

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. med. Sergij Goerdts)

Einfluss der konstitutiven Aktivierung von β -Catenin auf die Leber- und Herzendothelzellendifferenzierung

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Kajetan Sandorski

aus
Posen (Polen)
2024

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Prof. Dr. med. Sergij Goerd

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Koch, P.S.* , Sandorski, K.* , Heil, J., Schmid, C.D., Kürschner, S.W., Hoffmann, J., Winkler, M., Staniczek, T., de la Torre, C., Sticht, C., *et al.* (2021b). Imbalanced Activation of Wnt-/ β -Catenin-Signaling in Liver Endothelium Alters Normal Sinusoidal Differentiation. *Front Physiol* 12, 722394. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.722394>

*Gleicher Beitrag

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	1
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	2
TABELLENVERZEICHNIS	3
1 Einleitung	4
1.1 Anatomie und Funktionen der Leber	4
1.1.1 Makroskopischer Aufbau der Leber	4
1.1.2 Histologie der Leber	5
1.1.3 Lipidstoffwechsel der Leber und Lebersteatose	7
1.2 Anatomie und Funktionen des Herzens	8
1.2.1 Makroskopischer Aufbau des Herzens	8
1.2.2 Histologie des Herzens	10
1.2.3 Der Herzzyklus und Kardiomyopathien	10
1.3 Endothelzellen	12
1.3.1 Klassifikation von Endothelzellen	12
1.3.2 Organspezifische Heterogenität der Endothelzellen	13
1.3.3 Angiokrine Signalübertragung durch Endothelzellen	14
1.4 Wnt/ β -Catenin-Signalweg	15
1.4.1 Mechanismus der Signalübertragung	15
1.4.2 β -Catenin als Faktor in der Endotheldifferenzierung	17
1.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit	18
1.5.1 Spezifische Ziele der Arbeit	18
2 MATERIAL UND METHODEN	19
2.1 Material	19
2.1.1 Primer	19

2.1.2	Antikörper.....	20
2.1.3	Reagenzien, Puffer	22
2.1.4	Verbrauchsmaterialien	28
2.1.5	Geräte	29
2.1.6	Software.....	32
2.2	Methoden.....	33
2.2.1	Tierversuche	33
2.2.2	Serologie	34
2.2.3	LSEC-Isolation	36
2.2.4	Molekularbiologische Methoden	37
2.2.5	Klassische Histochemie	39
2.2.6	Immunhistochemie.....	39
2.2.7	Bildgebung	41
2.2.8	Echokardiographie.....	42
2.2.9	Statistik	42

3 ERGEBNISSE 43

3.1	Generierung endothelialer β -Catenin-Überaktivierung am Mausmodell.....	43
3.2	Populationsbiologie und makroskopischer Phänotyp der generierten Mauslinien.....	44
3.2.1	Allelfrequenzen	44
3.2.2	Überlebensraten	45
3.2.3	Körper- und Organgewichte.....	45
3.2.4	Blutserumveränderungen bei <i>Ctnnb1</i> ^{OE-EC} Mäusen	47
3.3	Histologische Charakterisierung der Leber von <i>Ctnnb1</i> ^{OE-EC} Mäusen	48
3.3.1	Charakterisierung der Leber mittels Routinehistologie	48
3.3.2	Charakterisierung der Leber mittels Immunfluoreszenzfärbungen ...	49
3.4	Transdifferenzierung der LSEC in <i>Ctnnb1</i> ^{OE-EC} Mäusen.....	51
3.4.1	Endotheliale Genotypisierung	53
3.4.2	Endotheliale Zonierung	55
3.4.3	Expression von angiokrinen Genen	57
3.5	Histologische Charakterisierung des Herzens von <i>Ctnnb1</i> ^{OE-EC} Mäusen ...	59
3.5.1	Charakterisierung des Herzens mittels Routinehistologie	59
3.5.2	Charakterisierung der Herzendothelien mittels Immunfluoreszenzfärbungen	59
3.6	Funktionelle <i>in vivo</i> -Untersuchung der Herzen von <i>Ctnnb1</i> ^{OE-EC} Mäusen ..	62

4 DISKUSSION	64
4.1 Metabolische Effekte durch Transdifferenzierung von Leberendothel.....	64
4.2 Metabolische Zonierung und Organogenese der Leber	67
4.3 Dilatative Kardiomyopathie nach endothelspezifischer β -Catenin-Überaktivierung.....	68
4.4 Ausblick	69
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	71
6 DANKSAGUNG	72
7 LEBENSLAUF	73
8 LITERATURVERZEICHNIS	74

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Nr.	Name	Seite
1	Lebersegmente und portale Trias	5
2	Funktionelle Einheiten der Leber	6
3	Herzwand und Herzklappen	9
4	Klassifizierung der Endothelzellen	13
5	Der Wnt/ β -Catenin Signalweg	16
6	Kreuzung der Versuchstiere	43
7	Bestätigung der β -Catenin Überaktivierung per FISH und qPCR aus LSEC isoliert aus <i>Ctnnb1</i> ^{OE-EC} Mäusen	44
8	Mendel'sche Frequenzen F1-Generation	44
9	Überlebensraten	45
10	Makroskopische Bilder von Herz und Leber sowie Körper- und Organgewichte	46
11	Serumwerte	47
12	Fettmessung in Lebergewebe	47
13	Übersichts- und Spezialfärbungen der Leber	48
14	Ölrot-O Färbung in Leber	49
15	Leberzonierungsmarker	50
16	Kollagen-Immunhistochemie und Quantifizierung	51
17	Genexpressionsanalyse Genset und Immunhistochemie Ki-67	52
18	Genexpressionsanalyse endotheliale Differenzierung	54
19	Endothelzellmarker in qRT-PCRs und Immunhistochemie von Lebergewebe	55
20	weitere Endothelzellmarker in Lebergewebe	56
21	Leberfibrosemarker	57
22	Phänotypisierung per In-situ-Hybridisierung (ISH)	58
23	Übersichtsfärbungen des Herzen	59
24	YFP-Reporteraktivität in Herzgewebe von <i>Clec4g-iCre;R26YFP</i> Mäusen	60
25	Endothelzellmarker im Herz - Immunhistochemie	61
26	Echokardiographie	63

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	Arteria
ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
BMI	Body-Mass-Index
Bmp	Bone Morphogenetic Protein
Ca ²⁺	Calcium
CD	Cluster of Differentiation
CEC	Kontinuierliche Endothelzellen
CK1	Casein Kinase 1
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejektionsfraktion
EMCN	Endomucin
EMT	Endotheliale-mesenchymale Transition
ESV	Endsystolisches Volumen
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fetales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
GLDH	Glutamatdehydrogenase
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGF	Hepatocyte Growth Factor
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IF	Immunfluoreszenz
ISH	In-situ-Hybridisierung
LSEC	Lebersinusendothelzellen
MACS	Magnetic-Activated Cell Sorting
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
ORO	Ölrot O
PAS	Periodic Acid-Schiff
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
S.	Seite
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SV	Schlagvolumen
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCF	Transcription Factor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
V.	Vena

TABELLENVERZEICHNIS

Nr.	Name	Seite
1	Primer für Genotypisierungen	19
2	Primer für quantitative PCRs	19
3	Primärantikörper	20
4	Sekundärantikörper	22
5	gebrauchsfertige Chemikalien	22
6	Bestandteile Ca ²⁺ -freies Medium	27
7	Verbrauchsmaterialien	28
8	Geräte	29
9	gebrauchte Software	32
10	Mauslinien	33

1 Einleitung

1.1 Anatomie und Funktionen der Leber

1.1.1 Makroskopischer Aufbau der Leber

Die Leber ist eines der zentralen Organe des menschlichen Körpers und spielt eine entscheidende Rolle beim Stoffwechsel, bei der Entgiftung und bei der Regulierung des Blutzuckerspiegels. Trotz ihrer lebenswichtigen Funktionen bleibt das Verständnis der vielfältigen biologischen Prozesse und komplexen Pathologien, die mit der Leber verbunden sind, eine Herausforderung.

Die Leber ist mit durchschnittlich 1,3 bis 2 Kilogramm beim Menschen die größte Drüse des Körpers (de la Grandmaison et al., 2001; Häussinger and Löffler, 2022). Sie liegt hauptsächlich im rechten Oberbauch, direkt unter dem Zwerchfell (Schünke et al., 2022e). Morphologisch wird die Leber durch die einziehenden bindegewebigen Septen der Glisson'schen Kapsel (Tunica fibrosa der Leber) grob in den rechten und linken Leberlappen (Lobus hepatis dexter und sinister) und die durch die Leberpforte (Porta hepatis) getrennten Lobi caudatus und quadratus unterteilt. In der Leberpforte befindet sich die portale Trias, d.h. der Lebergallengang (Ductus hepaticus communis), die Pfortader (Vena portae hepatis) und die Leberarterie (Arteria hepatica propria) (Schünke et al., 2022f) (siehe Abbildung (Abb.) 1, Seite (S.) 5). Während die Leberarterie sauerstoffreiches Blut zur Leber transportiert, liefert die Pfortader nährstoffreiches, sauerstoffarmes Blut aus dem Magen-Darm-Trakt zur Leber, und der Lebergallengang transportiert die in den Leberzellen (Hepatozyten) produzierte Gallenflüssigkeit in Richtung Dünndarm. Über diese drei Wege ist die Leber am Fett-, Eiweiß- und Kohlenhydratstoffwechsel beteiligt, sorgt durch die Verstoffwechslung portalvenös eintreffender Medikamente für deren therapeutische Wirksamkeit und übernimmt die Entgiftung verschiedener körperfremder oder körpereigener Substanzen, die ebenfalls über die Pfortader aus dem Verdauungstrakt eintreffen. Des Weiteren verbinden sich die mikroskopisch kleinen Gallengänge zum Ductus hepaticus dexter und sinister und bilden den Ductus hepaticus communis, der die Leber verlässt. Außerhalb der Leber vereinigt er sich mit dem Ductus cysticus zum Ductus choledochus, der durch den Pankreaskopf in den Dünndarm mündet. Dort unterstützt die Gallenflüssigkeit Verdauung und Absorption von Fetten (Heinrich et al., 2022).

Eine weitere, funktionell und klinisch wichtigere Aufteilung der Leber erfolgt wiederum über die gemeinsamen Verläufe der Äste der Pfortader, Leberarterie und der Gallengänge. Hier wird vom Lobus caudatus als Segment I im Uhrzeigersinn von ventral nach dorsal in 8 Segmente aufgeteilt (Segmente I-IV links, Segmente V-VIII rechts) (siehe Abb. 1, S. 5). Abgesehen von der Ausdehnung der Mausleber über den gesamten subdiaphragmalen Raum und der Unterteilung der Mausleber in 4 separate Lappen, ähneln sich Mausleber und menschliche Leber in Morphologie, Funktion und mikroskopischer Struktur (Kruepunga et al., 2019).

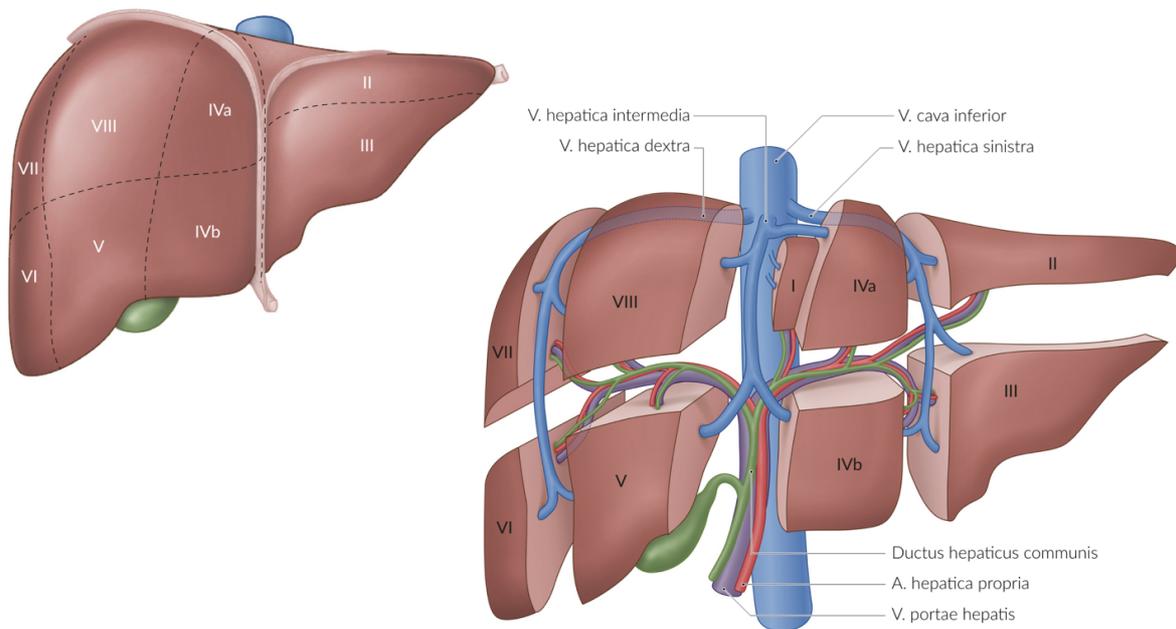


Abb. 1: Lebersegmente und portale Trias

Die Unterteilung der Leber in ihre 8 funktionellen Segmente, wie durch den Verlauf der Gefäße der portalen Trias (A. hepatica propria, V. portae hepatis und Ductus hepaticus communis) und deren Äste bestimmt.

Abbildung von (Amboss, 2024) auf

<https://next.amboss.com/de/article/F60g5S?q=leber&m=tlaxAk#Zd2e720665a4464aa1e9b8bf5aa0c8ecd>,
abgerufen am 31.07.2024.

1.1.2 Histologie der Leber

Die mikroskopische Beschreibung der Leber erfolgt, ähnlich der makroskopischen, zunächst durch mehrere Einteilungen, die nach funktionellen Einheiten und deren Betrachtung vorgenommen werden. Eine der gebräuchlichsten mikroskopischen Einteilungen der Leber beruht auf der so genannten „Glisson-Trias“, bestehend aus den Ductus biliferi interlobulares sowie den Arteriae und Venae interlobulares (Schünke et al., 2022f). Im Zentrum des „klassischen“ sechseckigen Zentralvenenläppchens (Lobulus hepatis) befindet sich die Vena centralis als Abflussgefäß für das aus der Glisson-Trias ankommende Mischblut. Die Gefäße der Glisson-Trias bilden hier die Ecken des Hexagons. Radiär zur Vena centralis verlaufen die Leberzellbälkchen aus Hepatozyten und dazwischen das Mischblut aus A. hepatica propria und V. portae hepatis in den sogenannten Lebersinusoiden. Zwischen zwei Zentralvenen und zwei periportal Triaden lässt sich jeweils ein rhombisches Feld beschreiben, das als weitere histologische Funktionseinheit, der Leberazinus, angesehen wird. Auch hier ist die Blutversorgung entscheidend, denn ausgehend von der Verbindungslinie zwischen zwei Glisson-Triaden in Richtung der jeweiligen Zentralvenen lassen sich hier 3 Stoffwechselzonen nach Sauerstoff- und Nährstoffreichtum unterteilen. Die erste Zone in der Nähe der zuführenden Gefäße ist die sauerstoff- und nährstoffreichste und weist die höchste Stoffwechselaktivität auf. In den Zonen 2 (Intermediärzone) und 3 (in der Nähe der zentralen Venen) nehmen die Konzentrationen und damit die Aktivität kontinuierlich ab. Dies führt zu entsprechend unterschiedlichen Stoffwechselschwerpunkten und Enzymaktivitäten in diesen Zonen (Rappaport and Wilson, 1958; Schünke et al., 2022f). Die Einteilung des Lebergewebes in dreieckige Periportalläppchen orientiert sich an der Gallenproduktion und stellt das periportale Feld in den Mittelpunkt. Die Galle fließt von den Ecken, die

von den zentralen Venen gebildet werden, durch die Ductus biliferi in die interlobulären Gallengänge (Ducti biliferi) und von dort in den Ductus hepaticus communis (Abdel-Misih and Bloomston, 2010) (siehe Abb. 2, S. 6).

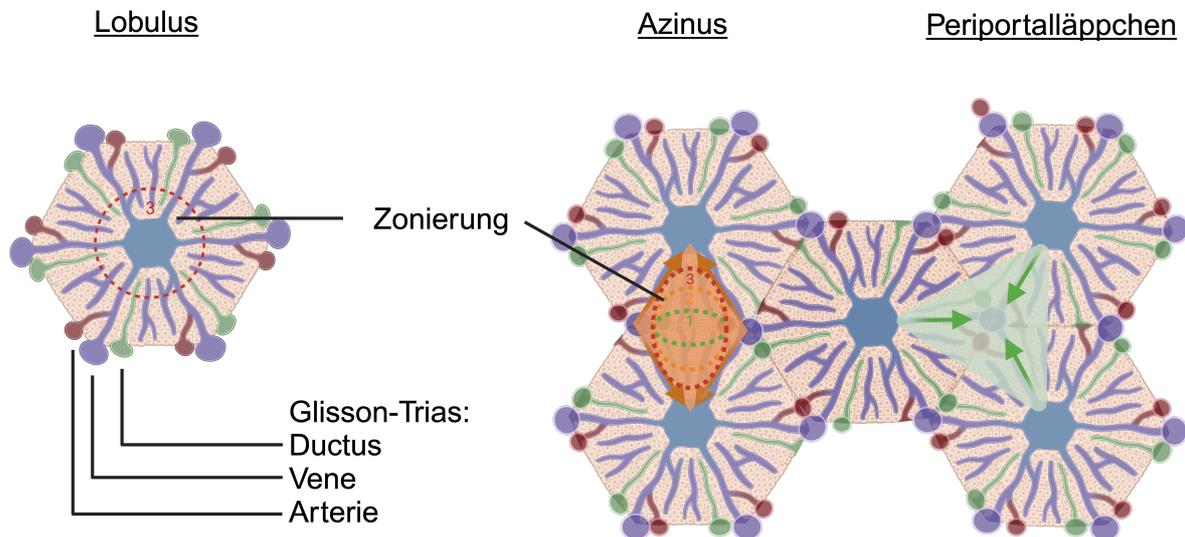


Abb. 2: Funktionelle Einheiten der Leber

Überblick der verschiedenen Einteilungen des Lebergewebes. **Links**: der hexagonale Lobulus hepatis, **mittig**: der rhombische Leberazinus mit schematischer Einteilung in die drei Stoffwechselzonen, **rechts**: das dreieckige Periportalläppchen.
Abbildung erstellt mit BioRender.com

Die zelluläre Zusammensetzung des Lebergewebes wird vor allem durch die Hepatozyten (Leberparenchymzellen) bestimmt. Diese machen ca. 78-80% des gesamten Lebergewebes aus und übernehmen in der Leber u.a. die Entgiftung, den Glukose-/Fettsäuren- und Aminosäurenstoffwechsel sowie die Gallensäuresynthese (Bogdanos et al.). Die Hepatozyten besitzen oft mehrere Zellkerne und eine große Anzahl von Zellorganellen, was der Leber eine hohe Regenerationsfähigkeit verleiht. Die Anordnung in ein- bis mehrschichtigen Zellplatten, die radial zu den Zentralvenen/Zentralvenenläppchen ausgerichtet sind, ermöglicht eine Unterteilung der Zellseiten. Die apikale(/biliäre) Zellmembran zweier gegenüberliegender Hepatozyten bildet die Canaliculi biliferi und ist durch einen Schlussleistenkomplex von der basolateralen Membran getrennt. Diese wiederum kann anderen Hepatozyten oder dem Disse-Raum zugewandt sein und ist dort mit Mikrovilli besetzt, über die die Hepatozyten mit dem durchströmenden Blut und auch mit anderen Zellen des Lebergewebes in Kontakt stehen. Zu diesen Zellen, die einen wesentlich geringeren Anteil des Gewebes ausmachen, gehören vor allem die Kupfferzellen und die Itozellen, die auch als Sternzellen bezeichnet werden. Die Itozellen sind fettspeichernde Zellen, die Vitamin A in ihrem Zytoplasma anreichern und werden für die erhöhte Kollagenproduktion bei Leberzirrhose verantwortlich gemacht (Lüllmann-Rauch and Asan, 2019a). Die Kupfferzellen sind die Makrophagen der Leber und können im Disse-Raum nicht nur Bakterien, Zelltrümmer oder Fremdkörper aufnehmen, sondern übernehmen auch den Abbau alter Erythrozyten. Sie stehen weiter mit den Endothellzellen der Lebersinusoide in Kontakt.

Diese Sinusoide sind Kapillaren zwischen den Leberzellbälkchen, durch die das Mischblut aus A. hepatica propria und V. portae hepatis fließt, sind mit einem fenestrierten Endothel aus hepatischen Sinusoidendothelzellen (LSEC) ausgekleidet

und werden durch den perisinusoidalen Disse-Raum vom Leberparenchym getrennt. Die hepatischen Sinusoidendothelzellen stellen daher mit 45% den größten Anteil der nicht-parenchymalen Zellen des Lebergewebes dar (Bogdanos et al.). Darüber hinaus besteht das Gewebe aus Bindegewebe, das in der Leber normalerweise nur in geringen Mengen vorkommt, bei chronischen Erkrankungen wie Leberfibrose oder Leberzirrhose jedoch stark erhöht sein kann und für diese Diagnosen relevante klinische Parameter darstellt (Hall et al., 2021).

1.1.3 Lipidstoffwechsel der Leber und Lebersteatose

Die Leber speichert wichtige Nährstoffe wie Glukose in Form von Glykogen, Vitamine (A, B12, D, E, K) und Folsäure, Spurenelemente wie Kupfer und Eisen und auch Fette in Form von Lipoproteinen. Außerdem stellt sie diese wichtigen Vitalstoffe über den Blutkreislauf dem gesamten Organismus zur Verfügung (Rassow, 2016). Im Fettstoffwechsel ist die Leber vor allem für die Biosynthese von Triacylglyceriden, Phosphoglyceriden, Sphingolipiden und auch Cholesterin aus den aufgenommenen Kohlenhydraten und Fetten verantwortlich. Bei ausreichendem Ernährungszustand nimmt die Leber freie Fettsäuren aus dem Blut auf und wandelt auch Glukose in Fettsäuren um, die sie wiederum zu Triacylglyceriden oder z.B. Cholesterin synthetisiert. Diese Produkte können dann entweder als Fetttropfchen in den Hepatozyten gespeichert oder als VLDL (Very Low Density Lipoprotein) ausgeschieden werden. VLDL ist eines der Lipoproteine, die von der Leber und dem Dünndarm produziert werden und Fettsäuren durch das Blutplasma transportieren. Die intrahepatischen Fetttropfchen bestehen hauptsächlich aus Triacylglyceriden, die als Energiereserve dienen und in Phasen erhöhten Energiebedarfs mobilisiert werden können. Die Leber versorgt sich selbst mit Energie durch die Oxidation von Fettsäuren, wobei sie als einziges Organ für den Bedarf extrahepatischer Gewebe zusätzlich Fettsäuren in Ketonkörper (Acetacetat, Aceton und β -Hydroxybutyrat) umwandeln, jedoch nicht selber verwerten kann (Rui, 2014). In Skelettmuskel, Herz und Gehirn können die Ketonkörper dann in Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) umgewandelt und für den Citratzyklus verwendet werden (Arima, 2023).

Ist der Fettsäuren- und Triglyceridstoffwechsel in der Leber gestört (z. B. bei übermäßigem Alkoholkonsum, Überernährung oder anderen toxisch oder genetisch bedingten Stoffwechselstörungen), können sich die Fetttropfchen anreichern und histologisch als Verfettung (Steatose) der Leber erkannt werden. Bei kleinen, den Zellkern nicht verdrängenden und unscharf abgrenzbaren Tröpfchen spricht man von mikrovesikulärer Steatose, bei größeren, den Zellkern verdrängenden und gut abgrenzbaren Fetttropfchen (oder einem einzelnen großen Tröpfchen) von makrovesikulärer Steatose (Takahashi and Fukusato, 2014). Während die makrovesikuläre Steatose vergleichsweise einfach mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) zu erkennen ist, kann zur Diagnose einer mikrovesikulären Steatose eine Ölrot O Färbung (ORO Färbung) nötig werden (M. Brunt and G. Tiniakos, 2009). Treten solche sichtbaren Veränderungen in mehr als 5% des Lebergewebes auf, wird klinisch je nach Ätiologie von einer alkoholischen bzw. nicht alkoholischen Fettlebererkrankung ((N)AFLD – (non-)alcoholic fatty liver disease) gesprochen (Weiß et al., 2014). Sind zusätzlich Ballonierung und/oder Apoptose der Hepatozyten und andere Entzündungszeichen sichtbar, wird der Begriff Steatohepatitis ((N)ASH) verwendet (Brown and Kleiner, 2016).

Erhöhungen der laborchemischen Leberparameter Aspartat-Aminotransferase (AST) und/oder Alanin-Aminotransferase (ALT) können auftreten, sind für eine Diagnose der Erkrankungen aber nicht zwingend erforderlich (Weiß et al., 2014). Eine Erhöhung der γ -Glutamyltransferasen und der Triglyceride im Serum konnte jedoch als unabhängiger prädiktiver Faktor identifiziert werden und wird zusammen mit dem Body-Mass-Index (BMI) und dem Taillenumfang im klinischen Alltag zum Screening von Patient*innen für eine weiterführende Ultraschalluntersuchung oder Biopsie (als diagnostischer Goldstandard zum Nachweis einer Fettleber) herangezogen (Bedogni et al., 2006; Weiß et al., 2014). Im Verlauf kann sowohl die (N)ASH als auch die (N)AFLD durch chronische Inflammation zu Akkumulation von Bestandteilen der Extrazellulärmatrix (EZM) und damit zur Vernarbung der Leber (Leberfibrose) und im Verlauf zur irreversiblen Leberzirrhose führen. Eine Leberzirrhose aufgrund von (N)ASH oder (N)AFLD ist im Verlauf mit Entwicklung eines Leberzellkarzinoms assoziiert (Qin et al., 2020; White et al., 2012).

1.2 Anatomie und Funktionen des Herzens

1.2.1 Makroskopischer Aufbau des Herzens

Das Herz ist die muskuläre Pumpe des Blutkreislaufs und befindet sich im mittleren Teil des unteren Mediastinums im Brustkorb zwischen den Lungen und auf dem Zwerchfell aufliegend. Die Längsachse des Herzens (von der Herzbasis bis zur Herzspitze) verläuft von rechts kranial und dorsal nach links kaudal und ventral. Dadurch liegt das Herz schräg nach links und nach hinten gerollt im Brustkorb und befindet sich etwas links von der Körpermitte (Schünke et al., 2022a). Das durchschnittliche humane Herz wiegt zwischen 234 und 436 g und hat ungefähr die Größe einer geschlossenen Faust (de la Grandmaison et al., 2001; Gray, 1878), jedoch variieren diese Größen je nach Alter, Geschlecht und sportlicher Aktivität (St Pierre et al., 2022).

Das Herz wird vom Herzbeutel (Perikard) umhüllt und verankert, die Herzwände selbst bestehen aus drei Schichten (siehe Abb. 3, S. 9). Das Epikard (oder anatomisch Lamina visceralis pericardii serosi) ist die äußerste Schicht und streng genommen bereits Bestandteil des Perikards, das Myokard ist die Muskelschicht des Herzens und für die Pumpaktion verantwortlich, das Endokard ist die innerste Schicht und bildet die Segel und Taschen der Herzklappen. Das Herzinnere gliedert sich in vier Herzbinnenräume, zwei Vorhöfe (Atrium cordis sinistrum und Atrium cordis dextrum) mit eigenen Ausstülpungen, den Herzohren (Auricula cordis sinistra et dextra) und zwei Herzkammern (Ventriculus cordis sinister et dexter). Die linken und rechten Vorhöfe und Kammern sind durch Scheidewände (Septum interatriale und Septum interventriculare) voneinander getrennt (Schmitz, 2020). Die Räume im Herzen werden zusätzlich durch Segel- und Taschenklappen getrennt, die den unidirektionalen Blutfluss gewährleisten. Die Segelklappen trennen die Vorhöfe von den Kammern: die dreisegelige Trikuspidalklappe liegt zwischen rechtem Vorhof und rechter Kammer, die zweisegelige Mitralklappe zwischen linkem Vorhof und linker Kammer. Die Taschenklappen trennen die Ventrikel von den Arterien: die Pulmonalklappe trennt den rechten Ventrikel vom Truncus pulmonalis, die Aortenklappe den linken Ventrikel von der Aorta (O'Donnell and Yutzey, 2020; Schünke et al., 2022b).

Das Herz gliedert sich also auch funktionell in ein rechtes und ein linkes Herz und kann als zwei hintereinander geschaltete Pumpen betrachtet werden. Zunächst fließt das venöse Blut aus den oberen und unteren Hohlvenen über den Sinus venosus cavernosus in den rechten Vorhof, wird dann durch die Trikuspidalklappe in die rechte Herzkammer gepumpt und gelangt über die Pulmonalklappe und den angrenzenden Truncus pulmonalis in die Lunge. Das dort mit Sauerstoff angereicherte Blut gelangt über die Lungenvenen in den linken Vorhof, über die Bikuspidalklappe in die linke Herzkammer und von dort über die Aortenklappe in die Hauptschlagader (Aorta), von wo aus der gesamte Körper mit sauerstoffreichem Blut versorgt wird (siehe Abb. 3, S. 9) (Schünke et al., 2022c).

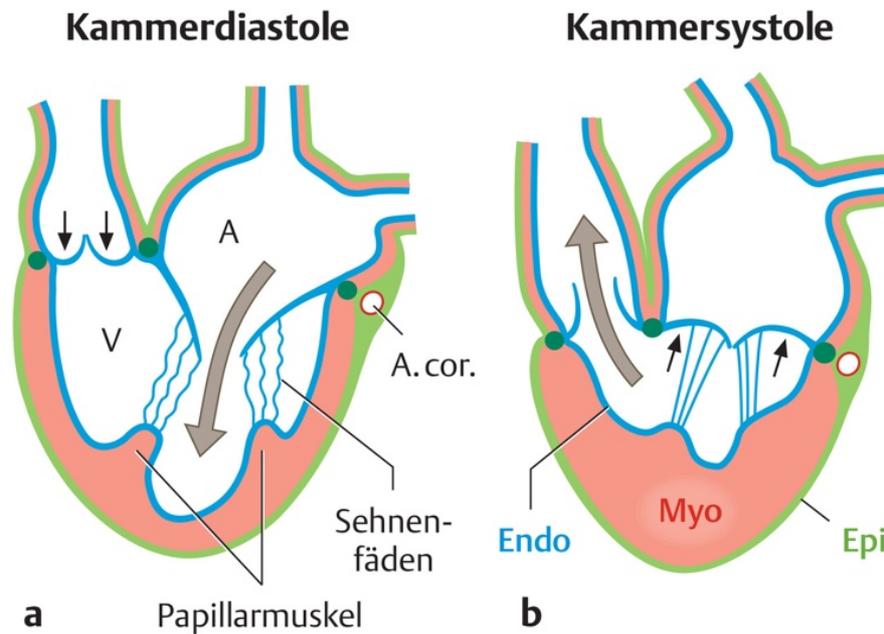


Abb. 3: Herzwand und Herzklappen

a, b: Stellung der Segel- und Taschenklappen in Abhängigkeit von der Herzphase (schematisch). **A**, Atrium. **V**, Ventrikel. **Endo**, Endokard (blau). **Myo**, Myokard (rot). **Epi**, Epikard (hellgrün). Herzskelett (dunkelgrün). Die Schichten setzen sich in die Intima, Media und Adventitia der angeschlossenen Gefäße fort. **A. cor.**, großer Ast einer A. coronaria. Die Segel der AV-Klappe sind mittels Sehnenfäden an Papillarmuskeln befestigt. **Große Pfeile**, Richtung des Blutstroms. Die **kleinen Pfeile** deuten die Krafteinwirkung an, durch die die Sehnenfäden und die Kollagenfasern der Segel im geschlossenen Zustand auf Zug beansprucht werden.

Abbildung und Beschriftung übernommen und angepasst aus (Lüllmann-Rauch and Asan, 2019b, 2024; Schünke et al., 2022c), mit Erlaubnis von Thieme

Der Sauerstoffbedarf des Herzmuskels, der durch die kontinuierliche Pumparbeit entsteht, wird durch die Herzkranzgefäße (Aa. coronariae dextra und sinistra) gedeckt. Diese entspringen der Aorta oberhalb der Aortenklappe und während die kleinere Arteria coronaria dextra im Sulcus coronarius rechts zur Herzhinterwand verläuft, teilt sich die größere Arteria coronaria sinistra in einen Ramus interventricularis anterior, welcher im Sulcus interventricularis anterior zur Herzspitze läuft, und einen Ramus circumflexus, welcher links im Sulcus coronarius zur Herzhinterwand verläuft (Schünke et al., 2022d).

Im Vergleich zum menschlichen Herzen weist das murine Herz neben einigen Unterschieden in wichtigen Größen wie Gewicht (nur ca. 0,2 g) und Herzfrequenz (500-600 Schläge pro Minute) nur unbedeutende anatomische Unterschiede auf. Aufgrund der anatomischen Gegebenheiten (das Herz der vierbeinigen Maus liegt nicht auf dem Zwerchfell auf und kann sich daher freier im Herzbeutel bewegen) hat es eine eher ellipsoide Form. Außerdem sind die Vorhöfe und die Herzohren im

Verhältnis zum Rest des Organs kleiner als beim Menschen. Anzahl und Lokalisation der Herzkammern, Herzklappen und Scheidewände sind beim postnatalen Herzen gleich. Somit sind die Erkenntnisse aus dem Mausmodell in Bezug auf das Herz in gewissem Maße auf den Menschen übertragbar (Wessels and Sedmera, 2003).

1.2.2 Histologie des Herzens

Die grundlegenden Bestandteile des Herzens sind das Herzskelett, der Herzmuskel und das Erregungsleitungssystem. Der größte Teil der Herzwand besteht jedoch aus dem Herzmuskel (Myokard), der wiederum hauptsächlich aus Kardiomyozyten besteht. Das Erregungsbildungs- und -leitungssystem des Herzens, das im Sinusknoten beginnt, besteht aus spezialisierten Myozyten, die eine zyklische elektrische Aktivität aufweisen und sich lichtmikroskopisch vor allem durch eine deutlich spärlichere Ausstattung mit Myofibrillen von den übrigen Myozyten unterscheiden (Murphy and Lazzara, 2016). Das bindegewebige Skelett des Herzens dient unter anderem als Gerüst für die Herzmuskelzellen (Saremi et al., 2017). Der Perikardbeutel besteht aus drei Schichten: der inneren Serosa, der mittleren Fibrosa und einer äußeren Schicht aus epiperikardialem Bindegewebe. Die Serosa, bestehend aus Mesothelzellen, ist für die Produktion und Resorption der Perikardflüssigkeit verantwortlich. Die Fibrosa enthält hauptsächlich Kollagenbündel und elastische Fasern, die für Dehnbarkeit sorgen. Die äußere Schicht enthält Fettgewebe, Nerven und Blutgefäße. Blut- und Lymphgefäße sowie Nerven, die das Herz versorgen, befinden sich im Subepikardium (Rodriguez and Tan, 2017).

Das Endokard besteht aus spezialisierten Endothelzellen, die eine wichtige Barriere für den Blutstrom darstellen. Diese Zellen durchlaufen während der embryonalen Entwicklung des Herzens eine Endothel-zu-Mesenchym-Transformation (Dye and Lincoln, 2020). Diese Umwandlung ist unter anderem für die Bildung der Herzklappen und der Herzscheidewand von Bedeutung. Störungen dieser Entwicklungsprozesse können zu schweren angeborenen Herzfehlern führen, wie z.B. einer fehlerhaften Klappenbildung oder einer gestörten Ventrikelentwicklung (Zhang et al., 2018). Da der Herzmuskel von Natur aus einen hohen Stoffwechselbedarf hat, ist die Dichte des von den Herzkranzgefäßen ausgehenden Kapillarnetzes mit 3000-4000 Kapillaren/mm² entsprechend hoch (im Vergleich z. B. zum Skelettmuskel, bei dem 500-2000 Kapillaren/mm² gemessen wurden) (Duncker and Bache, 2008). Auch hier dienen die kardialen kontinuierlichen Endothelzellen nicht nur als Barriere zwischen Blut und Herzgewebe, sondern kommunizieren auch aktiv untereinander und mit den Kardiomyozyten über auto-/para-/angiokrine Signalwege (Brutsaert, 2003).

1.2.3 Der Herzzyklus und Kardiomyopathien

Der Herzzyklus ist ein komplexer, koordinierter Prozess, der in zwei Hauptphasen unterteilt ist: die Systole und die Diastole. Die Systole beginnt per definitionem wenn die Mitralklappe (bzw. Trikuspidalklappe) schließt. Während der Systole kontrahieren die Ventrikel, was zu einem Druckanstieg und relativen Überdruck der Ventrikel im Vergleich zu den angrenzenden Blutgefäßen führt. Die Pulmonal-/Aortenklappe öffnet und Blut wird in die Aorta (bzw. Truncus pulmonalis) gedrückt, gleichzeitig füllen sich die Herzvorhöfe. Diese Phase ist entscheidend für die Berechnung der Ejektionsfraktion (EF), die das Verhältnis des ausgeworfenen zum enddiastolischen Volumen (EDV) darstellt. Ein normaler EF-Wert liegt typischerweise bei ca. 60 % und

seine Messung bietet Einblicke in die systolische Funktion des Herzens. Die Systole endet und die Diastole beginnt mit dem Schluss der Aortenklappe (bzw. Pulmonalklappe). In der Diastole entspannen sich die Ventrikel und die Vorhöfe kontrahieren, entsprechend öffnen sich die Mitralklappen und Trikuspidalklappen und das Herz wird durch die Füllung der Ventrikel auf die nächste Kontraktion vorbereitet (Barros, 2019). Hierbei ist das enddiastolische Volumen von besonderer Bedeutung, da es zusammen mit dem endsystolischen Volumen (ESV) zur Bestimmung des Schlagvolumens (SV) und des Herzzeitvolumens (HZV) dient. Das Schlagvolumen, also das Volumen, das bei jedem Herzschlag ausgeworfen wird, kann durch die Differenz zwischen EDV und ESV ermittelt werden. Das Herzzeitvolumen, welches das gesamte Blutvolumen beschreibt, das pro Minute vom Herzen gepumpt wird, wird durch Multiplikation des Schlagvolumens mit der Herzfrequenz berechnet (King and Lowery, 2024).

Die Echokardiographie bietet durch die Integration dieser Messgrößen (EF, SV, EDV, ESV, sowie die Ventrikelwanddicke) eine umfassende Analyse des Herzzyklus und ermöglicht so die Beurteilung sowohl der systolischen als auch der diastolischen Funktion (Luis et al., 2019; Pombo et al., 1971). Liegt eine muskuläre Dysfunktion des Herzens vor, kann auch die Herzaktion erheblich gestört sein. Erkrankungen, die solche strukturellen und funktionellen Veränderungen des Herzmuskels auslösen und zu Herzversagen und Tod führen können, werden als Herzmuskelerkrankungen (Kardiomyopathien) bezeichnet und stellen eine inhomogene Gruppe von Herzerkrankungen dar (Hänselmann et al., 2020). Während früher nur in primäre (oder idiopathische) Kardiomyopathie und Kardiomyopathie sekundären Ursprungs (nach identifizierbaren Herzerkrankungen, wie Koronarer Herzkrankheit, erhöhtem Blutdruck, Herzklappenerkrankungen oder nicht auf das Myokard bezogener angeborener Herzfehler) unterteilt wurde, werden auf Basis neuerer diagnostischer Methoden und Entdeckung der Ätiologie, folgende Untergruppen klassifiziert: Dilatative Kardiomyopathien, Hypertrophe Kardiomyopathien, Restriktive Kardiomyopathien, Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathien, Unklassifiziert. Diese werden dann wiederum nach Ursprung klassifiziert.

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist die häufigste Form der Kardiomyopathien und definiert als Erweiterung (Dilatation) des linken oder beider Ventrikel ohne globale systolische Fehlfunktion (z.B. durch abnormale Volumenbelastung durch Hypertonus oder koronarer Herzkrankheit), die zu einer systolischen Dysfunktion führt (Elliott et al., 2007). Es ist gleichzeitig der häufigste Grund für Herzinsuffizienz bei jungen Menschen und daher auch der häufigste Grund für Herztransplantationen (McKenna et al., 2017). In ca. 25% der Fälle kann eine genetische Ursache identifiziert werden (McNally and Mestroni, 2017). Klinisch manifestiert sich die DCM in den meisten Fällen durch Symptome der Herzinsuffizienz wie Atemnot, Wassereinlagerungen oder häufiges nächtliches Wasserlassen. Echokardiographie ist hier die wichtigste Bildgebungsmethode um die Zeichen der Erkrankung darzustellen und zu quantifizieren. Neben der Dilatation, welche so groß werden kann, dass sich die Herzgeometrie in Richtung der Form einer Kugel ändern kann, kann eine verminderte Ventrikelwanddicke, ein erhöhtes enddiastolisches Volumen und Verminderung der systolischen Funktion (z.B. in Form von verminderter EF) gemessen werden. Zusätzlich kann ein Rückfluss durch die Mitralklappe, Erweiterung aller 4 Herzkammern und auch diastolische Dysfunktion (z.B. in Form von restriktiven Füllungsmustern) beobachtet werden (Hänselmann et al., 2020). Die Histologie der DCM zeigt sich unspezifisch mit Fibrose, Vergrößerung der Zellkerne von Myozyten,

sowie Streckung der Myozyten selber (Leone et al., 2012). Für die Behandlung wird eine Herzinsuffizienz-Therapie empfohlen, die möglicherweise durch die Implantation eines Herzschrittmachers oder sogar durch eine Herztransplantation erweitert werden kann (Berliner et al., 2023).

1.3 Endothelzellen

Endothelzellen sind polarisierte Zellen, die eine luminale Seite besitzen, die direkt mit den im Gefäßsystem zirkulierenden Zellen in Kontakt steht, und eine basolaterale Seite, die typischerweise mit einer Basalmembran verbunden ist und das umliegende Gewebe von den Endothelzellen trennt. Im Zellverband bilden sie eine Monoschicht auf der Innenseite von Arterien, Venen, Kapillaren und Lymphgefäßen. Diese Schicht fungiert nicht nur, wie man bis Anfang der 1970er Jahre annahm, als passive Barriere zwischen Gewebe und Blut (Krüger-Genge et al., 2019; Trimm and Red-Horse, 2023), sondern die aktuelle Forschung zeigt, dass Endothelzellen metabolisch hoch aktiv sind. Sie zeigen eine bemerkenswerte Heterogenität in Struktur und Funktion, sowohl räumlich als auch zeitlich, was die Anpassungsfähigkeit des Endothels an unterschiedliche Umgebungen und funktionelle Anforderungen widerspiegelt. So spielen Endothelien eine Vielzahl von Rollen bei der Regulation der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Gewebes (Aird, 2007), der Immunantwort (Shetty et al., 2018), der Hämostase und Koagulation (Yau et al., 2015), der Angiogenese (Chen et al., 2019b), sowie der Regulation der Organgröße und -funktion (Greene et al., 2003; Tirziu et al., 2007). Trotz ihrer wesentlichen Bedeutung wird das diagnostische und therapeutische Potenzial von Endothelzellen erst allmählich erschlossen.

1.3.1 Klassifikation von Endothelzellen

Endothelzellen lassen sich in verschiedene Typen einteilen, abhängig von ihrem Vorkommen in unterschiedlichen Gefäßtypen und Organen. Grundsätzlich werden Endothelien in kontinuierliche, fenestrierte und diskontinuierliche (oder sinusoidale) Endothelien unterteilt (siehe Abb. 4, S. 13). Diese Klassifikation basiert auf der Struktur der Zellschicht und ihrer Durchlässigkeit für Moleküle. Das kontinuierliche Endothel, das in Arterien, Venen und Kapillaren von Organen wie Gehirn, Haut, Herz und Lunge vorkommt, bildet eine dichte Barriere, die den Austausch von Molekülen selektiv reguliert. Die Diffusion von Wasser, kleinen gelösten Stoffen und lipidlöslichen Substanzen in das umgebende Gewebe wird ermöglicht. Größere Moleküle werden durch Transzytose mit spezifischen Transporterproteinen durch die Endothelzellen geschleust. Fenestriertes Endothel, das in Organen mit hoher Filtrationsrate wie den Nieren und endokrinen Drüsen (z.B. Hypophyse oder Schilddrüse) vorkommt, ist durch transzelluläre Poren, welche mit einem Diaphragma bedeckt sind, gekennzeichnet. Diese erleichtern den Transport von Flüssigkeiten und kleinen Molekülen bis hin zu kleinen Peptiden. Das diskontinuierliche (oder sinusoidale) Endothel, das vor allem in sinusoidalen Gefäßbetten wie der Leber zu finden ist, besitzt größere Poren und Lücken, die einen ungehinderten Transport größerer Moleküle, wie auch Plasmaproteine, ermöglichen und eine inkomplette Basalmembran aufweisen. Weiterhin charakteristisch für das sinusoidale Endothel ist eine Verlangsamung des Blutflusses in den Sinusoiden zur Maximierung des Stoffaustausches. Neben der Leber ist diese Art von Endothel auch in Knochenmark, Milz und einigen anderen endokrinen Organen zu finden (Augustin and Koh, 2017).

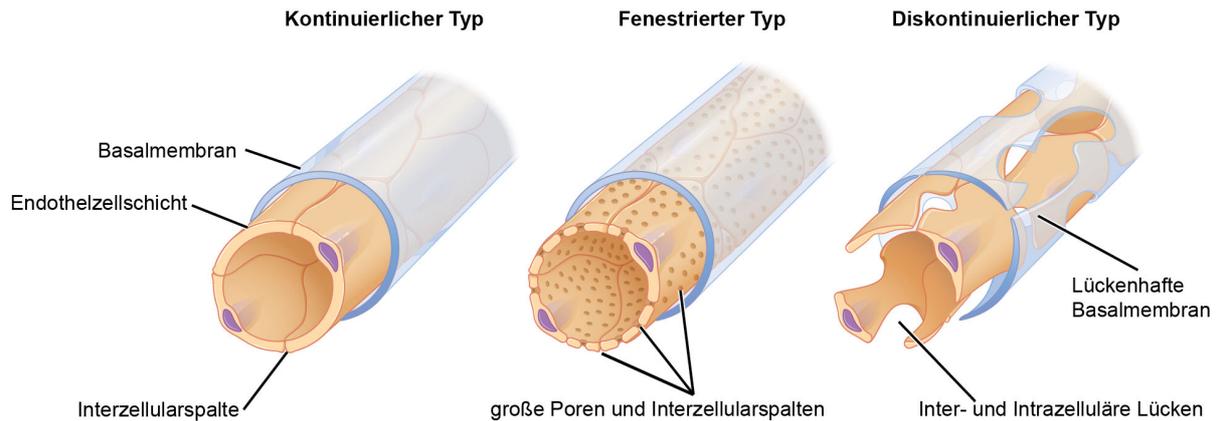


Abb. 4: Klassifizierung der Endothelzellen

Abbildung (CC BY 4.0) übernommen von OpenStax College auf <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=103475564>, abgerufen am 12.09.2024

1.3.2 Organspezifische Heterogenität der Endothelzellen

Die Heterogenität der Endothelzellen zeigt sich deutlich in ihrer Genexpression. Während Endothelzellen von Arterien, Venen und Lymphgefäßen viele gemeinsame Markergene teilen und einander ähnlicher sind, weisen kapilläre Endothelzellen unter dem Einfluss organspezifischer Gewebe deutlich größere Unterschiede auf. Innerhalb der Organgewebe lassen sich spezifische Gruppen anhand von Markergenen identifizieren, die auf ähnliche funktionelle Eigenschaften der Endothelien hindeuten (Kalucka et al., 2020). Durch Single-cell RNA-Sequencing und fortschrittliche Techniken zur Untersuchung der Endothelzell-Heterogenität konnten präzise verschiedene Zellpopulationen in Organen wie Leber, Herz, Lunge und Niere erfasst werden (Trimm and Red-Horse, 2023).

Zu den bekannten pan-endothelialen Markern gehören CD31 (PECAM-1; platelet endothelial cell adhesion molecule-1) (Pusztaszeri et al., 2006), CD54 (ICAM-1; intercellular adhesion molecule-1) (Page and Liles, 2013), CD144 (VE-Cadherin; vascular endothelial-cadherin) (Grant et al., 2021) und Podocalyxin (Doyonnas et al., 2005). Diese Marker werden in fast allen Endothelzellen exprimiert, sind jedoch nicht spezifisch für bestimmte Endothelzellpopulationen. Weitere Marker wie Endomucin-1 (EMCN), das hauptsächlich in venösen und kapillären Endothelien vorkommt (Liu et al., 2001), sowie LYVE-1 (Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1), das vor allem in lymphatischen Endothelzellen exprimiert wird (Carreira et al., 2001), bieten eine gezieltere Differenzierung von Endothelzelltypen.

Während pan-endotheliale Marker eine breite Übersicht über verschiedene Endothelzellpopulationen bieten, ermöglichen organspezifische Marker eine noch detailliertere Differenzierung. Insbesondere in der Leber konnten hochspezifische Marker für Lebersinusendothelzellen (LSEC) identifiziert werden. Stabilin-1 und -2, die in LSEC als wichtige Scavenger Rezeptoren fungieren, spielen eine zentrale Rolle beim Abbau potenzieller Noxen (Schledzewski et al., 2011). Interessanterweise zeigen LSEC ein zonierungsabhängiges Expressionsmuster. EMCN wird sowohl in der Zentralvene als auch weiter in Richtung der Zone 1 des Leberazinus exprimiert, während CD36 ausschließlich in den LSEC der Zone 1 vorkommt (Strauss et al., 2017;

Walter et al., 2014). LYVE-1 wird in den LSEC der Zone 1 schwach exprimiert, erreicht jedoch in Zone 2 seine stärkste Expression, während es auch in Zone 3 noch nachweisbar ist (Carreira et al., 2001; Strauss et al., 2017). Weitere Marker, die spezifisch in den Zonen 2 und 3 exprimiert werden, sind CD14, CD32, CD36 und ICAM-1 (Strauss et al., 2017).

Auch im Herzen findet sich eine Vielzahl von Endothelzellen, sie machen etwa 12 % der Vorhof- und 8 % der Herzkammerzellen aus (Litviňuková et al., 2020). Kardiale Endothelzellen können in fünf Haupttypen unterteilt werden: endokardial, koronararteriell, venös, kapillär und lymphatisch (Ishii et al., 2009). Allgemein exprimieren sie auch panendotheliale Marker wie CD31 und EMCN (Liu et al., 2001; Lother et al., 2018) und können weiter durch Marker wie CD34, CD144 und die endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase (*nitric oxide synthase*; NOS) identifiziert werden (Pratumvinit et al., 2013). Venöse und koronararterielle Endothelzellen sind zusätzlich durch die Expression von Apelin (Apln), dem Apelin-Rezeptor (Aplnr) sowie durch VEGFA und VEGFC (vascular endothelial growth factor a/c) charakterisiert (Quijada et al., 2021).

1.3.3 Angiokrine Signalübertragung durch Endothelzellen

Endothelzellen interagieren aktiv mit dem umgebenden Gewebe sowie den Blutkomponenten und tragen wesentlich zur Aufrechterhaltung der Organhomöostase bei. Dabei spielen sie eine Schlüsselrolle bei der Anpassung an pathologische Veränderungen, indem sie spezifische Signale aussenden und empfangen. Zur Signalübertragung bedienen sie sich angiokriner Faktoren wie Exosomen, EZM-Komponenten, Wachstumsfaktoren und Zytokinen (Augustin and Koh, 2017). Diese Faktoren ermöglichen gezielte Reparaturprozesse, die insbesondere bei Gewebeschäden, Hypoxie oder Ischämie aktiviert werden. Zudem spielen sie eine Rolle in der Kommunikation zwischen verschiedenen Gewebearten und bei der Modulation von Immunantworten (Dor and Keshet, 1997; Rafii et al., 2016).

Zum Beispiel, kommt es nach einer partiellen Hepatektomie zu einer Hochregulation von HGF (*hepatocyte growth factor*) und einer Herunterregulation von TGF β (*transforming growth factor beta*), wodurch die Leberregeneration durch parakrine Mechanismen gesteuert wird (Augustin and Koh, 2017; Nakamura et al., 1984). Zusätzlich wird Wnt2 (*Wingless-type MMTV integration site family, member 2*) verstärkt in den Lebersinusendothelzellen gebildet, was die Bedeutung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs für die Leberentwicklung und -regeneration unterstreicht (Ding et al., 2010; Ober et al., 2006). In diesem Kontext wurde der Transkriptionsfaktor GATA4 als entscheidender Regulator für die Differenzierung der LSEC während der Leberentwicklung und -homöostase identifiziert. Eine Deletion des *Gata4*-Gens in LSEC führt zur Umwandlung des Leberendothels in ein kontinuierliches Endothel und verhindert somit die Ansiedlung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen in der fetalen Leber, was zu einer letalen Anämie führt (Geraud et al., 2017). Eine Ausschaltung des Gens in der reifen Leber führte zu einer Hepatopathie und perisinusoidaler Leberfibrose (Winkler et al., 2021). Auch eine Notch-Signal-Aktivierung im Leberendothel resultierte in einem teilweisen Verlust von LSEC-Markern und einer verstärkten Expression von Markern kontinuierlicher Endothelzellen (CECs), jedoch ohne Ausbildung einer festen Basalmembran oder Fibrogenese (Wohlfeil et al., 2019). Zu den weiteren Angiokinen, die die Leberhomöostase beeinflussen, gehören BMP2, welches eine Rolle in der Eisenhomöostase spielt (Koch

et al., 2017), sowie BMP9, das vor allem von den Sternzellen der Leber und LSEC auf parakrine, hepatokrine und autokrine Weise freigesetzt wird und die Differenzierung des sinusoidalen Endothels unterstützt (Miller et al., 2000).

Im Herzen spielt angiokrine Signalübertragung eine zentrale Rolle bei der Herzentwicklung. Endotheliale Vorläuferzellen differenzieren sich zu Endokardzellen (Milgrom-Hoffman et al., 2011), und durch die Einwirkung von Scherkräften im Blutstrom wird das Gen *KLF2* überexprimiert, was zur Aktivierung des Notch-Signalwegs führt (Li et al., 2020). Dieser Signalweg stimuliert die endothelial-mesenchymale Transformation (EMT) und fördert damit die Umwandlung der embryonalen Endokardkissen in Herzklappen und das Kammerseptum (Chang et al., 2011). Auch bei der Trabekelbildung des Herzens ist der Notch-Signalweg entscheidend: Eine Hemmung des Signalwegs führt zu einer Beeinträchtigung der Trabekelentwicklung, die durch die Hochregulation von Neuregulin-1 wiederhergestellt werden konnte (Grego-Bessa et al., 2007). Neuregulin-1 hat außerdem eine regenerative Wirkung auf Kardiomyozyten, da es unter hypoxischen und ischämischen Bedingungen vermehrt von Endokardzellen und subendokardialen Koronargefäßen produziert wird und die Proliferation von Herzmuskelzellen sowie die Angiogenese stimuliert (Gemberling et al., 2015; Hedhli et al., 2012). Zusammen mit anderen vom Endokard freigesetzten angiokrinen Faktoren wie NO, Endothelin-1, Prostaglandinen und Angiotensin 2 beeinflusst es direkt die Herzarbeit, indem es die Kontraktilität der Kardiomyozyten moduliert (Noireaud and Andriantsitohaina, 2014).

1.4 Wnt/ β -Catenin-Signalweg

Signalwege sind entscheidend für die Regulation von Wachstums-, Differenzierungs- und Überlebensprozessen in Zellen (Hayat et al., 2022; Nusse and Clevers, 2017). Einer der am weitesten verbreiteten und evolutionär konservierten Signalwege ist der Wnt-Signalweg, der eine zentrale Rolle in der Embryonalentwicklung (Li et al., 2022), Geweberegeneration (Raslan and Yoon, 2020) sowie der Karzinogenese spielt (Kato, 2017). Der Wnt-Signalweg lässt sich in drei Haupttypen unterteilen: den kanonischen und den nicht-kanonischen Weg, der wiederum nochmal in den nicht-kanonischen Weg der planaren Zellpolarität und den Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg unterteilt werden. (Hayat et al., 2022). Der nicht-kanonische Signalweg moduliert und reguliert das Cytoskelett und die Zellpolarität (Amin and Vincan, 2012). Im kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg übernimmt das zytoplasmatische Protein β -Catenin eine Schlüsselrolle. Es ist sowohl an der Zelladhäsion beteiligt als auch an der Aktivierung von Genen, die für die Zellproliferation und -differenzierung verantwortlich sind (van der Wal and van Amerongen, 2020). Im Endothel reguliert β -Catenin wichtige Prozesse wie die Angiogenese (Klein et al., 2009) und die Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke (Liebner et al., 2008), was seine zentrale Bedeutung für die Endothelfunktion unterstreicht. Jüngste Studien belegen zudem, dass der Wnt/ β -Catenin-Signalweg eine essenzielle Rolle sowohl in Lebersinusendothelzellen als auch in kardialen Endothelzellen spielt, was auf seine Vielseitigkeit und Bedeutung für die Organentwicklung und Homöostase hinweist (Deb, 2014; Leibing et al., 2018).

1.4.1 Mechanismus der Signalübertragung

Die Signalkaskade des Wnt/ β -Catenin Signalwegs ist ein mehrstufiger Prozess (siehe Abb. 5, S. 16). Im inaktiven Zustand wird β -Catenin durch einen Zerstörungskomplex

aus Axin, APC (adenomatous polyposis coli), GSK-3 β (Glycogen synthase kinase 3 beta) und CK1 (Casein kinase 1) phosphoryliert und dadurch für den Abbau durch Proteasomen markiert. Damit wird die Akkumulation von β -Catenin im Zytoplasma verhindert. Sobald Wnt Liganden an die Rezeptoren Frizzled und LRP5/6 auf der Zellmembran binden, wird der Degradationskomplex durch Rekrutierung von Axin an die Zellmembran destabilisiert (Liu et al., 2022). Die Signaltransduktion erfolgt über Proteine der Dishevelled-Gruppe, die durch Inhibition des APC-Proteins eine Translokation von β -Catenin in das Zytoplasma und den Zellkern initiieren (Parker and Neufeld, 2020; Sharma et al., 2018; Tortelote et al., 2017). Im Zellkern führt es zusammen mit den Transkriptionsfaktoren TCF/LEF zur Stimulation der Expression von Zielgenen (Cadigan and Waterman, 2012).

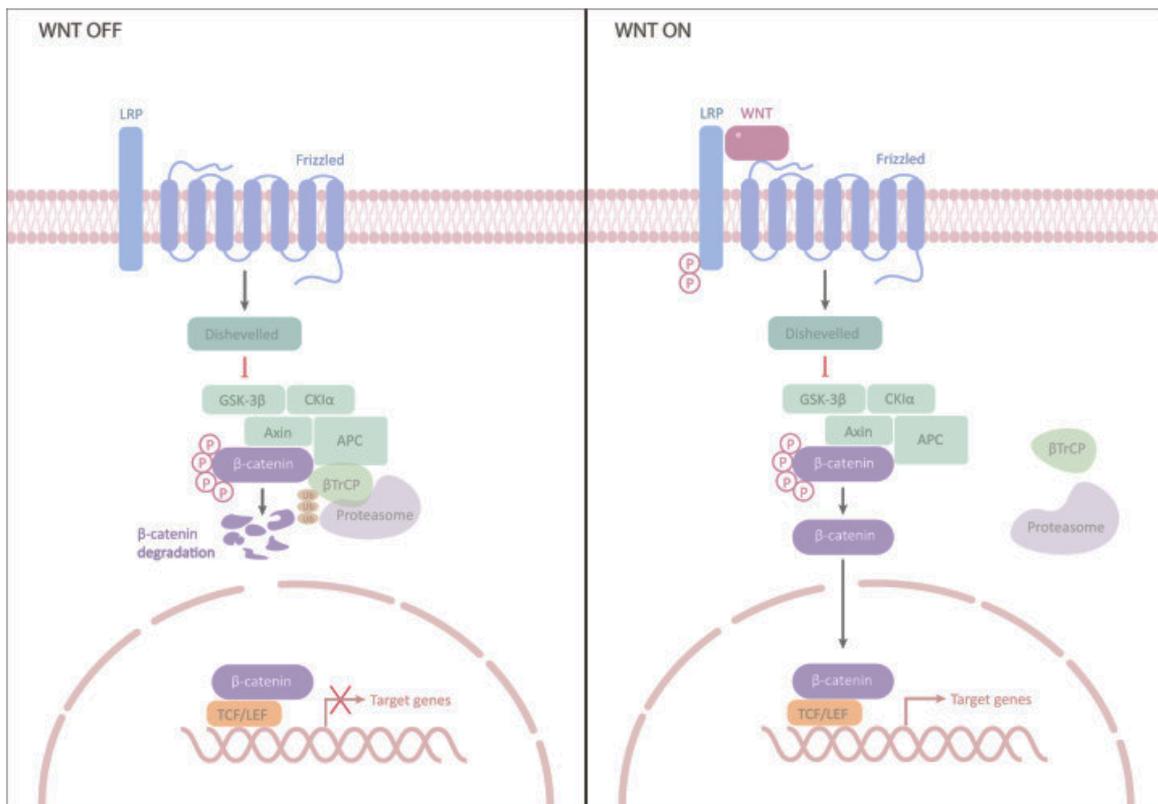


Abb. 5: Der Wnt/ β -Catenin Signalweg

Links: inaktivierter Signalweg ohne Wnt Protein am Frizzled Rezeptor, **rechts:** durch Aktivierung des Frizzled Rezeptors per Wnt Aktivierung des Signalweges und mit TCF/LEF Transkriptionsfaktoren transkription der Zielgene. *Abbildung (CC BY 4.0) aus (Liu et al., 2022)*

1.4.2 β -Catenin als Faktor in der Endotheldifferenzierung

Endothelzellen exprimieren neben Frizzled Rezeptoren auch intrazelluläre β -Catenin-Moleküle sowie die für den Signalweg erforderlichen β -Catenin-abhängigen Transkriptionsfaktoren. Dadurch wird β -Catenin zu einem entscheidenden Regulator für Gene, die an der Bildung und Differenzierung des Gefäßsystems beteiligt sind (Dejana and Kühl, 2010). Eine Erhöhung von β -Catenin in den Endothelzellen des Gehirns erniedrigt die Permeabilität der Gefäße. Experimentell konnte in den eigentlich permeablen Zirkumventrikularorganen, die Expression von Blut-Hirn-Schranken (BBB)-Markern und die Herunterregulation von Nicht-BBB-spezifischen Markern erwirkt werden, was die Durchlässigkeit dieser Endothelzellen herabsetzte (Benz et al., 2019; Wang et al., 2019).

In der Leber aktivieren Endothelzellen β -Catenin in perizentralen Hepatozyten durch die Produktion von Wnt Proteinen. LSEC, Endothelzellen der Zentralvene sowie Makrophagen produzieren Wnt2, während Zentralvenen und Makrophagen zusätzlich Wnt9b freisetzen, um die Zellproliferation zu fördern (Preziosi et al., 2018). Auf diese Weise reguliert β -Catenin die metabolische Zonierung der Hepatozyten und unterstützt die Geweberegeneration (Hu et al., 2022; Leibing et al., 2018). Es wird angenommen, dass β -Catenin hierbei eine Rolle spielt, indem es die Sekretion mitogener Faktoren fördert. In Studien an Mäusen zeigte sich, dass die Deletion des endothelzellspezifischen Transkriptionsfaktors ID1 die Proliferation der Hepatozyten 48 Stunden nach partieller Hepatektomie deutlich beeinträchtigte, was auf eine verringerte Expression der angiokrinen Signale Wnt2 und HGF in LSEC zurückgeführt wurde (Ding et al., 2010).

Im Herzen ist das Endothel entscheidend für die Aufrechterhaltung der Pumpfunktion und die Regulation des kardialen Remodellings (Ozhan and Weidinger, 2015). β -Catenin spielt dabei eine zentrale Rolle in kardialen Endothelzellen und ist, ähnlich wie der Notch-Signalweg, im Rahmen des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs für EMT während der Herzpolsterbildung von Bedeutung. In frühen Entwicklungsstadien wandeln sich endokardiale Zellen in der atrioventrikulären Region des Herzens durch einen TGF- β -abhängigen Prozess in mesenchymale Zellen um, aus denen später die Herzklappen und Teile der Septen entstehen. Studien belegen, dass β -Catenin in dieser Entwicklungsphase unerlässlich ist, um die TCF/Lef-abhängige Transkription zu aktivieren, die für die EMT notwendig ist (Liebner et al., 2004). Mäuse, denen β -Catenin in den Endothelzellen fehlt, zeigen eine stark gestörte Herzpolsterbildung und sterben frühzeitig aufgrund von Herzfehlern (Tian et al., 2010).

1.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Wie aktuelle Studien belegen, sind Endothelzellen nicht nur passive Strukturen im Blutkreislauf und Metabolismus, sondern sie spielen eine aktive Rolle in der Organentwicklung und Homöostase (Augustin and Koh, 2017; Hedhli et al., 2012; Nakamura et al., 1984; Noireaud and Andriantsitohaina, 2014). Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben wichtige Effekte des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in der Leber aufgedeckt (Leibing et al., 2018). Hierbei haben sich Wnt2 und Wnt9b als parakrine Mediatoren aus LSEC als signifikant erwiesen, da sie die Differenzierung und das Wachstum von Hepatozyten fördern, was möglicherweise Auswirkungen auf die Leberregeneration haben könnte (Preziosi et al., 2018). Diese Ergebnisse legen nahe, dass ein ungleichgewichtiges kanonisches Wnt-Signaling in LSEC die Differenzierung dieser Zellen sowie die damit verbundene Leberfunktion beeinträchtigen könnte. Im Herzen konnte gezeigt werden, dass eine Überaktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in den kardialen Endothelzellen zu Herzversagen führen kann (Liebner et al., 2004).

Um diese Interaktionen zwischen Endothelzellen und Organgeweben weiter zu untersuchen, wurde eine Mauslinie entwickelt, die eine konstitutive β -Catenin Überaktivierung in LSEC und kardialen Endothelzellen aufweist. Dazu wurden *Clec4g-iCre^{tg/wt}* mit *Ctnnb1(Ex3)^{fl/fl}* Mäusen gekreuzt. Anschließend wurden die Effekte dieser Überaktivierung auf die Endothelzellsubpopulationen der Leber und des Herzens analysiert, wobei der Fokus auf Organentwicklung und -funktion lag. Die gewonnenen Erkenntnisse könnten als Grundlage für zukünftige therapeutische Ansätze dienen, um endotheliales Signaling gezielt zu modulieren und dadurch chronische Herz- und/oder Lebererkrankungen zu behandeln

1.5.1 Spezifische Ziele der Arbeit

1. Entwicklung eines Mausmodells zur Untersuchung der Auswirkungen einer β -Catenin-Überaktivierung in Lebersinusendothelzellen (LSEC) und kardialen Endothelzellen durch genetische Modifikation.
2. Charakterisierung der molekularen Veränderungen in diesen Organ-spezifischen Endothelzellen
3. Analyse der histologischen und molekularen Veränderungen des Leber- und Herzparenchyms
4. Erforschung der Auswirkungen der β -Catenin-Überaktivierung auf die strukturelle und funktionelle Integrität der Leber und des Herzens

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Primer

Tab. 1: Primer für Genotypisierungen

Genname	Sequenz 5' - 3'
Mm Clec4g-iCre_Fw	AAGCTGAACAACAGGAAATGGTTC
Mm Clec4g-iCre_Rv	GGAGATGTCCTTCACTCTGATTCT
Mm Ctnnb1_Ex3_Fw	GACACCGCTGCGTGGACAATG
Mm Ctnnb1_Ex3_Rv	GTGGCTGACAGCAGCTTTTCT
Mm Rosa26_common_Fw	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT
Mm Rosa26_flox_Rv	AAGACCGCGAAGAGTTTGTC
Mm Rosa26_wt_Rv	GGAGCGGGAGAAATGGATATG

Tab. 2: Primer für quantitative PCRs

Genname	Sequenz 5' - 3'
Mm Bmp2_Fw	TGCTTCTTAGACGGACTGCG
Mm Bmp2_Rv	CACGGCTTCTTCGTGATGGA
Mm Pdgfb_Fw	CTACCTGCGTCTGGTCAGC
Mm Pdgfb_Rv	GCTCAGCCCCATCTTCATCTAC
Mm Apln_Fw	ACTGCAGTTTGTGGAGTGCCA
Mm Apln_Rv	CACTTGGCGAGCCCTTCAAT
Mm CD34_Fw	CTTCTGCTCCGAGTGCCATT
Mm CD34_Rv	AACTCCTCACAAGTAGATGCTTCA
Mm Myc_Fw	TACAACACCCGAGCAAGGAC
Mm Myc_Rv	GAGGCTGCTGGTTTTCCACT
Mm Axin2_Fw	GAGTTATCCAGCGACGCACT
Mm Axin2_Rv	CATGCGGTAAGGAGGGACTC
Mm Stab1_Fw	GAACCCTCCTTCTGCTCTGT
Mm Stab1_Rv	GTCGCAACGTTTAGACCGTA
Mm Stab2_Fw	TCCGGCGTTTTGAGTCAGAAGA
Mm Stab2_Rv	TGTTCTCCAGCTCCCGTTCT

Genname	Sequenz 5' - 3'
Mm Gata4 (EJ6/7)_Fw	GCTCCATGTCCCAGACATTC
Mm Gata4 (EJ6/7)_Rv	ATGCATAGCCTTGTGGGGAC

2.1.2 Antikörper

Tab. 3: Primärantikörper

Name	Katalognummer	Hersteller
Kaninchen Anti-Cav1	N-20	Santa Cruz Biotechnology
Kaninchen Anti-Claudin 5	34-1600	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kaninchen Anti-Collagen Typ I	R1038	Acris, Hiddenhausen, Nordrhein-Westfalen, Deutschland
Kaninchen Anti-Collagen Typ III alpha 1 Kette	R1040	Acris, Hiddenhausen, Nordrhein-Westfalen, Deutschland
Kaninchen Anti-Collagen IV	GTX19808	Genetex, Irvine, CA, USA
Kaninchen Anti-Cyp2E1	HPA009128	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Bavaria, Germany
Kaninchen Anti-Desmin	ab15200	Abcam, Cambridge, Cambs., UK
Kaninchen Anti-Glutamin Synthetase	G2781	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Bavaria, Germany
Kaninchen Anti-Intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1 (ICAM1)	10020-1-AP	Proteintech, Rosemont, IL, USA
Kaninchen Anti-Kollagen Typ I	R1038	Acris, Hiddenhausen, Nordrhein-Westfalen, Deutschland
Kaninchen Anti-Kollagen Typ III alpha 1 Kette	R1040	Acris, Hiddenhausen, Nordrhein-Westfalen, Deutschland

Name	Katalognummer	Hersteller
Kaninchen Anti-Kollagen IV	GTX19808	Genetex, Irvine, CA, USA
Kaninchen Anti-grün fluoreszierendes Protein/gelb fluoreszierendes Protein (YFP)	A11122	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Kaninchen Anti-intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1 (ICAM1)	10020-1-AP	Proteintech, Rosemont, IL, USA
Ratte Anti-CD31	102502	BioLegend, San Diego, CA, USA
Ratte Anti-GATA-4 (Maus/Mensch)	14-9980-82	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ratte Anti-Ki67	14-5698-82	eBioscience, San Diego, CA, USA
Ratte Anti-Maus CD68	137002	BioLegend, San Diego, CA, USA
Ratte Anti-Endomucin	14-5851-82	eBioscience, San Diego, CA, USA
Ziege Anti-Arginase I	sc-18351	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
Ziege Anti-CD32b	AF1460	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Ziege Anti-Lyve1	AF2125	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

Tab. 4: Sekundärantikörper

Name	Katalognummer	Hersteller
Esel IgG anti-Huhn IgG Alexa Fluor 488	703-545-155	DIANOVA GmbH, Hamburg Deutschland
Esel IgG anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor 488	711-545-152	DIANOVA GmbH, Hamburg Deutschland
Esel IgG anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor 647	711-605-152	DIANOVA GmbH, Hamburg Deutschland
Esel IgG anti-Kaninchen IgG Cy3	711-165-152	DIANOVA GmbH, Hamburg Deutschland
Esel IgG anti-Ratte IgG Alexa Fluor 488	712-545-153	DIANOVA GmbH, Hamburg Deutschland
Esel IgG anti-Ratte IgG Alexa Fluor 647	712-605-153	DIANOVA GmbH, Hamburg Deutschland
Esel IgG anti-Ratte IgG Cy3	712-165-153	DIANOVA GmbH, Hamburg Deutschland
Esel IgG anti-Ziege IgG Alexa Fluor 488	705-545-147	DIANOVA GmbH, Hamburg Deutschland
Esel IgG anti-Ziege IgG Alexa Fluor 647	711-605-147	DIANOVA GmbH, Hamburg Deutschland
Esel IgG anti-Ziege IgG Cy3	705-165-147	DIANOVA GmbH, Hamburg Deutschland

2.1.3 Reagenzien, Puffer

Tab. 5: gebrauchsfertige Chemikalien

Name	Hersteller
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Eurobio, Courtaboeuf, Frankreich
Bovines Serumalbumin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dako REAL Antibody Diluent	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Dako Target Retrieval Solution Citrat Puffer pH 6,0 (x10)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Dako Target Retrieval Solution EDTA Puffer pH 8,0 (x10)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA

Name	Hersteller
Dako Target Retrieval SolutionT-EDTA Puffer pH 9,0 (x10)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DFS Taq DNA Polymerase	Bio-Techne, Minneapolis, USA
DNA-Gel-Ladefarbstoff (6x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DNA-Größenmarker GeneRuler™ DNA Ladder Mix (100–10 000 bp)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DNA-Größenmarker GeneRuler™ Plus DNA Ladder (100–3 000 bp)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
dNTP Mix, 2mM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
EDTA 25mM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ethanol 96%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Faramount® Eindeckmedium, wässrig	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Fetales Kälberserum (FCS) 10%	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Flüssigstickstoff	Broser, Frankenthal, Deutschland
Fluoreszenz-Eindeckmedium	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Formaldehyd 37 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
GeneChip™ Hybridisierungs-, Wasch-, und Färbe-Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GeneChip™ WT PLUS Reagenzkit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Geys ausgewogene Salzlösung	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
innuPREP DNA/RNA Mini Kit	Analytik Jena GmbH+Co. KG, Jena, Deutschland
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Name	Hersteller
Mayers-Hämalaun	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaCl Invitrogen™ UltraPure™ (5 M)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nancy-520	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Nonidet™ P 40 Ersatz BioXtra	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Nycodenz A®	Axis-Shield Diagnostics, Dundee, Vereinigtes Königreich
Ölrot-O Stammreagenz	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Paraffin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) (10X), pH 7,4	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pikro-Siriusrot-Lösung 0,1%	MORPHISTO GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Proteinase K (P6556) (10mg/ml)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Reinstwasser	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RNAscope 2.5 HD Assay - RED	Bio-Techne, Minneapolis, USA
RNAscope® Negative Control Probe - DapB	Bio-Techne, Minneapolis, USA
RNAscope® Positive Control Probe - Mm-Ppib	Bio-Techne, Minneapolis, USA
RNAscope® Probe - Mm-Axin2	Bio-Techne, Minneapolis, USA
RNAscope® Probe - Mm-Clec4g	Bio-Techne, Minneapolis, USA
RNAscope® Probe - Mm-Bmp2-E3	Bio-Techne, Minneapolis, USA
RNAscope® Probe - Mm-Hgf	Bio-Techne, Minneapolis, USA

Name	Hersteller
RNAscope® Probe - Mm-Wnt2	Bio-Techne, Minneapolis, USA
RNAscope® Probe - Mm-Wnt9b	Bio-Techne, Minneapolis, USA
RNAscope® Probe - Mm-Stab1	Bio-Techne, Minneapolis, USA
RNAscope® Probe - Mm-Stab2	Bio-Techne, Minneapolis, USA
SDS (Natriumdodecylsulfat) 10 %	Bio-Rad, Hercules, USA
SYBR ® Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sucrose	BioFroxx, Einhausen, Deutschland
Taq-Polymerase-Puffer (10x)	BIORON GmbH, Ludwigshafen, Deutschland
Triglyceride Quantification Colorimetric/Fluorometric Kit	Biovision, Waltham, USA
Triton-X-100	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
TRIS-Acetat-EDTA (TAE) Buffer (2M Tris, 1M Acetat, 50 mM EDTA, pH 8,5) (50x)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-HCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trypanblau-Lösung (0,4 %)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tween®-20	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Hergestellte Reagenzien

Lysepuffer zur DNA-Isolation aus Mäusegewebe

100 mM Tris HCL pH 8,0 - pH 8.5	20 mL
25 mM EDTA	0,4 mL
10% SDS	0,8 mL
200 mM NaCl	8 mL
Reinstwasser ad	200 mL

DNA-Polymerisationslösung

10 mM dNTP Mix	0,4 μ l
Primer (siehe Tabelle 1) je	0,8 μ l
10x PCR Puffer	2 μ l
DFS Taq DNA Polymerase	0,2 μ l
Reinstwasser	14,8 μ l

Agarosegel (1,5 %)

Agarosepulver wurde in einem Erlenmeyerkolben mit 1x TAE-Puffer gemischt und in einer Mikrowelle zum Kochen gebracht, bis es sich vollständig löste. Anschließend wurde der Fluoreszenzfarbstoff Nancy-520 hinzugegeben.

Agarose	1,5 g
1x TAE-Puffer	100 ml
Nancy-520	10 μ l

Hämoglobin Extraktionspuffer

KCN	0,19 g
NaOH	0,4 g
K ₃ [Fe(CN) ₆]	0,33 g
Borsäure	1,25 g
destilliertes Wasser	1 l

MACS Puffer

10 % FCS	10 mL
25 mM EDTA	8 mL
PBS ad	100 mL

Ca²⁺-freies Medium

Tab. 6: Bestandteile Ca²⁺-freies Medium

Substanz	molare Masse [g/mol]	Konzentration Medium [mM]	Ansatz	Für 2 L
L-Asparaginsäure	133,1	0,1	0,83 g/250 mL	8 mL
L-Threonin	119,1	0,2	3 g/100 mL	1,6 mL
L-Serin	105,1	0,3	10,5 g/100 mL	600 µL
Glycin	75,07	0,5	7,5 g/100 mL	1 mL
L-Alanin	89,09	0,6	8,9 g/100 mL	1,2 mL
L-Glutaminsäure	147,1	0,9	1,84 g/250 mL	36 mL
L-Glutamin	146,14	0,9	7,3 g/250 mL	9 mL
D(+) Glucose		20		7,2 g
Fructose	180,2	20	90,1 g/500 mL	40 mL
Sucrose		197		134,8 g
KCl	74,56	3	74,6 g/L	6 mL
NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O	156,01	0,7	39 g/L	5,6 mL
MgCl ₂	203,3	0,5	20,3 g/L	1 mL
HEPES Buffer	238,3	10	59,58 g/250 mL	20 mL
NaHCO ₃	84,01	24	42 g/L	96 mL

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tab. 7: Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
2-teilige Einmalspritzen, verschiedene Größen	B.Braun SE, Melsungen, Deutschland
96-Well-Mikroplatte für PCR	Analytik Jena GmbH+Co. KG, Jena, Deutschland
96-Well-Polystyrol-Microplatte, transparent	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
96-Well-Versiegelungsfolie	GeneOn GmbH, Ludwigshafen, Deutschland
Adhäsionsobjektträger SuperFrost Plus®	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
CryoPure Röhre, 2 ml, QuickSeal Schraubverschluss	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Dako Pen	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Deckgläser (mikroskopisch)	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Einmal-Mikropipetten BLAUBRAND intraMark 20 µL	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Erlenmeyerkolben	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
GeneChip™ Mouse Gene 2.0 ST Array	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
MACS™ LS Säulen	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland
Microvette® 500 Lithium-Heparin, 500 µL	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Mikrotiterplatte 96-Well	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Mikrotomklingen S35	PFM Medical AG, Köln, Deutschland
Nadeln 30G 1/2	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Parafilm® M	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PCR-8er-Kette, 200 µl, verschiedene Farben	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Name	Hersteller
Pierce™ Tissue Strainers, 250 µm	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pipettenspitzen mit Filter, steril	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen TipOne®	Starlab, Hamburg, Deutschland
Plastikkämme für Agarosegelprobetaschen	Bio-Rad, Hercules, USA
Probenkassetten für Paraffineinbettung	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Siebgewebe Polyester Monolen, 250 µm Maschenweite	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Skalpell Cutoff® steril, 11	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tissue-Tek® Cryomold® Kryoeinbettformen	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen am Rhein, Niederlande
Tissue-Tek® O.C.T. Compound	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen am Rhein, Niederlande
Zählkammer Neubauer	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Zentrifugenröhrchen Falcon™, konisch 50 mL	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA

2.1.5 Geräte

Tab. 8: Geräte

Name	Hersteller
Analysenwaage R300S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Cobas c 311 Analyzer	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
NanoPhotometer® NP80	Implen, München, Deutschland
Nukleinsäureamplifikator qPCR System Mx3005P	Agilent Technologies, Santa Clara, USA

Name	Hersteller
Sicherheitswerkbank Laminar flow hood	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Eismaschine AF100	Scotsman Ice, Mailand, Italien
Gasanästhesiesystem XGI-8	Caliper, A PerkinElmer Company, Hopkinton, USA
Gefrierschränke	Sanyo, Osaka, Japan
Gelektrophoresesystem Mupid® One	Advance, Tokyo, Japan
Gelfluoreszenzdetektor Azure Imager C400	Azure Biosystems, Dublin, USA
Homogenisator Precellys® Evolution	Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich
HybEZ™ Hybridisierungssystem	Advanced Cell Diagnostics, Inc., Hayward, USA
Imagingsystem Intas ChemoStar Touch	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Inkubator	Fa. BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Intensilight Epifluoreszenz Illuminator	Nikon, Tokyo, Japan
Inverses Mikroskop Axio Vert.A1	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Kühlschränke	Liebherr, Bulle FR, Schweiz
Kühlplatte 4100	PFM Medical AG, Köln, Deutschland
Kryostat CM3050 S	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
MACS™ MultiStand	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland
Magnetseparator QuadroMACS™	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mikroskop Eclipse Ci	Nikon, Tokyo, Japan
Mikrowelle R-332	Sharp, Osaka, Japan

Name	Hersteller
Motorisiertes Mikroskop Eclipse Ni-E	Nikon, Tokyo, Japan
Nukleinsäureanalysegerät Nanodrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Peristaltische Pumpe Ismatec® REGLO Digital MS-2/6	Cole-Parmer, Vernon Hills, USA
Probenschüttler Vortex	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Probenschwenker Heidolph Polymax 1040	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
T100 Thermal Cycler	Bio-Rad, Hercules, USA
Thermoblock Thermomixer C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ultrasonic 3100 pro	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Vevo 3100 Ultraschall System mit MX700 Sonde	Visualsonics, Toronto, Canada
Vollelektronisches Rotationsmikrotom 3006EM	PFM Medical AG, Köln, Deutschland
Waage PT210	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Wasserbad SW-21	Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Labofuge 400R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge Sorvall RC 5C Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.6 Software

Tab. 9: gebrauchte Software

Name	Version	Hersteller
clusterProfiler Paket für R	3.12.0	(Yu et al., 2012)
ComplexHeatmap Paket für R	3.17	(Gu et al., 2016)
enrichR Paket für R	3.2	(Chen et al., 2013)
fgsea Paket für R	1.10.0	(Korotkevich et al., 2021)
Fiji ImageJ	2.0.0	National Institutes of Health, Bethesda, USA
GraphPad Prism 8	8.4.3	GraphPad Software, Boston, USA
Microsoft Excel	16.72	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft PowerPoint	16.72	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Word	16.72	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Nanodrop 2000/2000c Software		Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nikon NIS Elements AR	5.02	Nikon, Tokyo, Japan
R	3.6.1.	R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich
SAS JMP15 Genomics	10	SAS Institute, Cary, United States
Stratagene MxPro	4.10	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Vevo Workstation	5.5.0	Visualsonics, Toronto, Canada

2.2 Methoden

2.2.1 Tierversuche

Im Zuge dieser Arbeit wurden Versuche an lebenden Tieren durchgeführt. Zusätzlich war ein Opfern der Tiere zur weiteren Analyse, auch nach Abwägung aller Alternativen, unersetzlich. Die Zahlen der Tiere wurden so gewählt, dass eine aussagekräftige Analyse möglich wurde, aber nur die dafür minimal nötige Zahl für Versuche genutzt und geopfert wurde. Dies geschah unter Beachtung aller gängigen Standards zur Minimierung des Leidens der Tiere und von speziell dafür ausgebildetem Personal. Alle Versuche wurden nach Genehmigung des Regierungspräsidium Karlsruhe, Referat 35 (Veterinärwesen, Lebensmittelüberwachung) mit den Aktenzeichen 35-9185.81/G-32/15 und 35-9185.81/G-117/20 unter der Aufsicht des zuständigen Tierversuchsleiters und Kontrolle durch den jeweils zuständigen Tierschutzbeauftragten durchgeführt.

Mauslinien

Die Züchtung von Mäusen mit endothelspezifischer *Ctnnb1*-Überaktivierung (*Ctnnb1*^{OE-EC}) erfolgte über eine Kreuzung von *Clec4g-iCre*^{tg/wt} (*Tg(Clec4g-icre)1.1Sgoe* (Wohlfeil et al., 2019) mit *Ctnnb1(Ex3)*^{fl/wt} (*Ctnnb1*^{tm1Mmt}) (Harada et al., 1999) Mäusen. Die Spezifität der Cre-Aktivität wurde per Kreuzung der transgenen *Clec4g-iCre*^{tg/wt} Mäuse mit *R26YFP* (*B6.129X1-Gt(ROSA)26Sortm1(EYFP)Cos/J*) [JAX 006148] (Srinivas et al., 2001) Reportertieren analysiert.

Tab. 10: Mauslinien

Name	Offizieller Name	Quelle
R26YFP	B6.129X1-Gt(ROSA) ^{26Sortm1(EYFP)Cos/J}	JAX 006148 (Srinivas et al., 2001)
<i>Ctnnb1(Ex3)</i> ^{fl/wt}	<i>Ctnnb1</i> ^{tm1Mmt}	(Harada et al., 1999)
<i>Clec4g-iCre</i> ^{tg/wt}	<i>Tg(Clec4g-icre)1.1Sgoe</i>	(Wohlfeil et al., 2019)

Die Tiere bekamen Standardfutter (ssniffR/M-H autoclavable, V1534-000; Ssniff). Die Haltung erfolgte in einzeln ventilierten Käfigen (Sealsafe plus DGM [Techniplast, Italy] und Streu H0234-20 [Ssniff, Germany]) und einen festen 12 Stunden Tag-/Nachtrhythmus in einer pathogenfreien Umgebung. Zum Enrichment wurden Nierenschalen aus Pappe und Kartonrollen verteilt.

Genotypisierungen

Zur Genotypisierungen wurden entweder Ohrmarkierungsstanzen oder Stücke der Schwanzspitzen benutzt. Nach Tod wurden zur Kontrolle wiederum Schwanzspitzen der Versuchstiere verwendet. Das Gewebe wurde jeweils in einem 1,5 ml Reagenzgefäß mit 50 µL Lysepuffer und 1,5 µL Proteinase K versetzt und bei 56 °C unter konstanter Bewegung über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Proben 3 Minuten unter Raumtemperatur bei 16200 rpm zentrifugiert und es wurde 500 µL Reinstwasser hinzugefügt. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurden die Proben für 10 Minuten auf 95 °C erhitzt. Zuletzt erfolgten weitere 5 Minuten Zentrifugation bei 16200 rpm unter Raumtemperatur. Die isolierte DNA konnte nun gekühlt gelagert oder per Polymerase-Kettenreaktion analysiert werden.

Die Detektion der *Cttnb1* und *iCre* Allele erfolgte über Polymerase-Kettenreaktion mit anschließender Gelelektrophorese zur Visualisation. Für die Zielallele wurde der entsprechende spezifische Primer verwendet und ein µL DNA Probe wurde mit 19 µL DNA-Polymerisationslösung gemischt und im Nukleinsäureamplifikator inkubiert. Gemäß Protokoll wurden die Proben zum Amplifizieren 3 Minuten bei 95 °C, danach 34 Zyklen je 20 s lang bei 95 °C, 30 s bei 60 °C und 45 s bei 72 °C gehalten. Danach wurden sie 5 Minuten bei 72 °C gehalten und nach Kühlung bei 4 °C gelagert. Den fertig amplifizierten Proben wurden 4 µL DNA-Gel-Ladefarbstoff hinzugefügt und eine Gelelektrophorese mit 1,5 %-igen Agarosegel in 1x TAE-Puffer wurde über 30 Minuten bei 100 V durchgeführt. Zur Größenabschätzung der DNA-Banden wurden parallel 5 µL DNA-Größenmarker im Agarosegel laufen gelassen. Per Gelfluoreszenzdetektor wurden mit UV-Licht der Farbstoff angeregt und Bilder aufgenommen.

Organentnahmen

Im Alter von 2-3 Monaten wurden die Tiere mit 5 % Isofluran betäubt und eine retrobulbäre Blutentnahme per 20 µL Micropipette durchgeführt. Hiernach wurde eine zervikale Dislokation durchgeführt. Das entnommene Blut wurde zum Teil in den Micropipetten verschlossen und für die Hämoglobinmessung gebraucht und zum Teil in einer heparinisierten Microvette für 5 Minuten bei 2000 g zentrifugiert und das Plasma als Überstand für die Serologie entnommen. Es wurden Leber, Herz, Gehirn, Nieren, Lymphknoten, Lunge, Bauchspeicheldrüse, Milz, Dünndarm, Beinknochen sowie Fett- und Hautproben entnommen. Die Proben wurden aufgeteilt und entweder direkt in Optimum Cutting Temperature (O.C.T.) Medium eingebettet und in Flüssigstickstoff eingefroren, in 4 % Paraformaldehyd bei 4 °C zur Fixierung und Einbettung in Paraffin gelegt oder in CryoTubes direkt bei -80 °C eingefroren.

2.2.2 Serologie

Das abzentrifugierte Serum wurde in Kooperation mit der Core Facilities Plattform der medizinischen Fakultät Mannheim auf folgende Routinelaborparameter analysiert: Alanin-Aminotransferase (ALT), Aspartat-Aminotransferase (AST), Calcium (Ca²⁺), Cholesteroll (Chol), Glucose (Glc), Glutamatdehydrogenase (GLDH), γ-Glutamyl-Transferase (GGT), Harnstoff (Urea), Kalium (K), Kreatinin (Krea), Natrium (Na⁺), Phosphat (PO₄), Totalprotein (Prot) und Triglyceride (TriGly).

Triglyceridmessung aus Lebergewebe

Zur Messung der Triglyceridmenge im Lebergewebe wurde das Triglyceride Quantification Colorimetric/Fluorometric Kit der Firma Biovision verwendet. Dazu wurde zunächst je ein 100 mg großes Stück der direkt eingefrorenen Lebern im 1 ml 5%-iger NP-40 Lösung homogenisiert und für 5 Minuten in einem Wasserbad bei ca. 100 °C erhitzt. Zum vollständigen Lösen der Triglyceride wurden die Proben wieder auf Raumtemperatur gekühlt und nochmals per Wasserbad erhitzt. Zum Trennen von nicht-löslichem Material wurden die Proben mit einer Mikrozentrifuge über 2 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Nun wurden die Proben zur weiteren Verarbeitung 10-fach mit destilliertem Wasser verdünnt.

Die Triglycerid Standardprobe wurde, ähnlich zum Lebergewebe, zum Wiederauflösen für eine Minute im Wasserbad (100 °C) erhitzt und geschüttelt. Die Triglyceridsonde wurde für 5 Minuten in einem 37 °C heißem Wasserbad erhitzt, damit das enthaltene Dimethylsulfoxid (DMSO) auftauft. Der Enzymmix und die Lipase wurden in jeweils 220 µL Assay Puffer aliquotiert.

Zur weiteren Verarbeitung wurden jeweils 8, 10 oder 20 µL der Proben auf eine 96-Well-Platte verteilt und es wurde mit Triglycerid Assay Puffer auf 50 µL aufgefüllt. Zum Herstellen einer Standardkurve wurde 40 µL des 1 mM Triglyceridstandards mit 160 µL Triglycerid Assay Puffer verdünnt und jeweils 0, 10, 20, 30, 40 und 50 µL des entstandenen 0,2 mM Triglyceridstandards in ein Well verteilt. Somit entstand eine Reihe mit 0, 2, 4, 6, 7, 10 nmol/Well an Triglyceridstandard. Es wurde jeweils 2 µL Lipase zu den Proben und Standards hinzugefügt und nach kurzem Mischen für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hierdurch wurden die Triglyceride in freie Fettsäuren und Glycerol gespalten. Zusätzlich wurde jeweils 4nmol des Triglyceridstandards in die Proben gegeben, um der möglichen Wirkung endogener Substanzen in den Proben auf die Präzision der Messung entgegenzuwirken und jeweils einer weiteren Probe 2 µL Triglycerid Assay Puffer, statt Lipase, hinzugefügt, um auf schon bestehendes Glycerol in den Proben korrigieren zu können.

Pro Well wurde 46 µL Triglycerid Assay Puffer mit 2 µL Triglycerid Sonde und 2 µL Triglycerid Enzym Mix gemischt und hinzugefügt. Nach kurzem Mischen wurde 60 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtschutz inkubiert. Danach konnten die Wells per Photometer bei 570 nm gemessen werden.

Hämoglobinmessung

Zur Messung der Hämoglobinkonzentration der murinen Blutproben wurde zunächst jeweils 1ml Extraktionspuffer in 1,5 ml Reagenzgefäße gefüllt. Aus mit Frischblut gefüllten 20 µL Kapillarröhrchen wurden jeweils 4 µL in die 1,5 ml Reagenzgefäße gefüllt und diese dann einige Sekunden geschwenkt und anzentrifugiert. Jeweils 1 ml der Mischung wurden nun in Küvetten gefüllt und per Spektralphotometer bei 546 nm ausgemessen. Mit einem Umrechnungsfaktor von 36,8 multipliziert ergab sich die Hämoglobinkonzentration in g/dl.

2.2.3 LSEC-Isolation

Die Isolation von sinusoidalen Endothelzellen der Leber erfolgte nach abgeändertem Protokoll von Diehl et al., 2008. Aufgrund der Größen der Lebern und der benötigten Masse zur Isolation auswertbarer LSEC Proben, wurden die Lebern jeweils zweier *Ctnnb1^{OE-EC}* und *Ctnnb1^{WT}* Tiere gepoolt.

Die Mäuse wurden per zervikaler Dislokation getötet und das Abdomen eröffnet. Hier wurden die Portalvene und die untere Hohlvene identifiziert, die Portalvene kannüliert und die untere Hohlvene aufgeschnitten, um die Leber über die eingelegte Kanüle mit 0,05 %-iger Kollagenase in Ca^{2+} -freien Medium mit 2 mL/min Laufrate zu spülen bis das Blut ausgespült war und die Leber weißlich wurde. Danach konnte die Leber aus dem Abdomen entfernt werden und vorsichtig die Gallenblase, möglichst ohne Galle aus ihr zu verteilen, von ihr getrennt werden. Die Leber wurde mit einer chirurgischen Schere in möglichst kleine Teile geschnitten und zusammen mit 15 mL gekühlter Geys ausgewogene Salzlösung (Gey's balanced salt solution; GBSS) in ein 50 mL Falcon Röhrchen gegeben.

Zur Digestion wurde der Mischung 100 μL Kollagenase hinzugefügt und die Mischung für 25 Minuten unter Agitation bei 37 °C inkubiert. Nach den ersten 10 Minuten wurde nochmals 50 μL Kollagenase hinzugefügt. Danach wurde die Zellsuspension durch Siebgewebe mit 250 μm Maschenbreite gegeben, zweimal mit GBSS gewaschen und bei 300 g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abpipettiert und das entstandene Zellkugelchen mit 1 mL GBSS resuspendiert.

Das Volumen der Zellsuspension wurde ermittelt und das 1,23-fache des Volumens an 35 %-iger Nycodenz A in GBSS Lösung hinzugefügt. Die Suspension wurde vorsichtig vermischt und um Austrocknen zu vermeiden mit 500 μL GBSS bedeckt. Anschließend wurde für 25 Minuten bei 1400 g ohne Bremse bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Zellen, welche sich als oberste Schicht des entstandenen Gradienten abgesetzt hatten, wurden abpipettiert und in 4 mL vorher gekühltem MACS Puffer resuspendiert. Mit einer Neubauer Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen dreimal gewaschen. Zwischen den Waschgängen wurde bei 300 g mit 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurden die Zellen mit 90 μL vorgekühltem MACS Puffer pro 10^7 Zellen resuspendiert und mit 10 μL Anti-LSEC (CD146⁺) Beads pro 10^7 Zellen vermischt und für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Mischung wurde mit 2 mL MACS Puffer versetzt und wieder für 10 Minuten bei 300 g und 4 °C zentrifugiert. Eine Separationssäule wurde in einen MACS Separator gesetzt und mit 3 mL MACS Puffer gespült. Die Zellen wurden mit 500 μL MACS Puffer versetzt, in die Separationssäule gegeben und dreimal mit 3 mL MACS Puffer gespült. Die gespülte Flüssigkeit wurde gesammelt. Die Säule wurde dann aus dem Separator entfernt, 5 mL auf die Säule gegeben und die Mischung mit einem passenden Kolben in ein 15 mL Falcon Röhrchen gedrückt. Ein letztes Mal wurde die Suspension bei 300g bei 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert und aus den Proben RNA extrahiert und weiter zu cDNA verarbeitet.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

RNA-Extraktion

Zur RNA-Extraktion wurde das innuPREP DNA/RNA Mini Kit der Firma analytik jena benutzt. Hier wurde auf RNase-freie Umgebung und zwischen den Extraktionsschritten auf ständige Kühlung der Proben geachtet.

Zuerst wurden 400 μL Lyselösung *RL* auf das Zellpellet gegeben und 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, dann das Pellet mit der Pipette resuspendiert und weitere 3 Minuten inkubiert. Unlysiertes Material wurde nun per Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für eine Minute bei Raumtemperatur herunter zentrifugiert. Danach konnte der Überstand auf einen, in einem Empfängerröhrchen platzierten, Spin Filter *D* transferiert werden und bei 10 000 g für 2 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert werden. Die genomische DNA im Spin Filter *D* konnte separat für DNA Extraktion weiterverarbeitet werden. Das Filtrat wurde nun mit dem gleichen Volumen (ca. 400 μL) 70 %-igem Ethanol versetzt und mit der Pipette vermischt. Dann wurde das Gemisch auf einen Spin Filter *R* in einem neuen Empfängerröhrchen transferiert, wieder bei 10 000 g für 2 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das neue Filtrat wurde verworfen und der Spin Filter *R* auf ein neues Empfängerröhrchen gesetzt. Es wurden 500 μL Waschlösung *HS* zum Spin Filter *R* hinzugefügt und bei 10 000 g für eine Minute zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen, der Spin Filter *R* wieder auf das Empfängerröhrchen gesetzt und, nach Zugabe von 700 μL Waschlösung *LS* auf den Filter gegeben, abermals für eine Minute zentrifugiert. Das Filtrat wurde wieder verworfen und es wurde nochmals bei 10 000 g für 2 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, um letzte Ethanolreste zu beseitigen. Zuletzt wurde der Spin Filter *R* auf ein Auswaschröhrchen gesteckt und mit 20-80 μL RNase-freiem Wasser ausgewaschen. Nach Inkubation für eine Minute bei Raumtemperatur wurde ein letztes mal mit 6 000 g für eine Minute zentrifugiert. Die entstandenen RNA Proben wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Die Reinheit der RNA wurde per NanoDrop 2000 durchgeführt. Hier wurde 1 μL Probe genommen und der Quotient aus Absorptionen bei 260 und 280 nm Wellenlänge ermittelt. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Absorption bei 260 nm Wellenlänge gemessen.

cDNA-Synthese

In einem RNase-freien Reagenzröhrchen wurde 1 μg RNA mit 1 μL Primer und 1 μL dNTP Mix vermischt und mit RNase-freiem Reinstwasser auf 14,5 μL aufgefüllt, kurz anzentrifugiert und für 5 Minuten bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Dann wurden die Proben auf Eis gekühlt und wieder kurz zentrifugiert. Nun wurden 4 μL 5X Reverse Transkriptase Puffer, 0,5 μL RNase Inhibitor und 1 μL Maxima Reverse Transkriptase hinzugefügt und das Gemisch kurz anzentrifugiert. Anschließend wurde für 30 Minuten bei $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert und zur Termination der Reaktion für 5 Minuten auf $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgeheizt. Die entstandenen DNA Proben wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

quantitative Echtzeit-PCR (*quantitative real-time PCR*; qRT-PCR)

Extrahierte cDNA wurde im Verhältnis 1:10 in Reinstwasser verdünnt und 1,8 µL wurden mit jeweils 2,4 µL Forward- und Reverse-Primer, 17 µL SYBR® Green PCR Master Mix und 9 µL Reinstwasser vermischt. Pro Probe wurden je drei Replikate amplifiziert. Im Thermocycler wurde die Polymerase bei 95 °C für 10 Minuten aktiviert und 50 Zyklen von Erhitzung auf 95°C für 15 Sekunden zur Auftrennung der DNA-Doppelstränge und Abkühlung auf 60 °C für eine Minute zur Hybridisierung der Primer und Elongation durchgeführt. Zur anschließenden Schmelzkurvenanalyse wurden die Proben auf 95 °C erwärmt und langsam abgekühlt. Damit konnten unspezifische Amplifikate ausgeschlossen werden. Zielparameter waren der Ct-Wert von Kontroll- und Versuchsgruppe und relative Quantifizierung des Zielgens („Fold change“ als Verhältnismaß der Genexpression zwischen Mutanten und Kontrollen) in Relation zum Haushaltsgen β -Actin. Normalisierte Genexpressionswerte wurden per Pfaffl-Methode berechnet (Pfaffl, 2001).

Microarray

Genexpressionsanalysen wurden mit den GeneChip™ Mouse Gene 2.0 ST Arrays der Firma Affymetrix (mittlerweile zu Thermo Fisher Scientific gehörig) durch Carolina de la Torre aus dem Bioinformatics Team der Next Generation Sequencing Core Facility der Universitätsmedizin Mannheim erstellt. Biotynilierte Antisense-cDNA und Array Hybridisierung wurden nach Herstellerangaben mit dem GeneChip™ WT plus Reagenz-Kit und dem GeneChip™ Hybridisierungs-, Wasch- und Färbe-Kit der Firma Thermo Fisher Scientific angefertigt. Eine angepasste Datei (Chip Description File; CDF Version 22) mit auf ENTREZ basierenden Gendefinitionen wurde zur Annotation benutzt und mit Robust Multiarray Analyse eine Hintergrundkorrektur, sowie eine Datennormalisierung per quantiler Normalisierung durchgeführt.

Unterschiede in der Genexpression wurden per univariater Varianzanalyse (ANOVA) analysiert und eine falsch-positiv Rate von 0,05 mit Korrektur für die Falscherkennungsrate (False Discovery Rate; FDR) als Signifikanzniveau gesetzt.

Zur Identifikation von Gensets mit statistisch signifikant veränderter Expression wurde eine Gene Set Enrichment Analyse (GSEA) durchgeführt. Hierzu wurden die clusterProfiler und fgsea Pakete für R und die Molecular Signatures Database (MSigDB) Hallmark Gene Set Kollektion und eine selbst definierte Genliste verwendet. Genlisten für Gene von LSEC und kontinuierlichen Endothelzellen wurden durch unsere Arbeitsgruppe bereits veröffentlicht (Winkler et al., 2021), Sets bezüglich Hirnendothelzellen wurden mit bereits veröffentlichten single-cell RNA Sequenzierungsdaten aufgestellt (Sabbagh et al., 2018). Einschlusskriterien waren eine mindestens 2-fache Veränderung für Hirn- versus lebersinusoidale Endothelzellen und mindestens 10 Transkripte pro Million in LSEC, um weniger häufig exprimierte Gene herauszufiltern. Überrepräsentationsanalysen (Overrepresentation Analysis; ORA) durch Gene Ontology definierter Bezeichnungen wurden mit EnrichR bei allen signifikant regulierten Genen durchgeführt. Die Rohdaten und die normalisierten Genexpressionsdaten wurden im NCBI Gene Expression Omnibus hinterlegt und sind unter der GEO Series Accession Nummer GSE175777 verfügbar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE175777>).

2.2.5 Klassische Histochemie

Standardfärbungen

Die Gewebeproben wurden mit 4%-igem Paraformaldehyd bei Raumtemperatur über 48 bis 72 Stunden fixiert. Hiernach wurden sie in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (phosphate-buffered Saline; PBS) gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Es folgte eine Einbettung in Paraffin. Das eingebettete Gewebe konnte nun in 4 µm dicke Sektionen geschnitten und auf einen Objektträger transferiert werden. Nach mindestens einer Stunde (oder maximal über eine Nacht) Inkubationszeit bei 60 °C in einem Inkubator wurden die Schnitte rehydriert. Dafür wurden sie dreimal 5 Minuten in ein Xylolbad (100 %), zweimal in 100%-iges Ethanol, und jeweils einmal in 90 %-, 80 %- und 70 %-iges Ethanol und PBS in ebendieser Reihenfolge getaucht. Nun konnten die Schnitte gefärbt werden.

Die Hämatoxylin & Eosin- (H&E), Sirius Rot- (SR), Berliner Blau- (BB) und Periodic acid-Shiff-Färbungen (PAS) wurden in Kooperation mit dem Pathologischen Institut der Universitätsmedizin Mannheim durchgeführt.

Ölrot-O Färbung

Für die Ölrot-O Färbung nach Romeis (Oertel, 1990) wurde zunächst eine Gebrauchslösung erstellt. Dafür wurde Stammlösung (0,5 g Ölrot-O in 100 mL 99 %-igem Isopropanol) in einem Verhältnis von 6:4 mit Reinstwasser gemischt und 24 Stunden stehen gelassen. Kurz vor Gebrauch wurde die Gebrauchslösung gefiltert. Es wurden frisch geschnittene getrocknete Gefrierschnitte mit 7 µm Dicke erstellt. Diese inkubierten für 5 Minuten in 60 %-igem Isopropanol bei Raumtemperatur und anschließend 10 Minuten bei Raumtemperatur in der Gebrauchslösung. Zur Differenzierung wurden die Schnitte nochmals in 60 %-iges Isopropanol getaucht und dann kurz in Reinstwasser getaucht. Danach wurde eine Kernfärbung mit Hämalaun (1:10 in Reinstwasser gelöst) durchgeführt, hier wurde 7 Minuten inkubiert und im Anschluss eingedeckt.

2.2.6 Immunhistochemie

Immunfluoreszenz

Paraffin-fixiertes Gewebe wurde mit einem Rotationsmikrotom geschnitten und über Nacht bei 60 °C im Ofen gebacken. Die Schnitte wurden nun einer Alkoholreihe zum Entfetten unterzogen. Dazu wurden sie zuerst drei Mal 5 Minuten in 100 %-iges Xylol, dann zwei Mal 3 Minuten in 100 %-igem Ethanol, und zuletzt jeweils 3 Minuten in 90 %-, 80 %-, 70 %-igem Ethanol und in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (Phosphate-buffered Saline, PBS) getaucht. Je nach Erstantikörper wurde zur Erhöhung der Antigenizität entweder bei 95 °C 45 Minuten in Citratpuffer mit pH 6,0, oder 30 Minuten in EDTA- (pH 8,0) oder T-EDTA-Puffer (pH 9,0) inkubiert und anschließend 20 Minuten in PBS abgekühlt. Zur besseren örtlichen Eingrenzung der folgenden Reagenzien auf den Schnitten wurde eine hydrophobe Barriere um die einzelnen Gewebeproben gezeichnet und danach zweimal 3 Minuten in PBS gewaschen.

Cryokonserviertes Gewebe wurde mit einem Kryotom geschnitten und auf einen Objektträger gebracht, dann wurde eine hydrophobe Barriere um das Gewebe gezogen und der Schnitt in PBS gewaschen.

Bis zu drei Primärantikörper wurden nun, je nach Zielproteinen und passenden verfügbaren Ursprungsspezies, in der vom Hersteller spezifizierten Verdünnung in PBS aufgebracht und über Nacht inkubiert gelassen werden. Danach wurden die Schnitte wiederum dreimal 5 Minuten in PBS gewaschen und die Sekundärantikörper inklusive 4',6-diamidin-2-phenylindol (DAPI) zur Kernfärbung appliziert und für eine Stunde inkubiert werden. Zum Schluss wurde ein letztes Mal für 3 Minuten mit PBS gewaschen und mit Fluoreszenz-Eindeckmedium eingedeckt.

RNA-in-situ-Hybridisierung

Zur RNA-in-situ-Hybridisierung (ISH) wurde das RNAScope™ 2.5 HD Kit der Firma Bio-Techne benutzt. Paraffin-fixierte Gewebeschnitte mit 4 µm Dicke wurden für eine Stunde bei 60°C gebacken und zum Entparaffinieren zweimal für 5 Minuten in Xylol und zweimal 2 Minuten in 100 %-igen Ethanol gebadet. Anschließend wurden die Schnitte für 5 Minuten bei 60 °C luftgetrocknet und mit jeweils 5 Tropfen Wasserstoffperoxid bedeckt. Es wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zweimal für eine Minute in destilliertem Wasser gewaschen. Zur Aufdeckung der Zielstrukturen wurden die Schnitte für 15 Minuten bei 99 °C in RNAScope™ Target Retrieval Lösung gekocht, dann 15 Sekunden in destilliertem Wasser, für 3 Minuten in 100 %-igem Ethanol gebadet und wieder für 5 Minuten bei 60 °C luftgetrocknet. Eine hydrophobe Barriere wurde mit entsprechendem Fettstift um die Schnitte gezeichnet. Nach Trocknen der Barriere wurden jeweils 5 Tropfen RNAScope™ Protease Plus auf die Schnitte gegeben und diese für 30 Minuten bei 40 °C inkubiert, wonach sie wiederum kurz in destilliertem Wasser gewaschen wurden. Die Sonden wurden für zwei Stunden bei 40 °C und die Amplifikatoren nach Herstellerangaben hybridisiert.

Für diese Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) wurde das Signal nach Herstellerangaben entwickelt. Es erfolgte eine Kernfärbung mit DAPI und die Eindeckung mit passendem Fluoreszenz Eindeckmedium.

Für die reguläre In-situ-Hybridisierung (ISH) erfolgte die Signaldetektion per Inkubation mit 100 µL einer RED-B und RED-A Mischung für 10 min bei Raumtemperatur und anschließendem dreimaligem Waschen mit destilliertem Wasser. Die Gegenfärbung erfolgte mit 1:2 in destilliertem Wasser verdünnter Hämalaunlösung.

2.2.7 Bildgebung

Hellfeldmikroskopie

Schnitte, welche konventionell, also ohne Fluorophorbindung, gefärbt wurden, wurden mit einem Lichtmikroskop ECLIPSE Ci mit softwaregestützter Belichtung und Weißabgleich fotografiert.

Fluoreszenzmikroskopie

Immunfluoreszenz-gestützte Mikroskopie erfolgte mit dem ECLIPSE Ni-E Mikroskop. Die Belichtungszeit mit der passenden Exzitationswellenlänge wurde für jedes Fluorophor einer Färbeserie kalibriert und gespeichert. Eine Serie von in der Z-Achse verschobenen Bildern wurde aufgenommen und mit der NIS-Elements Anwendung bearbeitet. Die Bilder wurden Hintergrund-korrigiert, dekonvuliert und auf eine Bildebene fokussiert.

Quantifizierung

Zur Auswertung der histologischen Bilder wurde Fluoreszenz-gestützte Bilder entweder der durchschnittliche Grauwert (Mean Gray Value in der ImageJ Software) als indirekter Messwert für die Intensität oder die Zellzahl quantifiziert. Bei Bildern, die per Hellfeldmikroskopie aufgenommen wurden, wurde zur indirekten Intensitätsmessung der Anteil der Pixel mit Farbpartikel an den gesamten Bildpixeln gemessen (Area Fraction in der ImageJ Software). Für jede Auswertung wurden pro Schnitt drei repräsentative Bereiche abfotografiert und die Messwerte gemittelt.

Die Quantifizierung der Immunfluoreszenzbilder erfolgte zunächst über ein Aufteilen der Bilder in die aufgenommenen Farbkanäle in der ImageJ Software. Nun konnte entweder direkt der durchschnittliche Grauwert gemessen werden oder zur Auszählung der Zellen aus dem DAPI-Kanal eine Maske generiert werden, um sie über den Kanal mit der auszuwertenden Färbung zu legen. So konnte Hintergrundsignal und größere Partikel rausgefiltert und nur die positiven (IF-gefärbten) Zellen automatisiert gezählt werden.

Zur Quantifizierung der Hellfeld-Bilder wurden mit der ImageJ Software zunächst am Bild manuell die drei Farben des Hintergrunds, der Gegenfärbung und des Zielsignals definiert und das Bild nach ihnen aufgeteilt. Bei dem Kanal mit dem Zielsignal konnte, nach Setzen einer Filterschwelle zum Rausfiltern von Hintergrundsignal, die Area fraction gemessen werden.

2.2.8 Echokardiographie

Die Echokardiographien der lebenden Mäuse wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe für kardiovaskuläre Physiologie des European Center for Angioscience (ECAS) der medizinischen Fakultät Mannheim durchgeführt. Die Mäuse wurden dazu zuerst mit 0,5-1,0 % Isofluran sediert. Als Nächstes wurden sie zur Erhaltung der Körpertemperatur auf eine Wärmeplatte gelegt und die Pfoten zur besseren Erreichbarkeit des Thorax mit Klebeband an der Platte fixiert. Es wurde eine nicht-invasive, trans-thorakale Echokardiographie durchgeführt und die Parameter mit einer linearen 50MHz Sonde aufgezeichnet. Dies erfolgte in parasternaler Längsachse in B- & M-Modus. Nach Verarbeitung wurde Herzfrequenz, posteriore und anteriore Wanddicke des linken Ventrikels, sowie enddiastolischer und endsystolischer Durchmesser des linken Ventrikels gemessen. Hieraus wurden das Volumen und die Ejektionsfraktion des linken Ventrikels und das Herzzeitvolumen berechnet.

2.2.9 Statistik

Statistische Analysen wurden mit der SigmaPlot 11 (Systat Software GmbH, Germany) und Prism 9 (GraphPad Software, USA) Software durchgeführt. Für Analysen normalverteilter Stichproben wurde der Zweistichproben-t-Test gebraucht, für nicht-normalverteilte der t-Test nach Satterthwaite. Der Pearson Chi-Quadrat-Test wurde für die Analyse der Allelfrequenz der geborenen Mäuse verwendet. Der Mann-Whitney-U-Test wurde für zur Analyse der ΔCt -Werte der qRT-PCR genommen. Ein P-Wert von $<0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen. Die Balken in Abbildungen zeigen den Standardfehler, sofern nicht anders gekennzeichnet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Generierung endothelialer β -Catenin-Überaktivierung am Mausmodell

Um ein Mausmodell mit Überaktivierung der Wnt-/ β -Catenin-Signalweges in Leber- und Herzendothelien zu erzeugen, wurde die *Cre*-transgene Mauslinie unter dem Einfluss des endothelzellspezifischen *Clec4g*-Promotors (Wohlfeil et al., 2019) mit einer Mauslinie gekreuzt, in der das Exon3 des *Ctnnb1* Gens von *loxP*-Sequenzen flankiert wird. Genauer gesagt wurden *Clec4g-iCre^{tg/wt}* Mäuse mit homozygoten *Ctnnb1(Ex3)^{fl/fl}* Mäusen gekreuzt, um *Clec4g-iCre^{tg/wt};Ctnnb1(Ex3)^{fl/wt}* Nachkommen zu produzieren, die als *Ctnnb1^{OE-EC}* bezeichnet wurden. (siehe Abb. 6, S. 43)

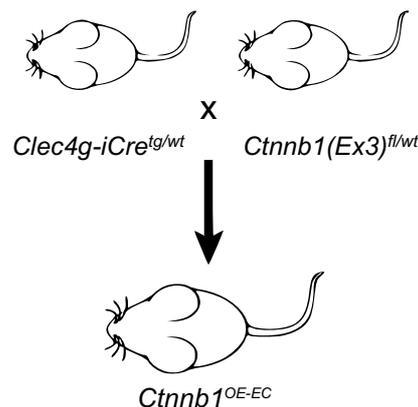


Abb. 6: Kreuzung der Versuchstiere

Die Kreuzung einer *Clec4g-iCre^{tg/wt}* Maus, welche unter spezifischem *Clec4g*-Promotor heterogen *Cre* exprimiert (Wohlfeil et al., 2019), mit einer *Ctnnb1(Ex3)^{fl/wt}* Maus, welche ein heterogen mit *loxP*-Site „gefloxtes“ Exon 3 des β -Catenin trägt (F0-Generation – oben). Ergebnis ist eine neue *Ctnnb1^{OE-EC}*benannte Mauslinie mit einer Mutation mit Überexpression von β -Catenin aufgrund von Exzision der Exon 3 Region durch die *Cre*-Rekombinase in den *Clec4g*-exprimierenden Endothelzellen (F1-Generation - unten).

Die Aktivierung der *Cre*-Rekombinase in den *Clec4g* exprimierenden Endothelzellen führte zur Deletion von Exon 3 des β -Catenin-Gens, das daraufhin konstitutiv aktiv wurde. Da sich das Fehlen dieses Exon 3 als molekularbiologisch schwer nachweisbar erwies, konnte die endothelzellspezifische β -Catenin-Überaktivierung nur indirekt bestätigt werden. Dazu wurden Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen von *Clec4g* und dem *Axis Inhibition Protein (Axin2)* durchgeführt und eine erhöhte Positivität des Gens für das *Axin2* in *Clec4g*-positiven Leberendothelzellen von *Ctnnb1^{OE-EC}*-Mäusen festgestellt. *Axin2* ist nämlich im Wnt/ β -Catenin-Signalweg dem β -Catenin nachgeschaltet. Um die tatsächliche Geninduktion von *Axin2* in den Leberendothelien zu messen, wurden LSEC aus *Ctnnb1^{OE-EC}* Mäusen isoliert und in diesen mittels qPCR eine signifikant erhöhte Expression von *Axin2* nachgewiesen (siehe Abb. 7, S.44). Als Kontrolltiere wurden in dieser Arbeit *Clec4g-iCre^{wt/wt};Ctnnb1(Ex3)^{fl/wt}*, im Folgenden als *Ctnnb1^{WE}* bezeichnet, verwendet.

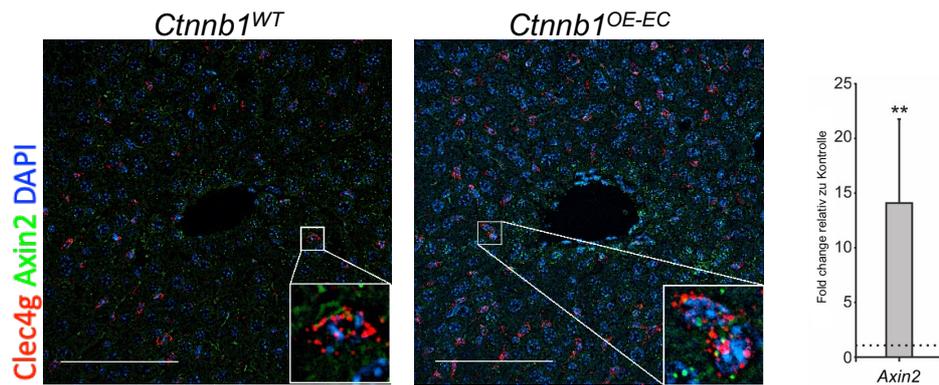


Abb. 7: Bestätigung der β -Catenin Überaktivierung per FISH und qPCR aus LSEC isoliert aus $Ctnnb1^{OE-EC}$ Mäusen

Links: FISH von *Axin2* und *Clec4g* in der sich mehr *Axin2* in *Clec4g*-positiven Leberendothelzellen bei den $Ctnnb1^{OE-EC}$ Tieren zeigte. DAPI als Zellkernfärbung in blau (Weibchen; n =3). Maßstabsbalken: 100 μ m Rechts: qRT-PCR für das Gen *Axin2* aus Lebersinusendothelzellen der $Ctnnb1^{OE-EC}$ - und Kontrolltiere. Fold change relativ zum Haushaltsgen (englk. housekeeping gene) β -Actin (Weibchen; n=3). **p < 0.01.

3.2 Populationsbiologie und makroskopischer Phänotyp der generierten Mauslinien

3.2.1 Allelfrequenzen

Nach Kreuzung der *Clec4g-iCre^{tg/wt}* mit der auf Exon 3 geflochtenen *Ctnnb1* Mauslinie (*Ctnnb1(Ex3)^{fl/wt}*) wurden lebensfähige $Ctnnb1^{OE-EC}$ (*Clec4g-iCre^{tg/wt};Ctnnb1(Ex3)^{fl/wt}*) Mäuse geboren. Die Frequenz der entstandenen $Ctnnb1^{OE-EC}$ Mäuse war gegenüber den restlichen Allelkombinationen der F1 Nachkommen vermindert (siehe Abb. 8, S.44) . Hier wurde nach Hardy-Weinberg-Gesetz eine Frequenz von jeweils 25% angenommen. Die Allelfrequenzanalyse ergab eine signifikante Abweichung mit einem χ^2 -Wert von 31,705 und einem p-Wert < .00001.

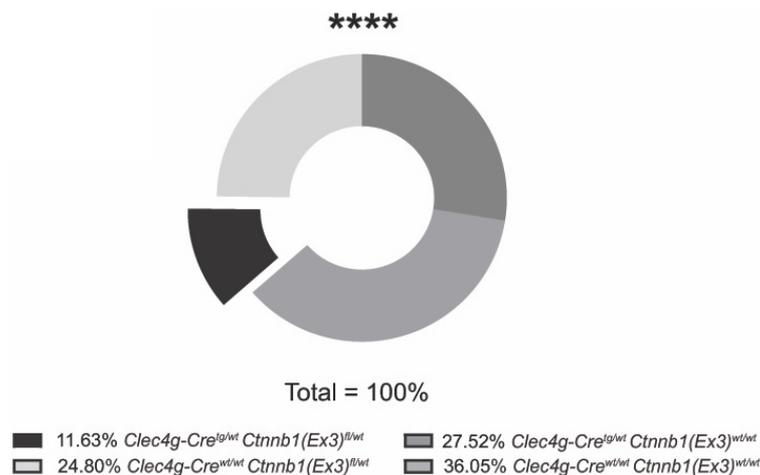


Abb. 8: Mendel'sche Frequenzen F1-Generation

Auswertung der Allelfrequenzen der generierten Mäuse. Auswertung per Chi-Quadrat-Test und ****p < 0.0001 (n=258).

3.2.2 Überlebensraten

Die *Ctnnb1^{OE-EC}* Mauslinie zeigte insgesamt eine signifikant verminderte Überlebensrate bei beiden Geschlechtern. Wie in der Kaplan-Meier-Kurve ersichtlich, erreichten 50 % der weiblichen und männlichen *Ctnnb1^{OE-EC}* Tiere ein Alter von weniger als 100 Tagen (siehe Abb. 9, S. 45). Viele Tiere starben pro Wurf kurz nach der Geburt und wurden nicht genotypisiert, sodass diese nicht in die Kurve eingingen. Das älteste beobachtete Tier erreichte ein Alter von 175 Tagen.

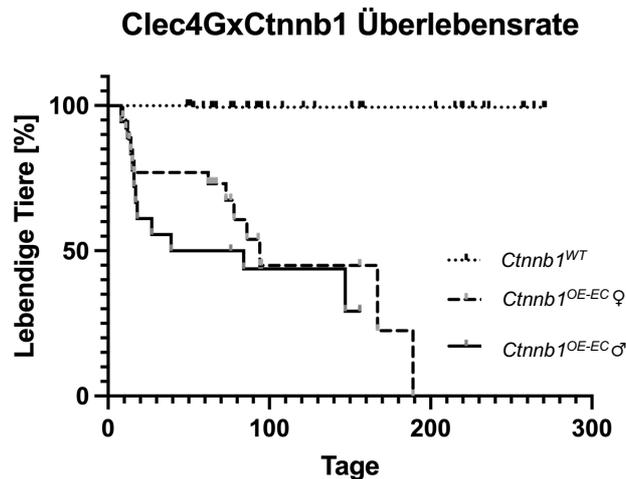


Abb. 9: Überlebensraten

Kaplan-Meier-Kurven der *Ctnnb1^{OE-EC}* (aufgeteilt nach Geschlecht) und *Ctnnb1^{WT}* Mäuse. **** $p < 0.0001$ (*Ctnnb1^{OE-EC}* Weibchen; $n = 26$; *Ctnnb1^{OE-EC}* Männchen; $n = 18$; *Ctnnb1^{WT}*: $n > 65$).

3.2.3 Körper- und Organgewichte

Trotz des vorzeitigen Todes, jedoch aufgrund der etablierten Labormethoden, die hauptsächlich auf 3 Monate alte Tiere ausgerichtet sind, wurde zur Wahrung der Homogenität der Ergebnisse festgelegt, adulte Mutanten und Kontrollmäuse im Alter von 3 Monaten sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch zu untersuchen. Das Körpergewicht bei Messungen 3 Monate alter *Ctnnb1^{OE-EC}* Tiere war im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert. Die makroskopische Beurteilung der Organe Herz und Leber zeigte bereits deutliche Größenunterschiede der *Ctnnb1^{OE-EC}* Mauslinien im Vergleich zu den *Ctnnb1^{WT}* Kontrollen (siehe Abb. 10A, S.46). Diese Beobachtung wurde zum Teil auch durch die Organmessungen bestätigt (siehe Abb. 10B-F, S.46). Das Herzgewicht und das Verhältnis Herz zu Körpergewicht waren bei beiden Geschlechtern signifikant erhöht. Dagegen zeigten die Körpergewichte, die Lebergewichte und teilweise die Leber-Körpergewichtsverhältnisse keine signifikanten Veränderungen. Lediglich die Lebergewichte der weiblichen *Ctnnb1^{OE-EC}* Tiere zeigten eine statistisch signifikante Verminderung.

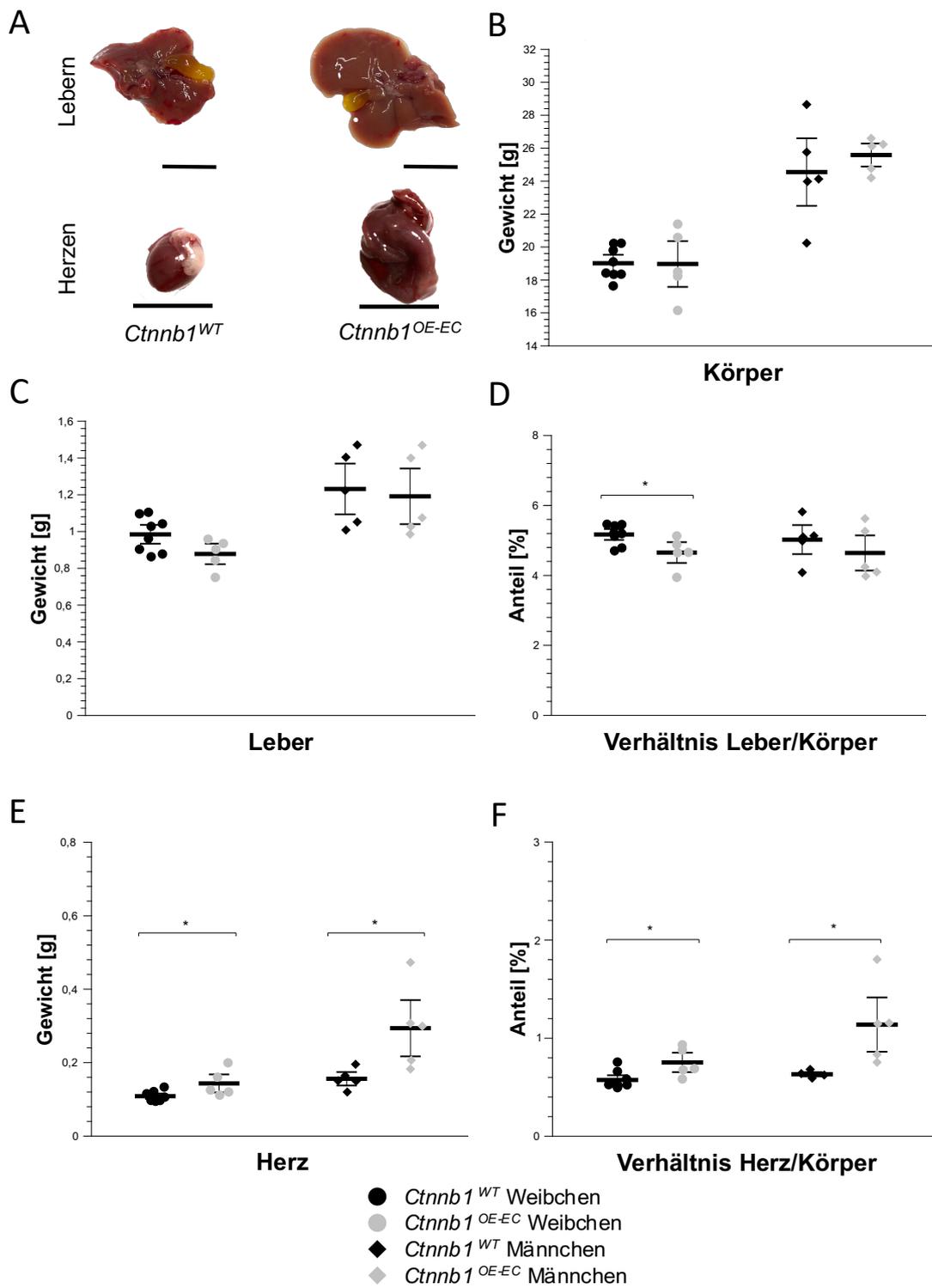


Abb. 10: Makroskopische Bilder von Herz und Leber sowie Körper- und Organgewichte

A: Makroskopische Ansicht von exemplarischen Lebern und Herzen von *Ctnnb1*^{WT} und *Ctnnb1*^{OE-EC} Weibchen. Maßstab: 1 cm. **B-F:** Körper- und Organgewichtsmessungen, sowie Herz/Leber-Körpergewichtsverhältnisse von *Ctnnb1*^{WT} und *Ctnnb1*^{OE-EC} Weibchen und Männchen (jeweils n=5). *p < 0.05.

3.2.4 Blutserumveränderungen bei *Ctnnb1^{OE-EC}* Mäusen

Die Elektrolyte Calcium, Kalium, Natrium und Phosphat im Blutserum zeigten keine signifikanten Veränderungen (siehe Abb. 11A, S.47). Grundlegende Leberfunktionsparameter wie Alaninaminotransferase (ALT), Aspartataminotransferase (AST), γ -Glutamyltransferase (gGT) und Glutamatdehydrogenase (GLDH) zeigten bei den *Ctnnb1^{OE-EC}* Mäusen keine Veränderungen (siehe Abb. 11B, S.47). Bis auf einen Wert von 34 U/L in einer *Ctnnb1^{WT}*-Maus blieben alle gemessenen γ -Glutamyltransferase (gGT)-Werte <3 U/L und sind hier nicht grafisch dargestellt. Es wurden auch keine signifikanten Veränderungen bei den Serumwerten für Cholesterin, Gesamtprotein und Glukose festgestellt, allerdings zeigten die Serumwerte für Triglyceride einen signifikanten Anstieg von durchschnittlich 65,5 mg/dL bei den *Ctnnb1^{WT}*-Mäusen auf 131 mg/dL bei den *Ctnnb1^{OE-EC}* Mäusen (siehe Abb. 11C, S.47).

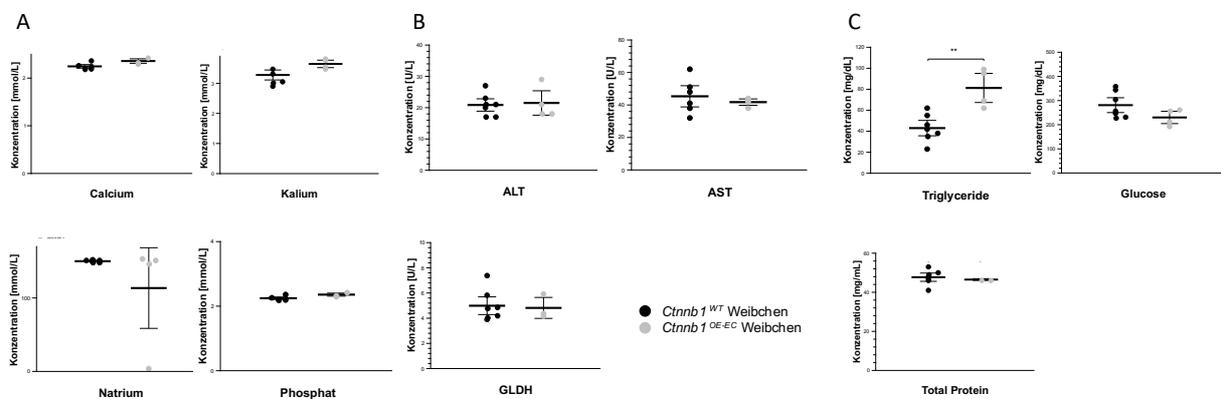


Abb. 11: Serumwerte

A-C: Messungen der Serumparmeter aus venösem Vollblut (Weibchen; n=4). **p < 0.01.

Ein durchgeführter Assay zur Messung der Triglyceride im Lebergewebe zeigte einen Trend zu niedrigeren Triglyceridwerten in der Leber bei den *Ctnnb1^{OE-EC}* Mäusen (siehe Abb. 12, S.47).

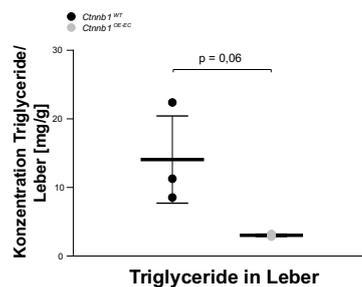


Abb. 12: Fettmessung in Lebergewebe

Eine direkte Triglyceridmessung aus Lebergewebe ergab keine Signifikanz mit einem p-Wert von 0,06 (mit einem Mittelwert von 14,06 mg/g bei den Wildtypmäusen gegenüber 3,02 mg/g bei den *Ctnnb1^{OE-EC}* Mäusen) (n=3).

3.3 Histologische Charakterisierung der Leber von *Ctnnb1*^{OE-EC} Mäusen

3.3.1 Charakterisierung der Leber mittels Routinehistologie

Die HE-Färbungen der Lebern waren im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen unauffällig mit erhaltener Struktur der Portalfelder und Zentralvenen (siehe Abb. 13, S.48). Die Gallengänge waren gut abgrenzbar, aber nicht erweitert, und es waren keine nekrotischen oder granulomatösen Bereiche erkennbar. Auch die PAS- und Berliner-Blau-Färbungen waren hinsichtlich Glykogen- und Eisenablagerungen unauffällig, und die Sirius-Rot-Färbung zeigte keine Kollagenakkumulation.

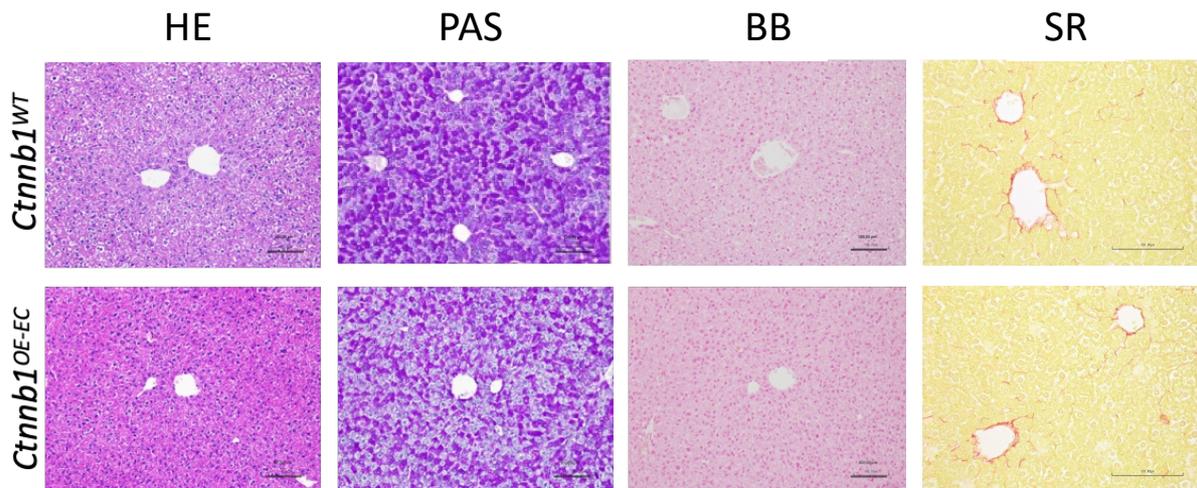


Abb. 13: Übersichts- und Spezialfärbungen der Leber

Exemplarische Bilder der histologischen Analyse mittels Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung, Periodischer Säure-Schiff (PAS)-Färbung, Berliner Blau und Sirius Rot Färbung zeigen keine sichtbaren Unterschiede zwischen *Ctnnb1*^{OE-EC} und *Ctnnb1*^{WT} Mäusen (Weibchen; n=4). Maßstabsbalken: 100 µm.

Die Ölrot-O Färbung zeigte jedoch eine leicht reduzierte Lipidspeicherung in den *Ctnnb1*^{OE-EC} Tieren (siehe Abb. 14, S.49). Hier konnte jedoch keine Signifikanz in der Quantifizierung nachgewiesen werden, ein Ergebnis, das die Messungen der Triglyceride in der Leber der *Ctnnb1*^{OE-EC} Tiere widerspiegelt.

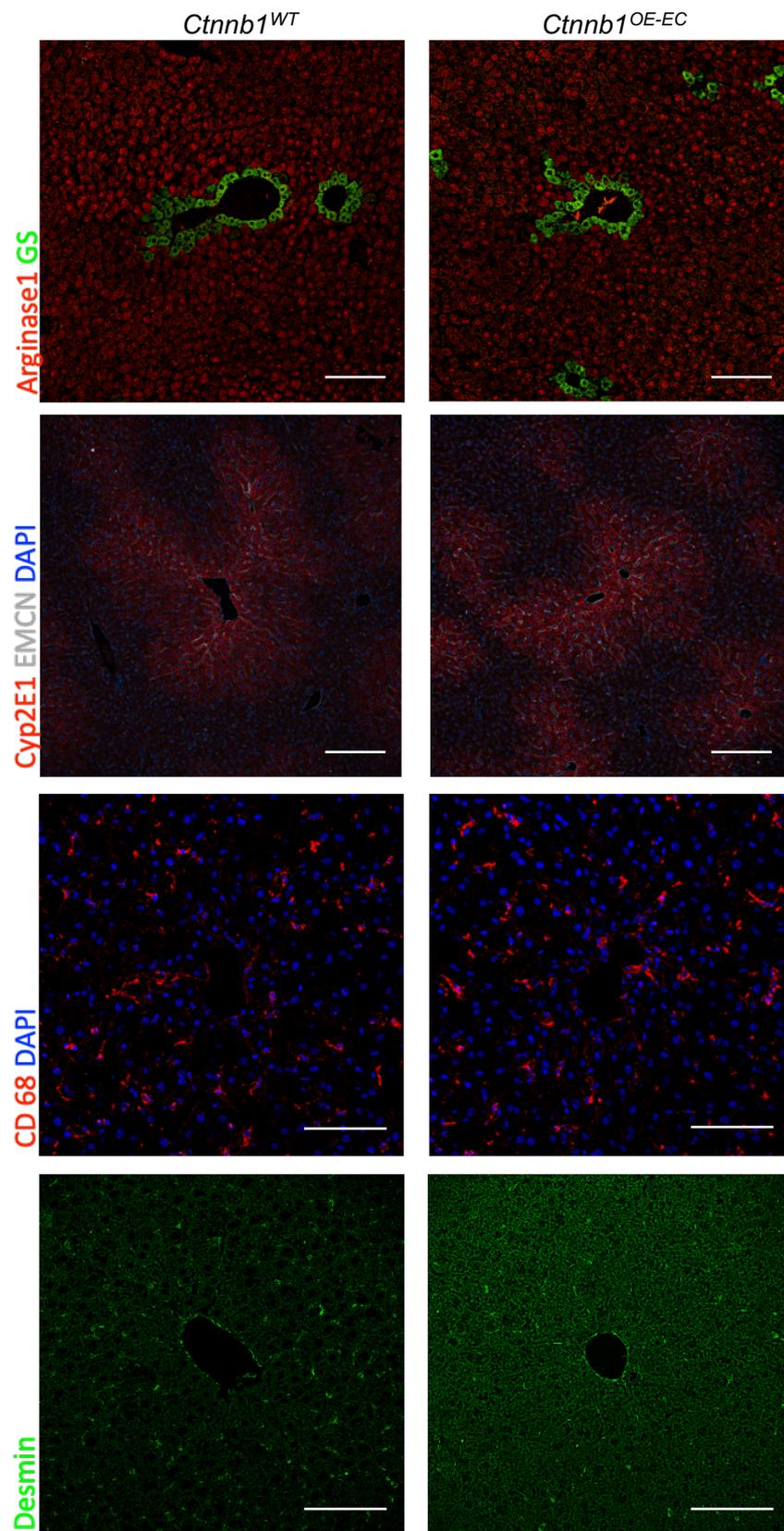


Abb. 15: Leberzonierungsmarker

Immunfluoreszenzfärbungen Arginase1 und Gluthathionsynthetase (GS) und darunter Cyp2E1 (mit Endomucin (EMCN) als endothelialer Marker zur besseren Abgrenzung der Zentralvene) (Weibchen; n=4), CD68 und Desmin (Weibchen; n=3). DAPI als Zellkernfärbung in blau. Maßstabsbalken: 100 µm.

Trotz der unveränderten Endomucin-Expression der Leberendothelzellen (siehe Abb. 15, S.50). führten wir eine weitere Untersuchung durch, um eine Kapillarisierung der Lebersinusendothelzellen auszuschließen. Bei dieser ergänzenden Analyse der anteiligen Menge an Kollagenen konnte durch Immunfluoreszenzfärbung und Quantifizierung gezeigt werden, dass keine Veränderung der Kollagene 1, -3 und -4 in den Lebern der *Ctnnb1^{OE-EC}* Mäusen nachweisbar war (siehe Abb. 16, S.51).

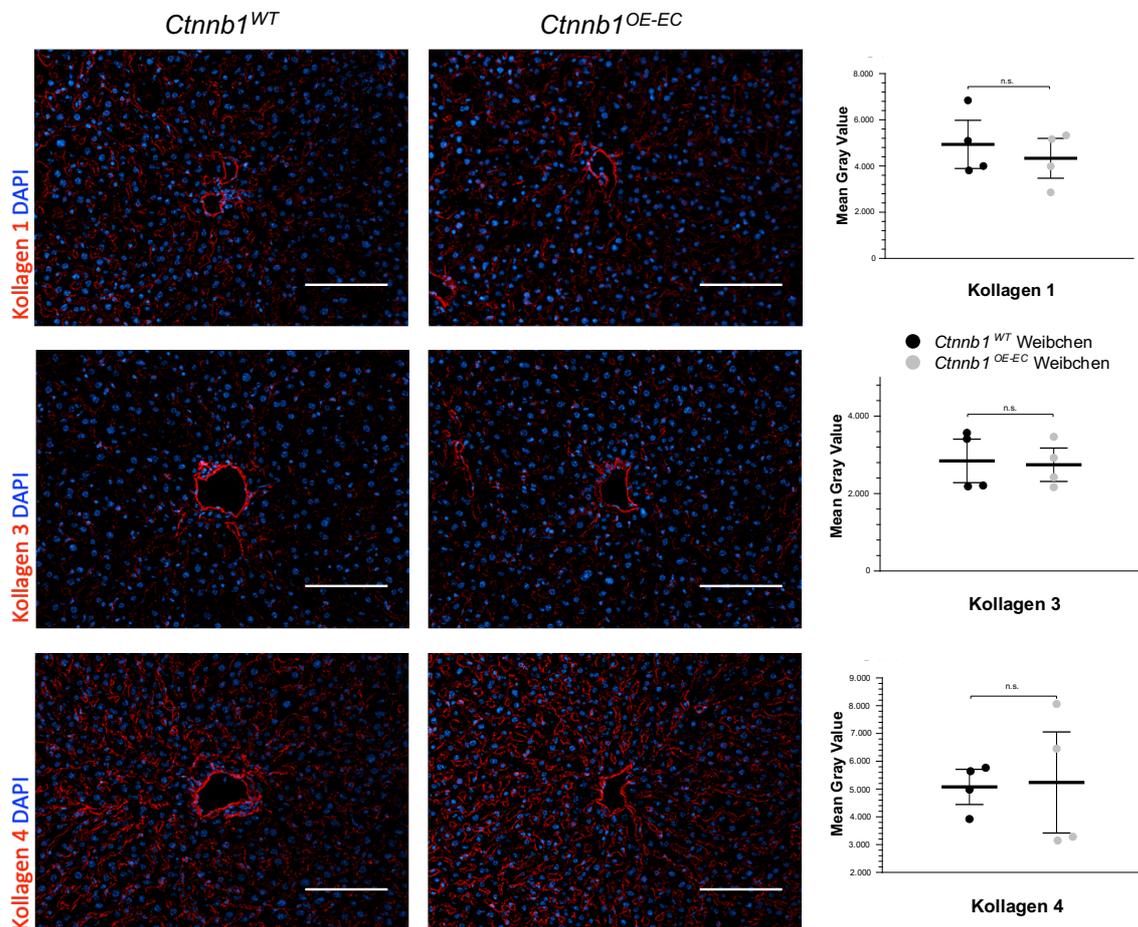


Abb. 16: Kollagen-Immunhistochemie und Quantifizierung

Links von oben nach unten Immunfluoreszenzfärbung von Kollagen 1, 3 und 4, rechtsseitig entsprechende Quantifizierung per Mean Gray Value, hier keine Signifikanz (n=4). DAPI als Zellkernfärbung in blau. Maßstabsbalken: 100 µm.

3.4 Transdifferenzierung der LSEC in *Ctnnb1^{OE-EC}* Mäusen

Um die Folgen der β -Catenin Überaktivierung in den LSEC weiter zu analysieren, wurden LSEC aus *Ctnnb1^{OE-EC}* und *Ctnnb1^{WT}* Lebern isoliert und mittels Affymetrix DNA Microarray auf genetische Veränderungen untersucht. Es wurden signifikante Veränderungen in 128 Genen im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe festgestellt. Eine Gene Set Enrichment Analyse (siehe Abb. 17A, S.52). zeigte verschiedene Signalwegveränderungen in den sogenannten Hallmark Genesets, darunter eine zusätzliche Aktivierung der Myc Target V1 und V2 Gene, sowie Gene der Cholesterinhomöostase und Zellzyklus- und Zellzykluskontrollgene, wie die G2M Checkpoint und E2F Zielgene. Zusätzlich konnte auch in diesem Fall die Überaktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in den LSEC bestätigt werden.

Eine Überrepräsentationsanalyse mit Enrichr zeigte signifikante Veränderungen in der sogenannten Gene Ontology Biological Processes Library 2018 (siehe Abb. 17B, S.52). Hier stand die positive Regulation der Zelldifferenzierung im Vordergrund. Tatsächlich konnte mittels Immunfluoreszenz die Proliferation von Endothelzellen durch Ki67 Färbung in der Leber von *Ctnnb1*^{OE-EC} Mäusen nachgewiesen werden (siehe Abb. 17C, S.52).

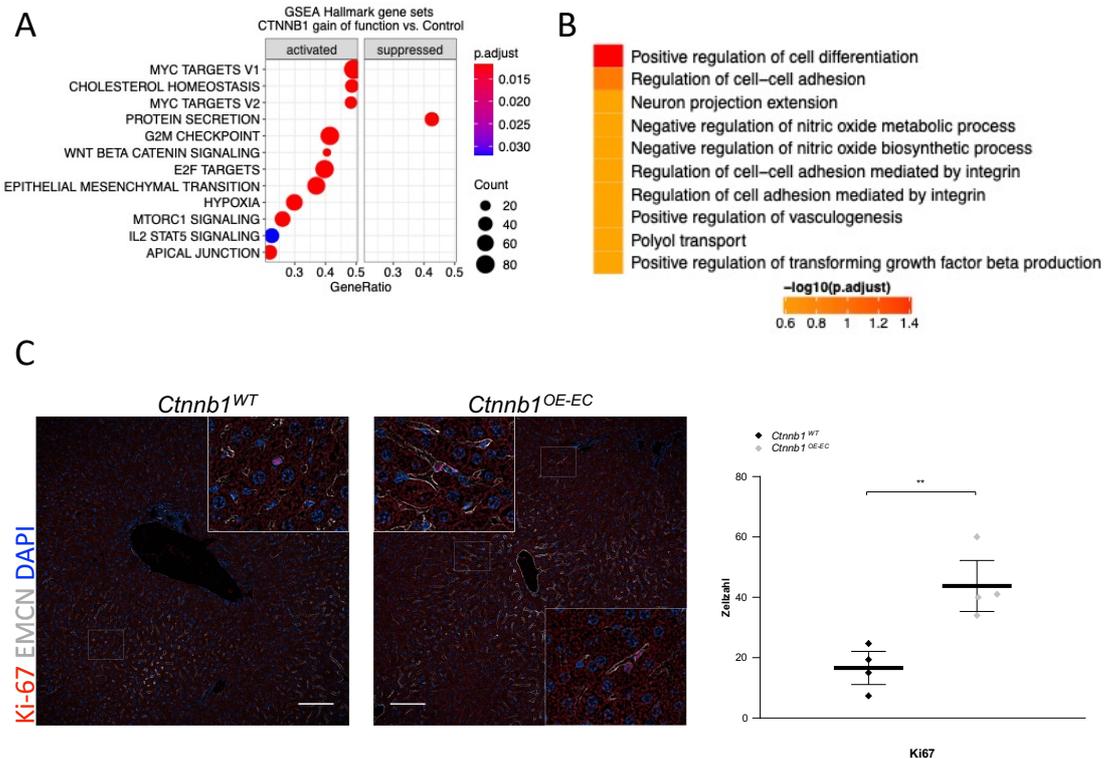


Abb. 17: Genexpressionsanalyse Genset und Immunhistochemie Ki-67

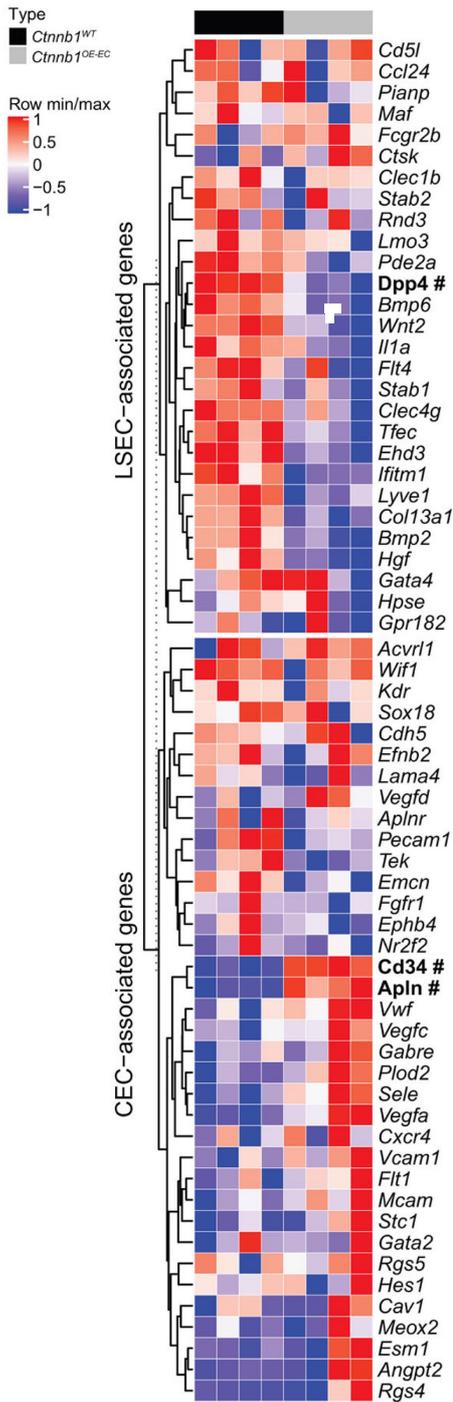
A: Links Gene Set Enrichment Analyse mittels Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (GSEA-KEGG) und MSigDB hallmark gene sets, **B:** rechts Overrepresentation Analyse mittels Gene Ontology "biological processes" Library von isolierten LSEC 2 Monate alter *Ctnnb1*^{WT} und *Ctnnb1*^{OE-EC} Weibchen (n = 4). **C:** Immunfluoreszenzfärbung Ki-67 mit beispielhaft ausgewählt vergrößert Ki-67+ Arealen, darunter Quantifizierung der Ki-67+ Zellen im Wildtyp und in *Ctnnb1*^{OE-EC} Tieren. DAPI als Zellkernfärbung in blau. Maßstabsbalken: 100 µm, n=3. **p < 0.01.

3.4.1 Endotheliale Genotypisierung

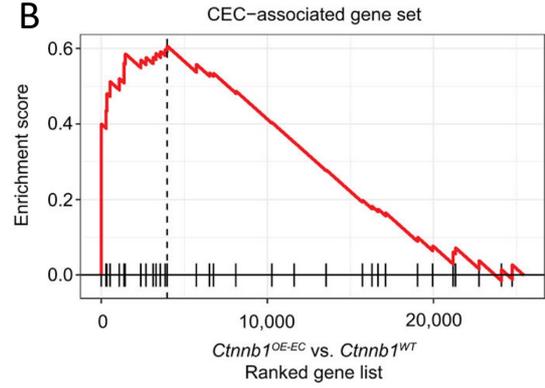
Nach der Analyse der Veränderungen in den Signalwegen wurde der Transkriptom-Datensatz auf genotypische Veränderungen dieser isolierten Lebersinus-Endothelzellen untersucht. Sinusoidale Endothelzellen unterscheiden sich von anderen Endothelzellen, wie z.B. dem kontinuierlichen Endothel, durch die Expression einer Reihe spezifischer Markergene. So konnte unsere Arbeitsgruppe Gruppen solcher LSEC- und CEC-assoziiierter Markergene publizieren (Geraud et al., 2017; Geraud et al., 2010; Olsavszky et al., 2021). Bei der Untersuchung dieser GSEA-Gruppen wurde in den β -Catenin-überexprimierenden Mutanten eine Induktion von CEC-assoziierten Genen und parallel dazu eine Reduktion von LSEC-assoziierten Genen beobachtet (siehe Abb. 18A-C, S.54).

Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg ist auch dafür bekannt, die Differenzierung des Hirnendothels zu kontrollieren (Sabbagh et al., 2018), weshalb auch in den LSEC der *Ctnnb1*^{OE-EC} Mäuse eine Überaktivierung von GSEA-Hirnendothel beobachtet wurde (siehe Abb. 18D, S.54). Zusammenfassend führt die Überaktivierung von β -Catenin in den LSEC zu einer transkriptomischen Transdifferenzierung.

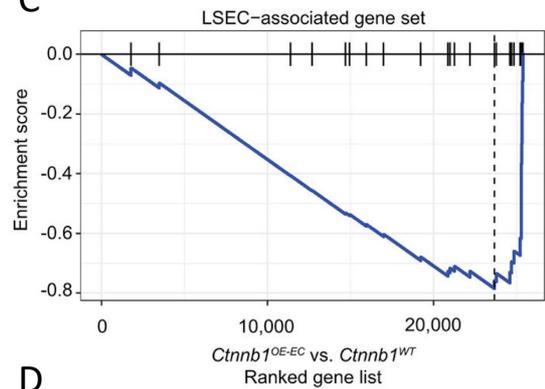
A



B



C



D

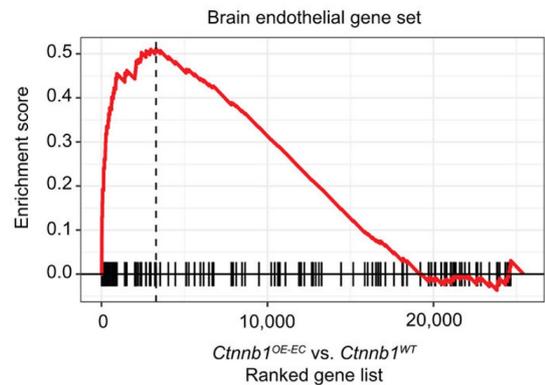


Abb. 18: Genexpressionsanalyse endotheliale Differenzierung

A: Heat map der LSEC- und CEC-assozierten Gen. Einige ausgewählte Gene aus isolierten LSEC aus *Ctnnb1^{WT}* und *Ctnnb1^{OE-EC}* Weibchen (2 Monate alt) mit markierten signifikanten Genen werden gezeigt. Bei $n=4$ entspricht die jeweilige Farbe den nach Mittelwert adjustierten Maximalwert für jedes Gen. Dunkelblau entspricht hier geringster Expression und dunkelrot höchster. **B:** Enrichment LSEC-assoziierter Gene ($p = 0.0023$; Normalisierter Enrichment Score (NES) = -2.43) **C:** Enrichment CEC-assoziierter Gene ($p = 0.0023$; NES = 2.04) **D:** Enrichment Hirnendothel-assoziierter Gene ($p = 0.0001$; NES = 2.16) ($n = 4$).

3.4.2 Endotheliale Zonierung

Im weiteren Verlauf wurde eine Auswahl von Endothelzellgenmarkern auch auf mRNA- oder Proteinebene *in situ* dargestellt. *CD34* und *Apln* als Marker für kontinuierliche Endothelzellen zeigten sich in den *Ctnnb1^{OE-EC}* LSEC hochreguliert (siehe Abb. 19A, S.55). Die panendothelialen Marker Podocalyxin und CD31 blieben dagegen unverändert, ebenso die CEC-typischen Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VE-Cadherin (siehe Abb. 19B, S.55).

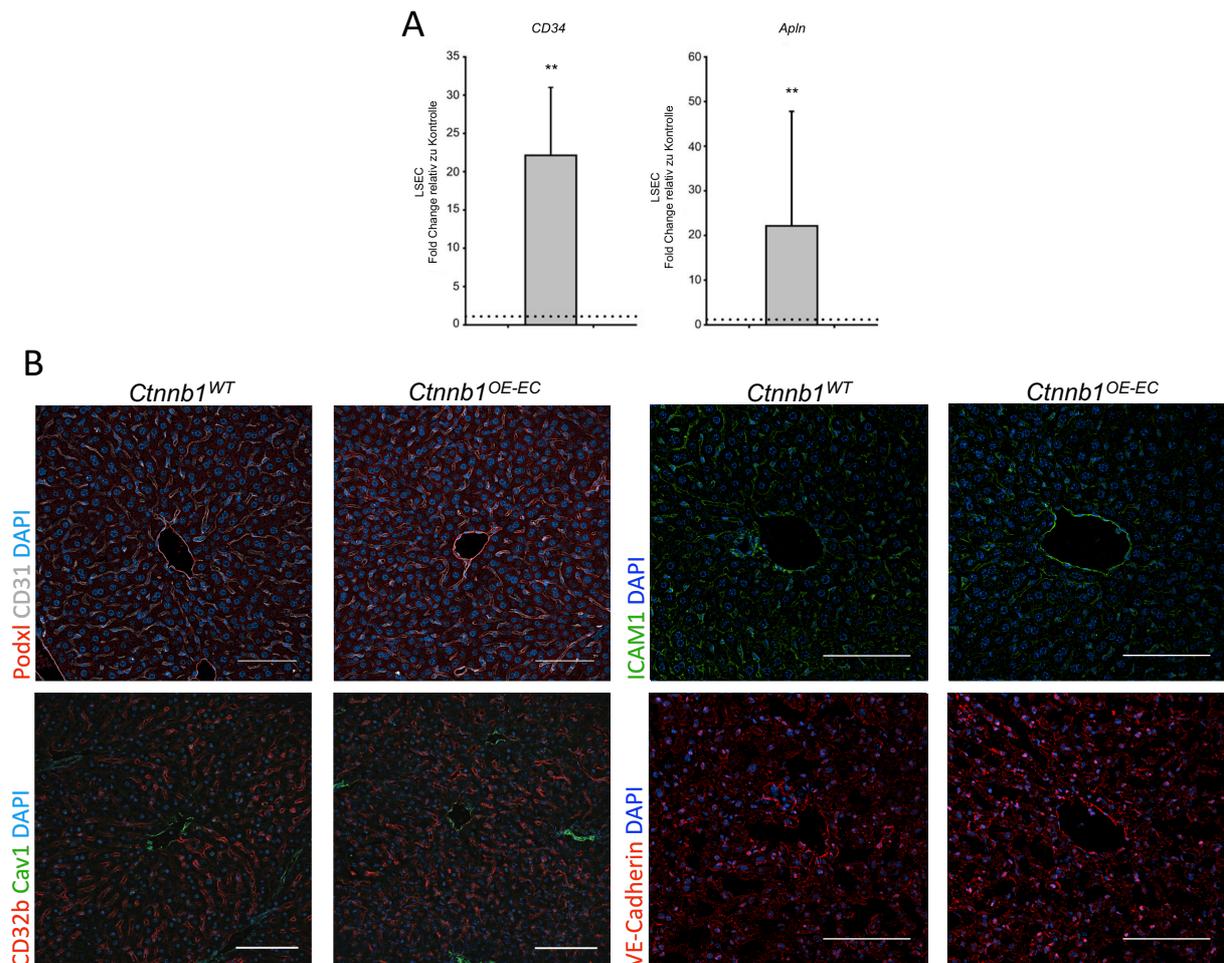
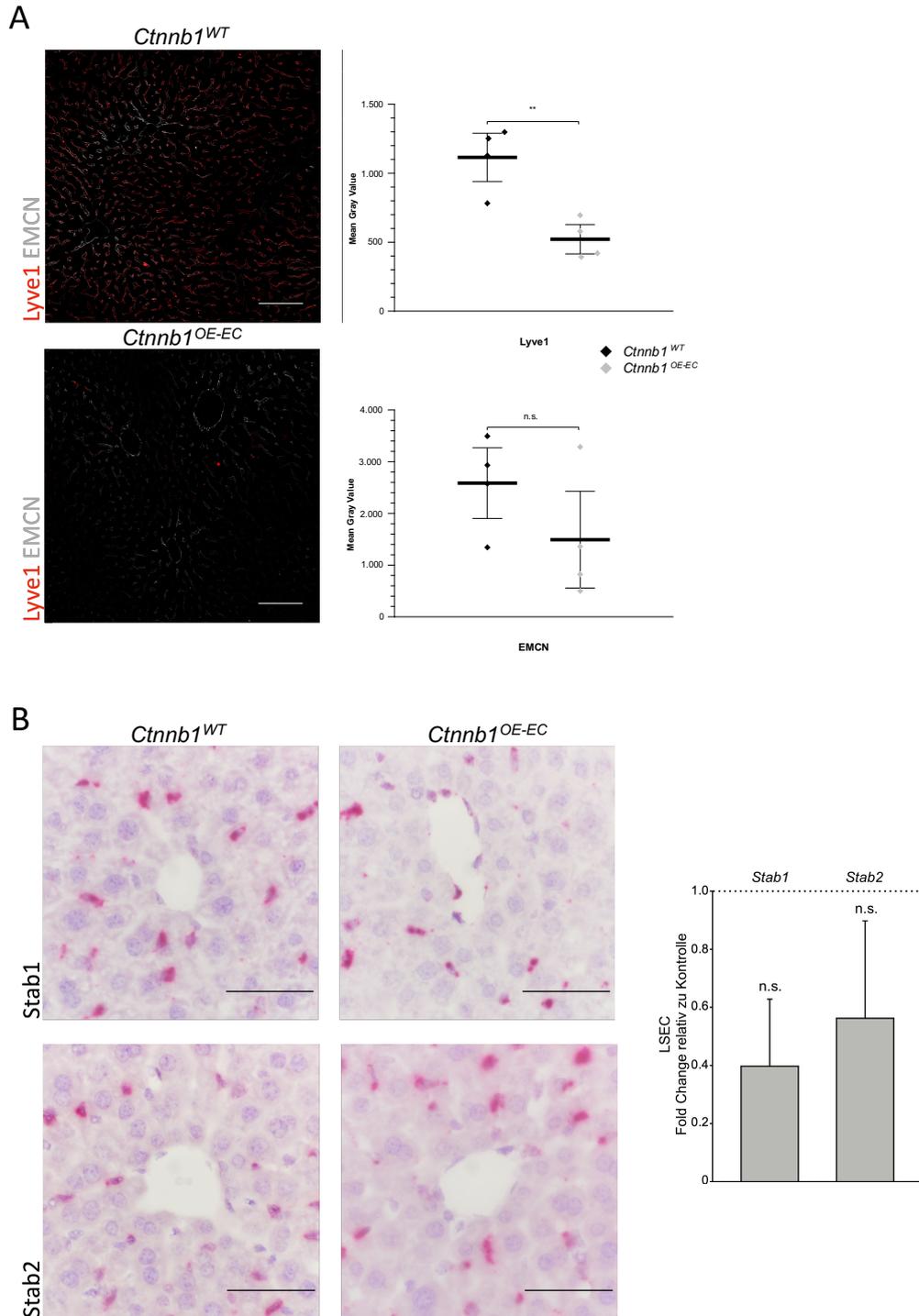


Abb. 19: Endothelzellmarker in qRT-PCRs und Immunhistochemie von Lebergewebe

A: qRT-PCRs für *CD34* und *Apln* aus Leberendothelzellen der *Ctnnb1^{OE-EC}* und Wildtypiere. Fold change relativ zu β -Actin, welches als Haushaltsgen gewählt wurde (n=3). **p < 0.01 **B:** Immunfluoreszenzfärbung Podxl und CD31, CD32b und Cav1, ICAM1, VE-Cadherin. DAPI als Zellkernfärbung in blau. Maßstabsbalken jeweils 100 μ m, n=4.

Im Gegensatz dazu war der LSEC-Marker der zentralen LSEC-Zone, LYVE-1, in den *Ctnnb1^{OE-EC}* Lebern signifikant reduziert, während der CD32b- und die perizentralen Marker Caveolin und EMCN nicht verändert waren (siehe Abb. 19B, S.55 und Abb. 20A, S.56). Interessanterweise, waren die LSEC-typischen Gene, Scavengerrezeptoren *Stab1* und *Stab2* auch unverändert (siehe Abb. 20B, S.56).



A: Links Immunfluoreszenzfärbung von Lyve1 und EMCN, Maßstabsbalken: 100 μ m. Rechts Quantifizierung der Färbungen per Mean Gray Value, n=4, ** entspricht $p < 0,01$

B: Links In-situ-Hybridisierungen von *Stab1* und *Stab2* in Lebergewebe, Maßstabsbalken: 50 μ m, n=4. Rechts qRT-PCR für *Stab1* und *Stab2* aus Leberendothelzellen der *Ctnnb1*^{OE-EC} und Wildtypiere. Fold change relativ zu β -Actin, welches aus Haushaltsgen gewählt wurde. (n=3)

3.4.3 Expression von angiokrinen Genen

Vorbeschriebene molekulare Marker zur Leberfibrose wie *Gata4*, *Myc* und *Platelet-derived Growth Factor Subunit B (Pdgfb)* wurden per Immunfluoreszenz und qRT-PCR analysiert. Während *Gata4* in der qRT-PCR nicht signifikant verändert war, ergab die Quantifizierung eine Induktion auf Proteinebene in der IF-Färbung (siehe Abb. 21 A-B, S.57). Ein endothelialer Verlust von *Gata4* führte zur *Pdgfb*-Induktion, *Myc*-Aktivierung und einem profibrotischer angiokrinen Switch in LSEC (Winkler et al. 2021), weshalb im weiteren Verlauf nachgeschaltete *Gata4* Gene untersucht wurden. Während *Pdgfb* nicht verändert war, zeigte sich in der qRT-PCR eine signifikante Erhöhung von *Myc* (siehe Abb. 21B, S.57).

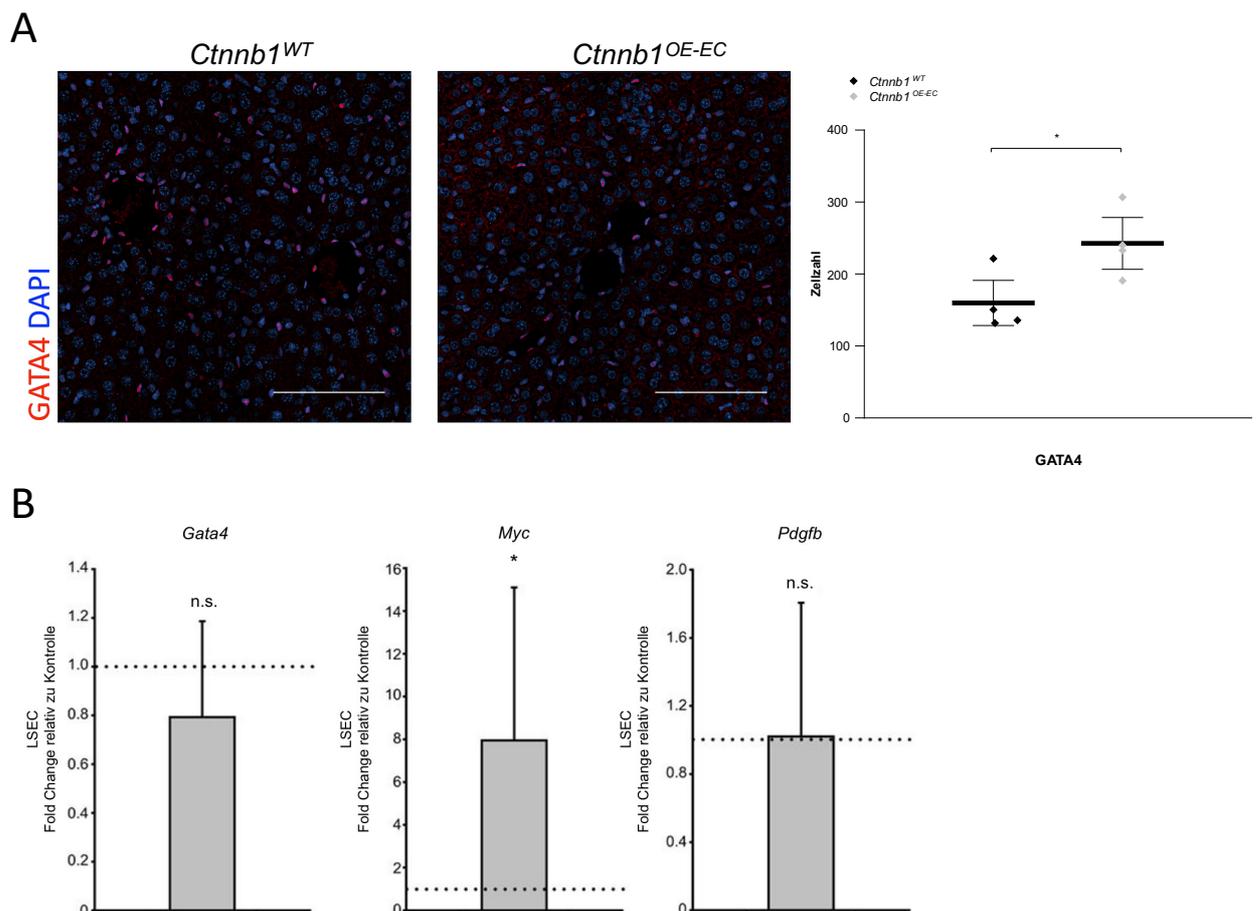


Abb. 21: Leberfibrosemarker

A: Immunfluoreszenzfärbung von GATA4, rechts Quantifizierung der Färbung per Zählzahl. DAPI als Zellkernfärbung in blau. Maßstabsbalken: 100 μ m, n=4. *p < 0.05.

B: qRT-PCR für *GATA4*, *Myc* und *Pdgfb* aus Leberendothelzellen der *Ctnnb1*^{OE-EC} und Wildtypiere. Fold change relativ zu β -Actin, welches aus Haushaltsgen gewählt wurde. *p < 0.05.

Bmp2, ein LSEC-abhängiger Eisenregulator, wurde entsprechend der Berliner-Blau-Färbung mittels *in situ*-Hybridisierung als unverändert reguliert dargestellt (siehe Abb. 22, S.58). Während *Wnt2* als angiokriner Faktor in der *in situ* Hybridisierung herunterreguliert war, war *Wnt9b* unverändert, was die konstante metabolische Zonierung der *Ctnnb1*^{OE-EC} Mäuse erklärt. Schließlich war auch *HGF* als LSEC-spezifisches Angiokin nicht dysreguliert (siehe Abb. 22, S.58).

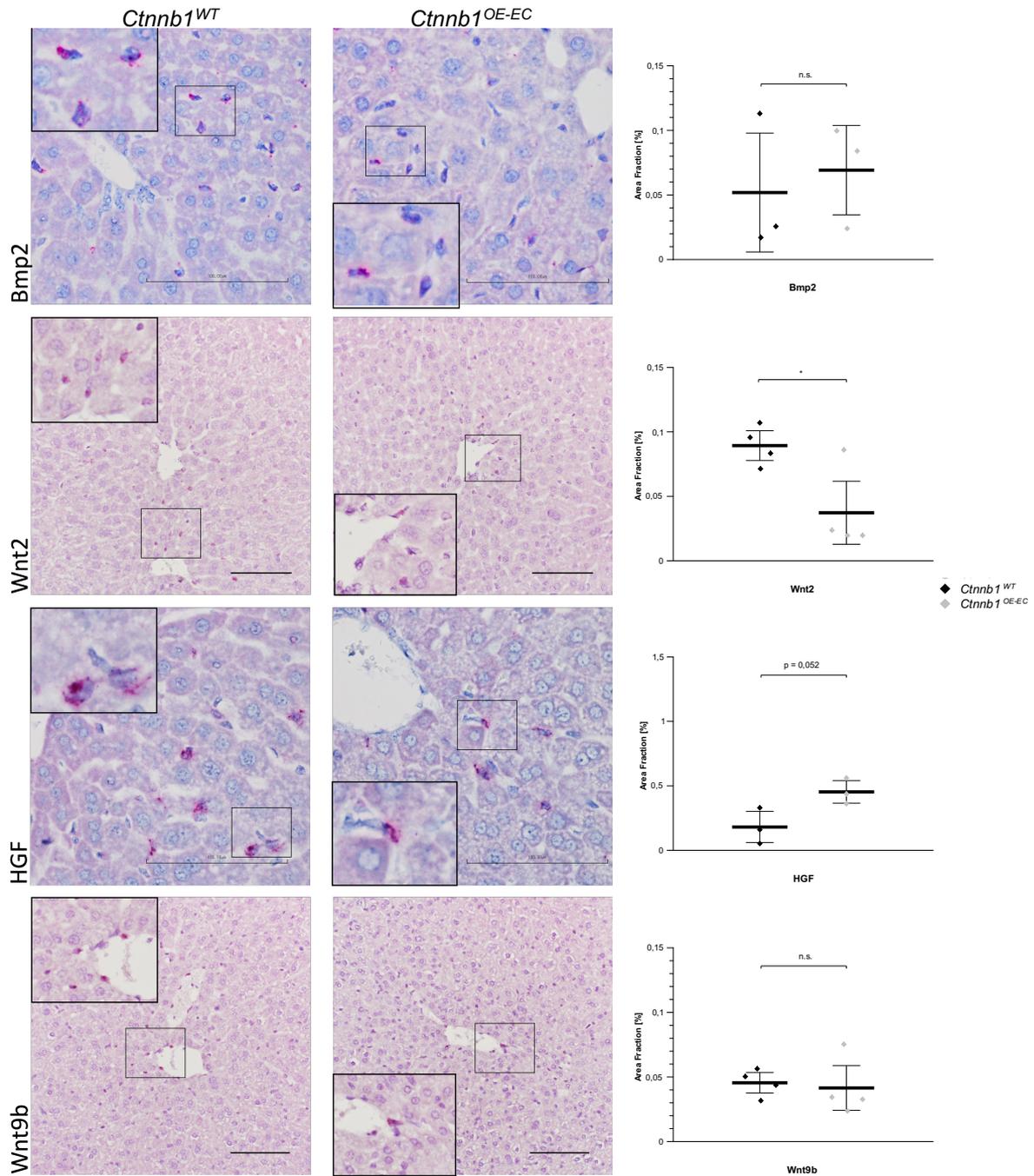


Abb. 22: Phänotypisierung per In-situ-Hybridisierung (ISH)

Von oben nach unten ISH von *BMP2*, *Wnt2*, *HGF* und *Wnt9b*, rechtsseitig entsprechende Quantifizierung der Färbung per Area Fraction, jeweils exemplarische Bilder mit beispielhaft ausgewählt vergrößerten positiven Arealen. Maßstabsbalken: 100 µm, n≥3.

3.5 Histologische Charakterisierung des Herzens von *Ctnnb1^{OE-EC}* Mäusen

3.5.1 Charakterisierung des Herzens mittels Routinehistologie

Um die histologischen Veränderungen in den Herzen der *Ctnnb1^{OE-EC}* und *Ctnnb1^{WT}* Mäuse zu untersuchen, wurden Herzgewebeproben mit verschiedenen Färbungen analysiert (siehe Abb. 23, S.59). In den H&E-Übersichtsbildern zeigten die Herzproben der *Ctnnb1^{OE-EC}* Mutanten deutlich vergrößerte Ventrikel, was dem erhöhten Herzgewicht und dem erhöhten Herz-Körper-Verhältnis entsprach. Die übrigen Routinefärbungen wie PAS-Färbung, Berliner-Blau-Färbung, Sirius-Rot-Färbung und Masson-Trichrom-Färbung zeigten keine Unterschiede im Glykogen-, Muzin-, Eisen- oder Kollagenfasergehalt im Herzgewebe der Mutanten und Kontrolltiere.

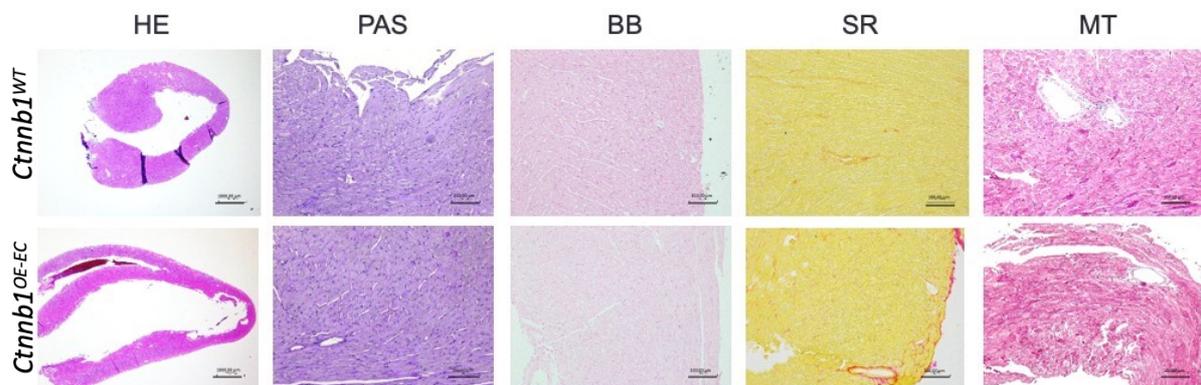


Abb. 23: Übersichtsfärbungen des Herzens

Exemplarische Bilder der histologische Analyse per Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) zeigte dilatierete Ventrikel bei den *Ctnnb1^{OE-EC}* Mäuserherzen. Periodic acid-Schiff-Färbung (PAS) und Berliner-Blau-Färbung und Masson-Trichrom-Färbung (MT) zeigte keine sichtbaren Differenzen zwischen *Ctnnb1^{OE-EC}* und *Ctnnb1^{WT}* Mäusen. Maßstabsbalken: 1000 µm für HE, 100 µm für die restlichen Färbungen (Weibchen; n=4).

3.5.2 Charakterisierung der Herzendothelien mittels Immunfluoreszenzfärbungen

Obwohl eine Cre-Aktivität in Endothelzellen des Herzens von *Clec4g-iCre*-Mäusen bereits zuvor erwähnt wurde (Wohlfeil et al., 2019), wurde in dieser Arbeit eine immunhistologische Analyse von *Clec4g-iCre;R26YFP* Reportertermäusen durchgeführt, um besser zu differenzieren, in welchen Herzendothelzellen Cre aktiviert wird. Es zeigte sich vor allem eine Aktivität in Form einer YFP-Positivität in CD31⁺ Endothelzellen und hier insbesondere im Endokard (siehe Abb. 24, 60). Endomucin (EMCN) positive endokardiale Trabeculae, CD31⁺ und αSMA⁺ Koronararterien und Venen zeigten endotheliale YFP Positivität. Lyve1⁺ Lymphgefäße waren dagegen YFP-negativ (siehe Abb. 24, S.60).

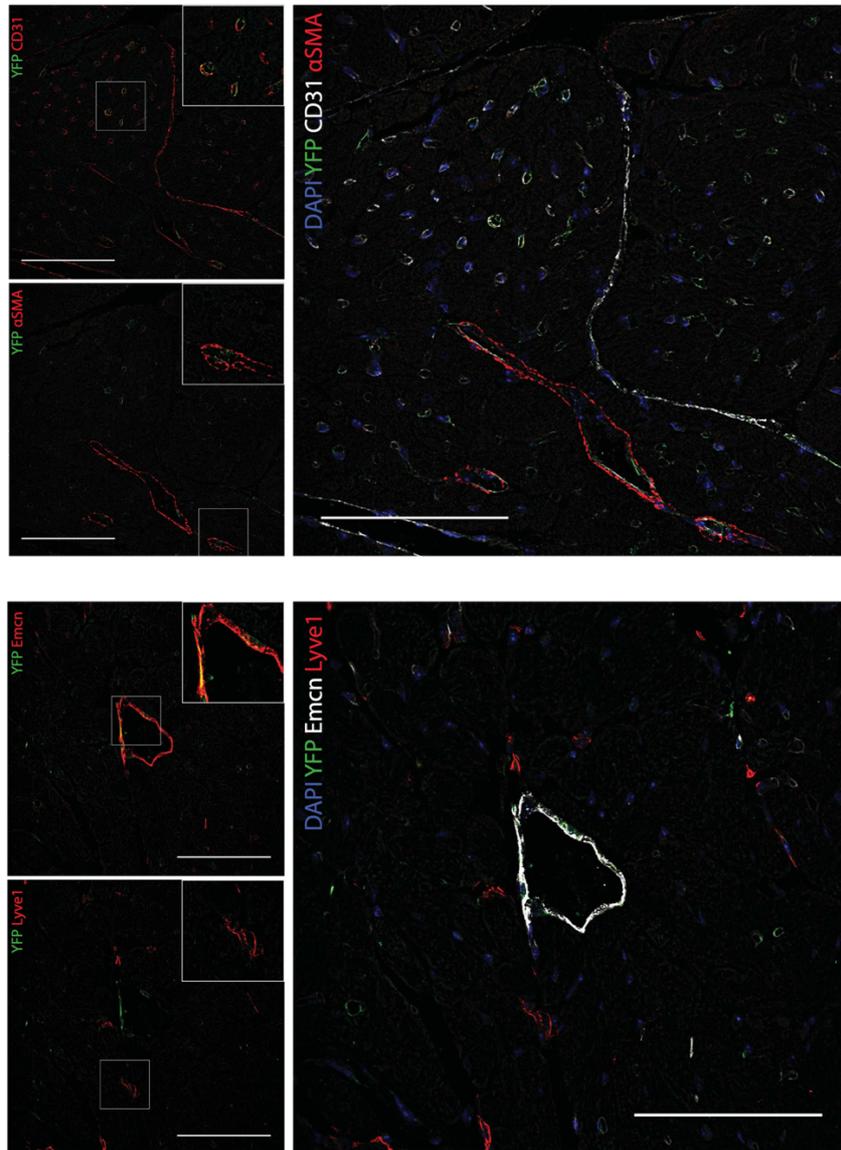


Abb. 24: YFP-Reporteraktivität in Herzgewebe von *Clec4g-iCre;R26YFP* Mäusen

Oben: Ko-Immunfluoreszenzfärbung von YFP, CD31 und α SMA, links getrennt YFP mit CD31 und YFP mit α SMA und ausgewählt vergrößerte Ansicht zweifach positiver Bereiche, rechts gemeinsam.
Unten: Ko-Immunfluoreszenzfärbung von YFP, EMCN und Lyve1, links getrennt YFP mit EMCN und YFP mit Lyve1 und ausgewählt vergrößerte Ansicht zweifach positiver Bereiche, rechts gemeinsam.
 DAPI als Zellkernfärbung in blau. Maßstabsbalken jeweils 100 μ m, n=3.

Trotz der hohen Cre-Aktivität in den Herzendothelien der *Clec4g-iCre*-Mäuse fand im Vergleich zur Leber mit den hier untersuchten Markern keine offensichtliche endotheliale Transdifferenzierung statt. Die Immunfluoreszenzfärbung der Herzendothelien von *Ctnnb1^{OE-EC}* und *Ctnnb1^{WT}* Mäusen zeigte keine Unterschiede in der Expression von EMCN, CD31 und VE-Cadherin und auch keine Unterschiede in den Endothelien der α SMA-positiven Koronararterien (siehe Abb. 25, S.61).

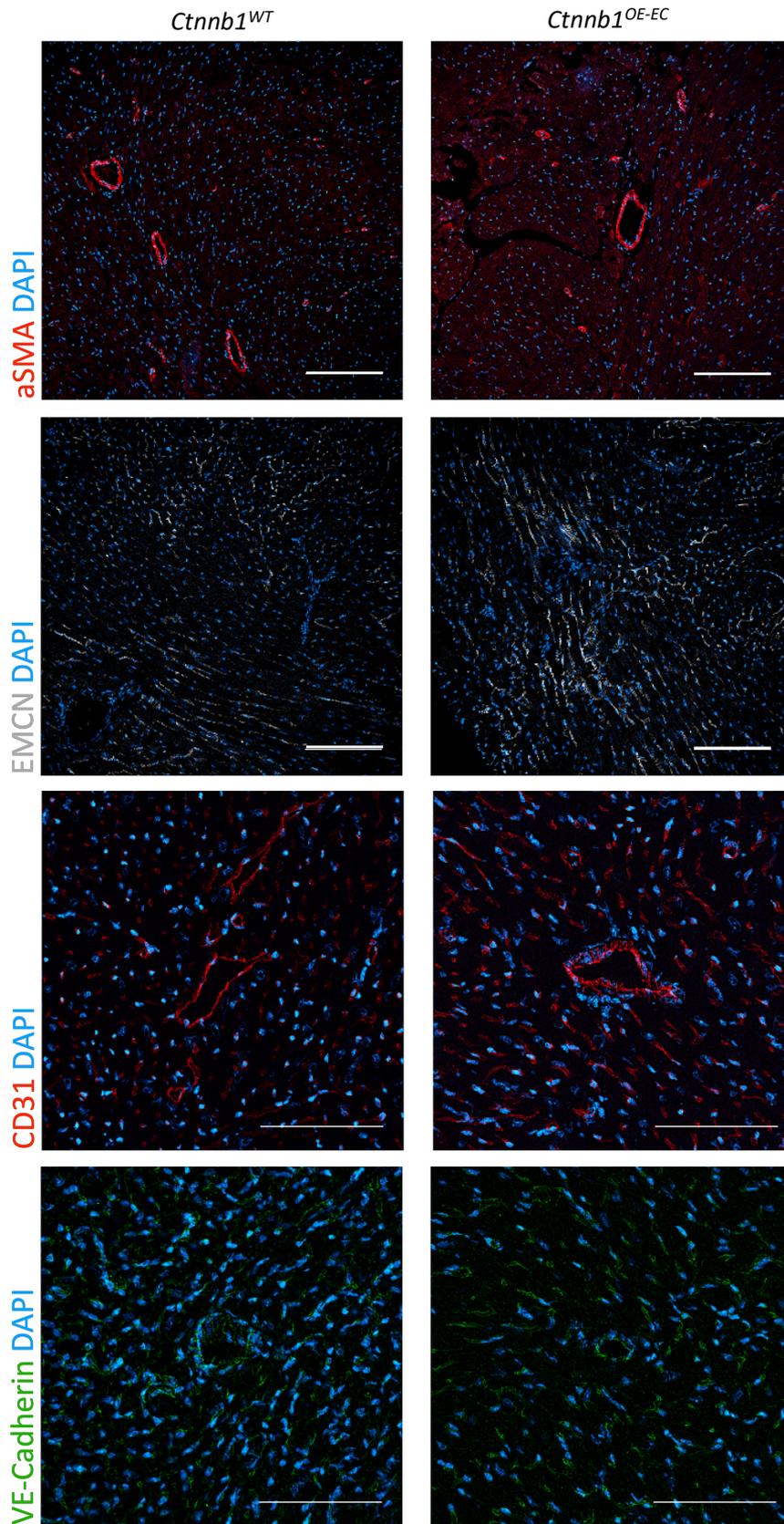


Abb. 25: Endothelzellmarker im Herz - Immunhistochemie

Von oben nach unten Immunfluoreszenzfärbung αSMA, EMCN, CD31 und VE-Cadherin, jeweils Vergleich representative Bilder *Ctnnb1^{OE-EC}* und *Ctnnb1^{WT}* Herzen, DAPI als Zellkernfärbung in blau.
 Maßstabsbalken: 100 µm, n=4.

3.6 Funktionelle *in vivo*-Untersuchung der Herzen von *Ctnnb1^{OE-EC}* Mäusen

Aufgrund des erhöhten Herzgewichtes und der vergrößerten Ventrikel wurde das klinische Bild einer dilatativen Kardiomyopathie festgestellt, die normalerweise mit einem Funktionsverlust einhergeht. Aus diesem Grund und zur weiteren funktionellen Untersuchung der Herzen der *Ctnnb1^{OE-EC}* Mäuse wurden echokardiographische Untersuchungen an 2 Wochen, 3 Wochen, 4 Wochen und 6 Wochen alten Tieren durchgeführt (siehe Abb. 26, S.63).

Die Ergebnisse zeigen, dass das Herzminutenvolumen bereits nach 2 Wochen reduziert war, jedoch wurde dieser Unterschied erst nach 6 Wochen statistisch signifikant. Die Ejektionsfraktion war in allen untersuchten Altersgruppen statistisch signifikant reduziert, was auf eine verminderte Pumpleistung des Herzens hinweist. Der Innendurchmesser des linken Ventrikels war bei den *Ctnnb1^{OE-EC}* Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen bereits nach 2 Wochen und teilweise auch nach 3 und 6 Wochen signifikant vergrößert, was auf eine Dilatation des Ventrikels hinweist.

Das Volumen des linken Ventrikels war nach 2 Wochen und nach 6 Wochen signifikant erhöht, die anteriore Wanddicke des linken Ventrikels war nach 4 und 6 Wochen signifikant reduziert, was auf eine Verdünnung der Ventrikelwand hindeutet. Die posteriore Wanddicke des linken Ventrikels zeigte ebenfalls eine signifikante Abnahme nach 2, 4 und 6 Wochen, was die angenommene dilatative Kardiomyopathie weiter unterstützt.

Diese Ergebnisse bestätigen auch im Gesamtbild die beobachtete dilatative Kardiomyopathie bei *Ctnnb1^{OE-EC}* Mäusen, die durch eine verminderte Herzfunktion und vergrößerte Ventrikel gekennzeichnet ist.

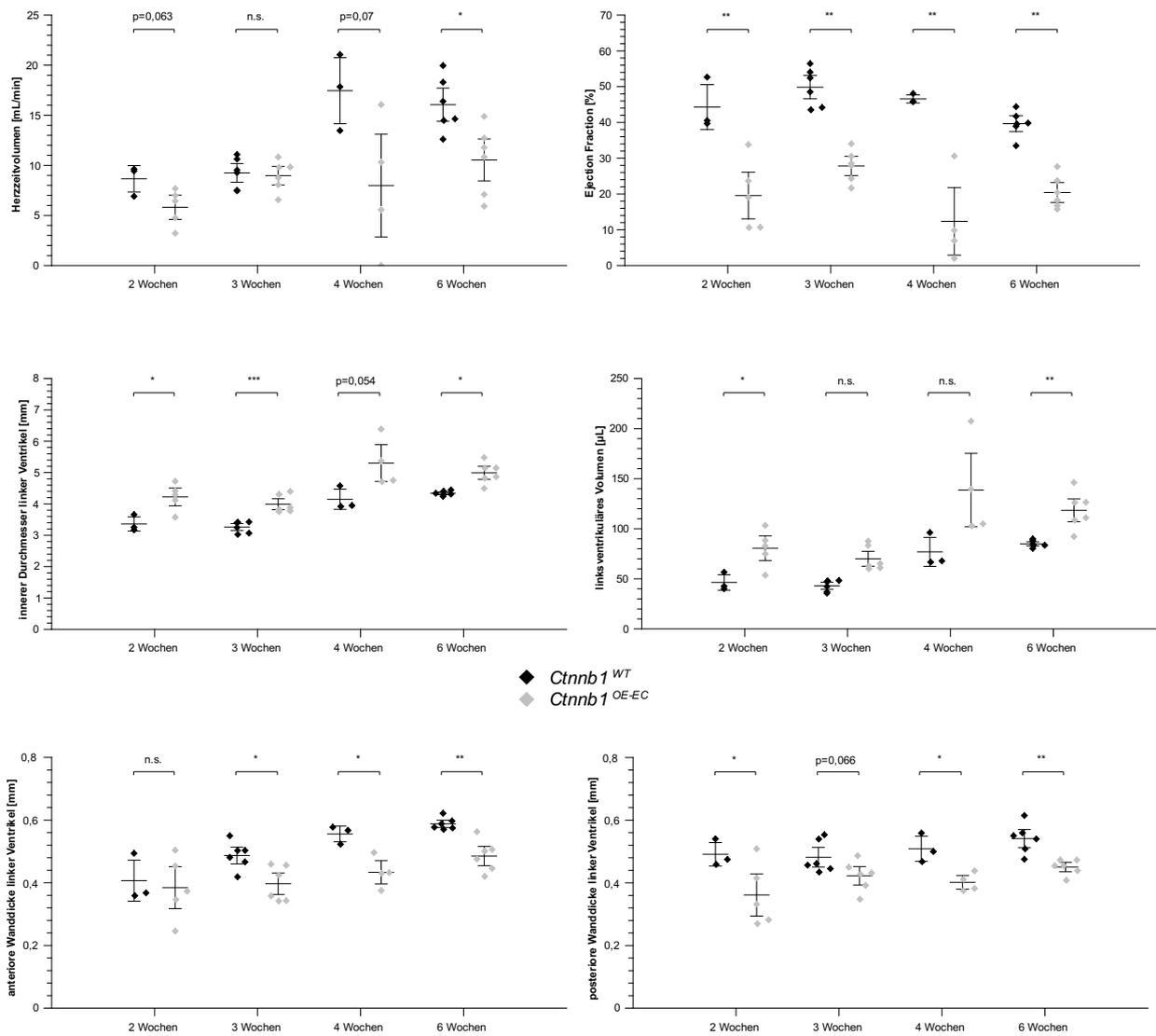


Abb. 26: Echokardiographie

Von links oben nach recht unten: Herzzeitvolumen, Ejection Fraction, innerer Ventrikeldurchmesser links, linksventrikuläres Volumen, anteriore und posteriore Wanddicke des linken Ventrikels. Gemessen per Echokardiographie der *Ctnnb1*^{OE-EC} und *Ctnnb1*^{WT} Mäuse im Alter von 2, 3, 4 und 6 Wochen, n ≥ 3).
 ** entspricht p < 0.01, *** p < 0.001; **** p < 0.0001.

4 DISKUSSION

4.1 Metabolische Effekte durch Transdifferenzierung von Leberendothel

Die Resultate der vorliegenden Arbeit erlauben eine vertiefte Analyse des Effekts, den der Wnt/ β -Catenin-Signalweg auf die Lebergenese und -differenzierung ausübt. Gleichzeitig konnten neue Erkenntnisse über die Rolle des Signalwegs im Endothel sowie dessen Interaktion mit dem Organgewebe gewonnen werden.

Eine Überaktivierung des β -Catenins führt in der Leber zu einer Transdifferenzierung der LSEC weg von Merkmalen eines sinusoidalen Endothels hin zu einem kontinuierlichen Phänotyp und verändert damit auch die Lipidhomöostase der Leber und damit des gesamten Körpers. Während isoliert die weiblichen Mutanten signifikant erhöhte Triglyceride im Serum aufzeigten, zeigten die Färbungen per Ölrot-O und die Messung der Triglyceride im Lebergewebe aller mutierten Mäuse Trends zu erniedrigten Fetten in der Leber selbst. Gleichzeitig gab es keine Anzeichen für Leberfibrose. Weder zeigten histologische und immunhistologische Färbungen erhöhte Kollagenbildung, noch wurden Apoptoseareale oder die Aktivierung von Ito-Zellen festgestellt.

Es ist bekannt, dass Steatose beim erwachsenen Menschen im Rahmen einer nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung typischerweise in Zone 3 der Leber einsetzt (Kleiner et al., 2005). Studien belegen, dass β -Catenin in Hepatozyten, aktiviert durch Wnt2 und Wnt9b aus LSEC und Endothelzellen der Zentralvenen, in dieser Zone die Genexpression der *Tcf/Lef* Familie hochreguliert und so die Proliferation von Hepatozyten anstößt (Preziosi et al., 2018). Dies verdeutlicht einen Zusammenhang zwischen dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg und positiven Effekten auf die Leberregeneration. In den *Ctnnb1^{OE-EC}* Mäusen wurde jedoch auch der proangiogene Leberfibrosemarker *Myc* erhöht, ein bekanntes Wnt-Zielgen (He et al., 1998), was auf gegenläufige profibrotische Prozesse hinweist. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass der Verlust von GATA4 als LSEC-Regulator, wie er auch bei zirrhotischen humanen Lebern beobachtet wurde, ebenso eine *Myc*-Induktion und *de novo* Expression von *Pdgfb* verursachte und so eine perisinusoidale Leberfibrose auslöste (Winkler et al., 2021). Im Fall der LSEC-spezifischen Überaktivierung von β -Catenin, wie bei den hier beschriebenen *Ctnnb1^{OE-EC}* Mutanten, zeigte sich keine signifikante Veränderung der GATA4 Expression. Dies könnte erklären, warum andere profibrotische Faktoren wie *Pdgfb* ebenfalls nicht erhöht waren und es trotz signifikanter *Myc*-Induktion nicht zur Ausbildung einer perisinusoidalen Leberfibrose kam (Winkler et al., 2021).

Das zweitstärkste der hochregulierten Gene in den LSEC der *Ctnnb1^{OE-EC}* Mutanten war *Apln*. Dieses Gen kodiert für ein sezerniertes Peptid, das eine wichtige regulatorische Funktion in Endothelzellen einnimmt, indem es unter anderem die Expression von Fettsäure-bindenden Proteinen wie FABP4 (fatty acid binding protein 4) fördert und somit den transendothelialen Lipidtransport moduliert. Die Regulation von *Apln* erfolgt direkt über den Wnt/ β -Catenin-Signalweg. Studien belegen, dass β -Catenin an die *Tcf/Lef*-Transkriptionsfaktor-Bindestellen in der Promotorregion von *Apln* bindet und dessen Transkription steigert (Chen et al., 2019a). In den transdifferenzierten LSEC der *Ctnnb1^{OE-EC}* Mäuse eine verstärkte *Apln*-Expression somit zur beobachteten Dysregulation der Lipidhomöostase beitragen. Dies wird durch

Erkenntnisse gestützt, dass *Apln*-Knockout-Mäuse eine erhöhte Anfälligkeit für Adipositas und verstärkte Fettablagerungen aufweisen, was auf eine gestörte Fettsäure-Aufnahme hinweist (Hwangbo et al., 2017). Darüber hinaus zeigen Studien von Sawane et al., dass *Apln* eine Schutzfunktion in Entzündungsprozessen übernimmt, indem es lymphatische Endothelzellen stabilisiert, die Permeabilität sowie das Kaliber von Lymphgefäßen reguliert und dadurch entzündliche Reaktionen und adipogene Prozesse moduliert (Sawane et al., 2013; Sawane et al., 2011). Diese Erkenntnisse erweitern die Perspektive auf die Rolle von *Apln*, insbesondere in Bezug auf seine schützende Funktion in der Leber. So wurde beispielsweise gezeigt, dass *Apln* vor der Entwicklung von Lebersteatose schützen kann (Huang et al., 2017). Gleichzeitig darf nicht außer Acht gelassen werden, dass bei pathologischen Zuständen wie Leberfibrose, Zirrhose und hepatozellulärem Karzinom eine erhöhte *Apln*-Expression gemessen wurde (Chen et al., 2019a; Winkler et al., 2021; Yokomori et al., 2012). Diese Befunde erfordern eine differenzierte Betrachtung der Relevanz von *Apln* im Kontext der vorliegenden Arbeit, da die genauen funktionellen Zusammenhänge noch nicht abschließend geklärt sind.

Die erhöhte Expression von *Apln* ging zudem mit einer Hochregulierung von *CD34* einher, einem Marker, der typischerweise mit kontinuierlichem Endothelzellphänotyp und angiogenen Prozessen assoziiert wird. Es zeigten sich somit Anzeichen für einen kontinuierlichen Endothelzellphänotyp, welcher per DNA-Microarray und GSEA bestätigt und weiter spezifiziert werden konnte. In den *Ctnnb1^{OE-EC}* LSEC konnte eine Aktivierung von Genen beobachtet werden, deren Expression in Endothelzellen des Gehirns nachgewiesen wurde (Daneman et al., 2010; Sabbagh et al., 2018; Wang et al., 2019). Während also der LSEC Wildtyp durch Fenestrations den Transport von Wasser, größeren Molekülen und sogar Proteinen in das umliegende Gewebe unterstützt, besitzt das Endothel des Gehirns zu weiten Teilen einen kontinuierlichen Phänotyp (Augustin and Koh, 2017). Die durch das Hirnendothel gebildete Blut-Hirn-Schranke besitzt einzigartige biologische Charakteristika, um den Ein- und Ausfluss durch die Gefäßwände zu begrenzen um die physiologische neuronale Aktivität und das dafür benötigte homöostatische Milieu zu schützen. Dafür ist es mit speziellen Schlussleistenkomplexen (tight junctions) ausgestattet, welche die Passage von Substanzen durch die Gefäßwand verhindern, sowie mit Transporterproteinen, die einen regulierten Durchfluss spezifischer Substanzen ermöglichen (Langen et al., 2019). Wie bereits in der Einleitung erwähnt, besitzt das Gehirn mit den zirkumventrikulären Organen spezielle Bereiche, die von der Blut-Hirn-Schranke ausgenommen sind. Diese Areale zeichnen sich durch fenestrierte Endothelien aus und zeigen somit einen eher sinusoidalen Phänotyp. Im Einklang mit unseren Ergebnissen konnte in Studien demonstriert werden, dass eine Überaktivierung von β -Catenin in diesen Endothelien, die normalerweise im adulten Zustand eine niedrige β -Catenin-Aktivität aufweisen, zu einer Transdifferenzierung in einen Blut-Hirn-Schranken-ähnlichen Phänotyp führen kann. In Claudin-5 (*Cldn5*)-positiven Gefäßen führte die Stabilisierung der Schlussleistenkomplexe zu einer Reduktion von PLVAP (plasmalemma vesicle-associated protein) und Fenestrations, wodurch die Permeabilität signifikant verringert wurde (Benz et al., 2019; Wang et al., 2019). Ähnliche Effekte konnten durch die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs an humanen Endothel-Vorgängerzellen aus pluripotenten Stammzellen erzielt werden. Dabei wurde mittels RNA-Sequenzierung ein Transkriptom identifiziert, das dem Endothel mit Blut-Hirn-Schranken-Funktion stark ähnelt (Gastfriend et al., 2021). In den *Ctnnb1^{OE-EC}* LSEC zeigte sich jedoch keine signifikante Veränderung der Expression des TJ-Proteins *Cldn5*. Dies könnte auf eine ebenfalls unveränderte

Expression von GATA4 zurückzuführen sein, einem bekannten Regulator der LSEC-Identität. Dieser Zusammenhang deutet darauf hin, dass der Effekt des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in der Leber möglicherweise weniger stark ausgeprägt ist.

Auch eine induzierte panendotheliale β -Catenin Überaktivierung zeigte Ähnlichkeiten mit den hier untersuchten *Ctnnb1*^{OE-EC} LSEC in Bezug auf signifikant dysregulierte Gene (Munji et al., 2019). Im Kontrast dazu konnte gezeigt werden, dass eine Verminderung der Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in Gefäßen des zentralen Nervensystems die Runterregulation von TJ-Molekülen und Transporterproteinen und Erhöhung der PLVAP Expression zur Folge hatte (Daneman et al., 2009; Liebner et al., 2008; Stenman et al., 2008). Ein experimentell induzierter Verlust von PLVAP, welches essentiell für die Bildung von Fenestrations in LSEC ist, führte weiter zu einer signifikanten Beeinträchtigung des Lipidtransports zwischen den Lebersinusoiden und Hepatozyten. Dies resultierte in einer Akkumulation von Chylomikron-Remnants, Hyperlipoproteinämie und erhöhten LDL-, Cholesterin- und Triglyceridspiegeln im Plasma. Gleichzeitig wurden HDL- und Albuminspiegel reduziert. Es wurde diskutiert, dass kompensatorische Lipogenese durch Hepatozyten für das langfristige Entwickeln von Steatose, Steatohepatitis und Fibrose in den PLVAP-defizienten Lebern verantwortlich sein könnte (Herrnberger et al., 2014). Eine isolierte Hypertriglyceridämie aufgrund einer reduzierten PLVAP-Expression erscheint jedoch unwahrscheinlich, da die *Ctnnb1*^{OE-EC} Mutanten keine Steatose oder Fibrose entwickelten. Der Effekt ist in unserem Fall stärker abgeschwächt, da wir *Ctnnb1* nur in LSEC überaktiviert haben, im Vergleich zur panendothelialen Überaktivierung.

Nur sinusoidale Endothelzellen der Leber ermöglichen eine Filtration von Chylomikronen-Überbleibsel (*Remnants*) aus dem Blut. Reduziert man die Fenestrations in den LSEC, so wird die Passage erschwert und experimentell konnte eine darauffolgende Hyperlipidämie gezeigt werden (Cogger et al., 2006; Fraser et al., 1995). Die β -Catenin-vermittelte Transdifferenzierung der Sinusoide mit teilweiser BBB-Reprogrammierung in *Ctnnb1*^{OE-EC} Mutanten könnte also ebenso die Aufnahme von Chylomikronen beeinträchtigen und zu erhöhten Serumlipidspiegeln führen. Frühere Studien unserer Arbeitsgruppe zeigen jedoch, dass der Verlust von Fenestrations und Aufbau einer Basalmembran in Gata4-defizienten LSEC zu einer Reduktion von Serumcholesterin- und Triglyceridspiegeln führten (Winkler et al., 2021) und ähnliche Kapillarisation der LSEC bei aktiviertem Notch Signalweg lediglich eine Reduktion des Cholesterins bewirkten (Wohlfeil et al., 2019). Eine β -Catenin-vermittelte Transdifferenzierung scheint eine spezifische Form der Hypertriglyceridämie zu fördern, die auf einem gestörten transendothelialen Transport oder einer Veränderung angiokriner Signalwege beruht, welche die Lipolyse und Lipogenese in Hepatozyten regulieren. Um diesen Mechanismus weiter zu erforschen, wäre es interessant, Messgrößen wie die Futtermittelaufnahme und Aktivität der *Ctnnb1*^{OE-EC} Mäuse zu berücksichtigen. Darüber hinaus könnten gezielte Diäten, wie Cholin- oder Methionin-defiziente und L-Aminosäuren haltige, zum Induzieren einer nicht-alkoholischen Steatose gebraucht werden und mögliche protektive Faktoren besser untersucht werden.

4.2 Metabolische Zonierung und Organogenese der Leber

In der vaskulären Nische der Leber ist die angiokrine Wnt-Signalgebung ein zentraler Regulator der Hepatozytenfunktion. Ein Fehlen zentraler angiokriner Faktoren dieses Signalwegs führt zu einer verminderten Lebergröße, einer gestörten metabolischen Zonierung und einer eingeschränkten Regenerationsfähigkeit (Leibing et al., 2018; Planas-Paz et al., 2016; Preziosi et al., 2018; Rocha et al., 2015; Wang et al., 2015). Hepatische Endothelzellen exprimieren Wnt2, Wnt9b, Mediator der Wnt Liganden Sekretion (*Wnt ligand secretion mediator*, WI) sowie den Wnt-Regulator R-Spondin 3 (Rspo3) (Geraud et al., 2010; Rocha et al., 2015). Perizentrale LSEC und Endothelzellen der Zentralvene fasilitieren mittels Wnt2, Wnt9b und Rspo3 die metabolische Zonierung sowie die Erneuerung der Hepatozyten. Dies gibt den Hepatozyten jeder Zone ein spezifisches metabolisches Genexpressionsmuster und damit eine funktionelle Spezialisierung (Carmon et al., 2011; Halpern et al., 2017; Rocha et al., 2015; Trefts et al., 2017; Wang et al., 2015).

In der periportalen Zone exprimieren Hepatozyten Enzyme der Glukoneogenese und Harnstoffsynthese, während perizentrale Hepatozyten für Glykolyse, Gallensäuresynthese und den Fremdstoffmetabolismus verantwortlich sind. Mehr als 50 % der Gene der Leber zeigen eine zonale Expression, die diese funktionelle Organisation widerspiegelt (Halpern et al., 2017). In den *Ctnnb1^{OE-EC}* Mäusen führte die β -Catenin Überaktivierung in LSEC zu einer Reduktion von *Wnt2*, während *Wnt9b* unverändert blieb. Diese Konstanz könnte die weitgehend erhaltene metabolische Zonierung der Leber erklären, die durch die unveränderte Expression periportal Marker wie Arginase 1 sowie perizentraler Marker wie Glutathionsynthetase und Cyp2E1 gestützt wird.

Das Körper- und Lebergewicht der 3 Monate alten *Ctnnb1^{OE-EC}*-Mäuse blieb im Vergleich zu den Kontrolltieren unverändert, wobei die weiblichen *Ctnnb1^{OE-EC}* Mäuse eine statistisch signifikante Verminderung des Lebergewichts aufwiesen. Die histologischen Analysen zeigten eine intakte Leberarchitektur mit erhaltenen Portalfeldern und Zentralvenen ohne Nekrosen, granulomatöse Bereiche oder pathologische Veränderungen der Gallengänge. Interessanterweise war jedoch die endotheliale Zonierung etwas verändert: Der midzonale Marker LYVE1 war signifikant reduziert, während perizentrale Endothelmarker wie EMCN sowie panendotheliale Marker wie Podocalyxin und CD31 unverändert blieben. Auch LSEC-spezifische Marker wie CD32b zeigten keine Abweichungen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass β -Catenin-Überaktivierung spezifische Veränderungen im endothelialen Phänotyp hervorruft, ohne die allgemeine Endothelzellcharakteristik oder zentrale LSEC-Funktionen umfassend zu beeinträchtigen. Dies steht im Kontrast zur Deletion von WI in hepatischen Endothelzellen, die eine gestörte metabolische Zonierung und ein vermindertes Leberwachstum verursacht, jedoch keine Veränderungen der endothelialen Zonierung mit sich brachte (Leibing et al., 2018).

Die β -Catenin-Überaktivierung förderte allerdings die Endothelzellproliferation signifikant, wie GSEA-Analysen zeigten. Eine Anreicherung in pro-proliferativen Gen-Sets wie „G2M Checkpoint“ und „E2F Targets“ sowie eine erhöhte Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 belegen diesen Effekt. Ähnliche Beobachtungen wurden in postnatalem Gehirn und Retina gemacht, wo ein Verlust endothelialer β -Catenin-Signale die Proliferation und das Sprouting der Gefäße beeinträchtigte (Martowicz et al., 2019).

Weiterhin zeigten histologische Färbungen wie PAS und Berliner Blau keine Auffälligkeiten hinsichtlich Glykogen- oder Eisenablagerungen. Auch Bmp2, ein LSEC-abhängiger Eisenregulator (Koch et al., 2017), blieb unverändert. Diese Stabilität, kombiniert mit den unveränderten panendothelialen und LSEC-spezifischen Genen, deutet darauf hin, dass die β -Catenin-Überaktivierung in LSEC zwar proliferative und spezifische angiokrine Veränderungen hervorruft, jedoch keine umfassenden dysregulatorischen Effekte auf den Metabolismus oder die strukturelle Integrität der Leber selbst hat.

4.3 Dilatative Kardiomyopathie nach endothelspezifischer β -Catenin-Überaktivierung

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass die endothelspezifische Überaktivierung von β -Catenin in *Ctnnb1^{OE-EC}* Mäusen zu einer dilatativen Kardiomyopathie führt. Dies wurde durch echokardiographische Analysen bestätigt, die bereits nach 2 Wochen eine signifikant reduzierte Ejektionsfraktion und ein erhöhtes linksventrikuläres Volumen zeigten. Gleichzeitig wurde in späteren Entwicklungsstadien eine Verdünnung der anterioren und posterioren Ventrikelwand beobachtet. Diese strukturellen und funktionellen Veränderungen des Herzens korrespondieren mit einer Zunahme des Herzgewichts und der Ventrikeldilatation, was auf eine fortschreitende Verschlechterung der Herzfunktion hinweist.

Zusätzlich wurde festgestellt, dass *Clec4g-iCre* in einer Untergruppe der kardialen Endothelzellen, insbesondere in den Koronararterien und im Endokard, aktiv ist. Dieser Befund unterstreicht die Bedeutung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in der Regulation der endothelialen und kardiovaskulären Homöostase. Die Ergebnisse der Studie legen nahe, dass die Überaktivierung dieses Signalwegs zu einer Form von angeborener Herzerkrankung beiträgt, die mit einem dilatativen Kardiomyopathie-Phänotyp assoziiert ist.

Eine vergleichbare Studie, in der β -Catenin konditional in arteriellen Endothelzellen mittels *Bmx-CreER^{T2}*-Mäuse überaktiviert wurde, zeigte ähnliche Ergebnisse (Nakagawa et al., 2016). Auch dort wurde ein erhöhtes Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht sowie zusätzlich eine gesteigerte Expression herzinsuffizienz-assoziiierter Gene wie *Nppa*, *Nppb* und *Col1a1* beobachtet. Die echokardiographischen Parameter dieser Studie, insbesondere die fraktionelle Verkürzung in Rahmen der Messung der linksventrikulären systolischen Funktion, spiegeln den Phänotyp der *Ctnnb1^{OE-EC}*-Mäuse wider (Lang et al., 2015) und bestätigen die pathologische Rolle von β -Catenin in der Entwicklung dilatativer Kardiomyopathien. Histologische Analysen ergaben weder Ischämieareale noch entzündliche oder fibrotische Veränderungen. Auch zeigte sich in weiterführenden Untersuchungen keine erhöhte Zahl apoptotischer Kardiomyozyten. Elektronenmikroskopische Befunde, wie erweiterte T-Tubuli und mitochondriale Degeneration, erinnerten an Phänotypen wie bei Kardiomyozyten-spezifischen Knockouts der ErbB2- und ErbB4-Rezeptoren sowie an Herzen von Patient*innen mit Trastuzumab-induzierter Kardiomyopathie. Diese Kardiomyopathien äußern sich laut den entsprechenden Studien als dilatative Kardiomyopathien mit Kammererweiterung, verringerter Wanddicke, eingeschränkter Kontraktilität und reduzierter Ejektionsfraktion (Crone et al., 2002; García-Rivello et al., 2005; Guarneri et al., 2006). Es wurde angenommen, dass eine Suppression der Neuregulin-ErbB-Signalgebung

als pathophysiologischer Mechanismus zur Progression der Herzinsuffizienz beiträgt (Nakagawa et al., 2016). Insgesamt ist allerdings ein direkter Vergleich der Phänotypen dieser Arbeit und der Studie von Nakagawa eingeschränkt und die erweiterte Analyse der *Bmx-CreERT²*-Mäuse in zukünftigen Studien wünschenswert. Nichtsdestotrotz, die beobachteten Übereinstimmungen untermauern die Hypothese, dass β -Catenin und der Wnt-Signalweg zentrale Rollen in der Pathogenese dilatativer Kardiomyopathien spielen.

Auch die endothelunabhängige Rolle von β -Catenin und des kanonischen Wnt-Signalwegs bei der Entstehung von Kardiomyopathien, insbesondere der arrhythmogenen Kardiomyopathie, wird diskutiert (Lorenzon et al., 2017). Wie bereits thematisiert, spielt der Wnt-Signalweg eine entscheidende Rolle in der gesunden Herzentwicklung und -septation, ist aber im adulten Herzen unter normalen Bedingungen nur schwach aktiv. Während nun eine Aktivierung nach Myokardinfarkt protektiv wirken soll, sind bei chronischer Überaktivierung profibrotische und hypertrophe Effekte im adulten Herzen beschrieben. Diese Effekte sowie die Wirkung von β -Catenin auf die Entstehung arrhythmogener Kardiomyopathien lassen sich jedoch nicht vollständig von der Rolle von β -Catenin im Lipidstoffwechsel trennen. So führte eine herzspezifische Deletion von β -Catenin zu einer Herunterregulation von Genen, die mit Fettsäuretransport, Lipolyse und Lipidspeicherung assoziiert sind, und in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen führten niedrige β -Catenin-Spiegel im Herzen zu einer Akkumulation von Triglyceriden in den Kardiomyozyten und verminderten freien Fettsäuren im Plasma (Balatskyi et al., 2023). Es lassen sich daher Parallelen zum beobachteten Leberphänotyp der *Ctnnb1^{OE-EC}* Mäuse in Bezug auf den Lipidstoffwechsel ziehen.

Eine naheliegende Ergänzung zur Phänotypisierung der mutierten Herzen, ähnlich den Messungen bei Nakagawa et al., wäre eine Blutdruckmessung zur besseren Einschätzung der generellen vaskulären Funktion. Zur besseren Kategorisierung der Kardiomyopathien sollte eine elektrokardiographische Untersuchung (EKG) der *Ctnnb1^{OE-EC}* Mäuse erfolgen. Hier könnten potentielle arrhythmogene Komponenten oder elektrische Leitungsanomalien identifiziert werden, die mit einer Überaktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges einhergehen könnten. Darüber hinaus wäre eine detaillierte Untersuchung des Endothelphänotyps im Herzen, differenziert nach den verschiedenen Entwicklungsstadien der mutierten Feten, essenziell.

4.4 Ausblick

Die normale sinusoidale Differenzierung erweist sich als entscheidend für grundlegende Funktionen der LSEC, einschließlich Scavenging, Immunregulation, Schutz vor Fibroseprozessen sowie für die angiokrine Regulation der Leberregeneration und des Eisenhaushalts (Koch et al., 2021; Lafoz et al., 2020; Poisson et al., 2017; Shetty et al., 2018). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine gestörte Differenzierung der LSEC hin zu einem kontinuierlichen Endothelphänotyp zusätzlich nicht nur die Aufnahme und Regulation von Fettsäuren in der Leber beeinflusst, sondern auch zu einer systemischen Dyslipidämie führen kann. Dies unterstreicht die zentrale Rolle der LSEC für die Lipidhomöostase, deren Beeinträchtigung, die Dyslipidämie, ein potenzieller Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen darstellt (Du and Qin, 2023).

Obwohl diese Ergebnisse Hinweise auf eine Interaktion zwischen der LSEC-Differenzierung und der Lipidhomöostase geben, bleibt der kausale Zusammenhang unklar. Es ist ungewiss, ob die veränderte Endothelzellstruktur direkt die Fettstoffwechselwege beeinflusst oder ob sekundäre angiokrine Signalwege eine Rolle spielen. Zukünftige Studien könnten untersuchen, ob spezifische Veränderungen in der Genexpression der transdifferenzierten LSEC mit den beobachteten metabolischen Effekten verknüpft sind und welche Rolle angiokrine Faktoren wie *Ap1n* in diesem Prozess spielen.

Auch unser Verständnis der kanonischen Wnt-Signaltransduktion im Hinblick auf ihre Funktion in der Herzentwicklung, Homöostase und Stoffwechsel hat zwar enorme Fortschritte gemacht, jedoch bleiben auch hier zahlreiche Fragen unbeantwortet. Insbesondere die zeitliche Entwicklung und spezifischen Mechanismen der pathologischen Prozesse gilt es aufzuklären. Die Bestimmung spezifischer transkriptioneller Kofaktoren und Partner von β -Catenin in unreifen und ausgereiften Kardiomyozyten könnten Aufschluss darüber geben, wie früh diese Veränderungen beginnen und welche molekularen Prozesse zugrunde liegen. Man kann annehmen, dass β -Catenin in Komplexen mit unterschiedlichen Proteinpartnern verschiedene Genexpressionsmuster reguliert, die Kardiomyozytendifferenzierung, Glukoseverbrauch und Fettsäurenverwertung steuern.

Die multiple Funktion von β -Catenin, sowohl im Metabolismus der Hepatozyten als auch der Kardiomyozyten, unterstreicht die Notwendigkeit weiterer intensiver Untersuchungen, um die vielfältigen molekularen Zusammenhänge besser zu verstehen. Dabei könnten Erkenntnisse über die Interaktion des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs mit metabolischen Prozessen in Herz und Leber nicht nur neue Therapiemöglichkeiten eröffnen, sondern auch bestehende Ansätze zur Behandlung von Dyslipidämie und kardiovaskulären Erkrankungen erweitern. Die gezielte Modulation dieses Signalwegs könnte vielversprechende Möglichkeiten bieten, um die endotheliale Funktion zu bewahren, die Lipidhomöostase und physiologische Herzfunktion wiederherzustellen und so metabolische und kardiovaskuläre Pathologien zu verhindern. Die komplexe Rolle dieses Signalwegs und die noch bestehenden Wissenslücken betonen, wie entscheidend zukünftige Forschung sein wird, um das volle Potenzial dieser Mechanismen zu entschlüsseln und für innovative medizinische Anwendungen nutzbar zu machen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Dissertation untersucht die Auswirkungen der Überaktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in Leber- und Herzendothelzellen von genetisch veränderten Mausmodellen (*Ctnnb1^{OE-EC}*). Hauptziel war es, die molekularen und physiologischen Konsequenzen dieser Überaktivierung zu analysieren und dabei insbesondere Veränderungen im endothelialen Phänotyp und deren systemische Auswirkungen zu beleuchten.

Die Überaktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs führte zu einer Transdifferenzierung von sinusoidalen zu kontinuierlichen Endothelzellen. Diese Veränderung war mit einer Dyslipidämie verbunden, die sich in erhöhten Serumtriglyceridwerten zeigte, während die Triglyceridgehalte in der Leber tendenziell reduziert waren. Es wurden keine Hinweise auf Leberfibrose oder strukturelle Schäden in der Leberarchitektur gefunden. Histologische und molekulare Analysen belegten eine weitgehend erhaltene metabolische Zonierung der Leber, jedoch mit einer Reduktion des midzonalen Markers LYVE1.

Durch umfassende Genexpressionsstudien wurden signifikante Veränderungen in Signalwegen identifiziert, darunter eine Hochregulation von Myc-assoziierten und proliferativen Genen in Lebersinusoidalendothelzellen. Die Hochregulation angiokriner Gene wie *Apln* deutet auf eine gestörte Lipidhomöostase hin, die potenziell durch veränderte endotheliale Signalmuster beeinflusst wird.

Im Herzen zeigten sich ähnliche Überaktivierungsmuster, jedoch ohne die ausgeprägte Transdifferenzierung wie in der Leber. Die Mäuse entwickelten eine dilatative Kardiomyopathie mit charakteristischen Veränderungen, wie vergrößerten Ventrikeln, reduzierter Ejektionsfraktion und dünneren Ventrikelwänden. Funktionelle Untersuchungen mittels Echokardiographie bestätigten eine verminderte Herzleistung, was eine Verbindung zwischen der endothelzellspezifischen Signalwegüberaktivierung und kardiovaskulären Dysfunktionen nahelegt.

Die Ergebnisse verdeutlichen die zentrale Rolle des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in der Differenzierung und Funktion von Endothelzellen sowie dessen Einfluss auf systemische Stoffwechselprozesse. Die Arbeit liefert neue Erkenntnisse zur Interaktion zwischen endothelialer Signalaktivität und Organdysfunktion, insbesondere in Leber und Herz, und eröffnet Perspektiven für weitere Untersuchungen zur pathophysiologischen Rolle von β -Catenin in endothelialen Systemen.

6 DANKSAGUNG

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Sergij Goerd, der mir ein ebenso spannendes wie facettenreiches Projekt anvertraute. Durch das von ihm geleitete Graduiertenkolleg 2099/2 „Hallmarks of Skin Cancer“ durfte ich nicht nur von einem Stipendium profitieren, sondern auch an zahlreichen inspirierenden und lehrreichen Veranstaltungen teilnehmen, die mich nachhaltig als Forschenden geprägt haben.

Ein weiterer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. med. Philipp-Sebastian Reiners-Koch und Herrn PD Dr. med. Victor Olsavszky, die mich als motivierte Betreuer während meiner Promotionsarbeit herausragend begleitet und geleitet haben. Ihre fachliche Expertise, ihre Geduld und ihre Anleitung waren essenziell für den Erfolg des Projekts.

Herrn Prof. Dr. med. Jörg Heineke und Herrn Dr. rer. nat. Felix Trogisch danke ich herzlich für die hervorragende Zusammenarbeit und ihre wertvolle Unterstützung durch die Durchführung der Echokardiographien. Ihr Beitrag hat wesentlich zur Aussagekraft der Arbeit beigetragen.

Herrn Dr. rer. nat. Kai Schledzewski, Frau Hiltrud Schönhaber und Frau Stephanie Riester, die mich mit ihrer herausragenden Unterstützung und ihrem reichen Erfahrungsschatz begleitet haben, danke ich für ihre fachliche Expertise, ihre wertvollen Ratschläge und die stets angenehme Zusammenarbeit. Sie und das ganze Laborteam haben maßgeblich zum Erfolg meiner Experimente beigetragen.

Meinen Mitdotorandinnen und Mitdotoranden danke ich dafür, dass ich mit ihnen eine so überaus kooperative und freundliche Atmosphäre erleben durfte. Ihre Unterstützung und der Austausch mit ihnen im Alltag haben meine Freude am Forschen und Entdecken von Anfang an befeuert.

Von Herzen möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die mich in jedem Moment unterstützt und motiviert haben. Meiner Mutter, Frau Urszula Schön-Sandorski, danke ich für ihre unermüdliche Liebe und Geduld. Meiner Partnerin, Sophia Adam, danke für ihr Verständnis, ihre Motivation und Zuneigung, mit der sie mir immer zur Seite stand. Eure Unterstützung hat mir in herausfordernden Zeiten die Kraft gegeben, nicht aufzugeben.

Schließlich möchte ich allen danken, die in irgendeiner Weise zum Erfolg dieses Projekts beigetragen haben – sei es durch Expertise, motivierende Worte oder einfach durch ihr Dasein.

7 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Sandorski, Kajetan
Geburtsdatum: 08.06.1995
Geburtsort: Posen (Polen)
Vater: Prof. Dr. Jan Tadeusz Sandorski
Mutter: Urszula Walentyna Schön-Sandorski

SCHULISCHER WERDEGANG

2005-2013 Gymnasium St. Ursula Schule Hannover
18.06.2013 Abitur

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS 2014/15 Beginn des Humanmedizinstudiums an der medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg
12.09.2016 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08.10.2020 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
19.11.2021 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
WS 2023/24 Beginn des Masterstudiums *Biomedical Engineering* an der medizinischen Fakultät der Universität Bern

8 LITERATURVERZEICHNIS

Abdel-Misih, S.R. und Bloomston, M. (2010). Liver anatomy. *Surg Clin North Am* 90, 643-653. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2010.04.017>

Aird, W.C. (2007). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* 100, 158-173. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000255691.76142.4a>

Amboss (2024): Leber. <https://next.amboss.com/de/article/F60q5S?q=leber&m=tlaxAk#Zd2e720665a4464aa1e9b8bf5aa0c8ecd>. Abgerufen 31.07.2024.

Amin, N. und Vincan, E. (2012). The Wnt signaling pathways and cell adhesion. *FBL* 17, 784-804. <https://doi.org/10.2741/3957>

Arima, Y. (2023). The Impact of Ketone Body Metabolism on Mitochondrial Function and Cardiovascular Diseases. *J Atheroscler Thromb* 30, 1751-1758. <https://doi.org/10.5551/jat.RV22011>

Augustin, H.G. und Koh, G.Y. (2017). Organotypic vasculature: From descriptive heterogeneity to functional pathophysiology. *Science* 357. <https://doi.org/10.1126/science.aal2379>

Balatskyi, V.V., Sowka, A., Dobrzyn, P. und Piven, O.O. (2023). WNT/ β -catenin pathway is a key regulator of cardiac function and energetic metabolism. *Acta Physiologica* 237, e13912. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/apha.13912>

Barros, V. (2019). The heart cycle: review. *Women's Health* 8, 66-69. <https://doi.org/10.15406/mojwh.2019.08.00214>

Bedogni, G., Bellentani, S., Miglioli, L., Masutti, F., Passalacqua, M., Castiglione, A. und Tiribelli, C. (2006). The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol* 6, 33. <https://doi.org/10.1186/1471-230x-6-33>

Benz, F., Wichitnaowarat, V., Lehmann, M., Germano, R.F., Mihova, D., Macas, J., Adams, R.H., Taketo, M.M., Plate, K.H., Guerit, S., *et al.* (2019). Low wnt/beta-catenin signaling determines leaky vessels in the subfornical organ and affects water homeostasis in mice. *Elife* 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.43818>

Berliner, D., Sonnenschein, K. und Bauersachs, J. (2023). Kardiomyopathien. In *Klinische Kardiologie: Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße*, N. Marx, and E. Erdmann, Hrsg. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), S. 365-393.

Bogdanos, D.P., Gao, B. und Gershwin, M.E. Liver Immunology. In *Comprehensive Physiology*, S. 567-598.

Brown, G.T. und Kleiner, D.E. (2016). Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Metabolism* 65, 1080-1086. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.11.008>

Brutsaert, D.L. (2003). Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity. *Physiol Rev* 83, 59-115. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2002>

Cadigan, K.M. und Waterman, M.L. (2012). TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007906>

Carmon, K.S., Gong, X., Lin, Q., Thomas, A. und Liu, Q. (2011). R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 11452-11457. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106083108>

Carreira, C.M., Nasser, S.M., di Tomaso, E., Padera, T.P., Boucher, Y., Tomarev, S.I. und Jain, R.K. (2001). LYVE-1 Is Not Restricted to the Lymph Vessels: Expression in Normal Liver Blood Sinusoids and Down-Regulation in Human Liver Cancer and Cirrhosis¹. *Cancer Research* 61, 8079-8084.

Chang, Alex C.Y., Fu, Y., Garside, Victoria C., Niessen, K., Chang, L., Fuller, M., Setiadi, A., Smrz, J., Kyle, A., Minchinton, A., *et al.* (2011). Notch Initiates the Endothelial-to-Mesenchymal Transition in the Atrioventricular Canal through Autocrine Activation of Soluble Guanylyl Cyclase. *Developmental Cell* 21, 288-300. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.06.022>

Chen, E.Y., Tan, C.M., Kou, Y., Duan, Q., Wang, Z., Meirelles, G.V., Clark, N.R. und Ma'ayan, A. (2013). Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* 14, 128. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-128>

Chen, H., Wong, C.C., Liu, D., Go, M.Y.Y., Wu, B., Peng, S., Kuang, M., Wong, N. und Yu, J. (2019a). APLN promotes hepatocellular carcinoma through activating PI3K/Akt pathway and is a druggable target. *Theranostics* 9, 5246-5260. <https://doi.org/10.7150/thno.34713>

Chen, W., Xia, P., Wang, H., Tu, J., Liang, X., Zhang, X. und Li, L. (2019b). The endothelial tip-stalk cell selection and shuffling during angiogenesis. *J Cell Commun Signal* 13, 291-301. <https://doi.org/10.1007/s12079-019-00511-z>

Cogger, V.C., Hilmer, S.N., Sullivan, D., Muller, M., Fraser, R. und Le Couteur, D.G. (2006). Hyperlipidemia and surfactants: the liver sieve is a link. *Atherosclerosis* 189, 273-281. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2005.12.025>

Crone, S.A., Zhao, Y.-Y., Fan, L., Gu, Y., Minamisawa, S., Liu, Y., Peterson, K.L., Chen, J., Kahn, R., Condorelli, G., *et al.* (2002). ErbB2 is essential in the prevention of dilated cardiomyopathy. *Nature Medicine* 8, 459-465. <https://doi.org/10.1038/nm0502-459>

Daneman, R., Agalliu, D., Zhou, L., Kuhnert, F., Kuo, C.J. und Barres, B.A. (2009). Wnt/beta-catenin signaling is required for CNS, but not non-CNS, angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 641-646. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805165106>

-
- Daneman, R., Zhou, L., Agalliu, D., Cahoy, J.D., Kaushal, A. und Barres, B.A. (2010). The mouse blood-brain barrier transcriptome: a new resource for understanding the development and function of brain endothelial cells. *PLoS One* 5, e13741. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013741>
- de la Grandmaison, G.L., Clairand, I. und Durigon, M. (2001). Organ weight in 684 adult autopsies: new tables for a Caucasoid population. *Forensic Science International* 119, 149-154. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(00\)00401-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0379-0738(00)00401-1)
- Deb, A. (2014). Cell-cell interaction in the heart via Wnt/beta-catenin pathway after cardiac injury. *Cardiovasc Res* 102, 214-223. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu054>
- Dejana, E. und Kühl, M. (2010). The Role of Wnt Signaling in Physiological and Pathological Angiogenesis. *Circulation Research* 107, 943-952. <https://doi.org/doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.223750>
- Diehl, L., Schurich, A., Grochtmann, R., Hegenbarth, S., Chen, L. und Knolle, P.A. (2008). Tolerogenic maturation of liver sinusoidal endothelial cells promotes B7-homolog 1-dependent CD8+ T cell tolerance. *Hepatology* 47, 296-305. <https://doi.org/10.1002/hep.21965>
- Ding, B.S., Nolan, D.J., Butler, J.M., James, D., Babazadeh, A.O., Rosenwaks, Z., Mittal, V., Kobayashi, H., Shido, K., Lyden, D., *et al.* (2010). Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration. *Nature* 468, 310-315. <https://doi.org/10.1038/nature09493>
- Dor, Y. und Keshet, E. (1997). Ischemia-Driven Angiogenesis. *Trends in Cardiovascular Medicine* 7, 289-294. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1050-1738\(97\)00091-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1050-1738(97)00091-1)
- Doyonnas, R., Nielsen, J.S., Chelliah, S., Drew, E., Hara, T., Miyajima, A. und McNagny, K.M. (2005). Podocalyxin is a CD34-related marker of murine hematopoietic stem cells and embryonic erythroid cells. *Blood* 105, 4170-4178. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-10-4077>
- Du, Z. und Qin, Y. (2023). Dyslipidemia and Cardiovascular Disease: Current Knowledge, Existing Challenges, and New Opportunities for Management Strategies. *J Clin Med* 12. <https://doi.org/10.3390/jcm12010363>
- Duncker, D.J. und Bache, R.J. (2008). Regulation of Coronary Blood Flow During Exercise. *Physiological Reviews* 88, 1009-1086. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2006>
- Dye, B. und Lincoln, J. (2020). The Endocardium and Heart Valves. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 12. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036723>
- Elliott, P., Andersson, B., Arbustini, E., Bilinska, Z., Cecchi, F., Charron, P., Dubourg, O., Kühl, U., Maisch, B., McKenna, W.J., *et al.* (2007). Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the european society of cardiology working group on myocardial and pericardial diseases. *European Heart Journal* 29, 270-276. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehm342>

Fraser, R., Dobbs, B.R. und Rogers, G.W. (1995). Lipoproteins and the liver sieve: the role of the fenestrated sinusoidal endothelium in lipoprotein metabolism, atherosclerosis, and cirrhosis. *Hepatology* 21, 863-874.

García-Rivello, H., Taranda, J., Said, M., Cabeza-Meckert, P., Vila-Petroff, M., Scaglione, J., Ghio, S., Chen, J., Lai, C., Laguens, R.P., *et al.* (2005). Dilated cardiomyopathy in Erb-b4-deficient ventricular muscle. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 289, H1153-H1160. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00048.2005>

Gastfriend, B.D., Nishihara, H., Canfield, S.G., Foreman, K.L., Engelhardt, B., Palecek, S.P. und Shusta, E.V. (2021). Wnt signaling mediates acquisition of blood–brain barrier properties in naïve endothelium derived from human pluripotent stem cells. *eLife* 10, e70992. <https://doi.org/10.7554/eLife.70992>

Gemberling, M., Karra, R., Dickson, A.L. und Poss, K.D. (2015). Nrg1 is an injury-induced cardiomyocyte mitogen for the endogenous heart regeneration program in zebrafish. *Elife* 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.05871>

Geraud, C., Koch, P.S., Zierow, J., Klapproth, K., Busch, K., Olsavszky, V., Leibing, T., Demory, A., Ulbrich, F., Dieltz, M., *et al.* (2017). GATA4-dependent organ-specific endothelial differentiation controls liver development and embryonic hematopoiesis. *J Clin Invest* 127, 1099-1114. <https://doi.org/10.1172/JCI90086>

Geraud, C., Schledzewski, K., Demory, A., Klein, D., Kaus, M., Peyre, F., Sticht, C., Evdokimov, K., Lu, S., Schmieder, A., *et al.* (2010). Liver sinusoidal endothelium: a microenvironment-dependent differentiation program in rat including the novel junctional protein liver endothelial differentiation-associated protein-1. *Hepatology* 52, 313-326. <https://doi.org/10.1002/hep.23618>

Grant, D., Wanner, N., Frimel, M., Erzurum, S. und Asosingh, K. (2021). Comprehensive phenotyping of endothelial cells using flow cytometry 2: Human. *Cytometry A* 99, 257-264. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24293>

Gray, H. (1878). *Anatomy of the human body*, Bd. 8 (Lea & Febiger).

Greene, A.K., Wiener, S., Puder, M., Yoshida, A., Shi, B., Perez-Atayde, A.R., Efstathiou, J.A., Holmgren, L., Adamis, A.P., Rupnick, M., *et al.* (2003). Endothelial-directed hepatic regeneration after partial hepatectomy. *Ann Surg* 237, 530-535. <https://doi.org/10.1097/01.Sla.0000059986.96051.Ea>

Grego-Bessa, J., Luna-Zurita, L., del Monte, G., Bolós, V., Melgar, P., Arandilla, A., Garratt, A.N., Zang, H., Mukoyama, Y.S., Chen, H., *et al.* (2007). Notch signaling is essential for ventricular chamber development. *Dev Cell* 12, 415-429. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.12.011>

Gu, Z., Eils, R. und Schlesner, M. (2016). Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics* 32, 2847-2849. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw313>

Guarneri, V., Lenihan, D.J., Valero, V., Durand, J.B., Broglio, K., Hess, K.R., Michaud, L.B., Gonzalez-Angulo, A.M., Hortobagyi, G.N. und Esteva, F.J. (2006). Long-term cardiac tolerability of trastuzumab in metastatic breast cancer: the M.D. Anderson

Cancer Center experience. *J Clin Oncol* 24, 4107-4115. <https://doi.org/10.1200/jco.2005.04.9551>

Hall, A., Cotoi, C., Luong, T.V., Watkins, J., Bhathal, P. und Quaglia, A. (2021). Collagen and elastic fibres in acute and chronic liver injury. *Scientific Reports* 11, 14569. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93566-1>

Halpern, K.B., Shenhav, R., Matcovitch-Natan, O., Tóth, B., Lemze, D., Golan, M., Massasa, E.E., Baydatch, S., Landen, S., Moor, A.E., *et al.* (2017). Single-cell spatial reconstruction reveals global division of labour in the mammalian liver. *Nature* 542, 352-356. <https://doi.org/10.1038/nature21065>

Hänselmann, A., Veltmann, C., Bauersachs, J. und Berliner, D. (2020). Dilated cardiomyopathies and non-compaction cardiomyopathy. *Herz* 45, 212-220. <https://doi.org/10.1007/s00059-020-04903-5>

Harada, N., Tamai, Y., Ishikawa, T., Sauer, B., Takaku, K., Oshima, M. und Taketo, M.M. (1999). Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene. *Embo j* 18, 5931-5942. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.21.5931>

Häussinger, D. und Löffler, G. (2022). LeberLeber – Zentrales Stoffwechselorgan. In Löffler/Petrides *Biochemie und Pathobiochemie*, P.C. Heinrich, M. Müller, L. Graeve, and H.-G. Koch, Hrsg. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), S. 1027-1047.

Hayat, R., Manzoor, M. und Hussain, A. (2022). Wnt signaling pathway: A comprehensive review. *Cell Biol Int* 46, 863-877. <https://doi.org/10.1002/cbin.11797>

He, T.C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L.T., Morin, P.J., Vogelstein, B. und Kinzler, K.W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281, 1509-1512. <https://doi.org/10.1126/science.281.5382.1509>

Hedhli, N., Dobrucki, L.W., Kalinowski, A., Zhuang, Z.W., Wu, X., Russell, R.R., 3rd, Sinusas, A.J. und Russell, K.S. (2012). Endothelial-derived neuregulin is an important mediator of ischaemia-induced angiogenesis and arteriogenesis. *Cardiovasc Res* 93, 516-524. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr352>

Heinrich, P.C., Sieger, R.M. und Löffler, G. (2022). Gastrointestinaltrakt. In Löffler/Petrides *Biochemie und Pathobiochemie*, P.C. Heinrich, M. Müller, L. Graeve, and H.-G. Koch, Hrsg. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), S. 991-1026.

Herrnberger, L., Hennig, R., Kremer, W., Hellerbrand, C., Goepferich, A., Kalbitzer, H.R. und Tamm, E.R. (2014). Formation of fenestrae in murine liver sinusoids depends on plasmalemma vesicle-associated protein and is required for lipoprotein passage. *PLoS One* 9, e115005. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115005>

Hu, S., Liu, S., Bian, Y., Poddar, M., Singh, S., Cao, C., McGaughey, J., Bell, A., Blazer, L.L., Adams, J.J., *et al.* (2022). Single-cell spatial transcriptomics reveals a dynamic control of metabolic zonation and liver regeneration by endothelial cell Wnt2 and Wnt9b. *Cell Reports Medicine* 3. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100754>

Huang, J., Kang, S., Park, S.J. und Im, D.S. (2017). Apelin protects against liver X receptor-mediated steatosis through AMPK and PPARalpha in human and mouse hepatocytes. *Cell Signal* 39, 84-94. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.08.003>

Hwangbo, C., Wu, J., Papangeli, I., Adachi, T., Sharma, B., Park, S., Zhao, L., Ju, H., Go, G.W., Cui, G., *et al.* (2017). Endothelial APLNR regulates tissue fatty acid uptake and is essential for apelin's glucose-lowering effects. *Sci Transl Med* 9. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad4000>

Ishii, Y., Langberg, J., Rosborough, K. und Mikawa, T. (2009). Endothelial cell lineages of the heart. *Cell Tissue Res* 335, 67-73. <https://doi.org/10.1007/s00441-008-0663-z>

Kalucka, J., de Rooij, L.P.M.H., Goveia, J., Rohlenova, K., Dumas, S.J., Meta, E., Conchinha, N.V., Taverna, F., Teuwen, L.-A., Veys, K., *et al.* (2020). Single-Cell Transcriptome Atlas of Murine Endothelial Cells. *Cell* 180, 764-779.e720. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.01.015>

Kato, M. (2017). Canonical and non-canonical WNT signaling in cancer stem cells and their niches: Cellular heterogeneity, omics reprogramming, targeted therapy and tumor plasticity (Review). *Int J Oncol* 51, 1357-1369. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4129>

King, J. und Lowery, D.R. (2024). Physiology, Cardiac Output. In *StatPearls (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.)*.

Klein, D., Demory, A., Peyre, F., Kroll, J., Géraud, C., Ohnesorge, N., Schledzewski, K., Arnold, B. und Goerdt, S. (2009). Wnt2 acts as an angiogenic growth factor for non-sinusoidal endothelial cells and inhibits expression of stanniocalcin-1. *Angiogenesis* 12, 251-265. <https://doi.org/10.1007/s10456-009-9145-5>

Kleiner, D.E., Brunt, E.M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M.J., Cummings, O.W., Ferrell, L.D., Liu, Y.C., Torbenson, M.S., Unalp - Arida, A., *et al.* (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease †. *Hepatology* 41, 1313-1321. <https://doi.org/10.1002/hep.20701>

Koch, P.S., Lee, K.H., Goerdt, S. und Augustin, H.G. (2021). Angiodiversity and organotypic functions of sinusoidal endothelial cells. *Angiogenesis* 24, 289-310. <https://doi.org/10.1007/s10456-021-09780-y>

Koch, P.S., Olsavszky, V., Ulbrich, F., Sticht, C., Demory, A., Leibing, T., Henzler, T., Meyer, M., Zierow, J., Schneider, S., *et al.* (2017). Angiocrine Bmp2 signaling in murine liver controls normal iron homeostasis. *Blood* 129, 415-419. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-07-729822>

Korotkevich, G., Sukhov, V., Budin, N., Shpak, B., Artyomov, M.N. und Sergushichev, A. (2021). Fast gene set enrichment analysis. *bioRxiv*, 060012. <https://doi.org/10.1101/060012>

Kruepunga, N., Hakvoort, T.B.M., Hikspoors, J., Kohler, S.E. und Lamers, W.H. (2019). Anatomy of rodent and human livers: What are the differences? *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1865, 869-878. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.05.019>

Krüger-Genge, A., Blocki, A., Franke, R.P. und Jung, F. (2019). Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20184411>

Lafoz, E., Ruart, M., Anton, A., Oncins, A. und Hernandez-Gea, V. (2020). The Endothelium as a Driver of Liver Fibrosis and Regeneration. *Cells* 9. <https://doi.org/10.3390/cells9040929>

Lang, R.M., Badano, L.P., Mor-Avi, V., Afilalo, J., Armstrong, A., Ernande, L., Flachskampf, F.A., Foster, E., Goldstein, S.A., Kuznetsova, T., *et al.* (2015). Recommendations for Cardiac Chamber Quantification by Echocardiography in Adults: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *European Heart Journal - Cardiovascular Imaging* 16, 233-271. <https://doi.org/10.1093/ehjci/jev014>

Langen, U.H., Ayloo, S. und Gu, C. (2019). Development and Cell Biology of the Blood-Brain Barrier. *Annu Rev Cell Dev Biol* 35, 591-613. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100617-062608>

Leibing, T., Geraud, C., Augustin, I., Boutros, M., Augustin, H.G., Okun, J.G., Langhans, C.D., Zierow, J., Wohlfeil, S.A., Olsavszky, V., *et al.* (2018). Angiocrine Wnt signaling controls liver growth and metabolic maturation in mice. *Hepatology* 68, 707-722. <https://doi.org/10.1002/hep.29613>

Leone, O., Veinot, J.P., Angelini, A., Baandrup, U.T., Basso, C., Berry, G., Bruneval, P., Burke, M., Butany, J., Calabrese, F., *et al.* (2012). 2011 Consensus statement on endomyocardial biopsy from the Association for European Cardiovascular Pathology and the Society for Cardiovascular Pathology. *Cardiovascular Pathology* 21, 245-274. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carpath.2011.10.001>

Li, D., Sun, J. und Zhong, T.P. (2022). Wnt Signaling in Heart Development and Regeneration. *Curr Cardiol Rep* 24, 1425-1438. <https://doi.org/10.1007/s11886-022-01756-8>

Li, X., Lu, Q., Peng, Y., Geng, F., Shao, X., Zhou, H., Cao, Y. und Zhang, R. (2020). Primary cilia mediate Klf2-dependant Notch activation in regenerating heart. *Protein Cell* 11, 433-445. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00695-w>

Liebner, S., Cattelino, A., Gallini, R., Rudini, N., Iurlaro, M., Piccolo, S. und Dejana, E. (2004). Beta-catenin is required for endothelial-mesenchymal transformation during heart cushion development in the mouse. *J Cell Biol* 166, 359-367. <https://doi.org/10.1083/jcb.200403050>

Liebner, S., Corada, M., Bangsow, T., Babbage, J., Taddei, A., Czupalla, C.J., Reis, M., Felici, A., Wolburg, H., Fruttiger, M., *et al.* (2008). Wnt/beta-catenin signaling controls development of the blood-brain barrier. *J Cell Biol* 183, 409-417. <https://doi.org/10.1083/jcb.200806024>

Litviňuková, M., Talavera-López, C., Maatz, H., Reichart, D., Worth, C.L., Lindberg, E.L., Kanda, M., Polanski, K., Heinig, M., Lee, M., *et al.* (2020). Cells of the adult human heart. *Nature* 588, 466-472. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2797-4>

Liu, C., Shao, Z.-M., Zhang, L., Beatty, P., Sartippour, M., Lane, T., Livingston, E. und Nguyen, M. (2001). Human Endomucin Is an Endothelial Marker. *Biochemical and*

Liu, J., Xiao, Q., Xiao, J., Niu, C., Li, Y., Zhang, X., Zhou, Z., Shu, G. und Yin, G. (2022). Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Signal Transduct Target Ther* 7, 3. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00762-6>

Lorenzon, A., Calore, M., Poloni, G., De Windt, L.J., Braghetta, P. und Rampazzo, A. (2017). Wnt/ β -catenin pathway in arrhythmogenic cardiomyopathy. *Oncotarget* 8, 60640-60655. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17457>

Lothar, A., Bergemann, S., Deng, L., Moser, M., Bode, C. und Hein, L. (2018). Cardiac Endothelial Cell Transcriptome. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 38, 566-574. <https://doi.org/doi:10.1161/ATVBAHA.117.310549>

Luis, S.A., Chan, J. und Pellikka, P.A. (2019). Echocardiographic Assessment of Left Ventricular Systolic Function: An Overview of Contemporary Techniques, Including Speckle-Tracking Echocardiography. *Mayo Clinic Proceedings* 94, 125-138. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2018.07.017>

Lüllmann-Rauch, R. und Asan, E. (2019a). Histologische Gliederung des Leberparenchyms. In *Taschenlehrbuch Histologie*, R. Lüllmann-Rauch, and E. Asan, Hrsg. (Georg Thieme Verlag).

Lüllmann-Rauch, R. und Asan, E. (2019b). Kreislauforgane. In *Taschenlehrbuch Histologie*, R. Lüllmann-Rauch, and E. Asan, Hrsg. (Georg Thieme Verlag).

Lüllmann-Rauch, R. und Asan, E. (2024). Wandschichten des Herzens. In *Taschenlehrbuch Histologie*, R. Lüllmann-Rauch, and E. Asan, Hrsg. (Georg Thieme Verlag KG).

M. Brunt, E. und G. Tiniakos, D. (2009). CHAPTER 41 - Fatty Liver Disease. In *Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract, and Pancreas (Second Edition)*, R.D. Odze, and J.R. Goldblum, Hrsg. (Philadelphia: W.B. Saunders), S. 1087-1114.

Martowicz, A., Trusohamn, M., Jensen, N., Wisniewska-Kruk, J., Corada, M., Ning, F.C., Kele, J., Dejana, E. und Nyqvist, D. (2019). Endothelial beta-Catenin Signaling Supports Postnatal Brain and Retinal Angiogenesis by Promoting Sprouting, Tip Cell Formation, and VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor) 2 Expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 39, 2273-2288. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.312749>

McKenna, W.J., Maron, B.J. und Thiene, G. (2017). Classification, Epidemiology, and Global Burden of Cardiomyopathies. *Circulation Research* 121, 722-730. <https://doi.org/doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.309711>

McNally, E.M. und Mestroni, L. (2017). Dilated Cardiomyopathy. *Circulation Research* 121, 731-748. <https://doi.org/doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309396>

Milgrom-Hoffman, M., Harrelson, Z., Ferrara, N., Zelzer, E., Evans, S.M. und Tzahor, E. (2011). The heart endocardium is derived from vascular endothelial progenitors. *Development* 138, 4777-4787. <https://doi.org/10.1242/dev.061192>

Miller, A.F., Harvey, S.A., Thies, R.S. und Olson, M.S. (2000). Bone morphogenetic protein-9. An autocrine/paracrine cytokine in the liver. *J Biol Chem* 275, 17937-17945. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.24.17937>

Munji, R.N., Soung, A.L., Weiner, G.A., Sohet, F., Semple, B.D., Trivedi, A., Gimlin, K., Kotoda, M., Korai, M., Aydin, S., *et al.* (2019). Profiling the mouse brain endothelial transcriptome in health and disease models reveals a core blood–brain barrier dysfunction module. *Nature Neuroscience* 22, 1892-1902. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0497-x>

Murphy, C. und Lazzara, R. (2016). Current concepts of anatomy and electrophysiology of the sinus node. *Journal of Interventional Cardiac Electrophysiology* 46, 9-18. <https://doi.org/10.1007/s10840-016-0137-2>

Nakagawa, A., Naito, A.T., Sumida, T., Nomura, S., Shibamoto, M., Higo, T., Okada, K., Sakai, T., Hashimoto, A., Kuramoto, Y., *et al.* (2016). Activation of endothelial beta-catenin signaling induces heart failure. *Sci Rep* 6, 25009. <https://doi.org/10.1038/srep25009>

Nakamura, T., Nawa, K. und Ichihara, A. (1984). Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 122, 1450-1459. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(84\)91253-1](https://doi.org/10.1016/0006-291x(84)91253-1)

Noireaud, J. und Andriantsitohaina, R. (2014). Recent insights in the paracrine modulation of cardiomyocyte contractility by cardiac endothelial cells. *Biomed Res Int* 2014, 923805. <https://doi.org/10.1155/2014/923805>

Nusse, R. und Clevers, H. (2017). Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* 169, 985-999. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.016>

O'Donnell, A. und Yutzey, K.E. (2020). Mechanisms of heart valve development and disease. *Development* 147. <https://doi.org/10.1242/dev.183020>

Ober, E.A., Verkade, H., Field, H.A. und Stainier, D.Y. (2006). Mesodermal Wnt2b signalling positively regulates liver specification. *Nature* 442, 688-691. <https://doi.org/10.1038/nature04888>

Oertel, B. (1990). B. Romeis, *Mikroskopische Technik* (17. neubearbeitete und erweiterte Auflage, herausgegeben von P. BÖCK). 697 S., 49 Abb., ca. 40 Tab. München – Wien – Baltimore 1989. Urban und Schwarzenberg. DM 148,00. ISBN: 3-541-11227-1. *Journal of Basic Microbiology* 30, 144-144. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jobm.3620300221>

Olsavszky, V., Sticht, C., Schmid, C.D., Winkler, M., Wohlfeil, S.A., Olsavszky, A., Schledzewski, K., Geraud, C., Goerdts, S., Leibing, T., *et al.* (2021). Exploring the transcriptomic network of multi-ligand scavenger receptor Stabilin-1- and Stabilin-2-deficient liver sinusoidal endothelial cells. *Gene* 768, 145284. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145284>

Ozhan, G. und Weidinger, G. (2015). Wnt/ β -catenin signaling in heart regeneration. *Cell Regeneration* 4, 4:3. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s13619-015-0017-8>

-
- Page, A.V. und Liles, W.C. (2013). Biomarkers of endothelial activation/dysfunction in infectious diseases *Virulence* 4, 507-516. <https://doi.org/10.4161/viru.24530>
- Parker, T.W. und Neufeld, K.L. (2020). APC controls Wnt-induced β -catenin destruction complex recruitment in human colonocytes. *Scientific Reports* 10, 2957. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59899-z>
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Planas-Paz, L., Orsini, V., Boulter, L., Calabrese, D., Pikiólek, M., Nigsch, F., Xie, Y., Roma, G., Donovan, A., Marti, P., *et al.* (2016). The RSPO-LGR4/5-ZNRF3/RNF43 module controls liver zonation and size. *Nat Cell Biol* 18, 467-479. <https://doi.org/10.1038/ncb3337>
- Poisson, J., Lemoine, S., Boulanger, C., Durand, F., Moreau, R., Valla, D. und Rautou, P.E. (2017). Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. *J Hepatol* 66, 212-227. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.07.009>
- Pombo, J.F., Troy, B.L. und Russell, R.O. (1971). Left Ventricular Volumes and Ejection Fraction by Echocardiography. *Circulation* 43, 480-490. <https://doi.org/doi:10.1161/01.CIR.43.4.480>
- Pratumvinit, B., Reesukumal, K., Janebodin, K., Ieronimakis, N. und Reyes, M. (2013). Isolation, characterization, and transplantation of cardiac endothelial cells. *Biomed Res Int* 2013, 359412. <https://doi.org/10.1155/2013/359412>
- Preziosi, M., Okabe, H., Poddar, M., Singh, S. und Monga, S.P. (2018). Endothelial Wnts regulate beta-catenin signaling in murine liver zonation and regeneration: A sequel to the Wnt-Wnt situation. *Hepatol Commun* 2, 845-860. <https://doi.org/10.1002/hep4.1196>
- Pusztaszeri, M.P., Seelentag, W. und Bosman, F.T. (2006). Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 54, 385-395. <https://doi.org/10.1369/jhc.4A6514.2005>
- Qin, J., Higashi, T., Nakagawa, S., Fujiwara, N., Yamashita, Y.I., Beppu, T., Baba, H., Kobayashi, M., Kumada, H., Gunasekaran, G., *et al.* (2020). Steatohepatitic Variant of Hepatocellular Carcinoma Is Associated With Both Alcoholic Steatohepatitis and Nonalcoholic Steatohepatitis: A Study of 2 Cohorts With Molecular Insights. *Am J Surg Pathol* 44, 1406-1412. <https://doi.org/10.1097/pas.0000000000001533>
- Quijada, P., Trembley, M.A., Misra, A., Myers, J.A., Baker, C.D., Pérez-Hernández, M., Myers, J.R., Dirx, R.A., Cohen, E.D., Delmar, M., *et al.* (2021). Coordination of endothelial cell positioning and fate specification by the epicardium. *Nature Communications* 12, 4155. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24414-z>
- Rafii, S., Butler, J.M. und Ding, B.S. (2016). Angiocrine functions of organ-specific endothelial cells. *Nature* 529, 316-325. <https://doi.org/10.1038/nature17040>

Rappaport, A.M. und Wilson, W.D. (1958). The structural and functional unit in the human liver (liver acinus). *The Anatomical Record* 130, 673-689. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ar.1091300405>

Raslan, A.A. und Yoon, J.K. (2020). WNT Signaling in Lung Repair and Regeneration. *Molecules and Cells* 43, 774-783. <https://doi.org/https://doi.org/10.14348/molcells.2020.0059>

Rassow, J. (2016). Biochemie der Leber. In *Duale Reihe Biochemie*, J. Rassow, K. Hauser, R. Deutzmann, and R. Netzker, Hrsg. (Georg Thieme Verlag KG).

Rocha, A.S., Vidal, V., Mertz, M., Kendall, T.J., Charlet, A., Okamoto, H. und Schedl, A. (2015). The Angiocrine Factor Rspodin3 Is a Key Determinant of Liver Zonation. *Cell Rep* 13, 1757-1764. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.10.049>

Rodriguez, E.R. und Tan, C.D. (2017). Structure and Anatomy of the Human Pericardium. *Progress in Cardiovascular Diseases* 59, 327-340. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pcad.2016.12.010>

Rui, L. (2014). Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol* 4, 177-197. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130024>

Sabbagh, M.F., Heng, J.S., Luo, C., Castanon, R.G., Nery, J.R., Rattner, A., Goff, L.A., Ecker, J.R. und Nathans, J. (2018). Transcriptional and epigenomic landscapes of CNS and non-CNS vascular endothelial cells. *Elife* 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.36187>

Saremi, F., Sánchez-Quintana, D., Mori, S., Muresian, H., Spicer, D.E., Hassani, C. und Anderson, R.H. (2017). Fibrous Skeleton of the Heart: Anatomic Overview and Evaluation of Pathologic Conditions with CT and MR Imaging. *Radiographics* 37, 1330-1351. <https://doi.org/10.1148/rg.2017170004>

Sawane, M., Kajiya, K., Kidoya, H., Takagi, M., Muramatsu, F. und Takakura, N. (2013). Apelin inhibits diet-induced obesity by enhancing lymphatic and blood vessel integrity. *Diabetes* 62, 1970-1980. <https://doi.org/10.2337/db12-0604>

Sawane, M., Kidoya, H., Muramatsu, F., Takakura, N. und Kajiya, K. (2011). Apelin attenuates UVB-induced edema and inflammation by promoting vessel function. *Am J Pathol* 179, 2691-2697. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.08.024>

Schledzewski, K., Geraud, C., Arnold, B., Wang, S., Grone, H.J., Kempf, T., Wollert, K.C., Straub, B.K., Schirmacher, P., Demory, A., *et al.* (2011). Deficiency of liver sinusoidal scavenger receptors stabilin-1 and -2 in mice causes glomerulofibrotic nephropathy via impaired hepatic clearance of noxious blood factors. *J Clin Invest* 121, 703-714. <https://doi.org/10.1172/JCI44740>

Schmitz, F. (2020). Herz (Cor). In *Duale Reihe Anatomie*, G. Aumüller, G. Aust, A. Conrad, J. Engele, J. Kirsch, G. Maio, A. Mayerhofer, S. Mense, D. Reißig, J. Salvetter, *et al.*, Hrsg. (Georg Thieme Verlag KG).

Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U., Voll, M. und Wesker, K.H. (2022a). 3.1 Lage des Herzens im Thorax. In *Prometheus LernAtlas - Innere Organe*, M. Schünke,

E. Schulte, U. Schumacher, M. Voll, and K.H. Wesker, Hrsg. (Georg Thieme Verlag KG).

Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U., Voll, M. und Wesker, K.H. (2022b). 3.6 Herzklappen im Überblick (Ventilebene und Herzskelett). In Prometheus LernAtlas - Innere Organe, M. Schünke, E. Schulte, U. Schumacher, M. Voll, and K.H. Wesker, Hrsg. (Georg Thieme Verlag KG).

Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U., Voll, M. und Wesker, K.H. (2022c). 3.12 Die mechanische Herzaktion. In Prometheus LernAtlas - Innere Organe, M. Schünke, E. Schulte, U. Schumacher, M. Voll, and K.H. Wesker, Hrsg. (Georg Thieme Verlag KG).

Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U., Voll, M. und Wesker, K.H. (2022d). 3.13 Koronararterien und Herzvenen: Systematik und Topografie. In Prometheus LernAtlas - Innere Organe, M. Schünke, E. Schulte, U. Schumacher, M. Voll, and K.H. Wesker, Hrsg. (Georg Thieme Verlag KG).

Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U., Voll, M. und Wesker, K.H. (2022e). 3.13 Leber (Hepar): Lage und Bezug zu Nachbarorganen. In Prometheus LernAtlas - Innere Organe, M. Schünke, E. Schulte, U. Schumacher, M. Voll, and K.H. Wesker, Hrsg. (Georg Thieme Verlag KG).

Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U., Voll, M. und Wesker, K.H. (2022f). 3.15 Leber: Segmente und Histologie. In Prometheus LernAtlas - Innere Organe, M. Schünke, E. Schulte, U. Schumacher, M. Voll, and K.H. Wesker, Hrsg. (Georg Thieme Verlag KG).

Sharma, M., Castro-Piedras, I., Simmons, G.E., Jr. und Pruitt, K. (2018). Dishevelled: A masterful conductor of complex Wnt signals. *Cell Signal* 47, 52-64. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.03.004>

Shetty, S., Lalor, P.F. und Adams, D.H. (2018). Liver sinusoidal endothelial cells - gatekeepers of hepatic immunity. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 15, 555-567. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0020-y>

Srinivas, S., Watanabe, T., Lin, C.S., William, C.M., Tanabe, Y., Jessell, T.M. und Costantini, F. (2001). Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev Biol* 1, 4. <https://doi.org/10.1186/1471-213x-1-4>

St Pierre, S.R., Peirlinck, M. und Kuhl, E. (2022). Sex Matters: A Comprehensive Comparison of Female and Male Hearts. *Front Physiol* 13, 831179. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.831179>

Stenman, J.M., Rajagopal, J., Carroll, T.J., Ishibashi, M., McMahon, J. und McMahon, A.P. (2008). Canonical Wnt signaling regulates organ-specific assembly and differentiation of CNS vasculature. *Science* 322, 1247-1250. <https://doi.org/10.1126/science.1164594>

Strauss, O., Phillips, A., Ruggiero, K., Bartlett, A. und Dunbar, P.R. (2017). Immunofluorescence identifies distinct subsets of endothelial cells in the human liver. *Scientific Reports* 7, 44356. <https://doi.org/10.1038/srep44356>

-
- Takahashi, Y. und Fukusato, T. (2014). Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 20, 15539-15548. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i42.15539>
- Tian, Y., Cohen, E.D. und Morrisey, E.E. (2010). The importance of Wnt signaling in cardiovascular development. *Pediatr Cardiol* 31, 342-348. <https://doi.org/10.1007/s00246-009-9606-z>
- Tirziu, D., Chorianopoulos, E., Moodie, K.L., Palac, R.T., Zhuang, Z.W., Tjwa, M., Roncal, C., Eriksson, U., Fu, Q., Elfenbein, A., *et al.* (2007). Myocardial hypertrophy in the absence of external stimuli is induced by angiogenesis in mice. *J Clin Invest* 117, 3188-3197. <https://doi.org/10.1172/jci32024>
- Tortelote, G.G., Reis, R.R., de Almeida Mendes, F. und Abreu, J.G. (2017). Complexity of the Wnt/ β -catenin pathway: Searching for an activation model. *Cellular Signalling* 40, 30-43. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.08.008>
- Trefts, E., Gannon, M. und Wasserman, D.H. (2017). The liver. *Curr Biol* 27, R1147-r1151. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>
- Trimm, E. und Red-Horse, K. (2023). Vascular endothelial cell development and diversity. *Nature Reviews Cardiology* 20, 197-210. <https://doi.org/10.1038/s41569-022-00770-1>
- van der Wal, T. und van Amerongen, R. (2020). Walking the tight wire between cell adhesion and WNT signalling: a balancing act for β -catenin. *Open Biol* 10, 200267. <https://doi.org/10.1098/rsob.200267>
- Walter, T.J., Cast, A.E., Huppert, K.A. und Huppert, S.S. (2014). Epithelial VEGF signaling is required in the mouse liver for proper sinusoid endothelial cell identity and hepatocyte zonation in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 306, G849-862. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00426.2013>
- Wang, B., Zhao, L., Fish, M., Logan, C.Y. und Nusse, R. (2015). Self-renewing diploid Axin2(+) cells fuel homeostatic renewal of the liver. *Nature* 524, 180-185. <https://doi.org/10.1038/nature14863>
- Wang, Y., Sabbagh, M.F., Gu, X., Rattner, A., Williams, J. und Nathans, J. (2019). Beta-catenin signaling regulates barrier-specific gene expression in circumventricular organ and ocular vasculatures. *Elife* 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.43257>
- Weiß, J., Rau, M. und Geier, A. (2014). Non-alcoholic fatty liver disease: epidemiology, clinical course, investigation, and treatment. *Dtsch Arztebl Int* 111, 447-452. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2014.0447>
- Wessels, A. und Sedmera, D. (2003). Developmental anatomy of the heart: a tale of mice and man. *Physiological Genomics* 15, 165-176. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00033.2003>
- White, D.L., Kanwal, F. und El-Serag, H.B. (2012). Association between nonalcoholic fatty liver disease and risk for hepatocellular cancer, based on systematic review. *Clin Gastroenterol Hepatol* 10, 1342-1359.e1342. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2012.10.001>

Winkler, M., Staniczek, T., Kurschner, S.W., Schmid, C.D., Schonhaber, H., Cordero, J., Kessler, L., Mathes, A., Sticht, C., Nessling, M., *et al.* (2021). Endothelial GATA4 controls liver fibrosis and regeneration by preventing a pathogenic switch in angiocrine signaling. *J Hepatol* 74, 380-393. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.08.033>

Wohlfeil, S.A., Hafele, V., Dietsch, B., Schledzewski, K., Winkler, M., Zierow, J., Leibing, T., Mohammadi, M.M., Heineke, J., Sticht, C., *et al.* (2019). Hepatic Endothelial Notch Activation Protects against Liver Metastasis by Regulating Endothelial-Tumor Cell Adhesion Independent of Angiocrine Signaling. *Cancer Res* 79, 598-610. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-1752>

Yau, J.W., Teoh, H. und Verma, S. (2015). Endothelial cell control of thrombosis. *BMC Cardiovasc Disord* 15, 130. <https://doi.org/10.1186/s12872-015-0124-z>

Yokomori, H., Oda, M., Yoshimura, K. und Hibi, T. (2012). Enhanced expressions of apelin on proliferative hepatic arterial capillaries in human cirrhotic liver. *Hepatol Res* 42, 508-514. <https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2011.00945.x>

Yu, G., Wang, L.G., Han, Y. und He, Q.Y. (2012). clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS* 16, 284-287. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118>

Zhang, H., Lui, K.O. und Zhou, B. (2018). Endocardial Cell Plasticity in Cardiac Development, Diseases and Regeneration. *Circ Res* 122, 774-789. <https://doi.org/10.1161/circresaha.117.312136>