasst chemisch ein sehr breites Spektrum. Lipide bzw. Fette sind im Allgemeinen hydrophobe oder amphotere Moleküle [27, 28]. Diese chemischen Eigenschaften ermöglichen es, dass Lipide zu Tröpfchen zusammengelagert in Adipozyten als Energieträger und physikalische Isolatoren gespeichert werden. Die Fähigkeit von Lipiden, sich in Lipiddoppelschichten zu organisieren, ist wesentlich für die Bildung der zellulären Membranen und für die Kompartimentierung der Zellen [27, 29].

Weiterhin fungieren Lipide als Hormon oder Signalmoleküle. So stellen die Sterole eines der wichtigsten Substrate des endokrinen Systems dar und dienen als Ausgangsstoffe von Glyko- und Mineralokortikoiden sowie von Androgenen [27, 30]. Auch das Immunsystem nutzt Lipide,

vorrangig ungesättigte Fettsäuren, zur Synthese immunmodulatorisch wirksamer Mediatoren wie Eikosanoide oder Resolvine [27].

1.2.3 Fettsäuren

Fettsäuren machen den Hauptanteil der täglich aufgenommenen Lipide aus. In der menschlichen Nahrung liegen Fettsäuren mehrheitlich mit Glycerol verestert als Triglyzeride vor [24]. Auch in enteralen oder parenteral applizierbaren Medikamenten werden zumeist Triglyzeride als Fettsäurequelle eingesetzt [22, 26, 31].

Aus chemischer Sicht handelt es sich bei Fettsäuren um hauptsächlich unverzweigte Kohlenwasserstoffketten, die aus einer Carboxylfunktion am α -C-Atom und einer in der Länge variablen Alkyl- oder Alkenylfunktion bestehen [27, 28]. Eine Unterscheidung von Fettsäuren kann neben der Anzahl der C-Atome anhand der Anzahl der Kohlenstoffdoppelbindungen geschehen [28]. Sind keine Doppelbindungen vorhanden wird die Fettsäure als gesättigt angesehen. Im Fall einer Doppelbindung wird die Fettsäure als einfach ungesättigt bezeichnet. Bei mehreren Doppelbindungen spricht man von mehrfach ungesättigten Fettsäuren oder PUFA. Zur Vereinfachung der Benennung wird die Position der Doppelbindungen aus der Perspektive der terminalen Methylfunktion (ω -System oder n-System) benannt [32]. Fettsäuren können mehrheitlich durch den Körper selbst synthetisiert werden. Lediglich die essentiellen Fettsäuren Linolsäure (LA) und α -Linolensäure (LNA) müssen über die Nahrung aufgenommen werden [33]. Fettsäuren können durch die β -Oxidation in Energie umgewandelt werden und stellen so neben Kohlenhydraten die Hauptenergielieferanten im Körper dar [30]. Zudem zeigen aktuelle Untersuchungen auf, dass die Zusammensetzung der mit der Nahrung aufgenommenen Fettsäuren sich nicht nur auf den Fettsäuremetabolismus sondern auch auf die menschliche Gesundheit und inflammatorische Prozesse auswirkt [34–37].

PUFA, wie die ω 6-Fettsäure Arachidonsäure (AA) oder die ω 3-Fettsäuren Eikosapentaensäure (EPA) und Dokosahexaensäure (DHA) sind Ausgangsstoffe für die Synthese von Entzündungsmediatoren (Eikosanoide, Resolvine). Die Gruppe der Eikosanoide untergliedert sich in Leukotriene, Prostaglandine, Thromboxane und Eikosatriene. Diese Botenstoffe spielen eine wichtige Rolle bei lokalen Entzündungsreaktionen, Regulation des Immunsystems, Thrombozytenaggregation, Gerinnung und Gefäßtonus, wobei sie eine proinflammatorische Wirkung entfalten [38]. Hierbei wirken die Derivate von AA stärker proinflammatorisch als die Derivate von EPA [39]. Die ω 3-Fettsäuren sind zudem Ausgangspunkt der Bildung der antiinflammatorisch wirksamen Resolvine, welche nach erfolgreicher Bekämpfung eingedrungener Krankheitserreger die Beendigung der Entzündungsreaktion vermitteln [38].

Ferner fungieren PUFA direkt als Rezeptorliganden. Immunologisch relevant sind die Rezeptoren Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma (PPAR γ) und G-Protein-gekoppelter Rezeptor 120 (GPR120) [38]. Bei PPAR γ handelt es sich um einen kernständigen Hormonrezeptor, der unter anderem an der Regulation der Synthese des Zytokins Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) beteiligt ist [40]. Als natürliche Liganden gelten LA, LNA, AA und DHA. GPR120 ist ein Transmembranrezeptor, der langkettige Fettsäuren, wie DHA, bindet. Aktivierung von GPR120 induziert eine antiinflammatorische Wirkung durch Expressionsminderung des bei Entzündungsprozessen zentralen Transkriptionsfaktors *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF κ B) [41].

Membranständige Rezeptoren können durch Fettsäuren auch indirekt beeinflusst werden. Fettsäuren bilden als Phospholipide den größten Anteil der Zellmembran. Grundlegende chemische und physikalische Eigenschaften der Membranen, wie die Fluidität, Permeabilität und Elastizität, sind durch die Fettsäurezusammensetzung beeinflusst [42, 43]. Dies wirkt sich auch auf die Strukturierung der Zellmembran aus. Es ist bekannt, dass die Zellmembran mittels Mikrodomänen, den *lipid rafts*, organisiert ist. Diese Mikrodomänen sind reich an gesättigten Fettsäuren und Cholesterol und üben wichtige Funktionen bei Transportprozessen oder der Signaltransduktion aus [44, 45]. Es ist bekannt, dass durch Supplementierung von PUFA die ungesättigten Fettsäuren in den *lipid rafts* angereichert werden, wodurch unter anderem die Interaktion des immunologisch bedeutsamen Membranrezeptors *Toll-like Rezeptor 4* (TLR4) mit seinem Korezeptor *Cluster of differentiation 14* (CD14) gestört und die nachgeschaltete Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B vermindert wird [46–48].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass PUFA sowohl als Ausgangsstoffe für die Synthese immunologischer Botenstoffe dienen als auch direkt/indirekt auf Rezeptoren wirken und so in die zelluläre Genexpression eingreifen (Abbildung 1). Für die Funktionalität einer Zelle ist aber nicht nur die Syntheserate spezifischer mRNAs von Bedeutung. Entscheidend sind auch die RNA-Stabilität und die Translationsrate, welche posttranskriptionell der Regulation durch nichtkodierende RNAs, wie microRNAs (miRNAs), unterliegen [49].

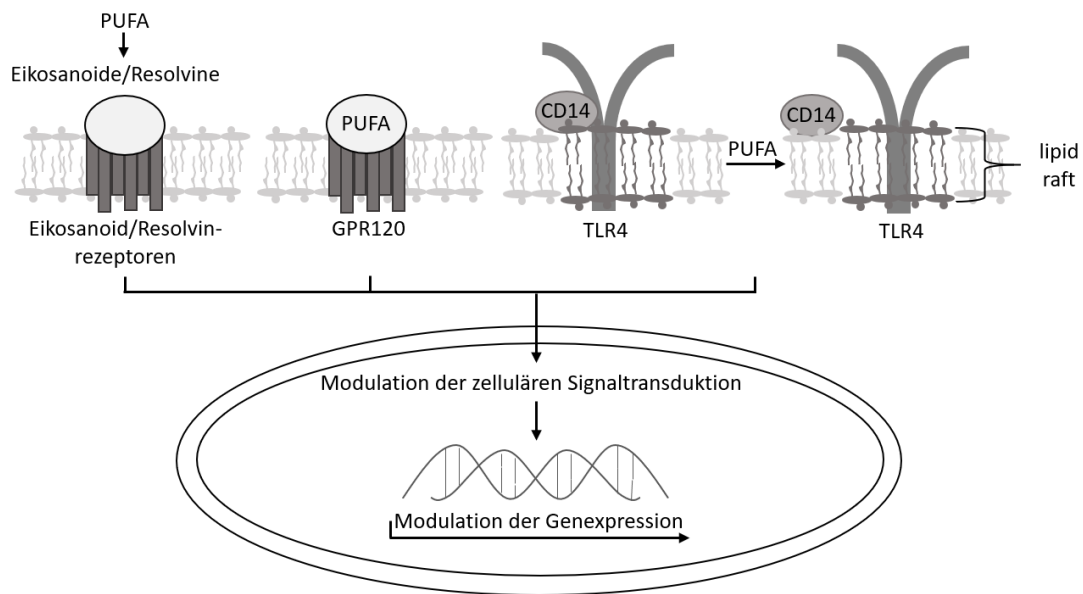


Abbildung 1: Beeinflussung der zellulären Genexpression durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA)
 G-Protein-gekoppelter Rezeptor 120 (GPR120); Toll-like Rezeptor 4 (TLR4); Cluster of differentiation 14 (CD14), Kofaktor von TLR4

1.3 miRNA

1.3.1 Allgemeines und Nomenklatur

miRNAs gehören zur Gruppe der nicht-kodierenden RNAs (*non-coding RNA*; *ncRNA*) und bilden die Klasse der am häufigsten auftretenden kleinen RNAs [50]. Die Erstbeschreibung von miRNAs gelang 1993 im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* [51]. Jedoch blieb das Feld der miRNAs bis 2001 eher vernachlässigt [52]. Seither wächst jedoch die Menge an bekannten miRNAs stetig. Aktuell sind beim Menschen 1917 reife miRNAs bekannt [53]. miRNA-Gene sind über das gesamte menschliche Genom verteilt. Meist liegen miRNA-Gene in Gruppen, sogenannten Clustern, vor und haben einen gemeinsamen Promotor [54]. Einige miRNAs besitzen eigene Promotoren, über welche ihre Expression reguliert wird [55]. Es ist aber auch möglich, dass sich miRNA-Gene im Intronbereich von Protein-kodierenden Genen befinden. Der vorgeschaltete Promotor reguliert so sowohl die Expression des zu transkribierenden Proteins als auch die Expression der miRNA [56]. miRNAs sind über viele Spezies hinweg konserviert und nehmen eine wichtige Funktion bei der posttranskriptionellen Genregulation ein [57].

Die Benennung der miRNAs bedient sich eines feststehenden Schemas (Abbildung 2: **miRNA-Nomenklatur am Beispiel hsa-miR-29b-3p**). Begonnen wird mit der Speziesbezeichnung. Stammt die miRNA aus dem menschlichen Genom, lauten die ersten drei Buchstaben „*hsa*“ für *homo sapiens*. Auf die Spezies folgt die Information, dass es sich um eine reife miRNA handelt

[58, 59]. Dies wird mit „miR“ verdeutlicht. Die folgende Nummerierung richtet sich nach der Reihenfolge der Erstbeschreibung und bildet eine miRNA-Gruppe. In dieser Gruppe werden miRNAs mit sehr ähnlichen Sequenzen zusammengefasst und durch einen lateinischen Buchstaben benannt. Das Attribut 5p oder 3p informiert darüber, ob die miRNA Sequenz aus dem 5´-Ende oder aus dem 3´-Ende der pre-miRNA stammt [58, 59].

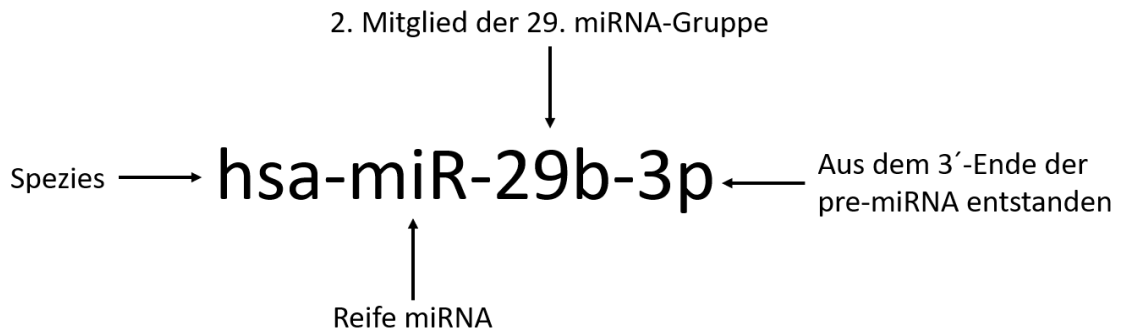


Abbildung 2: miRNA-Nomenklatur am Beispiel hsa-miR-29b-3p

1.3.2 Aufbau, Synthese und Mechanismus der Genregulation

Reife miRNAs sind einzelsträngige RNA-Moleküle mit einer Länge von 21-23 Nukleotiden [50]. Die Entstehung einer reifen miRNA erfordert mehrere Schritte, welche im Zellkern und im Zytoplasma stattfinden. In Säugetieren wird durch RNA-Polymerase II oder RNA-Polymerase III ein Primärtranskript gebildet. Posttranskriptionell wird am 5´-Ende ein 7´-Methylguanylat angelagert und am 3´-Ende eine Polyadenylat-Kette angehängt [60]. Diese pri-miRNA bildet durch komplementäre Basen eine Haarnadelstruktur (*hairpin*) aus [55, 60]. Intranukleär lagern sich an diese Haarnadelstruktur das Ribonuklease III-Enzym Drosha und das DiGeorge Syndrom Critical Region 8 (DGCR8 oder Pasha) an [61, 62]. Diese beiden Nukleasen sind für den ersten Prozessierungsschritt zuständig. DGRC8 erkennt innerhalb der pri-miRNA N6-methyladenylierte GGAC-Motive und schneidet an diesen Stellen [61]. Drosha hingegen schneidet an der Basis der Haarnadelstruktur, so dass ein zwei Nukleotide langer 3´-Überhang entsteht. Die prozessierte, ca. 70 Nukleotide umfassende pre-miRNA bindet an Exportin 5 und wird so aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert [62, 63]. Im Zytosol wird die pre-miRNA durch die RNase III-Endonuklease Dicer weiter prozessiert. Dicer schneidet als Endonuklease die Schleife ab, die die beiden gegenläufigen RNA-Stränge verbindend, so dass ein miRNA-Duplex entsteht [64].

Der vorliegende miRNA-Doppelstrang bestehend aus dem 5p- und dem 3p-Segment wird durch eine Helikase entspiralisiert. Anschließend wird einer der miRNA-Einzelstränge durch das Agonautenprotein 2 (Ago2) gebunden und in den RNA-induced silencing complex (RISC)

importiert [65]. Der Komplex aus miRNA und RISC bildet die funktionelle Einheit, die in der Lage ist an der Ziel-mRNA zu binden und so deren Expression zu regulieren [66]. Abhängig von der Bindungsstelle und dem Grad an komplementären Basenpaarungen der miRNA an der Ziel-mRNA zeigen sich unterschiedliche Effekte. Beschrieben ist eine beschleunigte Degradation des Poly-A Schwanzes und ein Decapping der Ziel-mRNA, wodurch deren Abbau gefördert wird [66]. Weiterhin kann die Bindung des miRNA-RISC-Komplexes an die Ziel-mRNA zur Verminderung der Translationseffizienz führen [67]. Unter spezifischen Umständen wurde zudem über eine Aktivierung der Geneexpression durch miRNAs berichtet [68]. Durch die inkomplette Sequenzhomologie zwischen miRNA und Ziel-mRNA kann eine miRNA verschiedene mRNAs modulieren bzw. kann eine mRNA von verschiedenen miRNA reguliert werden [69, 70]. Hierdurch ergeben sich komplexe Regelmechanismen der posttranskriptionellen Genregulation, die sowohl im physiologischen als auch im pathologischen Bereich relevant sind.

1.3.3 Sepsis, miRNAs, PUFA

Bei einer Sepsis kommt es zu einer massiven Störung der Autoregulation des Körpers. Die systemisch von den Immunzellen freigesetzten Zytokine induzieren eine Schädigung des Endothels [7, 8]. Die endotheliale Dysfunktion, die u.a. durch eine Störung der Barrierefunktion des Endothels gekennzeichnet ist, stellt einen wesentlichen Pathomechanismus einer Sepsis dar [17, 71]. Es ist bekannt, dass die Störung der endothelialen Barrierefunktion auf eine verminderte Expression von Adhäsionsproteinen zurückzuführen ist [8, 12]. Ferner ist beschrieben, dass immunologisch relevante Rezeptoren, wie TLR4 oder der Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNF-R), Einfluss auf die Expression und Stabilität endothelialer Adhäsionsmoleküle nehmen [8]. Der Fokus der Forschung lag hierbei auf der Modulation der Transkriptionseffizienz. Die Bedeutung posttranskriptioneller Regulatoren, wie miRNAs, ist hingegen nicht abschließend geklärt.

Sepsispatienten weisen ein verändertes miRNA-Expressionsprofil auf [72]. Eine Veränderung des miRNA-Profiles unter septischen Bedingungen ist auch für Endothelzellen beschrieben, wobei dies mit einer Störung der endothelialen Barrierefunktion einherging [73-75]. Untersuchungen im Zellkulturmodell belegen, dass bestimmte miRNAs in der Lage sind posttranskriptionell die Expression von Adhäsionsproteinen, wie e-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1, zu modulieren [75, 76]. So konnte *in vitro* an Gehirndothelzellen gezeigt werden, dass eine induzierte Endothelfunktionsstörung durch Hemmung von miR-155 verhindert werden kann [75]. An den bisherigen Erkenntnissen lässt sich ein Zusammenhang zwischen Inflammation, Zelladhäsion und miRNA ableiten.

In klinischen Studien wurde gezeigt, dass die TNF- α Spiegel im Serum bei kritisch Kranken nach PUFA-Supplementierung signifikant sanken und antiinflammatorische Mediatoren wie Interleukin 10 (IL-10) verstärkt exprimiert wurden [25]. Weiterhin belegen vorangegangene Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, dass PUFA in der Lage sind die Zytokin-induzierte endotheliale Dysfunktion teilweise zu reduzieren [77]. Diese Effekte basieren vermutlich auf der Fähigkeit der Fettsäuren die zelluläre Signaltransduktion in vielfältiger Weise zu modulieren (Abbildung 1). Neben einer Beeinflussung auf transkriptioneller Ebene, wäre auch eine posttranskriptionelle, miRNA-basierte Modulation der Genexpression denkbar. In der Tat zeigen Fütterungsversuche an Ratten, dass sich die miRNA-Profile verschiedener Gewebe in Abhängigkeit einer PUFA-Alimentierung verändern [78, 79]. Da auch die miRNA-Expression den zellulären Signalkaskaden unterliegt, impliziert diese Beobachtung, dass ein Zusammenhang zwischen supplementierten Fettsäuren und der zellulären Synthese bestimmter miRNAs gegeben sein könnte. Vor dem Hintergrund der während der intensivmedizinischen Behandlung an Sepsispatienten verabreichten Lipide wäre ein derartiger Zusammenhang von klinischer Relevanz.

2 Zielstellung

Das komplexe Krankheitsbild Sepsis ist auch nach Jahren der Forschung nicht vollständig mechanistisch verstanden. In der Klinik sind spezifische therapeutische Optionen limitiert. So ist die Sepsis auch bei zeitgerecht begonnener Therapie mit einer hohen Mortalität verbunden.

Ein wesentlicher Pathomechanismus der Sepsis ist die endotheliale Dysfunktion. Zytokine induzieren durch Bindung an Zytokinrezeptoren der Endothelzellen spezifische Signalkaskaden, welche die zelluläre Genexpression und damit einhergehend die Funktionalität der Zellen modulieren. Es ist bekannt, dass die Genexpression von Endothelzellen sowohl transkriptionell als auch posttranskriptionell beeinflussbar ist. Ein relevanter Faktor in der posttranskriptionellen Regulation stellen miRNAs dar. Doch während die Veränderung des Transkriptoms von Endothelzellen im septischen Milieu gut beschrieben ist, sind die Auswirkungen einer Zytokinstimulation von Endothelzellen auf das miRNA-Profil bislang nahezu unbekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher zu untersuchen, ob ein septisches Milieu das miRNA-Spektrum in Endothelzellen verändert und die betroffenen miRNAs zu identifizieren.

Patienten, die an einer Sepsis leiden, erhalten während der intensivmedizinischen Therapie in der Regel Medikamente, wie Propofol und Ernährungspräparate, die relevante Mengen an Fettsäuren beinhalten. Fettsäuren wirken bekanntermaßen immunmodulatorisch und können die zelluläre Genexpression beeinflussen. Auch eine Modulation der Endothelfunktion durch Fettsäuren ist beschrieben. Inwieweit Fettsäuren Einfluss auf die miRNA-Expression von Endothelzellen nehmen, ist hingegen nicht untersucht. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher zudem, die Bedeutung von Fettsäuren für die miRNA-Expression von Endothelzellen zu eruieren.

3 Diskussion

Die Stimulation von Endothelzellen durch proinflammatorische Zytokine, wie Interleukin 1 β (IL-1 β), TNF- α und Interferon γ (IFN- γ), geht mit funktionellen Anpassungen einher [6]. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe belegen, dass Endothelzellen in Gegenwart eines proinflammatorischen Milieus veränderte Syntheseraten von Gerinnungsfaktoren (von-Willebrandfaktor (vWF), Tissue Factor (TF)), Adhäsionsproteinen (ICAM-1, VCAM-1) sowie Zytokinen (Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 8 (IL-8), GM-CSF und MCP-1) aufweisen [77]. Um Einblicke in die zu Grunde liegenden Mechanismen zu gewinnen, wurde in der vorliegenden Arbeit die mRNA-Expression von zytokinstimulierten und unstimulierten Endothelzellen vergleichend gegenübergestellt. Hierbei wurde das Hochdurchsatzverfahren Next Generation Sequencing (NGS) mit der bioinformatischen Gene-Set-Enrichment-Analysis (GSEA) kombiniert. GSEA fasst Gene mit ähnlicher Funktion in Gengruppen zusammen, so dass statistisch relevante Expressionsänderung definierter Gensets im biologischen System abgebildet werden können [80]. Es zeigte sich, dass eine Zytokinexposition nicht nur mit einer signifikanten Hochregulation von Genen, die einer Entzündungsreaktion zugeordnet sind, einhergeht. Die GSEA-Daten belegten ferner eine erhebliche Verringerung der Expression von Membranadhäsionsproteinen, welche Zell-Zell-Kontakte vermitteln. Diese Beobachtung fügt sich in das für eine Sepsis typische Phänomen, welches auf eine Störung der endothelialen Zell-Zell-Adhäsion zurückzuführen ist [8]. Weiterführende Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zur endothelialen Barrierefunktion bei Zytokinexposition lieferten Hinweise auf den Wirkmechanismus der Zytokine. Es wurden Impedanzmessungen der adhären wachsenden Endothelzelllinie TIME (*Telomerase-Immortalized Human Microvascular Endothelial cells*) durchgeführt, welche unter klassischen Zellkulturbedingungen stabile Zell-Zell-Kontakte ausbildet. Bei der Impedanzanalyse ist dies durch einen hohen *cell index* (CI) gekennzeichnet [81]. Bei Zytokinstimulation wurde eine signifikante Abnahme des CI beobachtet, was sich mit dem allgemein akzeptierten Prinzip der endothelialen Dysfunktion bei Sepsis deckt [8, 10-12, 37]. Hervorzuheben ist, dass die Zytokin-induzierte Reduktion des CI durch Austausch des Zytokin-haltigen Zellkulturmediums gegen ein Zytokin-freies Zellkulturmedium innerhalb von lediglich vier Stunden vollständig aufgehoben werden konnte. Die Beobachtung der Rekonstitution der Endothelzellschicht in einer derart kurzen Zeitspanne ist ein klarer Hinweis auf einen schnellen Regulationsmechanismus, welcher auf transkriptioneller Ebene nicht umsetzbar wäre. Eine denkbare Möglichkeit ist hingegen eine posttranskriptionelle, miRNA-vermittelte Regulation der Synthese von Membranadhäsionsproteinen. Daher wurde im nächsten Schritt die miRNA-Expression der Endothelzellen unter proinflammatorischen Bedingungen genauer beleuchtet.

Im menschlichen Genom sind 1917 miRNAs beschrieben [53]. Dies macht ein Screening erforderlich. Die verfügbaren Screening-Methoden unterscheiden sich hinsichtlich Spezifität und Sensitivität [82]. Deshalb kamen in der vorliegenden Arbeit parallel zwei technisch verschiedene Screening-Methoden zum Einsatz: (i) ein Sequenzierungs-basierter Ansatz (Illumina HiSeq 2500) und (ii) ein Microarray-Hybridisierung-System (NanoString™). Durch das kombinierte Screeningverfahren, welches Schwächen der Einzelmethoden hinsichtlich Spezifität und Sensitivität ausgleicht, konnte eine verlässliche Vorauswahl geeigneter miRNA-Kandidaten getroffen werden. Die Validierung der miRNAs erfolgte mittels digital droplet PCR (ddPCR). Bei diesem Verfahren kann die miRNA-Kopienzahl in der Probe absolut bestimmt werden. Im Gegensatz zur Standardmethode der RealTime-PCR ist keine relative Quantifizierung unter Bezugnahme auf die Expression eines als stabil exprimiert definierten Haushaltsgens erforderlich. Bei Untersuchungen zu miRNAs kommen oftmals kleine nukleäre RNAs, wie U6, als Referenzgene zum Einsatz [83, 84]. Allerdings ist beschrieben, dass diese biologischen Standards durch Zytokinstimulation in ihrer Expression beeinflusst sind [82, 83, 85]. Vor dem Hintergrund dieser Limitation ist eine präzise Bestimmung der miRNA-Expression im inflammatorischen Milieu mittels quantitativer RealTime-PCR nur eingeschränkt möglich. Die ddPCR ist die Validierungsmethode der Wahl, da eine zuverlässige Quantifizierung auch von Proben unter Zytokinexposition möglich ist und so eine hohe Validität der Ergebnisse angenommen werden kann.

Die Untersuchungen zur miRNA-Expression der Endothelzellen ergaben, dass eine Stimulation mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β , TNF- α und IFN- γ zu einer Änderung des miRNA-Profiles der Zellen führt. Im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen waren Endothelzellen nach Zytokinexposition durch eine signifikant erhöhte Expression von miR-29a-3p, miR-29b-3p und miR-155-5p gekennzeichnet. Bemerkenswert war zudem die hohe Abundanz von deutlich über Tausend Kopien dieser miRNAs pro Nanogramm Gesamt-RNA. Dies spricht für ein erhebliches Wirkpotential von miR-29a-3p, miR-29b-3p und miR-155-5p auf posttranskriptioneller Ebene.

Die Expression von miRNAs unterliegt in Analogie zu Protein-kodierenden Genen der Regulation durch spezifische Transkriptionsfaktoren. Mittels einer Datenbank-Recherche (GeneCards v5.3 [86]) wurden die Transkriptionsfaktoren identifiziert, welche spezifisch die Transkription von miR-29a-3p, miR-29b-3p und miR-155-5p beeinflussen können. Die Datenbank liefert Informationen darüber, welche Transkriptionsfaktorbindungsstellen vor den miRNA-Genen liegen. Diese wurden mit den durch IL-1 β , TNF- α und IFN- γ aktivierten Transkriptionsfaktoren abgeglichen. Für IL-1 β , TNF- α und IFN- γ ist bekannt, dass diese an der Hochregulation von CCAAT/enhancer binding protein α und β (C/EBP α und C/EBP β) aus dem MAPK-Signalweg, der

p65 Untereinheit aus dem NFκB-Signalweg und des Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT1) aus dem JAK-STAT-Signalweg beteiligt sind [87]. Die Daten der *in silico*-Analyse legen nun nahe, dass alle drei genannten Signalkaskaden in die Expressionsmodulation von miR-29a-3p, miR-29b-3p und miR-155-5p involviert sind [89–93]. Zu den Zytokin-induzierten Transkriptionsfaktoren, welche die Expression von miR-29a-3p, miR-29b-3p und miR-155-5p beeinflussen können, zählen zentrale Mediatoren des NFκB-Signalweges (u.a. RELA, RELB), des MAPK-Signalweges (u.a. JUNB, JUND, FOS, FOSL2, CEBPA, CEBPB, CEBPG, ATF2, ATF3, BATF) und des JAK-STAT-Signalweges (u.a. STAT3, STAT5A, IRF4, IRF9) (Tabelle 2: **Transkriptionsfaktoren, welche die Expression von miR-29a-3p, miR-29b-3p und miR-155-5p beeinflussen**. Recherchiert in der Datenbank GeneCard v5.3). In der Summe untermauern die Ergebnisse der *in silico*-Analyse die Hypothese, dass die Aufregulation der miRNAs miR-29a-3p, miR-29b-3p und miR-155-5p direkt durch die Zytokine IL-1β, TNF-α und IFN-γ vermittelt wird, wobei es zu einem synergistischen Zusammenspiel der Zytokine und der durch sie aktivierten Transkriptionsfaktoren kommt.

Tabelle 2: Transkriptionsfaktoren, welche die Expression von miR-29a-3p, miR-29b-3p und miR-155-5p beeinflussen. Recherchiert in der Datenbank GeneCard v5.3

Signalweg	miR-29a-3p	miR29b-3p	miR-155-5p
NFκB-Signalweg	RELA, RELB, NFKBIZ	NFKBIZ	RELB
MAPK-Signalweg	JUN, JUNB, JUND, FOS, FOSL2, CEBPA, CEBPB, CEBPG, CREB1, ATF1, ATF2, ATF3, ATF4, BATF	JUND, FOS, FOSL2, CEBPA, CEBPB, CEBPG, ATF3, BATF	JUNB, JUND, CEBPA, CEBPB, ATF2, BATF
JAK-STAT-Signalweg	STAT3, STAT5A, IRF2, IRF4, IRF9	STAT3, IRF9	STAT5A, IRF4

ATF = cAMP depending transcription factor, BATF = Basic leucine zipper ATF-like transcription factor, CEBP = CCAAT enhancer binding protein, CREB1 = cAMP responsive element binding protein 1, IRF = Interferon regulatory factor, JUN/JUNB/JUND/FOS/FOSL2 = Untereinheiten von AP-1, NFKBIZ = NFκB inhibitor zeta, RELA = p65, STAT = Signal transducer and activator of transcription

Zur Beantwortung der Frage, ob der reversible Verlust der endothelialen Integrität bei Exposition der Zytokine IL-1β, TNF-α und IFN-γ mit der Zytokin-induzierten Aufregulation von miR-29a-3p, miR-29b-3p und miR-155-5p in Zusammenhang zu bringen ist, wurden die Zielgene der miRNAs identifiziert. Hierzu kamen die Datenbanken miRWalk 2.0 [88] und DIANA-TarBase v8 [89] zum Einsatz. Mit Hilfe dieser Datenbanken können anhand von Sequenzhomologien putative mRNA-miRNA-Interaktionen ermittelt werden. Weiterhin finden sich auch Informationen zu experimentell bereits bestätigten Interaktionen. Es zeigte sich, dass für miR-29a-3p, miR-29b-3p und miR-155-5p zahlreiche experimentell gesicherte Interaktionen mit TJ- und AJ-kodierenden mRNAs bestehen. Zu den validierten Ziel-mRNAs von miR-29a-3p, miR-29b-3p sowie miR-155-5p gehören die Transmembranproteine F11-Rezeptor (F11R) und Claudin 1 (CLDN1) sowie die Adhäsionsproteine β-Catenin (CTNNB1), p120-Catenin (CTNND1) und Eplin (LIMA1). Neben den bereits validierten Zielgenen ergab die bioinformatische Auswertung zudem zahlreiche weitere putative Zielgene aus der Familie der Adhäsionsproteine. So kann aufgrund

von Sequenzhomologie angenommen werden, dass miR-29a-3p, miR-29b-3p und miR-155-5p an der Regulation von Occludin (OCLN) und junctionalem Adhäsionsmolekül C (JAM3) beteiligt sind. miR-29a-3p und miR-29b-3p sind aufgrund ihrer Sequenzen vermutlich in der Lage mit den mRNAs zu interagieren, welche VE-Cadherin (CDH5), α -Catenin (CTNNA1) und Zona Occludens 2 (TJP2) kodieren. miR-29b-3p und miR155-5p sind mögliche Regulatoren von Claudin 5 (CLDN5). γ -Catenin (JUP) und Zona Occludens 1 (TJP1) stellen möglicherweise ein Regulationsziel von miR-29a-3p und junctionales Adhäsionsmolekül B (JAM2) und Vinculin (VCL) ein Regulationsziel von miR-155-5p dar.

Der Befund einer Assoziation der miRNAs miR-29a-3p, miR-29b-3p und miR-155-5p mit der Zell-Zell-Adhäsion von Endothelzellen bestätigte sich auch im Rahmen einer GO (Gene Ontology) - Anreicherungsanalyse. Es handelt sich hierbei um eine bioinformatische Untersuchung, welche auf der Zuordnung von Genen und Genprodukten zu hierarchisch strukturierten feststehenden Begriffen beruht [90]. Überschneidungen in den ontologischen Begriffen verschiedener Gene weist auf funktionelle Gemeinsamkeiten der Gene im Organismus hin. Als bioinformatisches Werkzeug wurde die Web-basierte Anwendung GOrilla (Gene Ontology enRICHment analysis and visualizAtion tool) [90] genutzt. Die GO-Analyse der Zielgene von miR-29a-3p und miR-29b-3p ergab in beiden Fällen eine Anreicherung des GO-Begriffes „*homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules*“ (GO:0007156). Für die Zielgene von miR-155-5p wurden eine Anreicherung des GO-Begriffes „*regulation of cell-cell adhesion*“ (GO:0022407) ermittelt. Die bioinformatische Analyse liefert somit in Übereinstimmung mit den bereits ausgeführten Ergebnissen der Datenbankrecherche einen klaren Beleg dafür, dass miR-29a-3p, miR-29b-3p und miR-155-5p modulierend auf die endotheliale Barrierefunktion einwirken können.

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, die endotheliale Zell-Zell-Adhäsion unter inflammatorischen Bedingungen auf zellulärer, auf mRNA- und auf miRNA-Ebene zu untersuchen. Die durchgeführten Impedanzmessungen zeigen, dass die Zell-Zell-Adhäsion unter Zytokinstimulation mit IL-1 β , TNF- α und IFN- γ gestört ist. Dies ist ein zellphysiologischer Hinweis auf eine durch Zytokine vermittelte Barrierefunktionsstörung des Endothels. Diese Beobachtung des Zellverhaltens in Kontext gesetzt mit den Befunden der miRNA-Expressionsanalyse, der angeschlossenen *in silico*-Analyse von miR-29a-3p, miR-29b-3p und miR-155-5p sowie der GO-Anreicherungsanalyse der Zielgene der vorgenannten miRNAs, weisen auf eine posttranskriptionelle Regulierung der endothelialen Permeabilität hin. Es lässt sich folgender Mechanismus postulieren: Exposition von Endothelzellen gegenüber Zytokinen bewirkt eine Hochregulation der miRNAs miR-29a-3p, miR-29b-3p und miR-155-5p, welche wiederum eine Expressionshemmung endothelialer Adhäsionsproteine vermitteln. Dieser Mechanismus stellt

eine Erweiterung des bisherigen Kenntnisstandes dar, insofern Zytokine nicht nur die Transkriptionsrate der Gene von Adhäsionsproteinen beeinflussen, sondern auch auf die Translationseffizienz einwirken.

Aus dem beschriebenen Mechanismus lassen sich neue Fragestellungen ableiten. Es gilt in weiteren Untersuchungen zu klären, in welchem Ausmaß miR-29a-3p, miR-29b-3p und miR-155-5p die Synthese von Adhäsionsproteinen auf posttranskriptioneller Ebene im Vergleich zur direkten Genregulation beeinflussen. Ein möglicher Ansatz wäre die Hemmung von miR-29a-3p, miR-29b-3p und miR-155-5p mittels Antagomirs [91, 92]. Dieses Verfahren stellt eine Möglichkeit dar miRNAs spezifisch stillzulegen und somit auch deren posttranskriptionellen Effekt zu negieren. Von besonderem Interesse ist anhand dieser weiterführenden Experimente zu beantworten, ob miR-29a-3p, miR-29b-3p und miR-155-5p sinnvolle, pharmakologische Ziele für die Behandlung von Endothelfunktionsstörungen darstellen.

In der Literatur sind Versuche dokumentiert die Sepsis-Symptomatik, namentlich endotheliale Dysfunktion und Hyperinflammation, durch Verabreichung mehrfach ungesättigter ω 3-Fettsäuren zu beeinflussen. [93]. Gründe für diesen Therapieansatz lassen sich aus der Verstoffwechslung der Fettsäuren ableiten. Es ist bekannt, dass Fettsäuren bzw. von Fettsäuren abgeleitete Mediatoren (Eikosanoide, Resolvine) über die Bindung an Rezeptoren, wie Eikosanoid-/Resolvinrezeptor und GPR120, immunologisch relevante zelluläre Signalkaskaden aktivieren [38, 40]. Weiterhin zeigen Vorarbeiten der Arbeitsgruppe, dass der Einbau ungesättigter Fettsäuren in die Plasmamembran zur Störung der *lipid rafts* in der Plasmamembran führt, wodurch die TLR4-Signalkaskade gestört wird [46-48]. Nach aktuellem Kenntnisstand unterliegen der NF κ B-Signalweg, der MAPK-Signalweg und der JAK-STAT-Signalweg der Modulation durch Fettsäuren [48, 94, 95]. So wurde *in vivo* bei Ratten eine verminderte Expression von C/EBP α nach gezielter Fütterung von PUFA erreicht [96]. *In vitro* konnte an glatten Gefäßmuskelzellen gezeigt werden, dass die Supplementierung mit ω 3-Fettsäuren die IL-1 β -induzierte Expression von C/EBP α und p65 hemmt [97]. *In vitro*-Untersuchung an HEK-Zellen belegen eine PUFA-vermittelte Hemmung von NF κ B [48]. Darüber hinaus wurde durch DHA eine reduzierte Bindungsaktivität von AP-1 an der DNA beobachtet [98]. Für den JAK-STAT-Weg ist eine Blockierung der IFN- γ vermittelten Phosphorylierung von STAT1 beschrieben, welche sowohl durch ω 3 als auch durch ω 6 PUFA vermittelt wird [94, 95].

Die Überschneidung der durch proinflammatorische Zytokine wie auch Fettsäuren modulierten Signalkaskaden wirft die Frage auf, ob die durch IL-1 β , TNF- α und IFN- γ induzierte Hochregulation der miRNAs miR-29a-3p, miR-29b-3p und miR-155-5p einer Beeinflussung durch

ungesättigte Fettsäuren unterliegt. Zur Beantwortung dieser Frage wurden die Expressionslevel der miRNAs vergleichend in PUFA-supplementierten und unsupplementierten Endothelzellen gegenübergestellt. Die Ergebnisse der ddPCR-Analysen zeigten, dass die Supplementierung mit PUFA sich weder alleine noch im inflammatorischen Milieu auf die Expression von miR-29b-3p und miR-155-5p auswirkt. Indessen wurde ein deutlicher Effekt einer PUFA-Anreicherung von Endothelzellen auf die Zytokin-induzierte Aufregulation von miR-29a-3p beobachtet. Die Supplementierung der Endothelzellen mit der ω 3-Fettsäure DHA oder der ω 6-Fettsäure AA führte zu einer fast vollständigen Suppression der Zytokin-induzierten Expressionssteigerung von miR-29a-3p. Ein Einfluss von DHA oder AA auf das Expressionsniveau von miR-29a-3p unstimulierter Endothelzellen wurde hingegen nicht beobachtet. Entsprechend blieb in PUFA-supplementierten Zellen die Kopienzahl von miR-29a-3p unabhängig von der An- oder Abwesenheit von IL-1 β , TNF- α und IFN- γ nahezu konstant.

Zu den Zielgenen von miR-29a-3p gehören neben den bereits ausgeführten Adhäsionsproteinen auch Gerinnungsfaktoren, wie SERPINE1 (Gen kodiert für PAI-1), F3 (Gen kodiert für TF) und VWF (Gen kodiert für vWF) sowie Zytokine, wie IL1b (Gen kodiert für IL-1 β), IL6 (Gen kodiert für IL-6) und CXCL8 (Gen kodiert für IL-8). Die im Rahmen der vorliegenden Studie vorgenommenen ddPCR-Analysen belegen, dass es bei Exposition von Endothelzellen mit proinflammatorischen Zytokinen zu einer vermehrten Expression von PAI-1, TF, IL-1 β , IL-6 und IL-8 sowie zu einer signifikant reduzierten Expression von vWF kommt. Wurden die Endothelzellen vorab der Zytokinstimulation mit PUFA angereichert, veränderte sich das Bild deutlich. Die Zytokin-induzierte Hochregulierung der mRNAs von PAI-1, TF, IL-1 β , IL-6 und IL-8 wurde durch die PUFA-Supplementierung signifikant vermindert. Des Weiteren wurde bei PUFA-angereicherten Endothelzellen eine Verstärkung der Zytokin-induzierten Herabregulation von vWF beobachtet. Die PUFA-Anreicherung von Endothelzellen wirkt sich somit sowohl auf die Expression von miR-29a-3p aus, als auch auf die Expression der Zielgene von miR-29a-3p. Hieraus ergibt sich das Bild eines komplexen PUFA-vermittelten Zusammenspiels von Genexpression und posttranskriptioneller Regulation. Die vorliegende Arbeit liefert somit erste Hinweise, dass PUFA ihre entzündungsmodulierende Wirkung sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranskriptioneller Ebene vermitteln. Ein möglicher Erklärungsansatz der PUFA-Wirkung ist, dass nicht nur Zytokine sondern auch ungesättigte Fettsäuren in die Lage sind die Expression der Transkriptionsfaktoren C/EBP, p65, AP-1 und STAT1 zu beeinflussen [48, 96, 97].

Das entzündungshemmende Potential von PUFA ist seit langem Gegenstand der Forschung. Inwiefern Unterschiede in der Wirkung zwischen verschiedenen Fettsäuren bzw. bestimmten Fettsäurefamilien bestehen, ist Inhalt kontroverser Diskussionen. Bei ω 3-Fettsäuren, wie DHA,

wird angenommen, dass diese antiinflammatorisch wirken [38]. Den ω 6-Fettsäuren, wie AA, wird hingegen eine proinflammatorische Wirkung unterstellt [36]. Entsprechend stellt die Verstoffwechslung von AA ein wesentliches Ziel für nichtsteroidale Antirheumatika dar. Die Pauschalisierung der ω 6-Fettsäuren als proinflammatorische Mediatoren wird jedoch auch kritisch diskutiert. Bekannt ist, dass viele von AA abgeleitete Derivate, wie Prostaglandine und Leukotriene, proinflammatorisch wirken [99]. Neuere Studien weisen jedoch darauf hin, dass eine erhöhte Zufuhr von AA keine gesteigerte Entzündungsaktivität nach sich zieht [99]. Dies steht im Einklang mit Vorarbeiten der Arbeitsgruppe, in denen gezeigt wurde, dass eine AA-Supplementierung von Endothelzellen in Analogie zu einer Supplementierung mit den ω 3-Fettsäuren DHA und EPA sich hemmend auf die Zytokin-induzierte Hochregulierung des Adhäsionsproteins VCAM-1 auswirkt [77]. Entsprechend wurde in der vorliegenden Arbeit beobachtet, dass die Zytokin-bedingte Aufregulation von miR29a-3p sowohl durch DHA- als auch durch AA aufgehoben werden kann. Auch hinsichtlich der Inhibition des Zytokineffektes auf die mRNA-Expression von PAI-1, TF, IL-1 β , IL-6, IL-8 und vWF wurde kein Unterschied zwischen ω 3- und ω 6-Fettsäure festgestellt.

Daten aus der Literatur deuten darauf hin, dass die antiinflammatorische Wirkung von ω 3- und ω 6-Fettsäuren rezeptorvermittelt sein könnte. Für die Rezeptoren PPAR γ und GPR120 ist bekannt, dass diese sowohl DHA als auch AA binden können [100, 101], wobei speziell für GPR120 gezeigt wurde, dass beide Fettsäuren im gleichen Maße eine Aktivierung des Rezeptors bewirken [100]. Die Aktivierung von GPR120 vermittelt antiinflammatorische Effekte in der Zelle, indem die proinflammatorischen Signalkaskaden von TLR und des TNF α gehemmt werden [102]. Hieraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass DHA und AA durch die Interaktion mit GPR120 einen antiinflammatorischen Effekt vermitteln können.

In der vorliegenden Studie wurde sowohl die ω 3-Fettsäure DHA als auch die ω 6-Fettsäure AA untersucht, unter der Prämisse die Wirkung beider PUFA-Klassen auf das Entzündungsgeschehen zu analysieren. Die erzielten Daten weisen deutlich auf einen entzündungshemmenden Effekt beider Fettsäuren hin. Dennoch bedarf dieses Feld weiterer Forschung, da der Mechanismus der PUFA-vermittelten antiinflammatorischen Wirkung nach wie vor nicht abschließend geklärt ist.

In der Intensivmedizin gilt das Dogma, dass ω 6-Fettsäuren proinflammatorisch und ω 3-Fettsäuren antiinflammatorisch wirken. Auch wenn sich aus den beschriebenen *in vitro*-Versuchen keine allgemeingültigen Schlussfolgerungen über die Wirkung von PUFA im menschlichen Körper ableiten lassen, unterstreichen die vorliegenden Daten die Notwendigkeit

des Aufbrechens dieses Dogmas. Intensivpatienten kommen nachweislich in den Kontakt mit PUFA. Quelle hierfür sind Ernährungspräparate und pharmakologische Hilfsstoffe. Die hier gezeigten Ergebnisse liefern schlüssige Hinweise, dass die verabreichten PUFA das Potential besitzen im Körper weitreichende und bisher nicht vollständig verstandene Effekte zu entfalten und geben Anlass zur weiteren Forschung.

4 Literaturverzeichnis

1. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW et al. (2016) The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315:801–810. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>
2. Fleischmann-Struzek C, Schwarzkopf D, Reinhart K (2021) Inzidenz der Sepsis in Deutschland und weltweit. *Med Klin Intensivmed Notfmed* 114:A-1424/B-1196/C. <https://doi.org/10.1007/s00063-021-00777-5>
3. Cohen J, Vincent J-L, Adhikari NKJ et al. (2015) Sepsis: A roadmap for future research. *The Lancet Infectious Diseases* 15:581–614. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)70112-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)70112-X)
4. Richter DC, Heininger A, Brenner T et al. (2019) Bakterielle Sepsis: Diagnostik und kalkulierte Antibiotikatherapie (Bacterial sepsis : Diagnostics and calculated antibiotic therapy). *Anaesthesist* 68:40–62. <https://doi.org/10.1007/s00101-017-0396-z>
5. Uhle F, Lichtenstern C, Brenner T et al. (2015) Sepsis und Multiorganversagen – Pathophysiologie der Sepsis. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 50:114–122. <https://doi.org/10.1055/s-0041-100391>
6. Martín-Fernández M, Tamayo-Velasco Á, Aller R et al. (2021) Endothelial Dysfunction and Neutrophil Degranulation as Central Events in Sepsis Physiopathology. *Int J Mol Sci* 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22126272>
7. Schlegel N, Waschke J (2014) cAMP with other signaling cues converges on Rac1 to stabilize the endothelial barrier- a signaling pathway compromised in inflammation. *Cell Tissue Res* 355:587–596. <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1755-y>
8. Radeva MY, Waschke J (2018) Mind the gap: Mechanisms regulating the endothelial barrier. *Acta Physiol* 222:e12860. <https://doi.org/10.1111/apha.12860>
9. Reglero-Real N, Colom B, Bodkin JV et al. (2016) Endothelial Cell Junctional Adhesion Molecules: Role and Regulation of Expression in Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 36:2048–2057. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.307610>
10. Ait-Oufella H, Maury E, Lehoux S et al. (2010) The endothelium: Physiological functions and role in microcirculatory failure during severe sepsis. *Intensive Care Med* 36:1286–1298. <https://doi.org/10.1007/s00134-010-1893-6>
11. Lee WL, Liles WC (2011) Endothelial activation, dysfunction and permeability during severe infections. *Current Opinion in Hematology* 18:191–196. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e328345a3d1>
12. Opal SM, van der Poll T (2015) Endothelial barrier dysfunction in septic shock. *J Intern Med* 277:277–293. <https://doi.org/10.1111/joim.12331>

13. Toshiaki Iba, Marcel Levi, Jerrold H. Levy (2020) Sepsis-Induced Coagulopathy and Disseminated Intravascular Coagulation. *Semin Thromb Hemost* 46:89–95. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1694995>
14. Landry DW, Oliver JA (2001) The pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med* 345. <https://doi.org/10.1056/NEJMra002709>
15. Parrillo JE (1993) Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Engl J Med* 328. <https://doi.org/10.1056/NEJM199305203282008>
16. Gotts JE, Matthay MA (2016) Sepsis: Pathophysiology and clinical management. *BMJ* 353:i1585. <https://doi.org/10.1136/bmj.i1585>
17. Bone RC, Balk RA, Cerra FB et al. (1992) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101. <https://doi.org/10.1378/chest.101.6.1644>
18. Levy MM, Fink MP, Marshall JC et al. (2003) 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 31. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000050454.01978.3B>
19. Vincent J-L, Moreno R, Takala J et al. (1996) The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensive Care Med* 22:707–710. <https://doi.org/10.1007/BF01709751>
20. Rhodes A, Le Evans, Alhazzani W et al. (2017) Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med* 43. <https://doi.org/10.1007/s00134-017-4683-6>
21. Evans L, Rhodes A, Alhazzani W et al. (2021) Executive Summary: Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for the Management of Sepsis and Septic Shock 2021. *Crit Care Med* 49:1974. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000005357>
22. Baxter Fachinformation Propofol 2%. https://www.baxter.de/sites/g/files/ebysai1301/files/2020-11/propofol_20_fs.pdf
23. Elke G, Hartl W, Kreyman K et al. (2018) DGEM-Leitlinie: „Klinische Ernährung in der Intensivmedizin“. *Aktuel Ernährungsmed* 43:341–408. <https://doi.org/10.1055/a-0713-8179>
24. Singer P, Blaser AR, Berger MM et al. (2019) ESPEN guideline on clinical nutrition in the intensive care unit. *Clin Nutr* 38:48–79. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.08.037>
25. Green P, Theilla M, Singer P (2016) Lipid metabolism in critical illness. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 19. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000253>

26. Walsh CT (2018) Propofol: Milk of Amnesia. *Cell* 175:10–13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.031>
27. Nelson DL, Cox MM (2011) *Lehninger Biochemie: Mit 131 Tabellen*, 4., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, Übersetzung der 5. amerikanischen Auflage, korrigierter Nachdruck. Springer-Lehrbuch. Springer, Berlin, Heidelberg
28. Fahy E, Subramaniam S, Brown HA et al. (2005) A comprehensive classification system for lipids¹. *Journal of Lipid Research* 46:839–861. <https://doi.org/10.1194/jlr.E400004-JLR200>
29. Bach D, Wachtel E (2003) Phospholipid/cholesterol model membranes: Formation of cholesterol crystallites. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1610:187–197. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(03\)00017-8](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(03)00017-8)
30. Alberts B (2008) *Molecular biology of the cell*, 5th ed. Garland Science, New York
31. Baxter Olimel 5,7%
32. Davidson BC, Cantrill RC (1985) Fatty acid nomenclature. A short review. *South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde* 67. <https://doi.org/10.1002/chin.198542383>
33. Spector AA, Kim H-Y (2015) Discovery of essential fatty acids. *Journal of Lipid Research* 56:11–21. <https://doi.org/10.1194/jlr.R055095>
34. Shahidi F, Ambigaipalan P (2018) Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits. *Annual review of food science and technology* 9. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-111317-095850>
35. Simopoulos AP (2002) The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 56. [https://doi.org/10.1016/s0753-3322\(02\)00253-6](https://doi.org/10.1016/s0753-3322(02)00253-6)
36. Innes JK, Calder PC (2020) Marine Omega-3 (N-3) Fatty Acids for Cardiovascular Health: An Update for 2020. *Int J Mol Sci* 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21041362>
37. Aird WC (2003) The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood* 101:3765–3777. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-06-1887>
38. Djuricic I, Calder PC (2021) Beneficial Outcomes of Omega-6 and Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Human Health: An Update for 2021. *Nutrients* 13. <https://doi.org/10.3390/nu13072421>
39. Calder PC (2020) Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid derived specialised pro-resolving mediators: Concentrations in humans and the effects of age, sex, disease and increased omega-3 fatty acid intake. *Biochimie* 178:105–123. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.08.015>

40. Christofides A, Konstantinidou E, Jani C et al. (2021) The role of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in immune responses. *Metabolism: clinical and experimental* 114. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154338>
41. Im D-S (2016) Functions of omega-3 fatty acids and FFA4 (GPR120) in macrophages. *European Journal of Pharmacology* 785:36–43. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03.094>
42. Stillwell W, Wassall, SR (2003) Docosahexaenoic acid: Membrane properties of a unique fatty acid. *Chemistry and physics of lipids* 126. [https://doi.org/10.1016/s0009-3084\(03\)00101-4](https://doi.org/10.1016/s0009-3084(03)00101-4)
43. Wassall, SR, Stillwell W (2008) Docosahexaenoic acid domains: The ultimate non-raft membrane domain. *Chemistry and physics of lipids* 153. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2008.02.010>
44. Pike LJ (2003) Lipid rafts: Bringing order to chaos. *Journal of Lipid Research* 44. <https://doi.org/10.1194/jlr.R200021-JLR200>
45. Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nature reviews. Molecular cell biology* 1. <https://doi.org/10.1038/35036052>
46. Axel Schoeniger, Herbert Fuhrmann, Julia Schumann (2016) LPS- or *Pseudomonas aeruginosa*-mediated activation of the macrophage TLR4 signaling cascade depends on membrane lipid composition. *PeerJ* 4:e1663. <https://doi.org/10.7717/peerj.1663>
47. Julia Schumann, Alexander Leichtle, Joachim Thiery et al. (2011) Fatty Acid and Peptide Profiles in Plasma Membrane and Membrane Rafts of PUFA Supplemented RAW264.7 Macrophages. *PLOS ONE* 6:e24066. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024066>
48. Schumann J, Fuhrmann H (2010) Impairment of NFkappaB activity by unsaturated fatty acids. *Int Immunopharmacol* 10:978–984. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.05.011>
49. Djebali S, Davis CA, Merkel A et al. (2012) Landscape of transcription in human cells. *Nature* 489:101–108. <https://doi.org/10.1038/nature11233>
50. Felekis K, Touvana E, Stefanou C et al. (2010) microRNAs: a newly described class of encoded molecules that play a role in health and disease. *Hippokratia* 14:236–240
51. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75:843–854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y)
52. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG et al. (2001) An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294:858–862. <https://doi.org/10.1126/science.1065062>
53. mirBase (Release 22.1) mirBase. <https://www.mirbase.org/>. Accessed 16 Mar 2022

54. Lin S, Gregory RI (2015) MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer* 15:321–333. <https://doi.org/10.1038/nrc3932>
55. Macfarlane L-A, Murphy PR (2010) MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Current genomics* 11:537–561. <https://doi.org/10.2174/138920210793175895>
56. Vishnoi A, Rani S (2017) MiRNA Biogenesis and Regulation of Diseases: An Overview. In: Rani S (ed) *MicroRNA Profiling: Methods and Protocols*. Humana Press, New York, NY, pp 1–10
57. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M et al. (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403:901–906. <https://doi.org/10.1038/35002607>
58. Desvignes T, Batzel P, Berezikov E et al. (2015) miRNA Nomenclature: A View Incorporating Genetic Origins, Biosynthetic Pathways, and Sequence Variants. *Trends in Genetics* 31:613–626. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.09.002>
59. Ambros V, BARTEL B, BARTEL DP et al. (2003) A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 9:277–279. <https://doi.org/10.1261/rna.2183803>
60. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y et al. (2018) Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol* 9:402. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>
61. Alarcón CR, Lee H, Goodarzi H et al. (2015) N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. *Nature* 519:482–485. <https://doi.org/10.1038/nature14281>
62. Denli AM, Tops BBJ, Plasterk RHA et al. (2004) Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432:231–235. <https://doi.org/10.1038/nature03049>
63. Okada C, Yamashita E, Lee SJ et al. (2009) A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science* 326:1275–1279. <https://doi.org/10.1126/science.1178705>
64. Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L et al. (2004) Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 118:57–68. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.017>
65. Sanghvi VR, Steel LF (2011) The cellular TAR RNA binding protein, TRBP, promotes HIV-1 replication primarily by inhibiting the activation of double-stranded RNA-dependent kinase PKR. *J Virol* 85:12614–12621. <https://doi.org/10.1128/JVI.05240-11>
66. Carroll AP, Goodall GJ, Liu B (2014) Understanding principles of miRNA target recognition and function through integrated biological and bioinformatics approaches. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 5:361–379. <https://doi.org/10.1002/wrna.1217>
67. Ipsaro JJ, Joshua-Tor L (2015) From guide to target: molecular insights into eukaryotic RNA-interference machinery. *Nat Struct Mol Biol* 22:20–28. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2931>

68. Correia de Sousa M, Gjorgjieva M, Dolicka D et al. (2019) Deciphering miRNAs' Action through miRNA Editing. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20246249>
69. Liu B, Li J, Cairns MJ (2014) Identifying miRNAs, targets and functions. *Brief Bioinform* 15:1–19. <https://doi.org/10.1093/bib/bbs075>
70. Friedman RC, Farh KK-H, BURGE CB et al. (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19:92–105. <https://doi.org/10.1101/gr.082701.108>
71. van der Poll T, van de Veerdonk FL, Scicluna BP et al. (2017) The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nat Rev Immunol* 17:407–420. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.36>
72. Wang N, Liang H, Zen K (2014) Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Front Immunol* 5:614. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00614>
73. Goodwin AJ, Guo C, Cook JA et al. (2015) Plasma levels of microRNA are altered with the development of shock in human sepsis: an observational study. *Crit Care* 19:440. <https://doi.org/10.1186/s13054-015-1162-8>
74. Hawiger J, Veach RA, Zienkiewicz J (2015) New paradigms in sepsis: from prevention to protection of failing microcirculation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 13:1743–1756. <https://doi.org/10.1111/jth.13061>
75. Pena-Philippides JC, Gardiner AS, Caballero-Garrido E et al. (2018) Inhibition of MicroRNA-155 Supports Endothelial Tight Junction Integrity Following Oxygen-Glucose Deprivation. *J Am Heart Assoc* 7. <https://doi.org/10.1161/JAHA.118.009244>
76. Kingsley SMK, Bhat BV (2017) Role of microRNAs in sepsis. *Inflamm Res* 66:553–569. <https://doi.org/10.1007/s00011-017-1031-9>
77. Trommer S, Leimert A, Bucher M et al. (2017) Impact of Unsaturated Fatty Acids on Cytokine-Driven Endothelial Cell Dysfunction. *Int J Mol Sci* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18122739>
78. Zheng Z, Ge Y, Zhang J et al. (2015) PUFA diets alter the microRNA expression profiles in an inflammation rat model. *Mol Med Rep* 11:4149–4157. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3318>
79. Davidson LA, Wang N, Shah MS et al. (2009) n-3 Polyunsaturated fatty acids modulate carcinogen-directed non-coding microRNA signatures in rat colon. *Carcinogenesis* 30:2077–2084. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp245>
80. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK et al. (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15545–15550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>

81. Agilent Technologies, Inc. (2020) Real-Time and Dynamic Monitoring of Cell Proliferation and Viability for Adherent Cells 2020
82. Mestdagh P, Hartmann N, Baeriswyl L et al. (2014) Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study. *Nat Methods* 11:809–815. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3014>
83. Benz F, Roderburg C, Vargas Cardenas D et al. (2013) U6 is unsuitable for normalization of serum miRNA levels in patients with sepsis or liver fibrosis. *Experimental & molecular medicine* 45:e42. <https://doi.org/10.1038/emm.2013.81>
84. Xiang M, Zeng Y, Yang R et al. (2014) U6 is not a suitable endogenous control for the quantification of circulating microRNAs. *Biochem Biophys Res Commun* 454:210–214. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.10.064>
85. Hirschberger S, Hübner M, Strauß G et al. (2019) Identification of suitable controls for miRNA quantification in T-cells and whole blood cells in sepsis. *Sci Rep* 9:15735. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51782-w>
86. Safran M, Rosen N, Twik M, BarShir R, Iny Stein T, Dahary D, Fishilevich S, and Lancet D. GeneCards – the human gene database. www.genecards.org. Accessed 01 Apr 2022
87. Kanehisa M, Goto S, Furumichi M et al. (2010) KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs. *Nucleic Acids Res* 38:D355-60. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp896>
88. Uni Heidelberg miRWalk 2.0. <http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>. Accessed 25 Mar 2022
89. Karagkouni D, Paraskevopoulou MD, Chatzopoulos S et al. (2018) DIANA-TarBase v8: a decade-long collection of experimentally supported miRNA-gene interactions. *Nucleic Acids Res* 46:D239-D245. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1141>
90. Eden E, Navon R, Steinfeld I et al. (2009) GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics* 10:48. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-48>
91. Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R et al. (2005) Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 438:685–689. <https://doi.org/10.1038/nature04303>
92. Czech MP (2006) MicroRNAs as therapeutic targets. *N Engl J Med* 354:1194–1195. <https://doi.org/10.1056/NEJMcibr060065>
93. Lu C, Sharma S, McIntyre L et al. (2017) Omega-3 supplementation in patients with sepsis: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Ann Intensive Care* 7:58. <https://doi.org/10.1186/s13613-017-0282-5>

94. Wang X, Breeze A, Kulka M (2015) N-3 polyunsaturated fatty acids inhibit IFN- γ -induced IL-18 binding protein production by prostate cancer cells. *Cancer Immunol Immunother* 64:249–258. <https://doi.org/10.1007/s00262-014-1630-z>
95. Bonilla DL, Ly LH, Fan Y-Y et al. (2010) Incorporation of a dietary omega 3 fatty acid impairs murine macrophage responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *PLOS ONE* 5:e10878. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010878>
96. Vara Prasad SSS, Jeya Kumar SS, Kumar PU et al. (2010) Dietary fatty acid composition alters 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene expression in rat retroperitoneal white adipose tissue. *Lipids Health Dis* 9:111. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-9-111>
97. Bousserouel S, Brouillet A, Béréziat G et al. (2003) Different effects of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids on the activation of rat smooth muscle cells by interleukin-1 beta. *Journal of Lipid Research* 44:601–611. <https://doi.org/10.1194/jlr.M200092-JLR200>
98. Liu G, Bibus DM, Bode AM et al. (2001) Omega 3 but not omega 6 fatty acids inhibit AP-1 activity and cell transformation in JB6 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7510–7515. <https://doi.org/10.1073/pnas.131195198>
99. Innes JK, Calder PC (2018) Omega-6 fatty acids and inflammation. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 132:41–48. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2018.03.004>
100. Moberaten K, Haug TM, Kleiveland CR et al. (2013) Omega-3 and omega-6 PUFAs induce the same GPR120-mediated signalling events, but with different kinetics and intensity in Caco-2 cells. *Lipids Health Dis* 12:101. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-12-101>
101. Dozsa A, Dezso B, Toth BI et al. (2014) PPAR γ -mediated and arachidonic acid-dependent signaling is involved in differentiation and lipid production of human sebocytes. *J Invest Dermatol* 134:910–920. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.413>
102. Da Oh Y, Talukdar S, Bae EJ et al. (2010) GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* 142:687–698. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.041>

5 Thesen

- I. Zytokinexposition (IL-1 β , TNF- α und IFN- γ) schwächt die endotheliale Expression von Molekülen der homophilen Zell-Zell-Adhäsion und führt zum Verlust der Integrität der Endothelzellschicht. Die Barrierefunktionsstörung ist nach Entfernung der Zytokine reversibel.
- II. Sowohl der Verlust als auch die Wiederherstellung der Integrität der Endothelschicht erfolgt in weniger als vier Stunden. Dies indiziert die Beteiligung eines schnellen Regulationsmechanismus.
- III. Die Exposition von Endothelzellen gegenüber proinflammatorischen Zytokinen führt zu einer signifikant gesteigerten Expression der miRNAs miR-29a-3p, miR-29b-3p und miR-155-5p.
- IV. Der Nachweis einer Zytokin-induzierten Aufregulierung von miR-29a-3p, miR-29b-3p und miR-155-5p zusammen mit der bereits in Datenbanken dokumentierten Beobachtung, dass wichtige Mediatoren endothelialer Zellkontakte Ziele dieser miRNAs sind, liefert einen klaren Hinweis darauf, dass der Verlust der endothelialen Barrierefunktion im entzündlichen Milieu zumindest teilweise auf einen posttranskriptionellen Mechanismus zurückzuführen ist.
- V. Die Zytokin-induzierte Aufregulierung von miR-29a-3p wird durch die Anreicherung von Endothelzellen mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) blockiert.
- VI. Die mRNA-Kopienzahlen der miR-29a-3p-Ziele, namentlich der Gerinnungsfaktoren PAI-1, TF und vWF sowie der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und IL-8, sind in PUFA-angereicherten Endothelzellen im Vergleich zu unsupplementierten Zellen vermindert, was der stimulierenden Wirkung eines entzündlichen Milieus entgegenwirkt

6 Publikationsteil

6.1 Publikation 1

Loss of Endothelial Barrier Function in the Inflammatory Setting: Indication for a Cytokine-Mediated Post-Transcriptional Mechanism by Virtue of Upregulation of miRNAs miR-29a-3p, miR-29b-3p, and miR-155-5p

Autoren: Daniel Maucher, Birte Schmidt und Julia Schumann

Journal: Cells (Impact Factor 2021: 7,666)


DOI: 10.3390/cells10112843

Zusammenfassung: Eine Störung der endothelialen Barriere spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese von akuten und chronischen Entzündungsprozessen wie Sepsis oder Atherosklerose. Durch die Abschwächung der Endothelzellkontakte kommt es zu einem vermehrten Transfer von Blutproteinen und Flüssigkeit in das umgebende Gewebe, was mit Ödembildung und Verteilungsstörungen einhergeht. Allerdings sind die Mechanismen, die dieser Reaktionen zugrunde liegen, nicht vollständig verstanden. In dieser Studie wurde der Verlust der Barrierefunktion in einem entzündlichen Milieu *in vitro* an humanen Endothelzellen nachgeahmt. Es zeigte sich, dass eine geschwächte endotheliale Barriere nach Zytokinstimulation mit signifikanten Veränderungen des Transkriptom einhergeht. Auffallend war eine Depletion von mRNAs, die für Zelladhäsionsmoleküle kodieren. Darüber hinaus war zu beobachten, dass die Zytokinbehandlung von Endothelzellen eine Hochregulierung von miR-29a-3p, miR-29b-3p und miR-155-5p auslöste. miRNAs sind dafür bekannt, dass sie die Stabilität und Translationseffizienz von Ziel-mRNAs negativ beeinflussen. Bemerkenswerterweise wurde bereits beschrieben, dass miR-29a-3p, miR-29b-3p und miR-155-5p die mRNAs zentraler Tight- und Adhärenz-Junction-Proteine wie F11-Rezeptor, Claudin 1, β -Catenin, p120-Catenin und Eplin angreifen. Dies zusammengenommen deutet auf die Existenz eines posttranskriptionellen Mechanismus für die Expressionshemmung zentraler Adhäsionsproteine hin, der durch entzündliche Zytokine ausgelöst und durch miR-29a-3p, miR-29b-3p und miR-155-5p vermittelt wird.

Darstellung der Eigenleistung: Hypothesenentwicklung und Planung der notwendigen Versuche; Extraktion und Aufarbeitung der RNA aus der Endothelzelllinie TIME; Auswertung der generierten NGS- und Nanostring-Daten; Identifizierung und Auswahl vielversprechender miRNA-Kandidaten; Validierung der miRNAs mittels ddPCR; *in silico*-Analyse der validierten miRNAs einschließlich Identifizierung von Zielgenen aus der Gruppe endothelialer Adhäsionsmoleküle

Article

Loss of Endothelial Barrier Function in the Inflammatory Setting: Indication for a Cytokine-Mediated Post-Transcriptional Mechanism by Virtue of Upregulation of miRNAs miR-29a-3p, miR-29b-3p, and miR-155-5p

Daniel Maucher, Birte Schmidt and Julia Schumann * 

University Clinic and Outpatient Clinic for Anesthesiology and Operative Intensive Care, University Medicine Halle (Saale), Franzosenweg 1a, 06112 Halle (Saale), Germany; Daniel.Maucher@uk-halle.de (D.M.); birteschmidt09@gmail.com (B.S.)

* Correspondence: julia.schumann@uk-halle.de; Tel.: +49-345-5571776



Citation: Maucher, D.; Schmidt, B.; Schumann, J. Loss of Endothelial Barrier Function in the Inflammatory Setting: Indication for a Cytokine-Mediated Post-Transcriptional Mechanism by Virtue of Upregulation of miRNAs miR-29a-3p, miR-29b-3p, and miR-155-5p. *Cells* **2021**, *10*, 2843. <https://doi.org/10.3390/cells10112843>

Academic Editor: Alexander E. Kalyuzhny

Received: 3 September 2021
Accepted: 12 October 2021
Published: 22 October 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Dysfunction of the endothelial barrier plays a central role in the pathogenesis of both acute and chronic inflammatory processes such as sepsis or atherosclerosis. Due to attenuation of endothelial cell contacts, there is an increased transfer of blood proteins and fluid into the surrounding tissue, which relates to edema formation and distribution disorders. However, the mechanisms underlying these responses are not fully understood. In this study, we used human endothelial cells to mimic the loss of barrier function in an inflammatory milieu. We found that a weakened endothelial barrier after cytokine stimulation was accompanied by a significantly changed transcriptome. Apparent was a depletion of mRNAs encoding cell adhesion molecules. Furthermore, we found that cytokine treatment of endothelial cells induced upregulation of miR-29a-3p, miR-29b-3p, and miR-155-5p. miRNAs are known to negatively affect stability and translational efficiency of target mRNAs. Remarkably, miR-29a-3p, miR-29b-3p, and miR-155-5p have already been described to target the mRNAs of central tight and adherent junction proteins including F11 receptor, claudin 1, β -catenin, p120-catenin, and eplin. This taken together points to the existence of a posttranscriptional mechanism for expression inhibition of central adhesion proteins, which is triggered by inflammatory cytokines and mediated by miR-29a-3p, miR-29b-3p, and miR-155-5p.

Keywords: endothelial barrier; miRNAs; tight junctions; adherens junctions

1. Introduction

The endothelium, formed by endothelial cells, lines all blood vessels. In the intact vascular system, the endothelium represents a continuous barrier and actively regulates the distribution of substrate and fluid between blood and tissues. To achieve this balance, endothelial cells form tight junctions (TJs) and adherens junctions (AJs) with each other. TJs serve to seal the intercellular space and thus have a direct limiting effect on paracellular permeability [1,2]. AJs contribute to barrier stabilization by providing mechanical strength to the endothelial cell layer [1,2]. The contact of adjacent endothelial cells within TJs and AJs is ensured by transmembrane proteins, such as occludin (*OCLN*), F11 receptor (*F11R*), JAM-B (*JAM2*), JAM-C (*JAM3*), claudin 1 (*CLDN1*), claudin 5 (*CLDN5*), and VE-cadherin (*CDH5*) [1,2]. These proteins are associated with the cellular cytoskeleton via adhesion molecules such as α -catenin (*CTNNA1*), β -catenin (*CTNNB1*), γ -catenin (*JUP*), p120-catenin (*CTNND1*), vinculin (*VCL*), ZO-1 (*TJP1*), ZO-2 (*TJP2*), and eplin (*LIMA1*) [1,2]. The expression and distribution of TJ and AJ proteins are strictly regulated to ensure stability, integrity, and proper function of the endothelial barrier. It is worth noting that during inflammatory processes, these binding molecules are reorganized. Previous studies have shown that treatment of endothelial cells with cytokines alters both the amount and localization of TJ and AJ proteins, leading to intercellular gap formation and reduction of endothelial

integrity [1,3,4]. The attenuation of endothelial cell–cell contacts is a physiological adaptation to facilitate the process of immune cell diapedesis into infected tissues. However, in systemic inflammatory processes such as sepsis or in the course of chronic inflammation, this inherently beneficial adaptive response shifts into a clinically significant maladaptation. Excessive, permanent and generalized activation of the endothelium occurs, which is accompanied by dysfunctionality [2,5–8]. Characteristic of this dysfunctionality is, among other things, a breakdown of barrier function.

Previous studies point at microRNA (miRNA)-mediated regulation of gene expression as a critical factor in deregulated endothelial function [9–13]. miRNAs are involved in the fine-tuning of gene expression. At the posttranscriptional level, miRNAs regulate the stability and translational efficiency of protein-encoding mRNAs [11,13–15]. The interaction between miRNAs and mRNAs is based on partial complementarity, so that a single miRNA can regulate the expression of hundreds of different mRNAs [11,14]. Indeed, disruption of miRNA-mediated regulation of TJ and AJ protein expression has already been associated with the formation of abnormal binding structures [16]. In an in vitro model of ischemic stroke, inhibition of miR-155 improved endothelial integrity and had a positive effect on claudin 1 and ZO-1 expression [12]. Additionally, miR-147b has been reported to impact endothelial barrier function owing to its ability to target the metalloproteinase ADAM15, which promotes increased endothelial permeability [17]. Taken together, these data suggest that miRNAs may play a critical role in endothelial function and vascular barrier integrity by affecting in a posttranscriptional manner the expression of adhesion molecules. Thus, the aim of the present study was to examine the possibility that miRNAs may act as (co)mediators in the loss of endothelial barrier function under inflammatory conditions.

2. Materials and Methods

2.1. Culturing and Stimulaton of Cells

The human cell line TIME (ATCC[®] number CRL-4025) cultured at 37 °C and 5% CO₂ in a humid atmosphere served as an in vitro model for microvascular endothelial cells. As recommended by ATCC[®], basal microvascular endothelial growth medium (Provitro, Berlin, Germany) was supplemented with 5 ng/mL VEGF, 5 ng/mL EGF, 5 ng/mL FGF, 15 ng/mL IGF-1, 10 mM L-glutamine, 0.75 U/mL heparin sulfate, 1 µg/mL hydrocortisone hemisuccinate, 50 µg/mL ascorbic acid, 5% *v/v* FCS, and 12.5 µg/mL blasticidin. Cell stimulation was performed over a 24 h period by adding the cytokines IL-1β, TNF-α and IFN-γ at a concentration of 5 ng/mL each (all PeproTech, Hamburg, Germany).

2.2. Impedance Analysis

Barrier stability was monitored in a non-invasive, label-free manner by continuous impedance measurement using the microelectronic biosensor system for cell-based assays xCELLigence[®] RTCA DP (ACEA Bioscience Incorporation via OLS, Bremen, Germany) according to manufacturer's instructions. For xCELLigence measurements, TIME on gold electrode-coated plates (E-Plate 16 PET, OLS, Bremen, Germany) were placed in the xCELLigence RTCA DP system and real-time monitoring of transendothelial resistance was initiated for 48 h. Impedance was measured between gold electrodes in individual wells of the E-Plate and converted to the unit-free parameter cell index (CI) by the RCTA software (version 2.0; ACEA Biosciences Inc., San Diego, CA, USA). When a confluent monolayer was reached, the cytokine-free culture medium was replaced by a cytokine-containing one (5 ng/mL each of IL-1β, TNF-α, and IFN-γ). After 12 h of incubation, the medium was changed back to the cytokine-free culture medium.

Impedance analysis was performed with three biological replicates and two technical replicates tested in each group. Two-way analysis of variance (ANOVA) with correction for multiple comparisons (Sidak) was performed to determine significant differences in means, with a *p* value < 0.05 as an indicator of significant differences. GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) was used as the statistical analysis software.

2.3. RNA Isolation

Total RNA was obtained using TRIzol-based standard isolation procedure following the manufacturer's directions (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany). Quality determination of the extracted RNA was performed using NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany) and Agilent Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). For subsequent procedures, only RNA with an absorbance quotient A260/280 >1.8 was used.

2.4. mRNA Expression (Transcriptome) Screening

mRNA-seq library preparation and deep-sequencing were performed by Novogene (UK) Company Limited (Cambridge, UK). Next generation sequencing (NGS) was carried out by means of an Illumina HiSeq2500 (San Diego, CA, USA). Three biological replicates were analyzed in every test group.

Differential gene expression analysis was conducted by the Core Facility Imaging, University Medicine Halle (Saale). In this analysis, low quality read ends as well as remaining parts of sequencing adapters were clipped off using Cutadapt software (<https://cutadapt.readthedocs.org/> (accessed on 3 September 2021)). The processed sequencing reads were aligned to the human genome (UCSC GRCh38) using HiSat2 v2.1.0 (<http://daehwankimlab.github.io/hisat2/> (accessed on 3 September 2021)) [18]. Removal of secondary alignments as well as filtering and indexing of alignments was performed using samtools [19]. FeatureCounts v1.53 (<http://subread.sourceforge.net/> (accessed on 3 September 2021)) [20] was used for summarizing gene-mapped reads. Ensembl [21] was used as annotation basis. Differential gene expression was determined using the R package edgeR v3.26.8 (<http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/edgeR.html> (accessed on 3 September 2021)) [22] utilizing trimmed mean of M-values (TMM) normalization. Normalized count data subsequently were FPKM (fragments per million mapped reads) transformed. All generated RNA-seq data were deposited at Gene Expression Omnibus (GEO) repository.

2.5. MiRNA Expression Screening

NGS and NanoString technology were used in parallel to identify differentially expressed miRNAs. Three biological replicates were screened per test group.

Small RNA-seq library preparation, deep sequencing, and differential gene expression analysis were conducted by the Core Unit DNA, Leipzig University. NGS was carried out viaan Illumina HiScanSQ (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). For differential gene expression analysis low-quality read ends and leftover sequencing adapters were truncated via Cutadapt software. Only sequences between 15 and 27 bases in length were analyzed. Reads were aligned to the human genome (UCSC GRCh38) and to mature sequences deposited in miRBase v21 by using the Bowtie aligner [23]. Removal of secondary alignments as well as filtering and indexing of alignments was performed using samtools [19]. The R/Bioconductor programming environment was used to determine the number of mapped reads using the ShortRead library with an acceptable error rate of 1 nt per mature miRNA sequence. Reads per million (RPM) and the TMM algorithm were used independently for data normalization. All generated small RNA-seq data were deposited at Gene Expression Omnibus (GEO) repository.

NanoString analysis was performed at the Institute of Human Genetics, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Germany, with the nCounter FLEX Analysis System (NanoString Technologies, Hamburg, Germany). The nCounter human v3 miRNA expression assay was run according to the manufacturer's instructions. The nSolver™ Analysis Software v3.0 (NanoString Technologies Inc., Seattle, WA, USA) was applied for data normalization. This included subtraction of background noise based on the negative controls of the miRNA assay, technical normalization based on the positive controls of the miRNA assay, and biological normalization based on the comparison of the samples with respect

to the 100 most highly expressed miRNAs and the so-called positive ligation controls to compensate for potential differences in the amount of total RNA between the samples.

2.6. Droplet Digital PCR (ddPCR)

Complementary DNA (cDNA) was synthesized according to standard protocol of miRCURY LNA RT Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), with spike-in RNA UniSp6 added to all samples as positive control. Subsequently, miRNA copy numbers were determined by applying droplet digital PCR technology (BioRad, Munich, Germany) according to the manufacturer's standard protocols and using appropriate miRCURY LNA miRNA PCR assay primers (QIAGEN, Hilden, Germany) and ddPCR EvaGreen Supermix (Bio-Rad, Munich, Germany). Nucleic acid copy number per μl of a sample was measured using a QX200 ddPCR Droplet Reader (Bio-Rad, Munich, Germany) and converted to nucleic acid copy number per ng of RNA.

ddPCR reaction was performed with six biological replicates and two technical replicates tested in each group. An unpaired t-test was performed to determine significant differences in means, with a p value < 0.05 as an indicator of significant differences. GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) was used as the statistical analysis software.

2.7. In Silico Analyses

To assess statistically significant, consistent differences in the transcriptome of cytokine-stimulated versus unstimulated endothelial cells, a gene set enrichment analysis (GSEA) was performed. GSEA was conducted by the Core Facility Imaging, University Medicine Halle (Saale) using the GSEA v3.0 software (UC San Diego and Broad Institute, San Diego, CA, USA) [24] and MSigDB v7.0 gene sets [25] thereby applying the pre-ranked test, 1000 permutations and the classical scoring scheme. Log₂ fold changes of all protein coding genes' expression determined by the differential expression analyses were used as input. A false discovery rate (FDR) < 0.05 was set as cut off criterion.

Transcription factor binding sites of differentially expressed miRNAs were identified utilizing the online database GeneCards v5.3 (<https://www.genecards.org/> (accessed on 26 May 2021)) [26].

Target genes of differentially expressed miRNAs were identified utilizing the online databases miRWalk2.0 (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/index.html> (accessed on 7 June 2021)) [27] and DIANA-TarBase v8 (https://carolina.imis.athena-innovation.gr/diana_tools/web/index.php?r=tarbasev8%2Findex (accessed on 7 June 2021)) [28].

Gene Ontology (GO) enrichment analysis was performed on the identified target genes of each miRNA using the online GeneOntology enrichment analysis and visualization tool (GORilla) (<http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/> (accessed on 28 June 2021)) [29]. In order to identify GO processes that appear densely at the top or the bottom of the ranked list of target genes of a given miRNA, the GO enrichment analysis was carried out in the "single list mode". A false p value < 0.01 was set as cut off criterion.

3. Results

3.1. Treatment with Proinflammatory Cytokines Attenuates Endothelial Expression of Molecules of Homophilic Cell–Cell Adhesion and Results in Loss of Endothelial Cell Layer Integrity

Cytokine stimulation of endothelial cells is known to result in distinct functional adaptations. For visualization of transcriptome changes involved in this process, a GSEA was used. GSEA is a computational method to determine whether an a priori-defined set of genes displays significant and concordant differences in expression between two biological states [24,30]. In this study, mRNA expression of cytokine-stimulated versus unstimulated endothelial cells was compared. As shown in Figure 1, cytokine stimulation is accompanied with a marked inflammatory response. The expression of genes involved in the regulation of immune defense and cytokine production is clearly elevated (Figure 1A–C; FDR < 0.01 for all presented gene sets). In addition, GSEA provides evidence that the expression

of membrane adhesion proteins mediating homophilic cell–cell adhesion is significantly reduced due to cytokine stimulation (Figure 1D–E; FDR 0.0 for both presented gene sets).

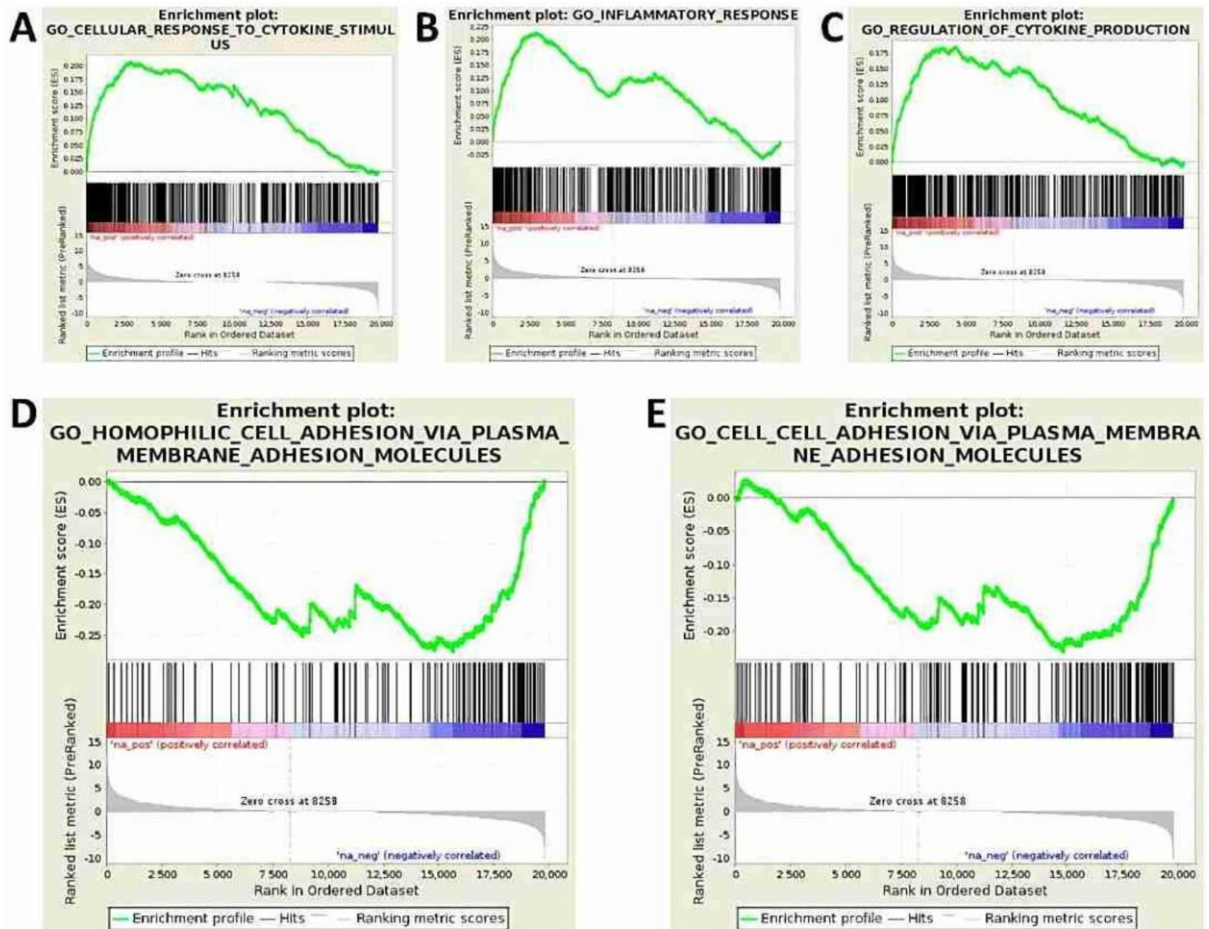


Figure 1. Human endothelial cells (cell line TIME, ATCC® number CRL-4025) were evaluated following stimulation with 5 ng/mL each of IL-1 β , TNF- α , and IFN- γ for 24 h and compared to untreated controls. Three biological replicates were tested in each group. Transcriptome data obtained by next generation sequencing (NGS) were gathered into a gene set enrichment analysis (GSEA). Shown are 5 enrichment plots, which correspond to defined gene sets. (A) GO-Cellular-Response-To-Cytokine-Stimulation, (B) GO-Inflammatory-Response, (C) GO-Regulation-Of-Cytokine-Production, (D) GO-Homophilic-Cell-Adhesion-Via-Plasma-Membrane-Adhesion-Molecules, (E) GO-Cell-Adhesion-Via-Plasma-Membrane-Adhesion-Molecules. Each plot shows the running Enrichment score (ES) for the gene set, which reflects the degree to which a gene set is over-represented at the top or bottom of a ranked list of genes. A positive ES indicates gene set enrichment at the top of the ranked list (=upregulation); a negative ES indicates gene set enrichment at the bottom of the ranked list (=downregulation).

To gain a deeper insight, the integrity of the endothelial single cell layer was monitored utilizing the xCELLigence® RTCA DP instrument. This approach allows for continuous, non-invasive, and label-free detection of cell responses in real-time through measurements of cellular impedance. The change in impedance is reported as a dimensionless parameter called cell index.

$$\text{cell index} = \frac{\text{impedance at time point } n - \text{impedance without cells}}{\text{nominal impedance value}} \quad (1)$$

Under standard cell culture conditions, endothelial cells form close cell–cell contacts, as reflected by a high cell index of 6.1 on average (Figure 2). Cytokine treatment results

in a sustained reduction of cell index (Figure 2; $p < 0.001$). Of note, this weakening of the endothelial barrier is completely reversed following removal of the stimulus through culture medium replacement. Both loss and restoration of the integrity of the endothelial cell layer occurs in less than 4 h after addition or removal of the cytokines (Figure 2). This observation points to the participation of a rapid regulatory mechanism, such as a miRNA-mediated posttranscriptional modulation of adhesion protein expression.

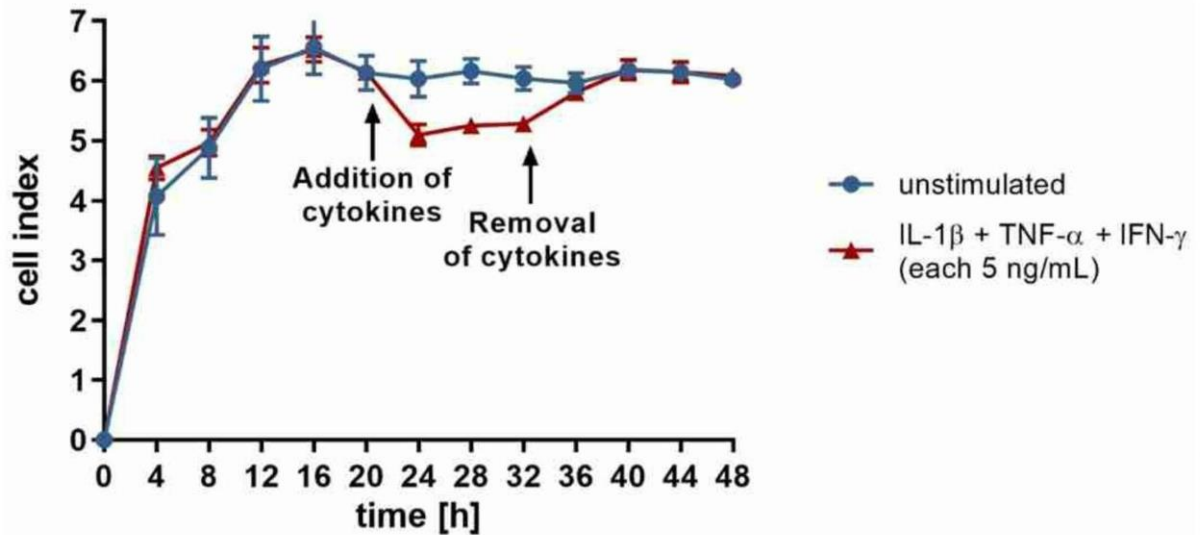


Figure 2. The cellular impedance of human endothelial cells (cell line TIME, ATCC® number CRL-4025) was investigated in real-time using the xCELLigence® RTCA DP instrument (ACEA Bioscience Incorporation). Changes in impedance are reported by the dimensionless parameter “cell index”. The blue and red data points symbolize cells cultured in basal cell culture medium versus medium containing 5 ng/mL each of IL-1 β , TNF- α , and IFN- γ for a defined time, respectively. The arrows indicate the time points of the performed medium changes. Three biological replicates and two technical replicates were tested in each group. Data are shown as means \pm standard deviation.

3.2. Activation of Endothelial Cells by Proinflammatory Cytokines Induces the Upregulation of miR-29a-3p, miR-29b-3p, and miR-155-5p

Multiple studies have investigated transcriptional control responses of endothelial cells under inflammatory conditions, but there is limited information focused on posttranscriptional regulatory events. For assessment of cytokine-mediated changes in endothelial miRNA expression, two screening approaches were performed in parallel to exclude false positive candidates at the earliest possible stage: the ligation-based Illumina next generation sequencing (NGS) and the hybridization-based NanoString technology. The Illumina method utilizes the sequencing-by-synthesis technology, which tracks the addition of labeled nucleotides as the nucleic acid strand is copied. The NanoString method is a variation of the DNA microarray approach, in which color-coded probes and microscopic imaging are used to detect and count formed transcripts. By doing so, seven miRNAs were identified (all upregulated), which (i) were detectable with an abundance >100 reads in both methods and (ii) showed a cytokine-induced altered expression rate >2 -fold: miR-21-5p, miR-29a-3p, miR-29b-3p, miR-146a-5p, miR-155-5p, miR-181b-5p, and miR-221-5p.

Next, screening results obtained with NGS and NanoString were subjected to PCR-based validation. Typically, RealTime PCR is used for this purpose; however, this approach only allows quantification relative to a housekeeping RNA, the expression of which is assumed to be unchanged. More detailed results can be obtained using droplet digital PCR (ddPCR). In this method, each sample is portioned into 20,000 droplets, thereby randomly distributing target and background DNA. Amplification of the target sequence takes place in each droplet by end-point PCR. Subsequently, positive droplets are counted

to provide a precise quantification of the target sequence in the specimen. Thus, ddPCR enables the determination of relative expression changes as well as absolute quantification of miRNA copy number. Another advantage of this strategy is its independence from a reference RNA, which eliminates the risk of normalization-based data bias. Using ddPCR, three of the miRNAs studied were validated. As shown in Figure 3, ddPCR data clearly demonstrate that the expression of miR-29a-3p, miR-29b-3p, and miR-155-5p is subject to regulation by proinflammatory cytokines. Compared to unstimulated controls, cytokine-treated endothelial cells display significantly increased expression of these miRNAs. The copy number is elevated 1.9-fold for miR-29a-3p, 2.5-fold for miR-29b-3p, and 2.1-fold for miR-155-5p. It is also important to emphasize the high miRNA abundance of several thousand copies per ng of RNA (Figure 3), which strongly suggests that the observed increases have functional importance.

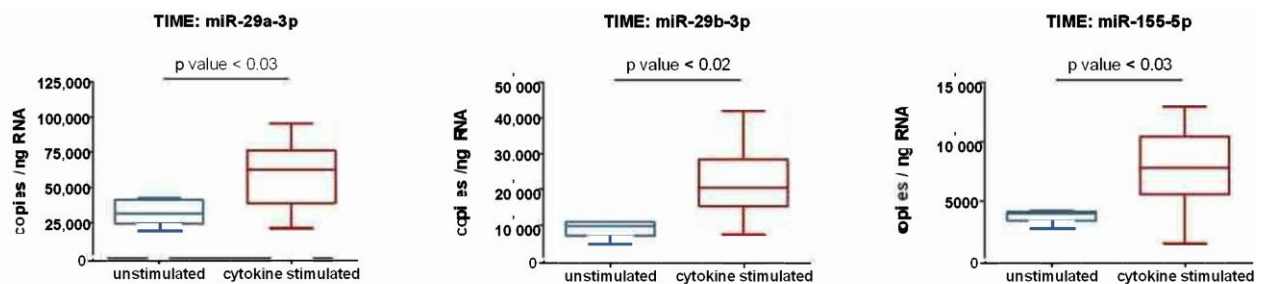


Figure 3. Human endothelial cells (cell line TIME, ATCC® number CRL-4025) were evaluated following stimulation with 5 ng/mL each of IL-1 β , TNF- α , and IFN- γ for 24 h, and compared to unstimulated controls. Absolute quantification of miRNAs from isolated total RNA was performed using ddPCR analysis. The QX 200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad) and specific LNA PCR primers (Qiagen) were used according to the manufacturer’s instructions. Based on the number of measured positive droplets, the system calculates the copy number of the target RNA in the total mixture, assuming a Poisson distribution. Since a defined amount of RNA sample is used in each ddPCR assay, the copy number per ng RNA can be determined. The box plots depict the median of determined miRNA expression levels, the lower and upper quartile, and the two extreme values. Each group included six biological replicates and two technical replicates. An unpaired t-test was used to identify significant differences. Statistical analysis was performed utilizing GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). In all cases, $p < 0.05$ was assumed to indicate significant differences.

3.3. Expression of miR-29a-3p, miR-29b-3p, and miR-155-5p Is Subject to the Influence of Cytokine-Induced Signaling Cascades

miRNA expression is known to be affected by various physiological and pathological stimuli [31]. Endogenous factors, such as cytokines, induce signaling cascades that ultimately lead to the activation of specific transcription factors. These in turn mediate transcriptional regulation of miRNA expression via interaction with distinct transcription factor binding sites of miRNA coding regions of DNA. To visualize the signaling pathways and transcription factors involved in cytokine-mediated upregulation of miR-29a-3p, miR-29b-3p, and miR-155-5p, a search of the GeneCards v5.3 database was performed. The transcription factor binding sites listed in the database were matched with the transcription factors known to be induced by the cytokines IL-1 β , TNF- α , and IFN- γ [32–39]. Table 1 provides an overview of the transcription factors that fulfill these conditional criteria. Not only is the absolute number of hits striking. It also indicates that different signaling pathways mediate the cytokine-induced change in endothelial miRNA expression jointly. Indeed, the simultaneous exposure of cells to IL-1 β , TNF- α , and IFN- γ is known to induce primarily three signaling pathways: NF κ B pathway, MAPK pathway, and JAK-STAT pathway [32–39]. Any of the three miRNAs expressed in an altered manner appears to be susceptible to mediators of each of these signaling pathways. In light of that *in silico* data, it seems reasonable to assume that in an inflammatory milieu there is a synergistic cytokine effect inducing upregulation of miR-29a-3p, miR-29b-3p, and miR-155-5p.

Table 1. Transcriptions factors affecting expression of miR-29a-3p, miR-29b-3p, and miR-155-5p were identified using the database GeneCards v5.3.

Pathway	miR-29a-3p	miR-29b-3p	miR-155-5p
NFκB pathway	RELA, RELB, NFKBIZ	NFKBIZ	RELB
MAPK pathway	JUN, JUNB, JUND, FOS, FOSL2, CEBPA, CEBPB, CEBPG, CREB1, ATF1, ATF2, ATF3, ATF4, BATF	JUND, FOS, FOSL2, CEBPA, CEBPB, CEBPG, ATF3, BATF	JUNB, JUND, CEBPA, CEBPB, ATF2, BATF
JAK-STAT pathway	STAT3, STAT5A, IRF2, IRF4, IRF9	STAT3, IRF9	STAT5A, IRF4

ATF = cAMP depending transcription factor, BATF = Basic leucine zipper ATF-like transcription factor, CEBP = CCAAT enhancer binding protein, CREB1 = cAMP responsive element binding protein 1, IRF = Interferon regulatory factor, JUN/JUNB/JUND/FOS/FOSL2 = AP-1 subunits, NFKBIZ = NFκB inhibitor zeta, RELA = p65, STAT = Signal transducer and activator of transcription

3.4. miR-29a-3p, miR-29b-3p, and miR-155-5p Upregulated by Cytokine Treatment Target Key Mediators of Endothelial Barrier Function

Interaction of miRNAs with (partially) complementary mRNAs typically decreases their stability and/or translational efficiency. Consequently, upregulation of miR-29a-3p, miR-29b-3p, and miR-155-5p is expected to be accompanied by posttranscriptional silencing of the specific target genes. To determine a possible causal link between the cytokine-induced alteration of the cellular miRNA profile and the observed reduction in expression of proteins of homophilic cell–cell adhesion, the corresponding target genes were identified by in silico analysis using the miRWalk2.0 and DIANA-TarBase v8 databases. Of note, numerous members of TJs and AJs are found in the target gene lists of these miRNAs (Table 2). Target genes of all three miRNAs that have already been experimentally validated include central transmembrane proteins, such as F11 receptor (*F11R*) and claudin 1 (*CLDN1*), as well as adhesion proteins, such as β-catenin (*CTNNB1*), p120-catenin (*CTNND1*), and eplin (*LIMA1*).

Table 2. Target genes of miR-29a-3p, miR-29b-3p, and miR-155-5p were identified using the databases miRWalk2.0 and DIANA-TarBase v8.

Target Genes	miR-29a-3p	miR-29b-3p	miR-155-5p
Validated by previous experiments	<i>F11R, CLDN1, CLDN5, CTNNB1, JUP, CTNND1, VCL, TJP1, LIMA1</i>	<i>F11R, CLDN1, CTNNB1, CTNND1, VCL, LIMA1</i>	<i>F11R, CLDN1, CTNNA1, CTNNB1, JUP, CTNND1, TJP1, TJP2, LIMA1</i>
Putative due to sequence analogies	<i>OCN, JAM3, CDH5, CTNNA1, TJP2</i>	<i>OCN, JAM3, CLDN5, CDH5, CTNNA1, JUP, TJP1, TJP2</i>	<i>OCN, JAM2, JAM3, CLDN5, VCL</i>

CDH5 = VE-cadherin, CLDN1 = claudin 1, CLDN 5 = claudin 5, CTNNA1 = α-catenin, CTNNB1 = β-catenin, JUP = γ-catenin, CTNND1 = p120-catenin, F11R = F11 receptor, JAM2 = junctional adhesion molecule-B, JAM3 = junctional adhesion molecule-C, LIMA1 = eplin, OCLN = occluding, TJP1 = zona occludens 1, TJP2 = zona occludens 2, VCL = vinculin.

In a further step of analysis, the entire target gene lists gained from miRWalk2.0 and DIANA-TarBase v8 databases were subject to a GO enrichment analysis by GOrilla. Again, a clear association with cellular adhesion was found for all three miRNAs. This is reflected in the enrichment of the GO term “homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules” (GO:0007156) for miR-29a-3p (FDR 0.0198) and miR-29b-3p (FDR

0.022) as well as of the GO term “regulation of cell–cell adhesion” (GO:0022407) for miR-155-5p (FDR 0.0125). The demonstration of cytokine-induced upregulation of miR-29a-3p, miR-29b-3p, and miR-155-5p, together with the fact, already documented in databases, that key mediators of endothelial cell contacts are targets of these miRNAs, provides a clear indication that the loss of endothelial barrier function in the inflammatory milieu may be due, at least in part, to a cytokine-mediated posttranscriptional mechanism.

4. Discussion

Exposure of endothelial cells to proinflammatory cytokines is associated with fulminant alterations in cell behavior. Previous studies of this working group show that in an inflammatory setting there is a significant increase in the expression of coagulation factors, such as vWF and TF, adhesion molecules, such as ICAM-1 and VCAM-1, cytokines, such as IL-6, IL-8, GM-CSF, and MCP-1 [40] as well as reactive oxygen species [41]. Another important adaptation is the local breaking of endothelial cell–cell contacts. This physiological response, which is also shown in the present study, enables the extravasation of immune cells from the blood into surrounding infected tissue. Systemic or chronic loss of endothelial barrier function, however, is of clinical relevance, for example, in sepsis or in the context of atherosclerosis, and contributes to the deterioration of the disease state [2,5–8]. This underscores the importance of approaches to prevent or treat such maladaptation. The present study focuses on a potentially useful but so far almost unexplored aspect: the posttranscriptional regulation of endothelial adhesion proteins.

Reduction of endothelial barrier integrity following exposure to the proinflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α , and IFN- γ was found to (i) be reversible and (ii) take place within just a few hours. This is suggestive of a posttranscriptional regulatory mechanism. And indeed, notable changes were found in the miRNA profile of endothelial cells after cytokine stimulation. Expression of miR-29a-3p, miR-29b-3p, and miR-155-5p proved to be significantly increased (about a doubling) in cytokine-activated endothelial cells. A notable feature of the present study is that absolute copy number of miRNAs was determined for the first time. The observed relative doubling of expression therefore translates into an absolute increase of approximately 27,500 copies of miR-29a-3p per ng of total RNA, approximately 13,150 copies of miR-29b-3p per ng of total RNA, and approximately 4000 copies of miR-155-5p per ng of total RNA. It is worth noting that these data are corroborated by previous studies. In particular, increased expression has previously been described for miR-155-5p as a consequence of cytokine stimulation of endothelial cells [42,43]. For miR-29b, an upregulation in response to the bacterial stimulus LPS has been reported [44]. Collectively, these observations can be attributed to the signaling cascades induced by inflammatory stimuli, such as cytokines. The performed mapping of cytokine-activated transcription factors with the transcription binding sites of miR-29a-3p, miR-29b-3p, and miR-155-5p yielded numerous matches. Taken together, the data from this and previous studies indicate that stimulation of endothelial cells by cytokines and subsequent activation of transcription factors leads to upregulation of miR-29a-3p, miR-29b-3p, and miR-155-5p, which is likely to be of physiological relevance affecting endothelial cell functionality.

The *in silico* analyses performed provide strong indications that miR-29a-3p, miR-29b-3p, and miR-155-5p are involved in the regulation of endothelial permeability. Not only does GO enrichment analysis point in this direction. Database records demonstrate that all three miRNAs directly target TJ and AJ proteins. The proposed mechanism of post-transcriptional inhibition of endothelial adhesion protein expression provides a plausible explanation for the decrease in mRNAs encoding homophilic cell–cell adhesion proteins detected by GSEA after cytokine treatment of endothelial cells. In light of this data, it seems reasonable to assume that miRNAs are involved in the regulation of endothelial barrier function.

5. Conclusions

Taken together, this study highlights the possibility that miRNAs, namely miR-29a-3p, miR-29b-3p, and miR-155-5p, may be involved in the regulation of endothelial permeability. This observation offers a new insight into the mechanism of inflammation-induced endothelial barrier dysfunction. However, the description of a posttranscriptional mechanism also opens up a number of issues that need to be addressed in subsequent studies. To what extent do miRNAs affect the expression of individual TJ and AJ proteins? Is it possible to preserve these proteins from posttranscriptional expression inhibition and concomitantly to maintain endothelial barrier function via blockade of miR-29a-3p, miR-29b-3p, and miR-155-5p? Is it sufficient to inhibit one of these miRNAs or do all three need to be blocked? And most importantly, what about biological significance? This requires detailed studies *in vivo*. Not until then will we be able to assess whether miR-29a-3p, miR-29b-3p, and miR-155-5p may be suitable as drug targets to treat a dysfunctional endothelial barrier in systemic or chronic inflammation.

Author Contributions: Conceptualization, J.S.; validation, D.M., B.S. and J.S.; formal analysis, D.M., B.S. and J.S.; investigation, D.M. and B.S.; writing—original draft preparation, J.S.; writing—review and editing, D.M. and B.S.; supervision, J.S. project administration, J.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Deep sequencing datasets generated and analyzed in the present study are available in the Gene Expression Omnibus (GEO) repository, accession numbers GSE132361 (miRNA screening) and GSE141957 (transcriptome screening).

Acknowledgments: We are thanking Knut Krohn, Core Unit DNA, Leipzig University for performing the NGS analysis of miRNA. In addition, we are grateful to Markus Glaß, Core Facility Imaging, University Medicine Halle (Saale) for performing the differential expression analysis of polyA-RNA-seq data as well as the gene set enrichment analysis (GSEA). We give thanks to Claudia Rößler for technical support in cell culturing and to Kerstin Körber-Ferl from the Institute of Human Genetics, Martin Luther University Halle-Wittenberg for her assistance in NanoString analysis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Schlegel, N.; Waschke, J. cAMP with other signaling cues converges on Rac1 to stabilize the endothelial barrier—A signaling pathway compromised in inflammation. *Cell Tissue Res.* **2014**, *355*, 587–596. [[CrossRef](#)]
- Radeva, M.Y.; Waschke, J. Mind the gap: Mechanisms regulating the endothelial barrier. *Acta Physiol.* **2018**, *222*, e12860. [[CrossRef](#)]
- Reglero-Real, N.; Colom, B.; Bodkin, J.V.; Nourshargh, S. Endothelial Cell Junctional Adhesion Molecules: Role and Regulation of Expression in Inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2016**, *36*, 2048–2057. [[CrossRef](#)]
- McKenzie, J.A.G.; Ridley, A.J. Roles of Rho/ROCK and MLCK in TNF-alpha-induced changes in endothelial morphology and permeability. *J. Cell. Physiol.* **2007**, *213*, 221–228. [[CrossRef](#)]
- Ait-Oufella, H.; Maury, E.; Lehoux, S.; Guidet, B.; Offenstadt, G. The endothelium: Physiological functions and role in microcirculatory failure during severe sepsis. *Intensive Care Med.* **2010**, *36*, 1286–1298. [[CrossRef](#)]
- Lee, W.L.; Liles, W.C. Endothelial activation, dysfunction and permeability during severe infections. *Curr. Opin. Hematol.* **2011**, *18*, 191–196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Aird, W.C. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood* **2003**, *101*, 3765–3777. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Opal, S.M.; van der Poll, T. Endothelial barrier dysfunction in septic shock. *J. Intern. Med.* **2015**, *277*, 277–293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zhong, L.; Simard, M.J.; Huot, J. Endothelial microRNAs regulating the NF-kappa B pathway and cell adhesion molecules during inflammation. *FASEB J.* **2018**, *32*, 4070–4084. [[CrossRef](#)]
- Weber, M.; Kim, S.; Patterson, N.; Rooney, K.; Searles, C.D. MiRNA-155 targets myosin light chain kinase and modulates actin cytoskeleton organization in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2014**, *306*, H1192–H1203. [[CrossRef](#)]
- Kingsley, S.M.K.; Bhat, B.V. Role of microRNAs in sepsis. *Inflamm. Res.* **2017**, *66*, 553–569. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

12. Pena-Philippides, J.C.; Gardiner, A.S.; Caballero-Garrido, E.; Pan, R.; Zhu, Y.; Roitbak, T. Inhibition of MicroRNA-155 Supports Endothelial Tight Junction Integrity Following Oxygen-Glucose Deprivation. *J. Am. Heart Assoc.* **2018**, *7*, e009244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Urbich, C.; Kuehbacher, A.; Dimmeler, S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc. Res.* **2008**, *79*, 581–588. [[CrossRef](#)]
14. Ma, X.; Ma, C.; Zheng, X. MicroRNA-155 in the Pathogenesis of Atherosclerosis: A Conflicting Role? *Heart Lung Circ.* **2013**, *22*, 811–818. [[CrossRef](#)]
15. Faraoni, I.; Antonetti, F.R.; Cardone, J.; Bonmassar, E. miR-155 gene: A typical multifunctional microRNA. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1792*, 497–505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Zhuang, Y.; Peng, H.; Mastej, V.; Chen, W. MicroRNA Regulation of Endothelial Junction Proteins and Clinical Consequence. *Mediat. Inflamm.* **2016**, *2016*, 5078627. [[CrossRef](#)]
17. Chatterjee, V.; Beard, R.S., Jr.; Reynolds, J.J.; Haines, R.; Guo, M.; Rubin, M.; Guido, J.; Wu, M.H.; Yuan, S.Y. MicroRNA-147b Regulates Vascular Endothelial Barrier Function by Targeting ADAM15 Expression. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e110286. [[CrossRef](#)]
18. Kim, D.; Langmead, B.; Salzberg, S.L. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat. Methods* **2015**, *12*, 357–360. [[CrossRef](#)]
19. Li, H.; Handsaker, B.; Wysoker, A.; Fennell, T.; Ruan, J.; Homer, N.; Marth, G.; Abecasis, G.; Durbin, R.; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 2078–2079. [[CrossRef](#)]
20. Liao, Y.; Smyth, G.K.; Shi, W. featureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 923–930. [[CrossRef](#)]
21. Aken, B.L.; Achuthan, P.; Akanni, W.; Amode, M.R.; Bernsdorff, F.; Bhai, J.; Billis, K.; Carvalho-Silva, D.; Cummins, C.; Clapham, P.; et al. Ensembl 2017. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, D635–D642. [[CrossRef](#)]
22. Robinson, M.D.; McCarthy, D.J.; Smyth, G.K. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 139–140. [[CrossRef](#)]
23. Langmead, B.; Salzberg, S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 357–359. [[CrossRef](#)]
24. Subramanian, A.; Tamayo, P.; Mootha, V.K.; Mukherjee, S.; Ebert, B.L.; Gillette, M.A.; Paulovich, A.; Pomeroy, S.L.; Golub, T.R.; Lander, E.S.; et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 15545–15550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Liberzon, A.; Birger, C.; Thorvaldsdottir, H.; Ghandi, M.; Mesirov, J.P.; Tamayo, P. The Molecular Signatures Database Hallmark Gene Set Collection. *Cell Syst.* **2015**, *1*, 417–425. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Stelzer, G.; Rosen, N.; Plaschkes, I.; Zimmerman, S.; Twik, M.; Fishilevich, S.; Stein, T.I.; Nudel, R.; Lieder, I.; Mazon, Y.; et al. The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Curr. Protoc. Bioinform.* **2016**, *54*, 1.30.1–1.30.33. [[CrossRef](#)]
27. Dweep, H.; Gretz, N. miRWalk2.0: A comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nat. Methods* **2015**, *12*, 697. [[CrossRef](#)]
28. Karagkouni, D.; Paraskevopoulou, M.D.; Chatzopoulos, S.; Vlachos, I.S.; Tastsoglou, S.; Kanellos, I.; Papadimitriou, D.; Kavakiotis, I.; Maniou, S.; Skoufos, G.; et al. DIANA-TarBase v8: A decade-long collection of experimentally supported miRNA-gene interactions. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, D239–D245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Eden, E.; Navon, R.; Steinfeld, I.; Lipson, D.; Yakhini, Z. GOrilla: A tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinform.* **2009**, *10*, 48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Mootha, V.K.; Lindgren, C.M.; Eriksson, K.F.; Subramanian, A.; Sihag, S.; Lehar, J.; Puigserver, P.; Carlsson, E.; Ridderstrale, M.; Laurila, E.; et al. PGC-1 alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat. Genet.* **2003**, *34*, 267–273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Amado, T.; Schmolka, N.; Metwally, H.; Silva-Santos, B.; Gomes, A.Q. Cross-regulation between cytokine and microRNA pathways in T cells. *Eur. J. Immunol.* **2015**, *45*, 1584–1595. [[CrossRef](#)]
32. Holbrook, J.; Lara-Reyna, S.; Jarosz-Griffiths, H.; McDermott, M.F. Tumour necrosis factor signalling in health and disease. *F1000Research* **2019**, *8*, 111. [[CrossRef](#)]
33. Hehlhans, T.; Pfeffer, K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: Players, rules and the games. *Immunology* **2005**, *115*, 1–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Martin, M.U.; Wesche, H. Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* **2002**, *1592*, 265–280. [[CrossRef](#)]
35. Daun, J.M.; Fenton, M.J. Interleukin-1/toll receptor family members: Receptor structure and signal transduction pathways. *J. Interferon Cytokine Res.* **2000**, *20*, 843–855. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Fitzgerald, K.A.; O'Neill, L.A. The role of the interleukin-1/Toll-like receptor superfamily in inflammation and host defence. *Microbes Infect.* **2000**, *2*, 933–943. [[CrossRef](#)]
37. Bhat, M.Y.; Solanki, H.S.; Advani, J.; Khan, A.A.; Prasad, T.S.K.; Gowda, H.; Thiyagarajan, S.; Chatterjee, A. Comprehensive network map of interferon gamma signaling. *J. Cell Commun. Signal.* **2018**, *12*, 745–751. [[CrossRef](#)]
38. Gough, D.J.; Levy, D.E.; Johnstone, R.W.; Clarke, C.J. IFN-gamma signaling-Does it mean JAK-STAT? *Cytokine Growth Factor Rev.* **2008**, *19*, 383–394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Schroder, K.; Hertzog, P.J.; Ravasi, T.; Hume, D.A. Interferon-gamma: An overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* **2004**, *75*, 163–189. [[CrossRef](#)]

40. Trommer, S.; Leimert, A.; Bucher, M.; Schumann, J. Impact of Unsaturated Fatty Acids on Cytokine-Driven Endothelial Cell Dysfunction. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2739. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Trommer, S.; Leimert, A.; Bucher, M.; Schumann, J. Polyunsaturated Fatty Acids Induce ROS Synthesis in Microvascular Endothelial Cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2018**, *1072*, 393–397. [[CrossRef](#)]
42. Duan, Q.; Mao, X.; Xiao, Y.; Liu, Z.; Wang, Y.; Zhou, H.; Zhou, Z.; Cai, J.; Xia, K.; Zhu, Q.; et al. Super enhancers at the miR-146a and miR-155 genes contribute to self-regulation of inflammation. *Biochim. Biophys. Acta-Gene Regul. Mech.* **2016**, *1859*, 564–571. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Yee, D.; Shah, K.M.; Coles, M.C.; Sharp, T.V.; Lagos, D. MicroRNA-155 induction via TNF- and IFN-suppresses expression of programmed death ligand-1 (PD-L1) in human primary cells. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 20683–20693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Yuan, H.; Ma, J.; Li, T.; Han, X. miR-29b aggravates lipopolysaccharide-induced endothelial cells inflammatory damage by regulation of NF-kappa B and JNK signaling pathways. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *99*, 451–461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

6.2 Publikation 2

Polyunsaturated Fatty Acids of Both the Omega-3 and the Omega-6 Family Abrogate the Cytokine-Induced Upregulation of miR-29a-3p by Endothelial Cells

Autoren: Daniel Maucher, Birte Schmidt, Kevin Kuhlmann und Julia Schumann
Journal: Molecules (Impact Factor 2021: 4,927)
DOI: 10.3390/molecules25194466

Zusammenfassung: Die Kontrolle der Proteinexpression ist von grundlegender Bedeutung für zelluläre Prozesse. Hierbei wird die Proteinexpression sowohl auf der transkriptionellen als auch auf der posttranskriptionellen Ebene reguliert. Es ist bekannt, dass PUFA die Gentranskription beeinflussen können. Die vorliegende Studie wurde durchgeführt, um die Frage zu beantworten, ob PUFA auch in der Lage sind, die miRNA-vermittelte posttranskriptionelle Feinabstimmung der mRNA-Kopienzahl zu beeinflussen. Zu diesem Zweck wurden zelluläre miRNA-Profile PUFA-angereicherter und ungesättigter Endothelzellen, die einem entzündlichen Milieu ausgesetzt waren, vergleichend mittels Next-Generation-Sequencing und NanoString-Analyse untersucht. Die Validierung erfolgte mittels digitaler Tröpfchen-PCR, die eine absolute Quantifizierung der RNA-Kopienzahl ermöglichte. Die Analysen zeigten, dass die stimulationsinduzierte Hochregulierung von miR-29a-3p durch die PUFA-Anreicherung der Endothelzellen blockiert wird. Darüber hinaus waren die mRNA-Kopienzahlen der miR-29a-3p-Ziele, namentlich der Gerinnungsfaktoren PAI-1, TF und vWF sowie der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und IL-8, in PUFA-angereicherten Endothelzellen im Vergleich zu ungesättigten Zellen reduziert. Diese Daten deuten auf einen neuen Wirkmechanismus hin, durch den PUFA die Funktionalität von Endothelzellen modulieren und der stimulierenden Wirkung einer entzündlichen Umgebung entgegenwirken. Offenbar werden die entzündungshemmenden Eigenschaften von PUFAs auch auf der posttranskriptionellen Ebene vermittelt.

Beiträge des Autors: Hypothesenentwicklung und Planung der notwendigen Versuche; Extraktion und Aufarbeitung der RNA aus der Endothelzelllinie TIME; Auswertung der generierten NGS- und Nanostring-Daten; Identifizierung und Auswahl vielversprechender miRNA-Kandidaten; Validierung der miRNAs mittels ddPCR; *in silico*-Analyse der miRNAs einschließlich Zuordnung der Signalwege, welche die miRNA-Expression kontrollieren; Beurteilung des PUFA-Effekts

Article

Polyunsaturated Fatty Acids of Both the Omega-3 and the Omega-6 Family Abrogate the Cytokine-Induced Upregulation of miR-29a-3p by Endothelial Cells

Daniel Maucher, Birte Schmidt, Kevin Kuhlmann and Julia Schumann * 

University Clinic and Outpatient Clinic for Anesthesiology and Operative Intensive Care, University Medicine Halle (Saale), 06112 Halle (Saale), Germany; daniel.maucher@uk-halle.de (D.M.); birteschmidt09@gmail.com (B.S.); kuhlmann-kevin@gmx.de (K.K.)

* Correspondence: julia.schumann@uk-halle.de; Tel.: +49-345-5571776; Fax: +49-345-5571781

Received: 26 August 2020; Accepted: 27 September 2020; Published: 29 September 2020



Abstract: Cellular processes fundamentally depend on protein expression control. At this, protein expression is regulated on the transcriptional and the post-transcriptional level. PUFAs are already known to affect gene transcription. The present study was conducted to answer the question whether PUFAs are also able to impact on the miRNA-mediated post-transcriptional fine-tuning of mRNA copy numbers. To this end, cellular miRNA profiles were screened by means of next-generation sequencing and NanoString analysis to compare PUFA-enriched to unsupplemented endothelial cells exposed to an inflammatory milieu. Validation took place by droplet digital PCR, allowing for an absolute quantification of RNA copy numbers. The analyses revealed that the stimulation-induced upregulation of miR-29a-3p is blocked by PUFA enrichment of endothelial cells. What is more, mRNA copy numbers of miR-29a-3p targets, namely the coagulation factors PAI-1, TF, and vWF, as well as the proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, and IL-8, were reduced in PUFA-enriched endothelial cells compared to unsupplemented cells, counteracting the stimulatory effect of an inflammatory environment. These data hint toward a new mechanism of action by which PUFAs modulate the functionality of endothelial cells. Apparently, the inflammation-modulating properties of PUFAs are also mediated at the post-transcriptional level.

Keywords: endothelial dysfunction; miRNA; docosahexaenoic acid; arachidonic acid

1. Introduction

Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are components of the diet that are considered to have a significant impact on human health. Dietary fatty acids pass from the gastrointestinal tract into the bloodstream to be circulated throughout the body. This distribution mechanism implies that cells with constant blood contact, such as the endothelial cells lining the blood vessels, are particularly exposed to the influence of dietary PUFAs.

Endothelial cells play an important role in both acute and chronic inflammatory processes and can be directly activated by proinflammatory cytokines [1,2]. In the activated state, endothelial cells are characterized by the production of reactive oxygen and nitrogen intermediates as well as proinflammatory mediators, such as tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), and the interleukins IL-1 β , IL-6, and IL-8 [1,2]. What is more, coagulation processes are facilitated and leukocyte adhesion and extravasation are promoted [1,2]. Accordingly, endothelial cells are regarded as part of a functional immune defense actively participating in the combat of invading pathogens. In order to achieve a physiologically meaningful reaction, however, the immunological activation of the endothelial cells

must necessarily be temporary and spatially limited. A generalized activation of the endothelium represents a pathophysiological process and is the hallmark of numerous serious diseases, such as atherosclerosis or sepsis [3–7].

Investigations by our working group have already shown that the cytokine-driven activation of endothelial cells is modulated by unsaturated fatty acids [2]. In line with this, PUFAs are already used in clinical practice to accompany the therapy of inflammatory diseases. For example, the parenteral solutions employed in intensive care units for the treatment of sepsis patients are enriched with PUFAs.

PUFAs are known to act through a variety of mechanisms. They serve as precursors for the inflammation-mediating eicosanoids and resolvins, represent direct ligands of receptors associated to the immune response, and are known to be incorporated into plasma membrane phospholipids, thus modulating cellular signaling events [8]. According to the hitherto-described mechanisms of action, PUFAs thus either act by direct conversion into inflammatory mediators or by influencing the transcription rate of certain genes.

In fact, cellular processes fundamentally depend on gene expression control. However, not only the mRNA synthesis rate but also the mRNA stability and mRNA degradation rate affect the efficiency of protein biosynthesis. This post-transcriptional regulation is mediated by non-coding RNAs, such as microRNAs (miRNAs) [9]. miRNAs were first discovered in *Caenorhabditis elegans* in 1993, but their function remained neglected until 2001 [10]. The short and single-stranded RNAs are described to be expressed in a cell- and tissue-specific manner [11], thereby influencing the translation of their target mRNA(s) [12]. The miRNA-based post-transcriptional regulation is somewhat complex. On the one hand, a specific mRNA can be the target of various miRNAs [13,14]. On the other hand, one miRNA can recognize and influence different mRNAs [13,14].

So far, numerous miRNAs have been identified that influence the immune system's defense mechanisms [15]. The importance of miRNAs in infectious processes is also reflected in the fact that changes in the miRNA profiles of immune cells have been detected in sepsis patients [15–17]. Remarkably, miRNAs have been shown to affect endothelial function and the vascular barrier [16,18–20]. The cytokine-mediated activation of endothelial cells is based on the initiation of signaling cascades whose mediators are known to be influenced by miRNAs [16,17,21–23]. Numerous studies also prove the modulating effect of miRNAs on the expression of the adhesion molecules e-selectin, ICAM-1, and VCAM-1, which are essential for the extravasation of leukocytes [17,18,21,22].

Feeding studies in rats have shown that the miRNA profile of different tissues and cell types, such as colon mucosa, pituicytes, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), adipocytes, and hepatocytes, differs depending on the PUFA content of the diet [24,25]. It is therefore reasonable to assume that PUFA supplementation also acts on the miRNA expression of endothelial cells. However, a scientific verification of this hypothesis has not yet been conducted, despite its potential medical importance.

Here, we present evidence that the miRNA expression profile of endothelial cells can be modulated by PUFAs. Both the omega-3 PUFA docosahexaenoic acid (DHA; C22:6n3) and the omega-6 PUFA arachidonic acid (AA; C20:4n6) were found to negatively affect the expression of the miRNA miR-29a-3p in an inflammatory setting. Remarkably, the target genes of miR-29a-3p include coagulation factors and cytokines, which play a crucial role in endothelial inflammatory processes. Indeed, PUFA enrichment of endothelial cells not only suppresses the cytokine-induced upregulation of miR-29a-3p but also counteracts the cytokines' effect on the expression of those target genes. Our data therefore provide proof of a new mechanism of action by which PUFAs modulate the functionality of endothelial cells.

2. Results

2.1. Cytokine Treatment of Endothelial Cells Results in Distinct Alterations of the miRNA Profile

Two independent screening methods (next-generation sequencing and NanoString) were used to compare the miRNA profiles of unstimulated and cytokine-stimulated endothelial cells. In total, 14 miRNAs were identified, which were consistently indicated as altered expressed in both methods:

miR-21-5p, miR-23b-3p, miR-26b-5p, miR-29a-3p, miR-29b-3p, miR-30d-5p, miR-30e-5p, miR-106b-5p, miR-146a-5p, miR-155-5p, miR-181a-5p, miR-181b-5p, miR-221-5p, and miR-342-3p.

To validate the cytokine-induced expression changes predicted by screening, absolute quantification using ddPCR was performed. The screening prognosis was confirmed for a total of five miRNAs. A significant reduction of expression in cytokine-treated endothelial cells was observed for the miRNAs miR-23b-3p and miR-30d-5p. For both miRNAs, the expression rate was decreased by a factor of 0.6 compared to unstimulated endothelial cells as a result of cytokine treatment (Figure 1). In addition, a cytokine-induced significant increase in expression was seen for the miRNAs miR-29a-3p, miR-29b-3p, and miR-155-5p. In cytokine-stimulated endothelial cells, the expression of miR-29a-3p was upregulated 1.9-fold, of miR-29b-3p 2.5-fold, and of miR-155-5p 2.1-fold (Figure 1).

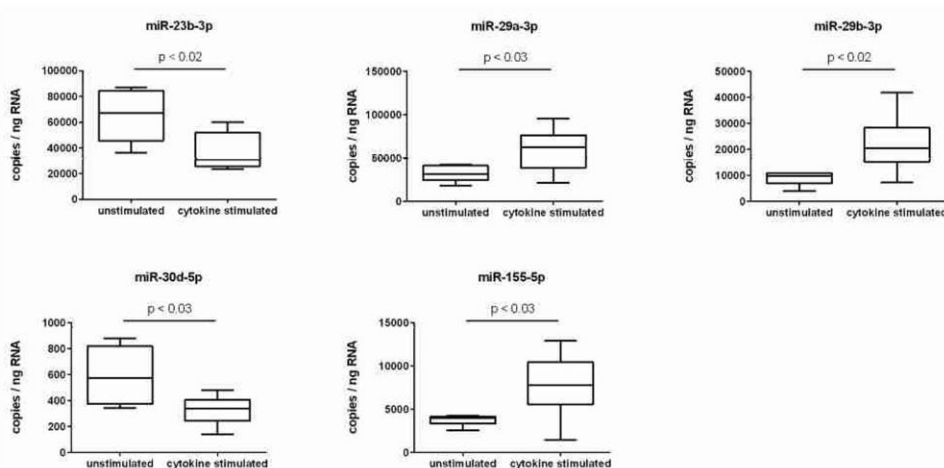


Figure 1. miRNA expression changes due to cytokine stimulation of endothelial cells.

Absolute quantification of miRNA expression was performed by ddPCR analysis using specific miRCURY LNA miRNA PCR assay primers ($N = 6$, $n = 2$). The endothelial cell line TIME was investigated after stimulation for 24 h with a cytokine mix consisting of IL-1 β , TNF- α , and IFN- γ (each in a concentration of 5 ng/mL) in comparison to the unstimulated control. miRNA expression was measured as RNA molecules per ng of isolated total RNA. The displayed boxplots indicate the median of the determined miRNA expression values, the lower and upper quantiles, and the two extreme values.

2.2. PUFA-Enriched Endothelial Cells Show No Upregulation of miR-29a-3p after Cytokine Stimulation

Next, a potential interference of PUFAs with the observed cytokine-induced changes in miRNA expression of endothelial cells was investigated. Indeed, a clear PUFA effect was found for the miRNA miR-29a-3p. The enrichment of the endothelial cells with the omega-3 fatty acid DHA or the omega-6 fatty acid AA caused an almost complete suppression of the cytokine-mediated upregulation of miR-29a-3p. That is, in PUFA-enriched cells, the expression level of miR-29a-3p was constant regardless of the presence or absence of the proinflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α , and IFN- γ (Figure 2). It is remarkable that PUFA supplementation itself did not have an effect on miRNA expression. The expression range of miR-29a-3p was comparable between unsupplemented and PUFA-enriched endothelial cells under control conditions. A PUFA effect only became apparent in a proinflammatory milieu (Figure 2).

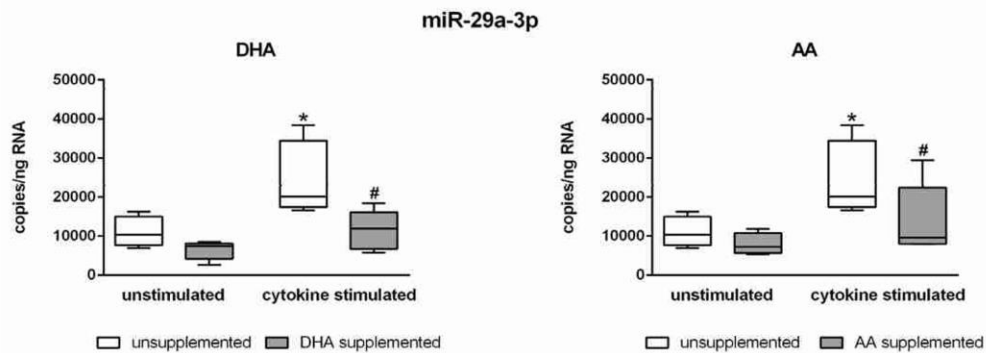


Figure 2. Abrogation of the cytokine effect on the expression of miR-29a-3p by DHA and AA.

Absolute quantification of miRNA expression was performed by ddPCR analysis ($n = 5$, $n = 3$). The endothelial cell line TIME was investigated after supplementation with either docosahexaenoic acid (DHA) or arachidonic acid (AA) for 144 h. Stimulation of cells was performed in the last 24 h of fatty acid supplementation by means of a cytokine mix consisting of IL-1 β , TNF- α , and IFN- γ (each in a concentration of 5 ng/mL). Unsupplemented and/or unstimulated cells served as a control. miRNA expression was measured as RNA molecules per ng of isolated total RNA. The displayed boxplots indicate the median of the determined miRNA expression values, the lower and upper quantiles, and the two extreme values. * indicates significant differences between unsupplemented/unstimulated and unsupplemented/cytokine-stimulated endothelial cells. # indicates significant differences between unsupplemented/cytokine-stimulated and supplemented/cytokine-stimulated endothelial cells.

2.3. Central Mediators of Endothelial Dysfunction are Targeted by miR-29a-3p

Using the *in silico* database miRWalk2.0, the target genes of miR-29a-3p were identified. The analysis showed that central mediators of endothelial dysfunction are among the predicted target genes. On the one hand, the group of coagulation factors came into focus. Putative target genes of miR-29a-3p from this group are SERPINE1 (encoding the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), an inhibitor of fibrinolysis), F3 (encoding the tissue factor (TF), a member of the coagulation cascade), and VWF (encoding the von Willebrand factor (vWF), an initiator of platelet adhesion). On the other hand, the group of cytokines was spotlighted. Predicted target genes of miR-29a-3p from this group are IL1b (encoding the proinflammatory interleukin 1 β (IL-1 β)), IL6 (encoding the proinflammatory interleukin 6 (IL-6)), and CXCL8 (encoding the chemotactic interleukin 8 (IL-8)).

2.4. Target Genes of miR-29a-3p Are Subject to the Modulating Effect of PUFAs

An inflammatory milieu distinctly affects the gene expression of endothelial cells. This also applies to the identified target genes of miR-29a-3p. Stimulated endothelial cells showed markedly increased mRNA expression levels of PAI-1, TF, IL-1 β , IL-6, and IL-8 and a significantly decreased mRNA expression level of vWF (Figure 3). Enrichment of endothelial cells with PUFAs revealed a changed scenario, whereby PUFA effects were observed for all investigated target genes of miR-29a-3p. The stimulation-induced upregulation of mRNA copy numbers of PAI-1, TF, IL-1 β , IL-6, and IL-8 was evidently diminished in fatty acid-supplemented cells (Figure 3). Additionally, the stimulation-induced downregulation of mRNA copy numbers of vWF was found by the trend to be further enhanced in PUFA-enriched endothelial cells (Figure 3). PUFA enrichment of endothelial cells thus affects both the expression of the miR-29a-3p itself and the expression of the target genes of this miRNA. This suggests a causal link. The data indicate that PUFAs influence the copy number of a specific mRNA available for protein synthesis by influencing endothelial miRNA expression.

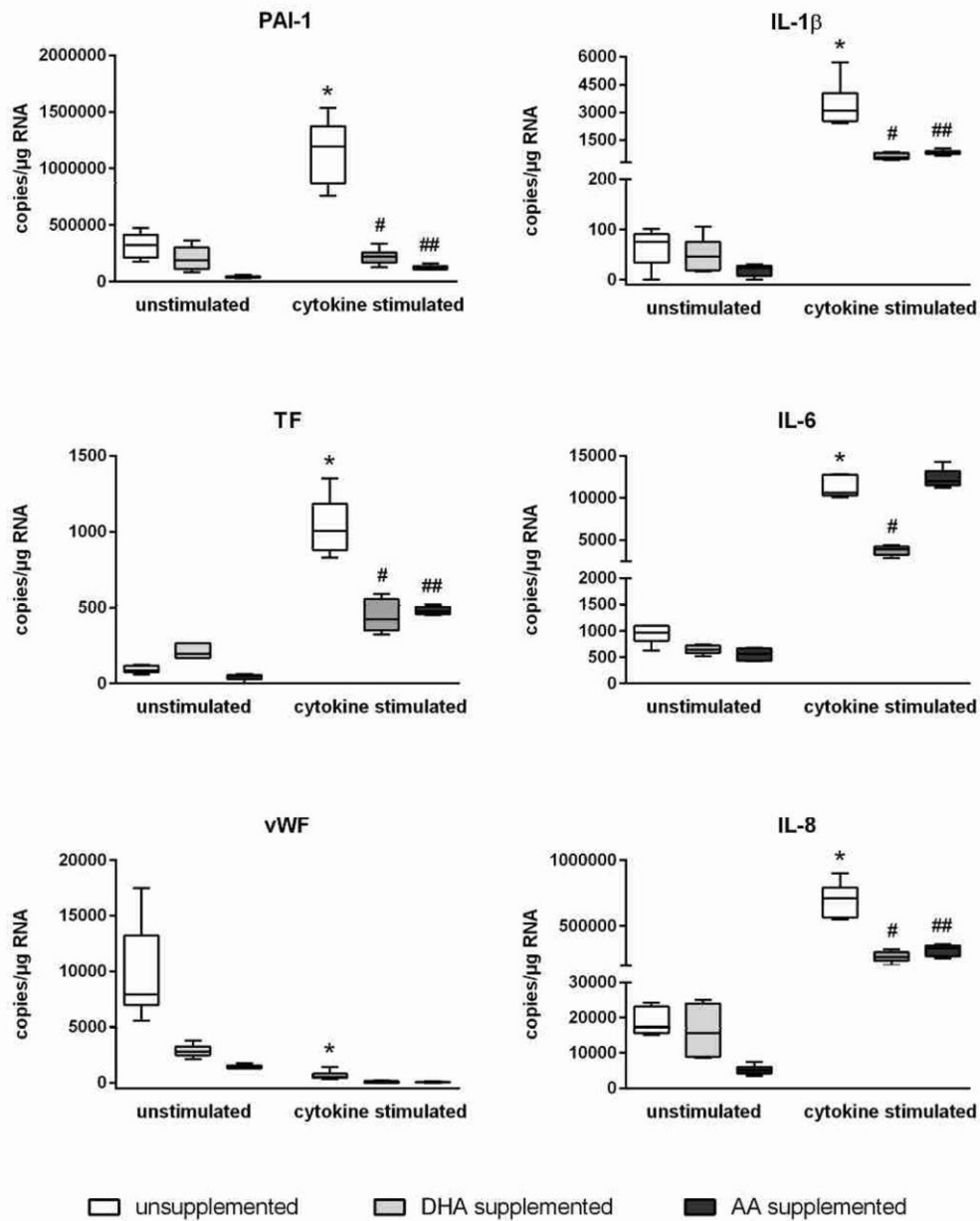


Figure 3. Abrogation of the cytokine effect on the expression of PAI-1, TF, vWF, IL-1 β , IL-6, and IL-8 by DHA and AA.

Absolute quantification of mRNA expression was performed by ddPCR analysis ($n = 6$, $n = 2$). The endothelial cell line TIME was investigated after supplementation with either docosahexaenoic acid (DHA) or arachidonic acid (AA) for 144 h. Stimulation of cells was performed in the last 24 h of fatty acid supplementation by means of a cytokine mix consisting of IL-1 β , TNF- α , and IFN- γ (each in a concentration of 5 ng/mL). Unsupplemented and/or unstimulated cells served as a control. mRNA expression was measured as RNA molecules per μg of isolated total RNA. The displayed boxplots indicate the median of the determined mRNA expression values, the lower and upper quantiles, and the two extreme values. * indicates significant differences between unsupplemented/unstimulated and unsupplemented/cytokine-stimulated

endothelial cells. # indicates significant differences between unsupplemented/cytokine-stimulated and DHA-supplemented/cytokine-stimulated endothelial cells. ## indicates significant differences between unsupplemented/cytokine-stimulated and AA-supplemented/cytokine-stimulated endothelial cells.

3. Discussion

The inflammation-modulating properties of PUFAs have long been the subject of research. It is known that PUFAs achieve their effects through a number of different mechanisms. PUFAs act as direct ligands of the receptors peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) and the G-protein coupled receptor 120 (GPR120), thus triggering predominantly anti-inflammatory signaling cascades [8]. Furthermore, fatty acids are essential components of phospholipids and thus of the cellular plasma membrane. When available, unsaturated fatty acids are incorporated into the membrane, which changes the chemical and physical properties of the membrane domains [8,26,27]. This also affects the protein–protein interactions of membrane receptors. Previous research of our working group has shown that the lipopolysaccharide (LPS)-induced interaction of the toll-like receptor 4 (TLR4) with its co-receptor CD14 is disrupted upon membrane enrichment with PUFAs, resulting in an inhibition of the signaling cascade [28] and a blockade of the LPS-mediated activation of the transcription factor nuclear factor kappa B (NF κ B), which is central to inflammatory processes [29]. Furthermore, PUFAs are the precursors of a number of inflammatory mediators. On the one hand, the group of eicosanoids needs to be pointed out. Eicosanoids mediate proinflammatory effects, whereby the effectiveness of omega-6 derivatives proves to be more potent than that of omega-3 derivatives [8]. On the other hand, resolvins, which perform important tasks in inflammation resolution, are also derived from PUFAs [8].

In the present study, DHA and AA, two central representatives of omega-3 and omega-6 fatty acids, were specifically selected to investigate a possible effect of PUFAs of both subclasses on the post-transcriptional regulation of gene expression. This was done against the background of an ongoing discussion of the role of omega-3 and omega-6 fatty acids in inflammatory processes. It is generally assumed that PUFAs of the omega-3 family, such as DHA or eicosapentaenoic acid (EPA; C20:5n3), are of crucial importance for inflammatory resolution [8]. However, the impact of omega-6 fatty acids appears less clear. On the one hand, AA serves as a precursor of potent prostanoids that promote inflammation [30]. Accordingly, many nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID), such as acetylsalicylic acid, act as enzyme inhibitors that prevent the synthesis of AA-derived prostanoids. On the other hand, some AA-derived resolvins promote the resolution of an inflammatory process [30]. Consequently, both proinflammatory and anti-inflammatory effects have been observed in the supplementation of healthy adults with AA [30]. A previous study of the working group on endothelial cells, which used identical cultivation, supplementation, and stimulation conditions as the present work, can serve as an example. Here, an inhibitory effect of AA on the cytokine-induced upregulation of the adhesion molecule VCAM-1 was found, an effect that had previously only been described for DHA and EPA [2]. Additionally, the effects of DHA and AA described in the present study also point consistently in the anti-inflammatory direction for both fatty acid families.

The description of miRNAs opens up the possibility of a further mechanism of action of PUFAs. miRNAs are of crucial importance for the stability of cellular mRNAs. In the presence of at least partial complementarity, miRNAs and mRNAs interact with each other, modulating the rate of mRNA degradation. Both inhibitory and promoting effects are described [31–33]. It is clear that the type and quantity of miRNAs present in a cell affect the number of mRNA copies available for translation. Thus, by modulating miRNA expression, it is possible to influence protein expression and consequently the biological functionality of a cell.

It is known that the presence of an inflammatory milieu impacts on the miRNA profile of a cell [34]. This was also confirmed in our study. The stimulation of endothelial cells with the cytokines IL-1 β , TNF- α , and IFN- γ was accompanied by a downregulation of the miRNAs miR-23b-3p and miR-30d-5p and an upregulation of the miRNAs miR-29a-3p, miR-29b-3p, and miR-155-5p. We were now interested in how PUFA enrichment of endothelial cells affects the process of miRNA expression. Indeed, we found

that the stimulation-induced upregulation of miR-29a-3p in PUFA-enriched endothelial cells was completely blocked.

Cytokine stimulation of cells induces signaling cascades that ultimately culminate in the activation of transcription factors. Considering the cytokine mix of IL-1 β , TNF- α , and IFN- γ used in our experiments, among others, an upregulation of the transcription factors CCAAT/enhancer-binding protein α and β (C/EBP α , C/EBP β), NF κ B subunit p65, activator protein 1 (AP-1), and signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) can be assumed (KEGG Pathway Database; [35]). Each of these transcription factors is capable of influencing the expression of miR-29a-3p, since specific binding sites have been shown to be part of the promoter and enhancer elements of the gene coding for miR-29a-3p (GeneCards; [36]). At this point, it is important to realize that not only cytokines but also PUFAs interfere with the expression and activation of the stated transcription factors. Feeding studies in rats demonstrate an inhibitory effect of PUFA-enriched nutrition on the expression of C/EBP α [37]. In core extracts of primary vascular smooth muscle cells, reduced protein levels of C/EBP β were detected after omega-3-PUFA supplementation, which correlated with a reduction of IL-1 β -induced C/EBP binding activity in an electrophoretic mobility shift assay (EMSA) [38]. Similar effects were also found for p65 [38]. This corresponds to previous data from our group that show PUFA-mediated inhibition of NF κ B activity utilizing a luciferase reporter gene assay [29]. In addition, an inhibitory effect on AP-1 activity was found for DHA, which was due to a suppression of stimulation-induced DNA binding by AP-1 [39]. There are also reports of blocking the IFN- γ -mediated phosphorylation of STAT1 by PUFA of both the omega-3 and omega-6 family (DHA, EPA, AA) [40,41]. In summary, a conclusive mechanistic approach is the result. Our data together with the findings from the scientific literature suggest that the observed inhibitory effect of PUFAs on the expression of miR-29a-3p is due to the interference of PUFA with the transcription factors C/EBP, p65, AP-1, and STAT1.

The analysis of the target genes of miR-29a-3p revealed that essential mediators of an endothelial inflammatory response, namely the coagulation factors PAI-1, TF, and vWF, as well as the cytokines IL-1 β , IL-6, and IL-8, may be subject to the influence of miR-29a-3p. Therefore, it is reasonable to assume that PUFAs, by inhibiting the stimulation-mediated upregulation of miR-29a-3p, make an impact on the post-transcriptional regulation of these central inflammation-associated factors. In fact, under inflammatory conditions, the detectable mRNA copy numbers of PAI-1, TF, vWF, IL-1 β , IL-6, and IL-8 in PUFA-supplemented cells were significantly altered compared to unsupplemented cells. In each case, there was a reduction in mRNA copies, which in the example of PAI-1 completely cancelled out the stimulation effect.

Our study thus provides first indications of a new mechanism of action of PUFAs. We were able to show that the enrichment of endothelial cells with PUFAs inhibits the upregulation of a specific miRNA in the inflammatory milieu, which had a direct effect on the copy numbers of the target mRNAs of this miRNA available for translation. This is the first evidence that the inflammation-modulating properties of PUFAs are also mediated post-transcriptionally. The elegance of the mechanism as well as the universality of miRNA-mediated modulation of protein expression suggests that the described principle is transferable to other inflammation-associated cell types. The proposed mechanism of action is therefore not only important for the understanding of the PUFA-mediated modulation of endothelial dysfunction but also for the overall understanding of the immunomodulatory effects of PUFAs.

4. Materials and Methods

4.1. Culturing and Stimulation of Cells

The human cell line TIME (ATCC[®] number CRL-4025) was used as a model of microvascular endothelial cells. Culturing of TIME was performed at 37 °C and 5% CO₂ in a humidified atmosphere using basal microvascular endothelial growth medium (Provitro, Berlin, Germany) containing 5 ng/mL VEGF, 5 ng/mL EGF, 5 ng/mL FGF, 15 ng/mL IGF-1, 10 mM L-glutamine, 0.75 U/mL heparin sulfate, 1 μ g/mL hydrocortisone hemisuccinate, 50 μ g/mL ascorbic acid, 5% *v/v* FCS, and 12.5 μ g/mL blasticidin.

PUFA supplementation was carried out for 144 h. This period of supplementation was previously proven to result in a membrane fatty acid steady state [2]. The PUFAs docosahexaenoic acid (DHA; C22:6n3) or arachidonic acid (AA, C20:4n6) (both Biotrend, Köln, Germany) were included in the culture medium at a final concentration of 15 $\mu\text{mol/L}$ using ethanol as a vehicle (0.1% *v/v* final ethanol concentration). Stimulation of cells was performed in the last 24 h of fatty acid supplementation by addition of the cytokines IL-1 β , TNF- α , and IFN- γ (all PeproTech, Hamburg, Germany), each in a concentration of 5 ng/mL.

4.2. RNA Isolation

Total RNA extraction was performed using a standard extraction protocol based on TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany) according to the manufacturer's instructions. The concentration and quality of RNA gained were analyzed by means of the NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany) as well as the Agilent Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). An absorbance quotient A260/280 > 1.8 was considered appropriate for following procedures.

4.3. miRNA Expression Screening

Screening for differentially expressed miRNAs was performed by means of two independent procedures: Next-generation sequencing (NGS) and the NanoString technique. Three biological replicates were analyzed in every test group. miRNAs, which were detected with a high abundance (≥ 100 reads) in both methods, were examined for cytokine-induced expression changes. Only those miRNAs were considered that were consistently indicated as having changed expression in both methods and that had a high effect strength (Cohen's $d \geq 0.8/\leq -0.8$). The deep sequencing datasets generated and analyzed during the current study are available in the Gene Expression Omnibus (GEO) repository, accession number GSE132361.

NGS analysis was carried out in the Core Unit DNA, Leipzig University by means of an Illumina HiScanSQ (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). Samples were processed using the TruSeq Small RNA Prep kit v2 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) following the manufacturer's standard protocol. Size restriction (140–165 bp), purification, and quantification of barcoded libraries were performed using the Library quantification kit-Illumina/Universal (KAPA Biosystems, Woburn, MA, USA). For cluster generation, up to 10 libraries per lane were factored using an Illumina cBot. Then, 50 bp sequencing was performed using an Illumina HighScanSQ sequencer based on version 3 chemistry and flowcell following the manufacturer's standard protocol. For deep sequencing data analysis, the adapter sequences were removed from raw sequences by means of Cutadapt software. Only 15–27-base-long sequences were analyzed. These reads were aligned to the human genome as well as mature sequences of miRBase v21 using the bowtie aligner. For data compression to bam format, Samtools were used. Mapped reads count was determined using the R/Bioconductor programming environment by application of the ShortRead library. An error ratio of 1 nt per mature miRNA sequence was accepted. Normalization of data was performed by independent application of the RPM and the TMM algorithm.

NanoString analysis was carried out at the Institute of Human Genetics, Martin Luther University Halle-Wittenberg by means of the nCounter FLEX Analysis System (NanoString Technologies, Hamburg, Germany) using the nCounter human v3 miRNA Expression Assay according to the manufacturer's instructions. Normalization of the generated data was performed using the nSolverTM Version 3.0 software. First, the background noise was subtracted with the help of the miRNA assay negative controls. This was followed by a technical normalization using the miRNA assay positive controls. Finally, to compensate for potential differences in the amount of total RNA used between the samples, a biological normalization was performed based on the comparison of the 100 most strongly expressed miRNAs and the so-called positive ligation controls.

4.4. cDNA Synthesis

For miRNA analysis, complementary DNA (cDNA) was synthesized from all RNA samples by means of the miRCURY LNA RT Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to standard protocol. As a positive control, the spike-in RNA UniSp6 was added to the samples before synthesis.

For mRNA analysis, cDNA was synthesized from all RNA samples by means of the qScript cDNA SuperMix (Quantabio, Beverly, MA, USA) according to standard protocol. As a positive control, cDNA was also synthesized from human heart aorta total RNA (Takara Bio Europe SAS, Saint-Germain-en-Laye, France).

4.5. Droplet Digital PCR (ddPCR)

miRNA and mRNA copy counts were determined by means of the housekeeper-independent Droplet Digital PCR technology (BioRad, Munich, Germany) following the manufacturer's standard protocols and using ddPCR EvaGreen Supermix (Bio-Rad, Munich, Germany). For miRNA analysis, appropriate miRCURY LNA miRNA PCR assay primers (QIAGEN, Hilden, Germany) were applied. These primers are designed to be used consistently with a given amplification protocol (40 cycles: 30 s at 95 °C, 60 s at 58 °C, ramp rate 1.6 °C per second). For mRNA analysis, primers were purchased from Eurofins Genomics Germany (Ebersberg, Germany) and used according to the specified amplification conditions listed in Table 1. The ddPCR reaction was performed in a T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, Munich, Germany). Measurement of positive droplets per μL of sample was performed on a QX200 ddPCR Droplet Reader (Bio-Rad, Munich, Germany). Based on the droplet count and according to Poisson distribution, the absolute nucleic acid copy count was calculated. Data output was converted into nucleic acid copy count per ng of RNA. ddPCR reaction was performed in duplicates to triplicates of five to six biological replicates in every test group.

Table 1. Target, primer sequence, annealing temperature (X), and elongation time (Y) used for mRNA analysis. Cycling conditions were as follows: initial denaturation for 3 min at 95 °C, followed by 44 cycles of 10 s denaturation at 95 °C, 10 s annealing at X °C, and extension at 72 °C for Y second. Abbreviation: IL-1 β = interleukin-1beta, IL-6 = interleukin-6, IL-8 = interleukin-8, PAI-1 = plasminogen activator inhibitor-1, TF = tissue factor, vWF = von Willebrand factor.

Target	Primer Sequence (5'→3')	Annealing Temperature [°C]	Extension Time [s]
IL-1 β	ACGCTCCGGGACTCACAGCA TGAGGCCCAAGGCCACAGGT	66	20
IL-6	AAGCCAGAGCTGTGCAGATG CTGGCATTGTGGTTGGGTC	56	10
IL-8	CCTGATTTCTGCAGCTCTGTG CCAGACAGAGCTCTCTCCAT	56	20
PAI-1	CAGACCAAGAGCCTCTCC ATCACTTGGCCCATGAAAAG	54	20
TF	CACAGAGTGTGACCTCACCG ATTGTTGGCTGTCCGAGGTT	60	20
vWF	GGCAATTCCTTCTCCACAAAC CAGTTGACCCGATGACTCTTCA	61	20

4.6. In Silico Analysis

The miRWalk2.0 database (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/index.html>) was used to identify the target genes of differentially expressed miRNAs. Validated target genes as well as target genes predicted on the basis of sequence analogies were determined. The predictions of all databases available at miRWalk2.0 were taken into account. Based on the databases miRWalk2.0 and miRBase (<http://www.mirbase.org/>), miRNA-specific information regarding gene family, transcription, genloki, and presence in gene clusters were also investigated.

4.7. Statistical Analysis

If not stated otherwise, data are shown as median \pm interquartile range (IQR). To identify significant differences, an unpaired *t* test was used in two group comparisons and a single factor analysis of variance (ANOVA) with post-hoc test according to Bonferroni–Šídák was used in multiple group comparisons. The statistical analysis was carried out by means of the GraphPad Prism 6 software (GaphPad Software, La Jolla, CA, USA). A *p* value < 0.05 was assumed as an indicator of significant differences.

Author Contributions: Conceptualization, J.S.; investigation, D.M., B.S., K.K.; formal analysis, D.M., B.S., K.K.; writing—original draft preparation, J.S.; writing—review and editing, D.M., B.S., K.K.; project administration, J.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: We are grateful to Claudia Rößler for technical support in cell culturing and to Kerstin Körber-Ferl from the Institute of Human Genetics, Martin Luther University Halle-Wittenberg for her assistance in NanoString analysis. In addition, we thank PD Dr. Knut Krohn, Core Unit DNA, Leipzig University for performing the NGS analysis of miRNAs. We acknowledge the financial support within the funding program Open Access Publishing by the German Research Foundation (DFG).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Pober, J.S.; Sessa, W.C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7*, 803–815. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Trommer, S.; Leimert, A.; Bucher, M.; Schumann, J. Impact of Unsaturated Fatty Acids on Cytokine-Driven Endothelial Cell Dysfunction. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2739. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Aird, W.C. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood* **2003**, *101*, 3765–3777. [[CrossRef](#)]
- Kaperonis, E.A.; Liapis, C.D.; Kakisis, J.D.; Dimitroulis, D.; Papavassiliou, V.G. Inflammation and atherosclerosis. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **2006**, *31*, 386–393. [[CrossRef](#)]
- Lee, W.L.; Liles, W.C. Endothelial activation, dysfunction and permeability during severe infections. *Curr. Opin. Hematol.* **2011**, *18*, 191–196. [[CrossRef](#)]
- Noll, G. Pathogenesis of atherosclerosis: A possible relation to infection. *Atherosclerosis* **1998**, *140*, S3–S9. [[CrossRef](#)]
- Peters, K.; Unger, R.E.; Brunner, J.; Kirkpatrick, C.J. Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis. *Cardiovasc. Res.* **2003**, *60*, 49–57. [[CrossRef](#)]
- Calder, P.C. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim. et Biophys. Acta (BBA)-Mol. Cell Boil. Lipids* **2015**, *1851*, 469–484. [[CrossRef](#)]
- Djebali, S.; Davis, C.A.; Merkel, A.; Dobin, A.; Lassmann, T.; Mortazavi, A.; Tanzer, A.; Lagarde, J.; Lin, W.; Schlesinger, F.; et al. Landscape of transcription in human cells. *Nature* **2012**, *489*, 101–108. [[CrossRef](#)]
- Lau, N.C.; Lim, L.P.; Weinstein, E.G.; Bartel, D.P. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **2001**, *294*, 858–862. [[CrossRef](#)]
- Macfarlane, L.-A.; Murphy, P.R. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr. Genom.* **2010**, *11*, 537–561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Carroll, A.P.; Goodall, G.J.; Liu, B. Understanding principles of miRNA target recognition and function through integrated biological and bioinformatics approaches. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2014**, *5*, 361–379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Friedman, R.C.; Farh, K.K.-H.; Burge, C.B.; Bartel, B. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* **2008**, *19*, 92–105. [[CrossRef](#)]
- Liu, B.; Li, J.; Cairns, M.J. Identifying miRNAs, targets and functions. *Briefings Bioinform.* **2012**, *15*, 1–19. [[CrossRef](#)]
- Essandoh, K.; Fan, G.-C. Role of extracellular and intracellular microRNAs in sepsis. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Mol. Basis Dis.* **2014**, *1842*, 2155–2162. [[CrossRef](#)]

16. Goodwin, A.J.; Guo, C.; Cook, J.A.; Wolf, B.; Halushka, P.V.; Fan, H. Plasma levels of microRNA are altered with the development of shock in human sepsis: An observational study. *Crit. Care* **2015**, *19*, 440. [[CrossRef](#)]
17. Kingsley, S.M.K.; Bhat, V. Role of microRNAs in sepsis. *Inflamm. Res.* **2017**, *66*, 553–569. [[CrossRef](#)]
18. Hawiger, J.; Veach, R.A.; Zienkiewicz, J. New paradigms in sepsis: From prevention to protection of failing microcirculation. *J. Thromb. Haemost.* **2015**, *13*, 1743–1756. [[CrossRef](#)]
19. Zhuang, Y.; Peng, H.; Mastej, V.; Chen, W. MicroRNA Regulation of Endothelial Junction Proteins and Clinical Consequence. *Mediat. Inflamm.* **2016**, *2016*, 1–6. [[CrossRef](#)]
20. Pena-Philippides, J.C.; Gardiner, A.S.; Caballero-Garrido, E.; Pan, R.; Zhu, Y.; Roitbak, T. Inhibition of MicroRNA-155 Supports Endothelial Tight Junction Integrity Following Oxygen-Glucose Deprivation. *J. Am. Hear. Assoc.* **2018**, *7*, e009244. [[CrossRef](#)]
21. Zhong, L.; Simard, M.J.; Huot, J. Endothelial microRNAs regulating the NF-kappa B pathway and cell adhesion molecules during inflammation. *FASEB J.* **2018**, *32*, 4070–4084. [[CrossRef](#)]
22. Ma, Y.; Liu, Y.; Hou, H.; Yao, Y.; Meng, H. MiR-150 predicts survival in patients with sepsis and inhibits LPS-induced inflammatory factors and apoptosis by targeting NF-kappa B1 in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *500*, 828–837.
23. Pfeiffer, D.; Roßmanith, E.; Lang, I.; Falkenhagen, D. miR-146a, miR-146b, and miR-155 increase expression of IL-6 and IL-8 and support HSP10 in an In vitro sepsis model. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0179850. [[CrossRef](#)]
24. Davidson, L.A.; Wang, N.; Shah, M.S.; Lupton, J.R.; Ivanov, I.; Chapkin, R.S. n -3 Polyunsaturated fatty acids modulate carcinogen-directed non-coding microRNA signatures in rat colon. *Carcinogenesis* **2009**, *30*, 2077–2084. [[CrossRef](#)]
25. Zheng, Z.; Ge, Y.; Zhang, J.; Xue, M.; Li, Q.; Lin, D.; Ma, W. PUFA diets alter the microRNA expression profiles in an inflammation rat model. *Mol. Med. Rep.* **2015**, *11*, 4149–4157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Hellwing, C.; Tigistu-Sahle, F.; Fuhrmann, H.; Käkälä, R.; Schümann, J. Lipid composition of membrane microdomains isolated detergent-free from PUFA supplemented RAW264.7 macrophages. *J. Cell. Physiol.* **2017**, *233*, 2602–2612. [[CrossRef](#)]
27. Basiouni, S.; Stöckel, K.; Fuhrmann, H.; Schumann, J. Polyunsaturated fatty acid supplements modulate mast cell membrane microdomain composition. *Cell. Immunol.* **2012**, *275*, 42–46. [[CrossRef](#)]
28. Schoeniger, A.; Fuhrmann, H.; Schümann, J. LPS- or Pseudomonas aeruginosa-mediated activation of the macrophage TLR4 signaling cascade depends on membrane lipid composition. *PeerJ* **2016**, *4*, 1663. [[CrossRef](#)]
29. Schumann, J.; Fuhrmann, H. Impairment of NFκB activity by unsaturated fatty acids. *Int. Immunopharmacol.* **2010**, *10*, 978–984. [[CrossRef](#)]
30. Innes, J.K.; Calder, P.C. Omega-6 fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **2018**, *132*, 41–48. [[CrossRef](#)]
31. Huntzinger, E.; Izaurralde, E. Gene silencing by microRNAs: Contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.* **2011**, *12*, 99–110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Ipsaro, J.J.; Joshua-Tor, L. From guide to target: Molecular insights into eukaryotic RNA-interference machinery. *Nat. Struct. Mol. Boil.* **2015**, *22*, 20–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Dharap, A.; Pokrzywa, C.; Murali, S.; Pandi, G.; Vemuganti, R. MicroRNA miR-324-3p Induces Promoter-Mediated Expression of RelA Gene. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e79467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Zhang, T.-N.; Li, D.; Xia, J.; Wu, Q.-J.; Wen, R.; Yang, N.; Liu, C.-F. Non-coding RNA: A potential biomarker and therapeutic target for sepsis. *Oncotarget* **2017**, *8*, 91765–91778. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Kanehisa, M.; Goto, S.; Furumichi, M.; Tanabe, M.; Hirakawa, M. KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *38*, D355–D360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Stelzer, G.; Rosen, N.; Plaschkes, I.; Zimmerman, S.; Twik, M.; Fishilevich, S.; Stein, T.I.; Nudel, R.; Lieder, I.; Mazor, Y.; et al. The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Curr. Protoc. Bioinform.* **2016**, *54*, 1–30. [[CrossRef](#)]
37. Prasad, S.S.V.; Jeyakumar, S.M.; Kumar, P.U.; Qadri, S.S.; Vajreswari, A. Dietary fatty acid composition alters 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene expression in rat retroperitoneal white adipose tissue. *Lipids Health Dis.* **2010**, *9*, 111. [[CrossRef](#)]
38. Bousserouel, S.; Brouillet, A.; Béréziat, G.; Raymondjean, M.; Andréani, M. Different effects of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids on the activation of rat smooth muscle cells by interleukin-1 beta. *J. Lipid Res.* **2003**, *44*, 601–611. [[CrossRef](#)]

39. Liu, G.; Bibus, D.M.; Bode, A.M.; Ma, W.-Y.; Holman, R.T.; Dong, Z. Omega 3 but not omega 6 fatty acids inhibit AP-1 activity and cell transformation in JB6 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 7510–7515. [[CrossRef](#)]
40. Wang, X.; Breeze, A.; Kulka, M. N-3 polyunsaturated fatty acids inhibit IFN-gamma-induced IL-18 binding protein production by prostate cancer cells. *Cancer Immunol. Immunother.* **2015**, *64*, 249–258. [[CrossRef](#)]
41. Bonilla, D.L.; Ly, L.H.; Fan, Y.-Y.; Chapkin, R.S.; McMurray, D.N. Incorporation of a Dietary Omega 3 Fatty Acid Impairs Murine Macrophage Responses to Mycobacterium tuberculosis. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e10878. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Sample Availability: Samples are not available from the authors.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

7 Erklärungen

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

(2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

(3) Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Datum, Unterschrift

8 Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank meiner Betreuerin Frau apl. Prof. Dr. rer. nat. habil. Julia Schumann für ihre außerordentliche wissenschaftliche Unterstützung und Motivation während der gesamten Dauer der Dissertation.

Auch möchte ich Herrn Prof. Dr. Michael Bucher danken, der es mir ermöglicht hat, dass Zeit neben der klinischen Tätigkeit frei wird für wissenschaftliche Tätigkeiten.

Besonderer Dank gilt Birte Schmidt und Kevin Kuhlmann für die vertrauensvolle Zusammenarbeit.

Außerdem danke ich Knut Krohn, Core Unit DNA, Universität Leipzig für die Durchführung der NGS-Analyse von miRNA.

Darüber hinaus danke ich Markus Glaß, Core Facility Imaging, Universitätsmedizin Halle (Saale) für die Durchführung der differentiellen Expressionsanalyse von polyA-RNAseq-Daten sowie der Gene Set Enrichment Analysis (GSEA).

Ich danke Claudia Rößler und Anja Leimert für die technische Unterstützung bei der Zellkultivierung und Kerstin Körber-Ferl vom Institut für Humangenetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für ihre Hilfe bei der NanoString-Analyse.

Ich danke der Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Förderprogramms Open Access Publishing.