

Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
(Direktor: Prof. Dr. med. Matthias Laschke)

**Die Blockade des Erythropoietin-producing hepatoma receptor B4
(EphB4) - Signalwegs hemmt die Vaskularisierung und das
Wachstum von Endometrioseherden**

Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes

2025

vorgelegt von Sophia Adriane Fuß

geb. am 01.05.1990 in Freiburg im Breisgau

Meiner lieben Mutter

INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. SUMMARY.....	3
3. EINLEITUNG	5
3.1. Endometriose.....	5
3.2. Mechanismen der Vaskularisierung von Endometrioseherden	11
3.3. Der EphB4/EphrinB2-Signalweg bei der Endometriose	17
4. ZIELSTELLUNG	21
5. MATERIAL UND METHODEN	22
5.1. <i>In vitro</i> Experimente	22
5.1.1. Zelllinie.....	22
5.1.2. Zellkultur	22
5.1.3. Viabilitäts- und Zytotoxizitäts-Assays	22
5.1.4. Zellmigrations-Assay	23
5.1.5. Tube-Formation-Assay	24
5.1.6. Sphäroid-Sprouting-Assay.....	24
5.1.7. <i>Ex vivo</i> Aortenring-Assay	25
5.2. <i>In vivo</i> Experimente.....	26
5.2.1. Versuchstiere	26
5.2.2. Zyklusbestimmung.....	26
5.2.3. Gewinnung von Transplantaten.....	27
5.2.4. Modell der Rückenhautkammer.....	28
5.2.4.1. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	31
5.2.4.2. Mikrozirkulatorische Parameter	31
5.2.5. Modell der intraperitonealen Endometriose.....	32
5.2.5.1. Volumenmessung mittels hochauflösendem Ultraschall	33
5.2.5.2. Größenmessung mittels digitalem Messschieber.....	35
5.2.6. Histologie und Immunhistochemie.....	36
5.2.6.1. Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung.....	36
5.2.6.2. CD31-Färbung	36
5.2.6.3. CD31/α-smooth muscle actin (SMA)-Doppelfärbung	36
5.2.6.4. Ki67- und cleaved Caspase (Casp)-3-Färbung	37
5.2.7. Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR).....	37
5.3. Experimentelles Protokoll	38
5.3.1. Substanzapplikation.....	38
5.3.2. Modell der Rückenhautkammer.....	38
5.3.3. Modell der intraperitonealen Endometriose	39
5.4. Statistik.....	40
6. ERGEBNISSE.....	42

6.1. Effekte von NVP-BHG712 auf Endothelzellen.....	42
6.1.1. Zellviabilität	42
6.1.2. Zellmigration	42
6.1.3. Tube formation.....	43
6.1.4. Sprouting-Aktivität.....	44
6.1.5. <i>Ex vivo</i> Aortenring-Assay	44
6.2. Effekte von NVP-BHG712 auf Endometrioseherde in der Rückenhautkammer.....	45
6.2.1. Wachstum der Endometrioseherde	45
6.2.2. Vaskularisierte Fläche der Endometrioseherde	46
6.2.3. Funktionelle Kapillardichte in den Endometrioseherden	46
6.2.4. Mikrohämodynamik in den Endometrioseherden	47
6.2.5. Mikrogefäßdichte in den Endometrioseherden.....	47
6.2.6. Zellproliferation in den Endometrioseherden.....	48
6.3. Effekte von NVP-BHG712 auf intraperitoneale Endometrioseherde	48
6.3.1. Wachstum der Endometrioseherde	48
6.3.2. Mikrogefäßdichte in den Endometrioseherden.....	50
6.3.3. Mikrogefäßreife in den Endometrioseherden	51
6.3.4. Zellproliferation in den Endometrioseherden.....	51
6.3.5. Apoptoserate in den Endometrioseherden	52
6.3.6. mRNA-Expression von EphB4 in den Endometrioseherden	52
6.4. Zusammenfassung der Ergebnisse	53
7. DISKUSSION.....	55
7.1. Diskussion von Material und Methoden.....	55
7.1.1. <i>In vitro</i> Experimente	55
7.1.2. <i>In vivo</i> Experimente	56
7.2. Diskussion der Ergebnisse	59
7.3. Schlussfolgerungen und klinische Perspektiven	65
8. LITERATURVERZEICHNIS.....	66
9. DANKSAGUNG	78
10. LEBENSLAUF	79
11. PUBLIKATION.....	81

1. Zusammenfassung

Die Endometriose ist mit einer Prävalenz von ca. 10% eine häufig vorkommende, benigne Erkrankung in der Gynäkologie, unter der insbesondere Frauen im gebärfähigen Alter leiden. Histopathologisch ist die Erkrankung durch das Auftreten von funktionalem, Endometrium-ähnlichem Gewebe außerhalb der Gebärmutterhöhle definiert. Nach der Implantationstheorie von Sampson werden während der Menstruation Endometriumfragmente retrograd über die Eileiter in die Bauchhöhle verschleppt, wo sie dann adhärieren und proliferieren. Dieser Prozess ist in hohem Maße von der Ausbildung neuer Blutgefäße abhängig, welche die heranwachsenden Endometrioseherde mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen. Die Etablierung eines funktionsfähigen Gefäßnetzwerks in den Endometrioseherden wird durch verschiedene pro- und anti-angiogene Signalwege gesteuert. Einer dieser Signalwege wird durch die membranständige Tyrosinkinase Erythropoietin-producing hepatoma receptor B4 (EphB4) und ihren Liganden Erythropoietin-producing hepatoma interactor B2 (EprinB2) vermittelt. Interessanterweise wurde eine erhöhte Expression von EphB4 auch in ektopem Endometriumgewebe nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig untersucht, ob die Hemmung des EphB4-Signalwegs durch den Kinase-Inhibitor 4-Methyl-3-[[1-methyl-6-(3-pyridinyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-yl]amino]-N-[3-(trifluoromethyl)phenyl]-benzamide (NVP-BHG712) zu einer Unterdrückung der angiogenen Aktivität von Endothelzellen *in vitro* und der Vaskularisierung sowie des Größenwachstums von Endometrioseherden *in vivo* führt.

Anhand von verschiedenen Angiogenese-Assays konnte gezeigt werden, dass die Migration, die Tube Formation und die Sprouting-Aktivität sowohl von humanen Endothelzellen als auch von kultivierten Maus-Aortenringen durch NVP-BHG712 gehemmt wird.

Zur Untersuchung der Effekte von NVP-BHG712 auf die Entwicklung von neuen mikrovaskulären Netzwerken in Endometrioseherden unter *in vivo* Bedingungen wurden zwei etablierte Mausmodelle eingesetzt. Im ersten Modell wurden Endometriumfragmente auf die quergestreifte Muskulatur in der Rückenhautkammer von weiblichen BALB/c Mäusen transplantiert. Dieses Modell wurde zur Analyse der Gefäßmorphologie und Mikrohämodynamik der heranwachsenden Endometrioseherde mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie gewählt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den *in vitro* Analysen konnte eine signifikant reduzierte funktionelle Kapillardichte mit individuell dilatierten Mikrogefäßen unter der NVP-BHG712-Behandlung im Vergleich zur Vehikel-behandelten Kontrollgruppe über einen 14-tägigen Beobachtungszeitraum nachgewiesen werden. Dieser anti-angiogene Effekt wurde

am Ende der *in vivo* Versuche immunhistochemisch mit einer Fluoreszenzfärbung gegen CD31 zur Markierung der Mikrogefäße in den Endometrioseherden bestätigt.

Durch die syngene Transplantation von Uterusgewebe in die Bauchhöhle von BALB/c Mäusen konnte im zweiten Modell die Wirkung von NVP-BHG712 auf das Wachstum von Endometrioseherden mittels repetitiver, hochauflösender Ultraschallbildgebung über 28 Tage untersucht werden. Die Behandlung mit NVP-BHG712 führte zu einer Reduktion des Stromagewebes und zu einer verringerten Gesamtgröße der Endometrioseherde im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zusätzliche immunhistochemische Analysen an Tag 28 zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede in der mikrovaskulären Dichte und der Stromaproliferationsrate zwischen NVP-BHG712- und Vehikel-behandelten Endometrioseherden. Dies ist dadurch zu erklären, dass zu diesem späten Zeitpunkt der Herdentwicklung hauptsächlich ein Umbau der vorhandenen Gefäße und keine Angiogenese mehr stattfindet. Daher wurden in einem weiteren Experiment intraperitoneal induzierte Endometrioseherde bereits nach 7 Tagen histologisch analysiert. Zu diesem frühen Zeitpunkt konnte eine signifikant reduzierte mikrovaskuläre Dichte und Proliferationsrate des Stromagewebes unter der Behandlung mit NVP-BHG712 nachgewiesen werden.

In weiteren Analysen wurde mit Hilfe einer quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) eine tendenziell geringere messenger ribonucleic acid (mRNA)-Expression von EphB4 in NVP-BHG712 behandelten, intraperitonealen Endometrioseherden nach 28 Tagen gemessen. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass NVP-BHG712 nicht nur einen inhibitorischen Effekt auf die Kinase-Aktivität von EphB4 haben könnte, sondern auch auf die Genexpression.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass die Blockade des EphB4-Signalwegs die Vaskularisierung und das Wachstum von Endometrioseherden hemmt. Daher könnte EphB4 ein vielversprechendes pharmakologisches Target für die zukünftige Behandlung von Endometriose-Patientinnen darstellen.

2. Summary

Endometriosis is a frequent gynecological disorder affecting approximately 10% of women especially during the reproductive age. Histopathologically the disease is defined by the presence of functional endometrium-like tissue outside the uterine cavity. According to Sampson's implantation theory, endometrial fragments are shed retrogradely through the fallopian tubes to the peritoneal cavity during menstruation, where they adhere and proliferate. This process is highly dependent on the formation of new blood vessels, which supply the growing endometriotic lesions with oxygen and nutrients. The establishment of a functional vascular network in endometriotic lesions is regulated by various pro- and anti-angiogenic signaling pathways. One of these signaling pathways is mediated by the membrane-based tyrosine kinase erythropoietin-producing hepatoma receptor B4 (EphB4) and its ligand erythropoietin-producing hepatoma interactor B2 (EprinB2). Interestingly, an increased expression of EphB4 has also been detected in ectopic endometrial tissue.

In the present thesis, it was analyzed for the first time whether the inhibition of the EphB4-pathway by the kinase inhibitor 4-methyl-3-[[1-methyl-6-(3-pyridinyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-yl]amino]-N-[3-(trifluoromethyl)phenyl]-benzamide (NVP-BHG712) suppresses the angiogenic action of endothelial cells *in vitro* and the vascularization as well as the growth of endometriotic lesions *in vivo*.

By means of various angiogenesis assays, it could be demonstrated that the migration, tube formation and sprouting activity of both human endothelial cells and of cultivated mouse aortic rings is inhibited by NVP-BHG712.

To analyze the effects of NVP-BHG712 on newly developing microvascular networks in endometriotic lesions *in vivo*, two different, well-established murine models were chosen. In a first experimental setting, endometrial fragments were transplanted onto the striated muscle within the dorsal skinfold chamber of female BALB/c mice. This model was selected for the analysis of the vascular morphology and microhemodynamics within the growing endometriotic lesions by means of intravital fluorescence microscopy. In line with the results of the *in vitro* analysis, a significantly reduced functional capillary density with individually dilated microvessels was found under NVP-BHG712 treatment when compared to vehicle-treated controls during an observation period of 14 days. This anti-angiogenic effect was confirmed immunohistochemically at the end of the *in vivo* experiments by fluorescence staining against CD31 to label the microvessels within the endometriotic lesions.

In a second set of experiments, the syngeneic transplantation of uterine tissue into the peritoneal cavity of BALB/c mice allowed studying the effect of NVP-BHG712 on the growth of endometriotic lesions over 28 days by means of repeated high-resolution ultrasound imaging. Treatment with NVP-BHG712 caused a regression of the stromal tissue and a decrease of the overall lesion size when compared to controls. However, in immunohistochemical analyses on day 28 no significant differences in the microvascular density and the stromal proliferation rate were detected between NVP-BHG712- and vehicle-treated endometriotic lesions. This can be explained by the fact that in this late phase of lesion development a remodeling of the existent vessels occurs rather than angiogenesis. Therefore, intraperitoneally induced endometriotic lesions were analyzed after only 7 days in an additional approach. At this early time point, a significantly reduced microvessel density and stromal proliferation rate could be detected under the treatment with NVP-BHG712.

Additional analyses by means of real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) demonstrated a tendency towards lower messenger ribonucleic acid (mRNA) expression levels of EphB4 in NVP-BHG712-treated intraperitoneal endometriotic lesions after 28 days. Hence, it may be speculated that NVP-BHG712 not only suppresses the kinase activity of EphB4 but also its gene expression.

In summary, in this thesis it could be demonstrated for the first time that interrupting EphB4 signaling suppresses the vascularization and growth of endometriotic lesions. Hence, EphB4 may represent a promising pharmacological target for the future treatment of endometriosis patients.

3. Einleitung

3.1. Endometriose

Die Endometriose ist eine gutartige, gynäkologische Erkrankung, die durch das Vorhandensein von Endometrium-ähnlichem Gewebe außerhalb der Gebärmutterhöhle in Form von Endometrioseherden verursacht wird, die eine sterile, lokale Entzündungsreaktion induzieren [KONINCKX et al., 1999; BURNEY und GIUDICE, 2012]. Typischerweise enthalten Endometrioseherde Drüsenepithel und gut vaskularisiertes Stromagewebe und proliferieren unter Östrogeneinfluss [BURNEY und GIUDICE, 2012]. Daher sind insbesondere Frauen im gebärfähigen Alter von der Krankheit betroffen, obwohl in der Literatur auch prämenarchale und postmenopausale Erscheinungsformen beschrieben werden [GIUDICE und KAO, 2004; LEYENDECKER und WILDT, 2011; POLYZOS et al., 2011].

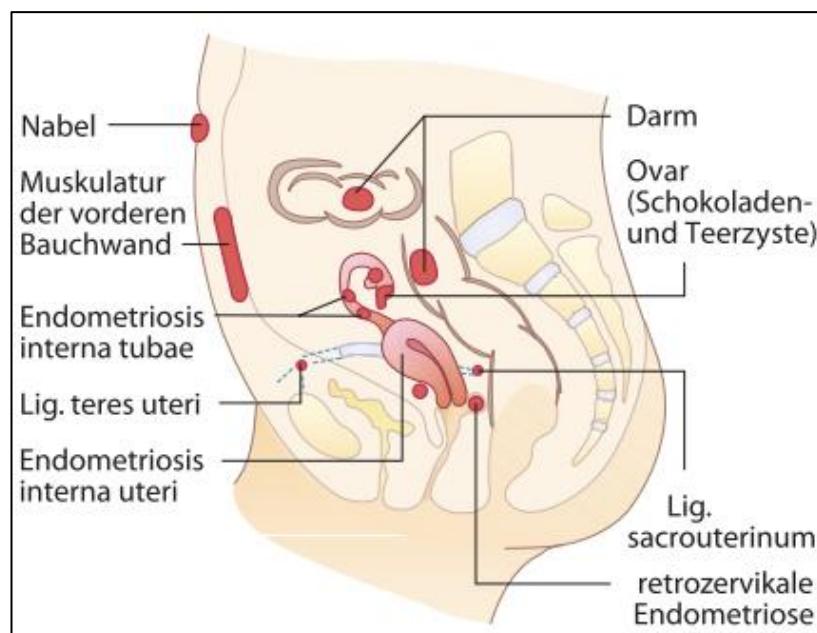


Abbildung 1: Typische Lokalisationen von Endometrioseherden (entnommen aus LASCH [2017]).

Entsprechend der Lokalisation der Endometrioseherde (Abb. 1) unterscheidet man zwischen drei Formen der Erkrankung. Die *Endometriosis genitalis interna* ist durch die Präsenz von Endometrioseherden auf den Tuben oder im Myometrium charakterisiert und wird auch als *Adenomyosis uteri* bezeichnet. Sind die Endometrioseherde im kleinen Becken, auf den Ovarien, Sakrouterinbändern bzw. auf dem Peritoneum der Blase oder des Rektums (häufig) lokalisiert, spricht man von einer *Endometriosis genitalis externa*. Die *Endometriosis extragenitalis* ist durch den Befall von Organen über das kleine Becken hinaus, wie z.B. der Lunge, des Darms oder des Urogenitaltrakts, gekennzeichnet. Andere Klassifikationssysteme teilen die Erkrankung anhand ihres Erscheinungsbildes in eine peritoneale, ovarische und,

bei Infiltration von Organgrenzen, in eine tief-infiltrierende Endometriose (DIE) ein [HALIS et al., 2010; GORDTS et al., 2017].

Wie auch das Endometrium in der Gebärmutterhöhle unterliegt das ektope Gewebe in Endometrioseherden hormonellen Einflüssen, wodurch es zu Umbauprozessen während des Menstruationszyklus kommt [LASCH, 2017]. Durch Anheftung der Endometriumfragmente am Peritoneum werden lokale Entzündungsreaktionen hervorgerufen, die mit vermehrter Angiogenese, Fibrosierung und Einwachsen von Nervenfasern einhergehen [GIUDICE, 2010]. Eine direkte Korrelation zwischen der Ausprägung einer Endometriose und der Schwere ihrer Symptome ist bisher nicht nachgewiesen [PARAZZINI et al., 2001]. Sehr häufig leiden die Patientinnen an Dysmenorrhö und Unterbauchschmerzen [GIUDICE, 2010; CULLEY et al., 2013]. Abhängig von der Lokalisation der Endometrioseherde können auch zyklusabhängige Beschwerden, wie Dyspareunie durch Infiltration der Vagina oder des Douglas-Raumes, Dysurie oder Dyschezie bei Befall des Urogenitaltraktes bzw. des Darms, auftreten [LASCH; 2017]. Entstehen durch die Endometrioseherde bzw. ovarielle Endometriosezysten Verwachsungen an Eileitern und Eierstöcken, kann die Erkrankung zu Sterilität führen. Durch chronische Entzündungsprozesse und funktionelle Veränderungen der Gebärmutterhaut kann eine *Impotentia gestandi* resultieren [MACER und TAYLOR, 2012]. In der Literatur wird die Endometriose daher als einer der häufigsten Gründe für eine ungeklärte Unfruchtbarkeit bei Frauen im gebärfähigen Alter genannt [PRESCOTT et al., 2016; CHANTALAT et al., 2020].

Die allgemeinen Angaben zur Prävalenz der Endometriose variieren sehr stark. Schätzungsweise liegt sie bei ca. 10% bei Frauen im gebärfähigen Alter und bei 16-50% bei Frauen, bei denen eine (ungeklärte) Infertilität vorliegt [MEULEMAN et al., 2009; GIUDICE, 2010]. Der chronische Verlauf der Erkrankung, das heterogene klinische Erscheinungsbild, eine oft sehr späte Diagnosestellung und die bisher fehlenden kurativen Therapieansätze führen zu erheblichen psychosozialen Einschränkungen der betroffenen Patientinnen [CULLEY et al., 2013]. Überdies zeigen SIMOENS et al. [2012] in einer prospektiven, multizentrischen Studie, dass die ökonomische Belastung durch die Behandlungskosten der Erkrankung erheblich ist und sich mit den Ausgaben für andere chronische Erkrankungen, wie Diabetes mellitus und Morbus Crohn, vergleichen lässt.

Als Basisdiagnostik sollte bei der Endometriose eine ausführliche Anamnese mit dem Fokus auf zyklusabhängige Beschwerden erfolgen [HALIS et al., 2010]. Eine vorläufige klinische Diagnose der Erkrankung kann durch eine symptomorientierte, körperliche Untersuchung und, abhängig vom Erscheinungsbild der Endometrioseherde, durch eine Ultraschallanalyse

gestellt werden [FALCONE und FLYCKT, 2018]. Insbesondere ovarielle Zysten lassen sich sonographisch als scharf begrenzte Raumforderungen mit homogener, echoarmer Binnenstruktur gut darstellen [BAZOT et al., 2004]. Bei unklaren Ergebnissen in der Sonographie kann eine Bildgebung mittels Magnetresonanztomographie (MRT) indiziert sein, insbesondere für die Visualisierung tief-infiltrierender Endometrioseherde aufgrund der guten Möglichkeit zur Gewebedifferenzierung im MRT [GRASSO et al., 2010]. Diagnostischer Goldstandard ist jedoch die histologische Sicherung der Herde, um die Präsenz von Endometrium-ähnlichem Gewebe nachzuweisen und zeitgleich andere Differenzialdiagnosen auszuschließen [ALIMI et al., 2018]. Obgleich die Studienlage bisher kein allgemein erhöhtes Krebsrisiko verzeichnet, ist die Endometriose mit einem bis zu 1,9-fach erhöhten Risiko für Ovarialkarzinome (histologisch v.a. vom klarzelligen und endometroiden Typ) assoziiert [SOMIGLIANA et al., 2006]. Die Evaluation zuverlässiger, nicht-invasiver Biomarker ist Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten [BECKER et al., 2011; YANG und LIU, 2014].

Klassifiziert wird die Endometriose am häufigsten nach dem Score der American Society for Reproductive Medicine, kurz rASRM-Score, welcher eine Schweregradeinteilung (Stufe I (minimal) bis Stufe IV (schwer)) der peritonealen und ovariellen Endometriose abhängig von Größe und Lokalisation in der Laparoskopie erlaubt [CANIS et al., 1997; ALIMI et al. 2018]. Um die Schwangerschaftsrate von Patientinnen mit chirurgisch dokumentierter Endometriose besser voraussagen zu können, wurde durch ADAMSON und PASTA [2010] der Endometriose-Fertilitäts-Index (EFI) entwickelt. Die durch eine deutschsprachige Arbeitsgruppe entwickelte ENZIAN-Klassifikation berücksichtigt in der überarbeiteten Version außerdem retroperitoneale Herde einschließlich der DIE. Für diese Klassifikation werden präoperativ, ähnlich der Klassifizierung maligner Tumore, die Invasionstiefe (angegeben in Grad 1 bis 3) und die Lokalisationen im Retroperitoneum (eingeteilt in Kompartiment A bis C) bestimmt [TUTTLIES et al., 2005; HAAS et al., 2013]. Auf internationaler Ebene hat sich der Gebrauch dieser Klassifikation bisher jedoch nicht durchgesetzt [HAAS et al., 2013].

Aufgrund der Östrogenabhängigkeit der Endometrioseherde werden derzeit sowohl in der Erstlinientherapie als auch nach operativer Entfernung im Rahmen adjuvanter Ansätze Medikamente eingesetzt, die den endogenen Östrogenspiegel senken, indem sie in die Hypothalamus-Hypophysen-Achse eingreifen und eine sekundäre Amenorrhö durch Verhinderung des Eisprungs erzeugen [FERRERO et al., 2018]. Der Östrogenentzug und die anti-proliferative, anti-inflammatoryische und anti-angiogene Wirkung von Gestagenen im Endometrium führt zur Atrophie der Herde, zur Reduktion der Dysmenorrhoe und der assoziierten Schmerzen [GIUDICE und KAO, 2004; FERRERO et al., 2018; REIS et al., 2020]. Nach der aktuellen Endometriose-Leitlinie der Gesellschaften für Gynäkologie und Geburtenhilfe

deutschsprachiger Länder sollten in der Erstlinientherapie gestagenhaltige Präparate (wie z.B. Dienogest) bevorzugt im Langzeitzyklus eingesetzt werden. In der Zweitlinientherapie können weitere orale kombinierte Kontrazeptiva (KOK), lokale Gestagene und Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH)-Analoga zum Einsatz kommen [AWMF, 2020]. GnRH-Analoga sollten mit einem der KOK als „Add-back-Therapie“ zur Reduktion der zahlreichen Nebenwirkungen durch die Östrogenmangelsituation kombiniert werden [WU et al., 2014]. Auf Grund ihres analgetischen und anti-inflammatoryischen Effekts können nicht-steroidale Antiphlogistika zur hormonellen Therapie ergänzt oder bei mild ausgeprägter Endometriose in erster Linie verwendet werden, wobei die Studienlage unterschiedliche Therapieerfolge verzeichnet [MARJORIBANKS et al., 2015; BROWN et al., 2017]. Besonders nachteilig an den medikamentösen Therapieansätzen ist ihr zeitlich limitierter Einsatz aufgrund der Nebenwirkungen und eine hohe Rezidivrate nach Absetzen [LASCHKE und MENGER, 2012a]. Eine komplett chirurgische Entfernung der Herde kann zur Therapie von funktionellen Einschränkungen und zur Linderung der durch die Endometrioseherde verursachten Beschwerden indiziert sein und muss gegen das Risiko von Komplikationen abgewogen werden [NEZHAT et al., 2019]. Die operativen Techniken dienen dann entweder als Erstlinientherapie oder Therapie in zweiter Linie nach Versagen der konservativen Maßnahmen oder werden in Kombination mit den oben genannten Therapeutika angewandt [GIUDICE, 2010; NEZHAT et al., 2019]. Besonders hervorzuheben ist ebenfalls die hohe Rezidivrate, die nach GIUDICE [2010] bei 30-60% der operierten Patientinnen innerhalb der ersten sechs bis zwölf Monate postoperativ liegt. Bis zum heutigen Zeitpunkt hat sich daran wenig geändert. Immer noch mehr als die Hälfte aller Frauen, die operiert werden, müssen sich innerhalb der folgenden fünf Jahre einer erneuten Operation unterziehen [SAUNDERS und HORNE, 2021]. Dementsprechend besteht ein dringender Bedarf, neue therapeutische Ansätze zu entwickeln, die ein günstiges Nebenwirkungsprofil und einen langfristigen Therapieerfolg versprechen sowie die Fertilität der Patientinnen nicht beeinträchtigen [LASCHKE und MENGER, 2012a].

Bei der Entwicklung neuer Therapiestrategien kommt erschwerend hinzu, dass der genaue Pathomechanismus der Erkrankung bis heute nicht abschließend geklärt ist. Bereits im 19. Jahrhundert wurden Theorien zur Pathogenese publiziert, die davon ausgehen, dass sich aberrante Müllerzellen während der Embryonalentwicklung oder pluripotente Zölkomzellen des Bauchfells *in situ* zu Endometrium-ähnlichen Gewebeinseln entwickeln können [ACIEN und VELASCO, 2013; SOURIAL et al., 2014]. Die Ansätze beschreiben folglich einen vom Uterusgewebe unabhängigen Ursprung und basieren auf der Annahme, dass erst endogene Stimuli wie Hormone und immunologische Faktoren die Differenzierung der Zellen in Endometrium-ähnliches Gewebe begünstigen [BURNEY und GIUDICE, 2012]. Als modernerer Ansatz wird derzeit auch die Stammzelltheorie diskutiert. DU und TAYLOR [2007] zeigten in

einer Studie, dass sich mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark von Spendermäusen *de novo* zu endometrialen Stroma- und Epithelzellen, sowohl im Endometrium von weiblichen Empfängertieren als auch in ektopem Endometriumgewebe von hysterektomierten Tieren, differenzieren können. Einzelne klinische Fallberichte beschreiben, dass auch bei Patientinnen mit Uterusaplasie, z.B. im Rahmen des Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser-Syndroms, Endometrioseherde histologisch nachgewiesen werden konnten [BURNLEY und GIUDICE, 2012]. Ein weiteres Konzept, das den Krankheitsursprung der Endometriose und Adenomyose im Uterus selbst sieht, stellten LEYENDECKER und WILDT [2011] mit der „Tissue Injury and Repair (TIAR)-Theorie“ auf. Diese beruht auf der Annahme, dass es durch wiederholte Mikrotraumata im Endometrium zur Herauslösung und Streuung von Fragmenten des basalen Endometriums in die Bauchhöhle bzw. zur Invasion ins Myometrium kommt. Durch nachfolgende physiologische, nicht-organspezifische Reparaturmechanismen entsteht lokal vermehrt Östradiol, das bei den erkrankten Frauen die Uterus-internen Kontraktionen verstärkt und dadurch zu einer Selbstunterhaltung des Geschehens führt [LEYENDECKER und WILDT, 2011, 2012]. Weiterhin werden in der Literatur bereits Theorien des frühen 20. Jahrhunderts beschrieben, die besagen, dass Endometrioseherde durch lymphatische und venöse Metastasierung von Endometrium-ähnlichen Zellen entstehen und hierdurch eine Erklärung für atypische Lokalisationen außerhalb des Beckens liefern [MACER und TAYLOR, 2012; ACIEN und VELASCO, 2013; EBERT und DAVID, 2017]. SAMPSON [1927] postulierte in seiner Implantationstheorie, dass vitales Gewebe aus dem Endometrium durch die geöffneten Tuben retrograd während der Menstruation mit dem Blut in die Bauchhöhle gelangt, dort adhäriert und proliferiert (Abb. 2).

Die Implantationstheorie ist bis heute eine der am meisten akzeptierten Theorien zur Entstehung pelviner Endometrioseherde [MACER und TAYLOR, 2012]. Die retrograde Menstruation ist jedoch ein physiologisches Phänomen. Zur Krankheitsentwicklung bedarf es daher eines multifaktoriellen Zusammenspiels, das von genetischen Veränderungen, hormonellen Einflüssen (Östrogenabhängigkeit, Progesteronresistenz), einem krankheitsbegünstigenden Milieu an Wachstumsfaktoren und Zytokinen im Blut und in der Peritonealflüssigkeit sowie anderen Umweltfaktoren beeinflusst wird [KONINCKX et al., 1999; BURNLEY und GIUDICE, 2012; MACER und TAYLOR, 2012] (Abb. 2).

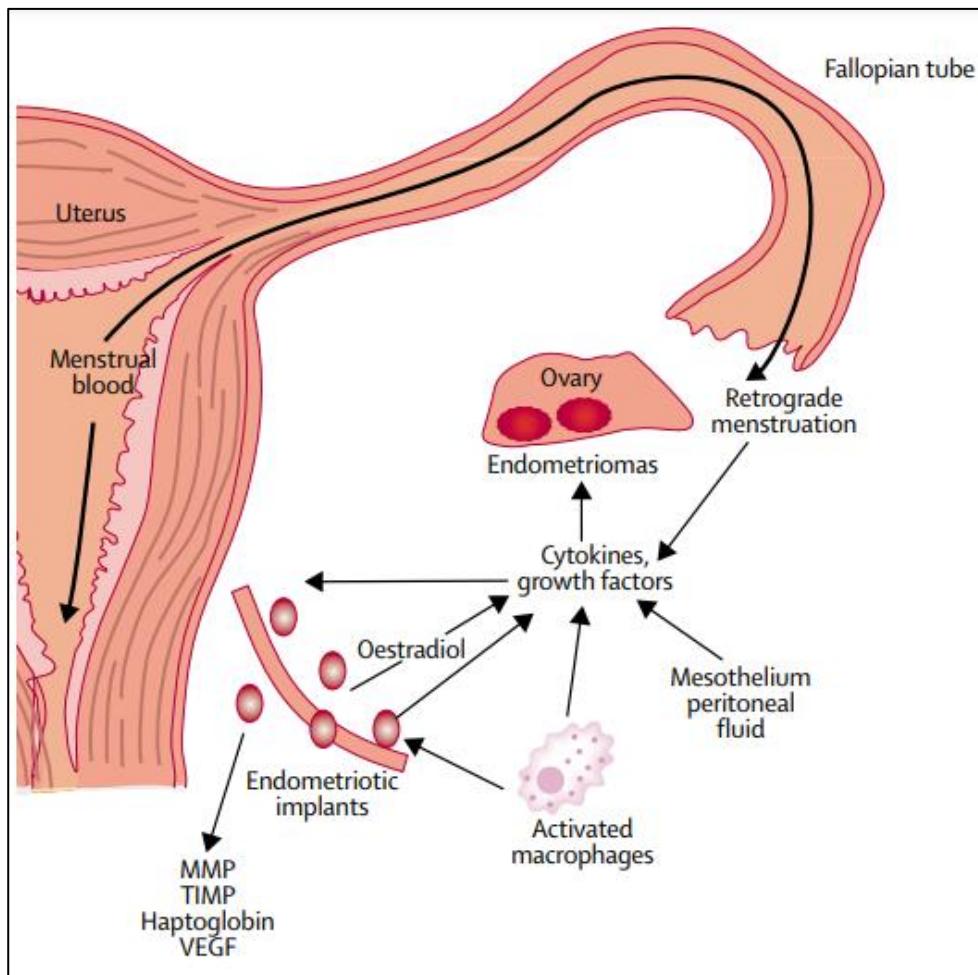


Abbildung 2: Retrograde Verschleppung von Endometriumfragmenten in die Bauchhöhle während der Menstruation und molekulare Mechanismen im nachfolgenden Krankheitsprozess. VEGF = vascular endothelial growth factor; MMP = matrix metalloproteinase; TIMP = tissue inhibitor of metalloproteinase (entnommen aus GIUDICE und KAO [2004]).

Während der letzten Jahre haben Studien gezeigt, dass die Ausbildung eines Gefäßnetzwerks in den Endometrioseherden entscheidend für das Überleben und das Wachstum des ektopen Gewebes ist [LASCHKE und MENGER, 2018]. Makroskopisch erscheinen Herde, die sich durch einen Wechsel von Gewebeuntergang und Heilung kennzeichnen, schwarz [KLEMMT und STARZINSKI-POWITZ, 2018] (Abb. 3A). Sie sind einerseits von weißen Herden abzugrenzen, die durch Remodellingprozesse fibrosiert sind (Abb. 3B), und andererseits von den roten, mitotisch hochaktiven Herden, die ein dichtes Netz an unreifen, dilatierten Gefäßen enthalten [NISOLLE et al., 1993; LASCHKE und MENGER, 2007; KLEMMT und STARZINSKI-POWITZ, 2018] (Abb. 3C). Es wird davon ausgegangen, dass das makroskopische Erscheinungsbild verschiedene Stadien der Erkrankung widerspiegelt [NISOLLE et al., 1993; NISOLLE und DONNEZ, 1997] (Abb. 3).

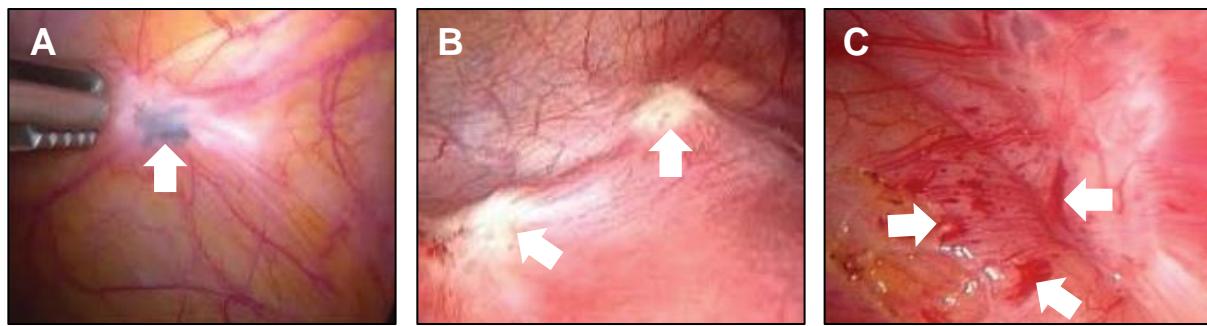


Abbildung 3: Laparoskopische Ansicht oberflächlicher, peritonealer Endometrioseherde (weiße Pfeile). (A) Schwarzer Herd als Zeichen eines fortgeschrittenen, moderat-schweren Endometriose-Stadiums. (B) Weiße, fibrosierte Herde in Abheilung oder im Latenzstadium. (C) Rote, mitotisch und vaskulär aktive Herde, die sich im Wachstum befinden (entnommen aus POP-TRAJKOVIC DINIC et al. [2017]).

Ähnlich maligner Tumoren exprimieren die Endometrioseherde und ihr Umgebungsgewebe pro-angiogene Faktoren, die zur Ausbildung eines mikrovaskulären Netzwerks in den Herden führen [LASCHKE und MENGER, 2018]. Dieses Netzwerk besteht typischerweise aus Arteriolen, Kapillaren und Venolen mit einem Durchmesser von weniger als 100 µm und enthält außerdem kleine Lymphgefäße und einwachsende Nervenfasern [ASANTE und TAYLOR, 2011; LUQUE-GONZALEZ et al., 2020]. Hierdurch wird die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen für die Zellproliferation und das Wachstum sichergestellt [HENRIET et al., 2018]. Es wird angenommen, dass eine Dysbalance zwischen stimulierenden und hemmenden Angiogenesefaktoren herrscht, sodass ein wachstumsbegünstigendes Milieu entsteht [LASCHKE und MENGER, 2018]. Die Endometriose wird daher in die Gruppe der angiogenen Erkrankungen eingeordnet und ihre Abhängigkeit von einer adäquaten Blutversorgung seit einigen Jahren als möglicher Angriffspunkt neuer Therapiestrategien genutzt [LASCHKE und MENGER, 2007]. Das grundlegende Konzept der anti-angiogenen Therapiestrategien lieferten HANAHAN und FOLKMAN [1996] mit ihrer Hypothese, dass Tumore ein funktionierendes Gefäßnetzwerk für ihr Wachstum benötigen und diese im Umkehrschluss durch die Hemmung ihrer Blutversorgung „ausgehungert“ werden können. Entsprechend konnten spätere Studien an Mausmodellen zeigen, dass die gezielte Hemmung von pro-angiogenen Faktoren auch zu einer reduzierten Dichte einwachsender Gefäße in Endometrioseherde und damit zu ihrer Regression führt [HULL et al., 2003; NAP et al., 2004].

3.2. Mechanismen der Vaskularisierung von Endometrioseherden

Bei der Ausbildung neuer Gefäße in Endometrioseherden sind verschiedene Mechanismen involviert. Dazu zählt die Vaskulogenese (*de novo* Ausbildung eines primitiven Netzwerks aus zirkulierenden Stammzellen), die Angiogenese (Entwicklung neuer Gefäße aus einem

bereits bestehenden mikrovaskulärem Netzwerk) und die Inoskulation (Anastomosenbildung zwischen vorhandenen Gefäßen und der Umgebung) [LASCHKE und MENGER, 2018].

Der Begriff Vaskulogenese bezog sich ursprünglich ausschließlich auf die Entstehung von Blutgefäßen während der Embryonalentwicklung. Durch Differenzierung und Ansammlung angioblastischer Vorläuferzellen aus dem Mesoderm bildet sich dabei ein primitives Netzwerk während der Embryogenese aus [RISAU und FLAMME, 1995]. Mittlerweile ist bekannt, dass auch bei Erwachsenen eine *de novo* Gefäßbildung stattfindet, beispielsweise bei der Regeneration des Endometriums während des Menstruationszyklus [LASCHKE und MENGER, 2018]. Diese postnatale Vaskulogenese findet durch Rekrutierung von zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen (EPCs) statt, die in das Endothel heranwachsender Mikrogefäße integriert werden und sich dort zu Endothelzellen differenzieren [VIRANI et al., 2013; RUDZITIS-AUTH et al., 2016]. In verschiedenen Studien an Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass zirkulierende EPCs aus dem Knochenmark auch an der Gefäßneubildung in Endometrioseherden beteiligt sind [BECKER et al., 2011; LASCHKE et al., 2011a]. Die Mobilisierung der EPCs erfolgt durch eine erhöhte Konzentration an chemotaktischen Faktoren, wie vascular endothelial growth factor (VEGF) [LASCHKE und MENGER, 2018]. Durch die Verschleppung der Endometriumfragmente an einen uterusfernen Ort entsteht eine Sauerstoffmangelsituation, wodurch der Transkriptionsfaktor hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α sezerniert und die Expression des stromal cell-derived factor (SDF)-1, auch CXC-Motiv-Chemokin (CXCL)-12 genannt, hochreguliert wird [CERADINI et al., 2004; BECKER et al., 2008]. Die mobilisierten EPCs werden dann durch Bindung mit ihrem Rezeptor chemokine receptor type (CXCR)-4 an SDF-1 rekrutiert und in das Endothel der Herde eingebaut [VIRANI et al., 2013]. Ein weiterer Stimulus für die Rekrutierung und Inkorporation von EPCs in Endometrioseherde ist Östrogen [RUDZITIS-AUTH et al., 2016].

Die Angiogenese findet physiologisch während der Wundheilung und im Rahmen des ständigen Ab- und Aufbauprozesses des Endometriums während des Menstruationszyklus statt [GARGETT und ROGERS, 2001]. Diese Art der Gefäßneubildung ist sehr gut erforscht und essentiell für das erfolgreiche Einwachsen von transplantiertem Gewebe, aber auch für das Tumorwachstum, chronisch-inflammatorische Erkrankungen und für die Endometriose [HANAHAN und FOLKMAN, 1996; GARGETT und ROGERS, 2001; LASCHKE und MENGER, 2012b; LASCHKE und MENGER, 2018]. Der Prozess der Angiogenese ist gekennzeichnet durch ein komplexes Zusammenspiel zwischen dem Endothel der Mikrogefäße, den wandbildenden Zellen und der extrazellulären Matrix sowie regulatorischen Angiogenesefaktoren. In Abhängigkeit von der Gewebeart erfolgt die Angiogenese über ein Gefäß-Sprouting, bei dem Gefäßsprossen aus einem bereits existierenden Gefäß auswaschen und

zu einem Netzwerk vereinigt werden, über ein Gefäß-Splitting (engl. intussusception) oder über eine Gefäß-Elongation [CARMELIET, 2000] (Abb. 4).

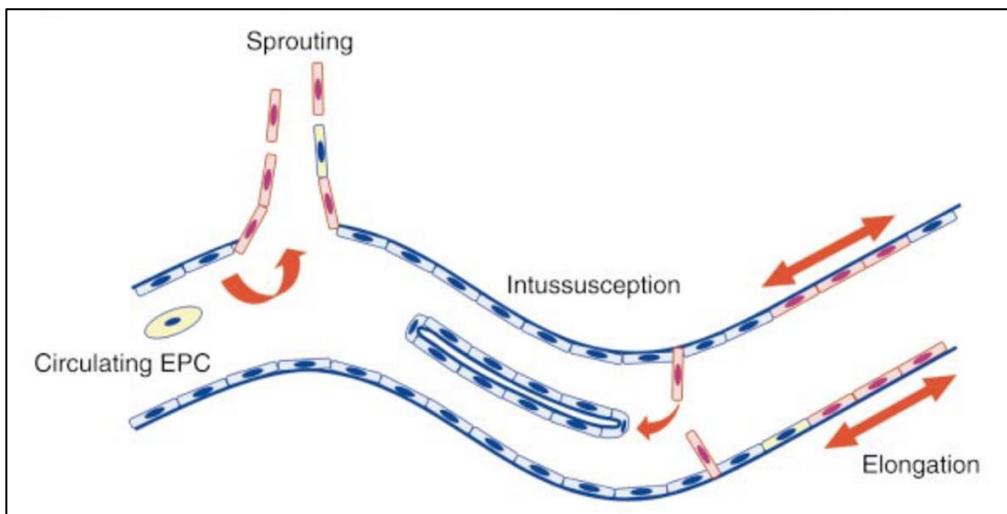


Abbildung 4: Mechanismen der Angiogenese: Sprouting, Splitting (engl. intussusception) und Elongation. Ruhende Endothelzellen sind blau dargestellt, proliferierende rot (entnommen aus GARGETT und ROGERS [2001]).

Die Angiogenese über Gefäßsprossung ist auch bei der Entwicklung der Endometriose von entscheidender Bedeutung. Ein wichtiger Stimulus dafür stellt die initiale Gewebehypoxie dar, der die Endometriumfragmente zu Beginn der Erkrankung auf ihrem Weg in die Bauchhöhle ausgesetzt sind [LASCHKE und MENGER, 2018]. Es kommt zur Akkumulation von HIF-1 α , was wiederum die Transkription von Genen aktiviert, die für pro-angiogene Faktoren, wie z.B. VEGF, kodieren [FONG, 2009]. Die Bindung von VEGF-A an den vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-2 induziert hauptsächlich die Gefäßsprossung [BLANCO und GERHARDT, 2013] (Abb. 5A). Es kommt zur Aktivierung von ruhenden Endothelzellen sowie zur Steigerung der Gefäßpermeabilität mit Degradierung der Basalmembran durch Matrix-Metalloproteininasen (MMPs) und der Ablösung von wandbildenden Zellen, wie den Perizyten, stimuliert durch Angiopoetin-2 [POTENTE et al., 2011; DJOKOVIC und CALHAZ-JORGE; 2014] (Abb. 5B). Dadurch können Plasmaproteine austreten und extravasal ein Gerüst für die anschließend proliferierenden Endothelzellen ausbilden [CARMELIET, 2000]. Diese differenzieren sich unter dem Einfluss von VEGF und dem Notch-Signalweg in zwei Phänotypen: Richtungs-führende Tip-Zellen und nachwandernde Stalk-Zellen [BLANCO und GERHARDT, 2013] (Abb. 5C). Tip-Zellen weisen dynamische, fadenförmige Ausstülpungen, sog. Filopodien, auf, die sie zur Migration entlang eines VEGF-A-Gradienten befähigen und somit die Wachstumsrichtung des Gefäßsprosses bestimmen [GERHARDT et al., 2003]. Schließlich fusionieren die Tip-Zellen einzelner Gefäßsprossen miteinander und bilden so ein verzweigtes Netzwerk (branching) aus (Abb. 5D). Der membran-gebundene Notch-Ligand Delta-like (DLL)-4 wird von Tip-Zellen unter dem Einfluss von VEGF-A exprimiert.

miert und interagiert wiederum mit dem Notch-1-Rezeptor auf benachbarten Endothelzellen, die sich in Folge einer Herabregulation von VEGFR-2 zu Stalk-Zellen differenzieren [TUNG et al., 2012; BLANCO und GERHARDT, 2013]. Stalk-Zellen besitzen weniger Filopodien, sind jedoch hoch proliferativ und dienen der Netzwerkstabilisierung [POTENTE et al., 2011; BLANCO und GERHARDT, 2013]. Sie folgen den Tip-Zellen, bilden Adhärenz- und Tight-Junctions aus und formen somit das Lumen des heranwachsenden Gefäßsprossens (Abb. 5D). Die Ausbildung des Lumens dient als Schlüsselreiz für die Gefäßperfusion, wodurch der Sauerstoffgehalt des umliegenden Gewebes erhöht und die VEGF-Ausschüttung durch ein negatives Feedback inhibiert wird [BLANCO und GERHARDT, 2013] (Abb. 5E). Zur Reifung und Stabilisierung der neu entstandenen Gefäße werden Perizyten, u.a. unter dem Einfluss des platelet-derived growth factors (PDGF)-B, und glatte Muskelzellen rekrutiert, welche sich dann zusammen mit extrazellulären Matrixkomponenten auf den Endothelzellen ablagnern [POTENTE et al., 2011; DJOKOVIC und CALHAZ-JORGE, 2014] (Abb. 5F).

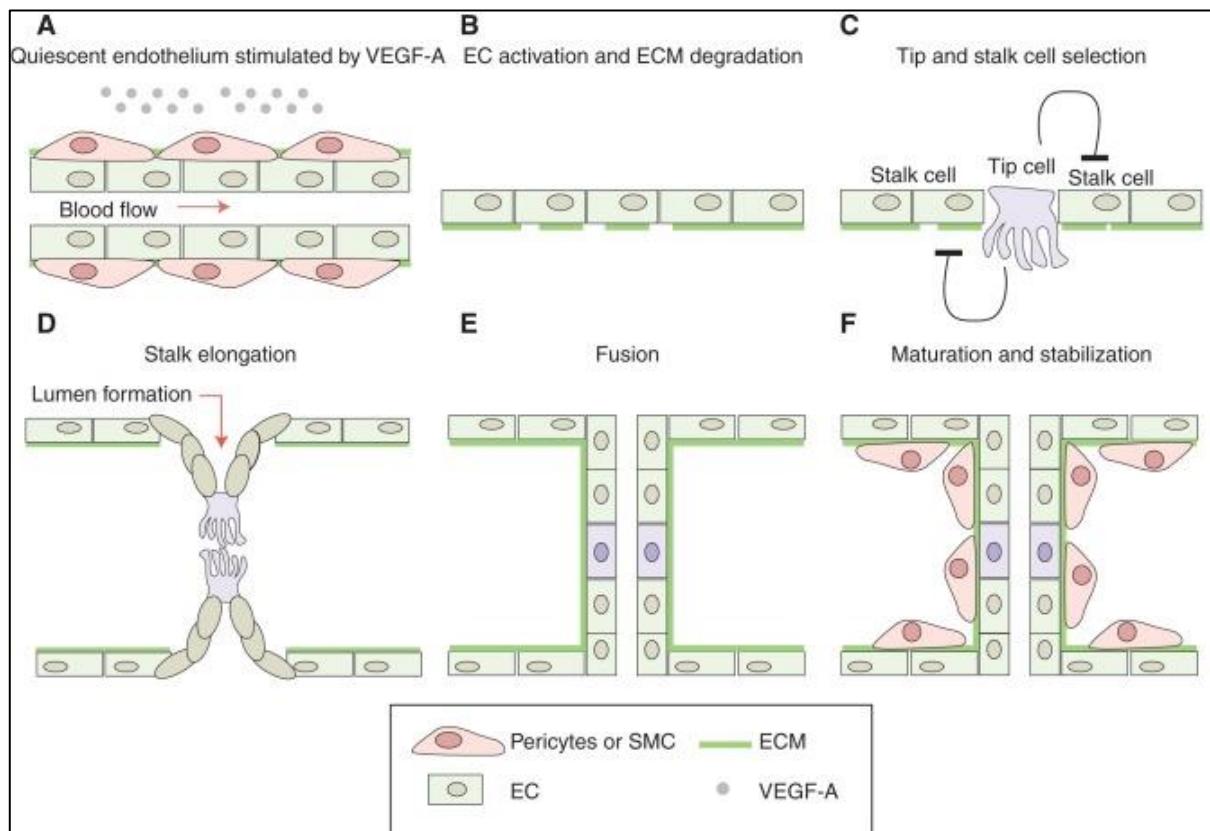


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Gefäßsprossung. (A) Die Angiogenese wird durch lokale Gewebehypoxie induziert. Das hypoxische Gewebe setzt endotheliale Wachstumsfaktoren, wie VEGF-A, frei. (B) Durch VEGF-A werden ruhenden Endothelzellen (EC) aktiviert und die Extrazellulärmatrizen (ECM) degradiert. (C) Dadurch differenzieren sich EC zu richtungsführenden Tip-Zellen mit Filopodien und hoch-proliferativen Stalk-Zellen. Durch laterale Inhibition zwischen den spezialisierten EC wird das Verhältnis von Tip- und Stalkzellen reguliert. (D) Stalk-Zellen prolifizieren und folgen den entlang des VEGF-A-Gradienten migrierenden Tip-Zellen an der Spitze des heranwachsenden Gefäß-Sprouts. Es kommt zur Lumenbildung und Elongation. (E) Durch Anastomosierung von Tip-Zellen bildet sich ein verzweigtes Gefäßnetzwerk aus. Die neugeformten Gefäß-Sprouts werden perfundiert, wodurch das Gewebe oxygeniert wird und infolge weniger endotheliale Wachstumsfaktoren freigesetzt werden. (F) Die Reifung und Stabilisierung des neuen Gefäßes erfolgt u.a. durch Anlagerung von wandbildenden Zellen, wie Perizyten, und ECM (entnommen aus BLANCO und GERHARDT [2013]).

Als Inoskulation wird die Verbindung von einzelnen Blutgefäßen oder ganzen mikrovaskulären Netzwerken miteinander bezeichnet [LASCHKE und MENGER, 2018]. Durch die Fusion mit Gefäßen in der Umgebung werden so auch größere Gewebetransplantate, die ein bereits vorgeformtes Gefäßnetzwerk besitzen, im Vergleich zur zeitaufwendigeren Angiogenese rasch reperfundierte [LASCHKE et al., 2008; LASCHKE und MENGER, 2016]. Dazu umhüllen die Endothelzellen aus dem Transplantat die Gefäße des Empfängergewebes und exprimieren verstärkt MMPs. Es kommt zur Degradation der umhüllten Gefäßwand, sodass in Folge Blut aus dem Gefäß des Empfängergewebes in das transplantierte Gefäßnetzwerk einströmen kann. Die Endothelzellen aus dem Transplantat und des Empfängers formen somit neue Verbindungen. Die Perfusion der neuen Anastomosen dient außerdem als Schlüsselreiz für anschließende Reifungsprozesse, wie der Anlagerung von Perizyten [CHENG et al., 2011].

Die Vaskularisierung heranwachsender Endometrioseherde wird über eine Verschiebung des Gleichgewichts pro- und anti-angiogener Signalwege reguliert [DJOKOVIC und CALHAZ-JORGE, 2014]. Pathologische Bedingungen, wie die Verschleppung von endometrialen Fragmenten via retrograder Menstruation, können durch den initialen Sauerstoffmangel des Gewebes zu einem sog. „angiogenen Switch“ zugunsten von stimulierenden Faktoren führen, was wiederum ein vermehrtes Gefäßwachstum induziert [HANAHAN und FOLKMAN, 1996; LASCHKE und MENGER, 2018] (Abb. 6). Die heranwachsenden Gefäße unterscheiden sich strukturell und funktionell von einem gesunden, bereits bestehenden Netzwerk. Sie sind hochgradig unregelmäßig und undicht im Wandaufbau, wodurch ein irregulärer Blutfluss und eine veränderte Volumenverteilung vorliegen. All dies unterhält letztendlich die Gewebehypoxie und die angiogene Aktivität [POTENTE et al., 2011]. Neben der Hypoxie werden pro-angiogene Faktoren unter anderem auch durch Hormone, wie Östrogen, sowie durch pro-inflammatorische Zytokine, wie man sie bei der Endometriose findet, reguliert [GIUDICE und KAO, 2004; LASCHKE und MENGER, 2018]. Endometrioseherde in der Rückenhautkammer von weiblichen Hamstern, bei denen durch eine Ovarektomie eine Östrogenmangelsituation induziert wurde, weisen z.B. eine verzögerte Vaskularisierung und eine verringerte Herdperfusion im Vergleich zu Tieren mit vorhandenen Ovarien auf [LASCHKE et al., 2005]. Das Peritoneum bei Endometriose-Patientinnen enthält außerdem eine erhöhte Anzahl an Makrophagen, die Cyclooxygenase (COX)-2 und Prostaglandine produzieren [BURNEY und GIUDICE, 2012]. In ovariellen Endometriomen besteht interessanterweise eine positive Korrelation zwischen der COX-2- und VEGF-Expression [CEYHAN et al., 2008]. In Nagermodellen konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der COX-2 sowohl die VEGF-abhängige Angiogenese, als auch die Rekrutierung von EPCs in die Gefäße von Endometrioseherden während der Vaskulogenese reduziert [LASCHKE et al., 2007;

RUDZITIS-AUTH et al., 2018]. In der Literatur wird außerdem beschrieben, dass nicht nur die Endometrioseherde selbst, sondern auch ihre Umgebung vermehrt Angiogenesefaktoren freisetzen [MC LAREN et al., 1996; TAYLOR et al., 2002]. MC LAREN et al. [1996] konnten eine erhöhte VEGF-Konzentration während der Proliferationsphase in der Peritonealflüssigkeit bei Patientinnen mit Endometriose nachweisen. Außerdem zeigten BOURLEV et al. [2006], dass es bei Endometriose-Patientinnen zyklusabhängig auch zu einer vermehrten Expression von VEGF-A und VEGFR-2 im Endometrium selbst bzw. dessen Mikrogefäßen kommt. Neben löslichen Faktoren wie VEGF, kommt membran-gebundenen Molekülen, die eine direkte Interaktion zwischen benachbarten Zellen vermitteln, eine große Bedeutung in der Entwicklung mikrovaskulärer Netzwerke zu [FÜLLER et al., 2003; DJOKOVIC und CALHAZ-JORGE, 2014]. Ihre Aktivierung führt zur Stimulation der embryonalen und der adulten Angiogenese [GERETY et al., 1999; GERETY und ANDERSON, 2002; WANG et al., 2010; LV et al., 2016]. Zu diesen Molekülen zählen der Tyrosinkinaserezeptor Erythropoietin-producing hepatoma receptor B4 (EphB4) und sein zugehöriger Ligand Erythropoietin-producing hepatoma interactor B2 (EphrinB2). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Expression von EphB4 bei erkrankten Frauen im ektopen Endometriosegewebe signifikant höher ist als im Endometrium selbst [YERLIKAYA et al., 2016]. Weiterhin konnte in einer Studie nahegewiesen werden, dass EphB4 auch die Transkription des Östrogenrezeptors- α reguliert [SCHMITT et al., 2013]. In der vorliegenden Arbeit wurde daher erstmalig untersucht, ob die Blockade des EphB4-Signalwegs zu einer Hemmung der angiogenen Aktivität von Endothelzellen *in vitro* und der Vaskularisierung sowie des Größenwachstums von Endometrioseherden *in vivo* führt.

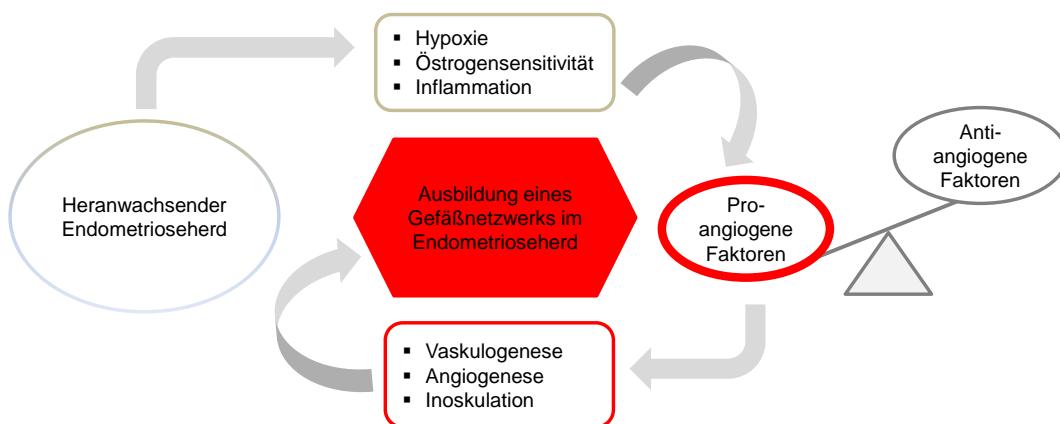


Abbildung 6: Regulierung von Vaskularisierungsprozessen bei der Endometriose durch den angiogenen Switch. Die Ausbildung eines Gefäßnetzwerks heranwachsender Endometrioseherde wird durch eine Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten pro-angiogener Faktoren stimuliert. Dieser Switch wird u.a. durch Sauerstoffmangel, dem die endometrialen Fragmente auf dem Weg in die Bauchhöhle zu Beginn ausgesetzt sind, sowie Östrogen und Zytokine, wie man sie bei der Endometriose findet, begünstigt. Durch den Überschuss pro-angiogener Faktoren kommt es zur Rekrutierung von EPCs in die heranwachsenden Endometrioseherde (Vaskulogenese), zum Einwachsen von Blutgefäßen aus bereits vorbestehenden Gefäßen (Angiogenese) und zur Fusion zwischen Gefäßen der Endometrioseherde und der Umgebung (Inoskulation).

3.3. Der EphB4/EphrinB2-Signalweg bei der Endometriose

Der erste Eph-Rezeptor wurde 1987 aus der Leberzelllinie „Erythropoietin-producing hepatocellular cell line“ isoliert, welcher er seinen Namen verdankt [HIRAI et al., 1987; YANG et al., 2016]. Die Eph-Rezeptoren bilden die größte Subklasse der Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) in Säugetieren [UNZUE et al., 2016]. Die dazugehörigen Liganden, die sogenannten Ephrinen, werden entsprechend ihrer Sequenzähnlichkeiten und Bindungsspezifitäten zusammen mit den Eph-Rezeptoren in die Subklassen A und B eingeteilt [YANG et al., 2016]. Vorzugsweise binden die EphA-Rezeptoren (EphA1-10) an die Ephrinen der Subklasse A (EphrinA1-6) und die EphB-Rezeptoren (EphB1-6) an die Ephrinen der Subklasse B (Ephrin B1-3) [PASQUALE, 2008; CHEN et al., 2019]. Interaktionen zwischen den verschiedenen Subklassen sind möglich. Eine Ausnahme stellt der EphB4-Rezeptor dar. EphB4 bindet mit hoher Spezifität an seinen Liganden EphrinB2 [CHEN et al., 2019] (Abb. 7).

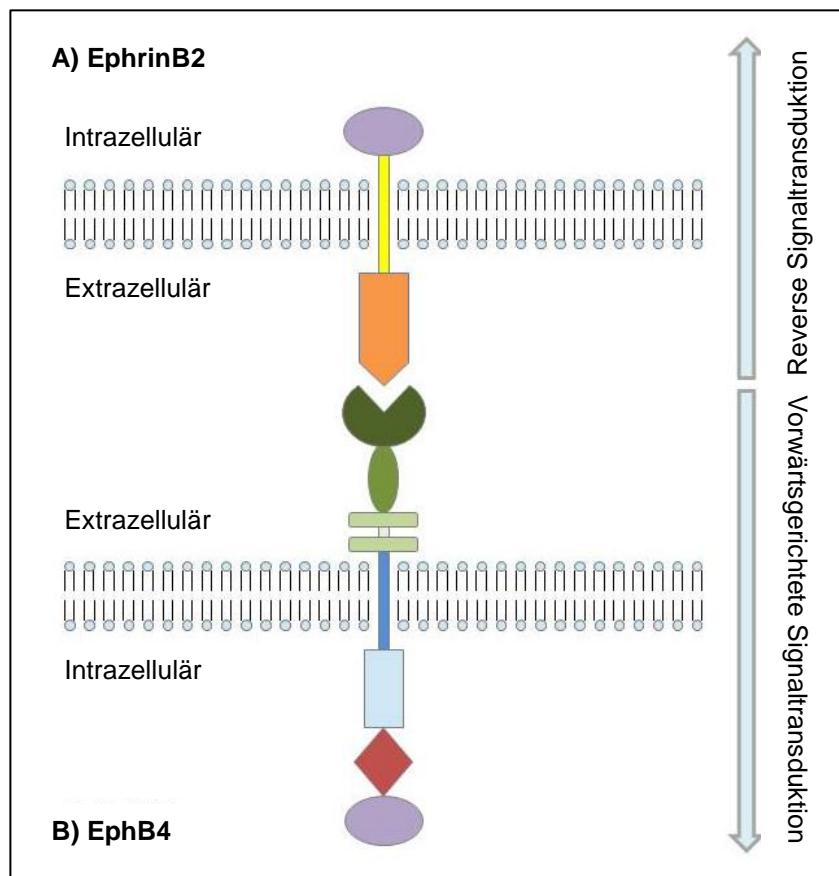


Abbildung 7: Struktur von EphrinB2 und EphB4. (A) EphrinB2 besitzt eine extrazelluläre EphB4-Bindungsdomäne (orange), eine transmembranöse Domäne (gelb) und eine kleine, intrazelluläre Domäne mit einem PDZ (PSD95/SAP90, Discs large 1, Zonula occludens-1)-bindenden Motiv (lila). Die intrazelluläre Domäne enthält mehrere Areale mit Tyrosin- und Serinresten, welche durch Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen aus der cellular und sarcoma (c-Src)-Familie phosphoryliert werden. Die PDZ-Bindungsdomäne trägt zur Formierung von Signalprotein-Komplexen bei. (B) Der EphB4-Rezeptor enthält einen extrazellulären Anteil mit einer globulären Ephrin-Bindungsdomäne für EphrinB2 (dunkelgrün), eine Cystein-reiche Region (mittelgrün) und zwei Fibronektin-Typ-III-Repeats (hellgrün). Der intrazelluläre Teil besteht aus einer Juxtamembranregion (blau), einer Tyrosinkinase (graublau), einer sterilen a-Motiv-Domäne (rot) und aus einem PDZ-bindenden Motiv (lila). Nach Rezeptor-Liganden-Bindung findet über den EphB4-Rezeptor die vorwärtsgerichtete Signaltransduktion und über EphrinB2 die reverse Signaltransduktion statt.

RTKs sind Transmembran-Proteine, die sich durch die Bindung mit ihren Liganden einer Konformationsänderung unterziehen. Die Änderung der Konformation des EphB4-Rezeptors vermittelt wiederum die Autophosphorylierung der eigenen Tyrosindomäne [CHEN et al., 2019]. Dadurch wird die Kinasedomäne des EphB4-Rezeptors aktiviert, die in der Lage ist, ihre Phosphatgruppen auf die Tyrosinreste anderer zytoplasmatischer Signalproteine zu übertragen [UNZUE et al., 2016]. Über die PDZ-Bindedomäne (Begriff zusammengesetzt aus den Anfangsbuchstaben des synaptischen Proteins PSD95/SAP90, des Septate-junction-Proteins Discs large 1 aus *Drosophila melanogaster* und des Tight-junction-Proteins Zonula occludens-1) können außerdem unabhängig von der Kinasefunktion Adaptermoleküle, die PDZ-Proteine enthalten, gebunden werden, wie z.B. PDZ-RGS3, Dvl2 und PTP-BL [BOYD et al., 2014; YANG et al., 2016]. In beiden Fällen erfolgt eine Abfolge verschiedener intrazellulärer Reaktionsketten, welche die Transkription von spezifischen Genen für wichtige biologische Prozesse, wie Zelldifferenzierung, -proliferation und -mortalität, induzieren [UNZUE et al., 2016].

Eine Besonderheit im Eph-Ephrin-System ist die bi-direktionale Signaltransduktion, bei der nach der Rezeptor-Liganden-Bindung nicht nur Signale in die Rezeptor-exprimierende Zelle (vorwärtsgerichtete Signaltransduktion) sondern auch in die Liganden-exprimierende Zelle (reverse Signaltransduktion) vermittelt werden können [UNZUE et al., 2016; YANG et al., 2016] (Abb. 7). Bei den transmembranösen Subklasse-B-Ephrinen geschieht dies über die Rekrutierung von Kinasen aus der cellular und sarcoma (c-Src)-Familie im Zytoplasma, da sie keine eigene Kinasedomäne besitzen. Diese Kinasen übertragen dann Phosphatgruppen auf die Tyrosinreste der zytoplasmatischen Domäne der Ephrine, was zur anschließenden Aktivierung von Adaptermolekülen wie Grb4 und signal transducer and activator of transcription (STAT)-3, Phosphatasen und Integrinen führt [YANG et al., 2016]. In der Literatur werden außerdem Eph-Rezeptor-unabhängige Aktivierungsmöglichkeiten der Ephrine beschrieben, einerseits über ihre PDZ-Domäne, andererseits durch die Bindung an die Rezeptoren anderer Wachstumsfaktoren [BOCHENEK et al., 2010; YANG et al., 2016].

Da sowohl die Eph-Rezeptoren als auch die Ephrinen in der Zellmembran fest verankert sind, findet die Rezeptor-Liganden-Bindung klassischerweise über einen direkten Kontakt zwischen der Eph-tragenden Zelle und der benachbarten Ephrin-tragenden Zelle (*trans* Kommunikation) statt [BOYD et al., 2014; CHEN et al., 2019]. Innerhalb der Eph/Ephrin-Familie wird das EphB4/EphrinB2-Paar für die Interaktion zwischen zwei Endothelzellen sowie den Endothelzellen und wandbildenden Zellen benötigt und zählt daher zu den wichtigsten Regulatoren der physiologischen und pathologischen Gefäßneubildung [GERETY et al., 1999; GERETY und ANDERSON, 2002; WANG et al., 2010; LV et al., 2016]. Der Rezeptor EphB4

wird hauptsächlich von venösen Endothelzellen exprimiert, während EphrinB2 von arteriellen Endothelzellen, mesenchymalen Zellen und Perizyten exprimiert wird [GERETY und ANDERSON, 2002]. Das EphB4/EphrinB2-Paar vermittelt insbesondere repulsive, aber auch anziehende Signale, und kann folglich die räumliche Anordnung von Zellen steuern [FÜLLER et al., 2003; POTENTE et al., 2011]. EphB4/EphrinB2 sind beispielsweise bei der arterio-venösen Differenzierung in der Embryonalentwicklung beteiligt [POTENTE et al., 2011]. Durch repulsive Signale wird die Segregation von Zellen gefördert und eine Zellvermischung verhindert, sodass arterio-venöse Grenzen in einem Kapillarnetzwerk ausgebildet werden können [FÜLLER et al., 2003]. Diese propulsiven und repulsiven Signale mit konsekutiver Veränderung der räumlichen Anordnung von den EphB4-/EphrinB2-tragenden Endothelzellen werden von FÜLLER et al. [2003] als „Push- und Pull-Interaktion“ beschrieben und tragen zu mehreren Schritten der Gefäß-Morphogenese während der Angiogenese bei, wie z.B. dem vaskulären Remodelling [POTENTE et al., 2011]. Studien beschreiben, dass Knock-out-Mäuse, die kein EphrinB2 oder EphB4 exprimieren, ein funktionell schwer beeinträchtigtes vaskuläres Netzwerk aufweisen und *in utero* versterben [GERETY et al., 1999; GERETY und ANDERSON, 2002]. Die gezielte Deletion von EphrinB2 in Perizyten und glatten Muskelzellen führt zur diffusen Ödembildung, Hämmorrhagien und zum Tod der Mäuse während der Perinatalperiode [FOO et al., 2006]. STEINLE et al. [2002] konnten weiterhin in einer Studie zeigen, dass EphB4 die Proliferation und Migration humaner Endothelzellen stimuliert und der Signalweg somit auch in der adulten Angiogenese von Bedeutung ist. In der Literatur wird beschrieben, dass die EphB4-Protein-Expressionsrate nicht zu jedem Zeitpunkt gleich hoch ist, an die Gewebeart angepasst ist und die EphB4-Signalkaskade mit vielen anderen intrazellulären Signalwegen interagiert [GERMAIN und EICHMANN, 2010; BOYD et al., 2014; DU et al., 2020]. In Tumorstudien wird der EphB4-Signalweg z.B. als „Vermittler“ zwischen vaskulären Zellen und Tumorzellen beschrieben und ist sowohl mit einer Aktivierung des Tumorwachstums als auch mit einer Wachstumshemmung assoziiert [CHEN et al., 2019].

Die Vermutung liegt nahe, dass die EphB4-Signalkaskade ebenfalls die Ausbildung eines funktionierenden Gefäßnetzwerks in sich neu entwickelnden Endometrioseherden beeinflusst. So konnten YERLIKAYA et al. [2016] zeigen, dass nicht nur EphB4 vermehrt in Endometrioseherden exprimiert wird, sondern auch eine positive Korrelation mit der Expression der pro-angiogenen Faktoren HIF1α, VEGFR-2 und PDGF-B besteht. Weiterhin konnten MARTINY-BARON et al. [2010] nachweisen, dass durch die Gabe des selektiven EphB4-Kinase-Inhibitors 4-Methyl-3-[[1-methyl-6-(3-pyridinyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-yl]amino]-N-[3-(trifluoromethyl)phenyl]-benzamide (NVP-BHG712) (Abb. 8) die VEGF-abhängige Gefäßneubildung und das Gewebewachstum in implantierten Teflonkammern in der Flanke

von Mäusen gehemmt wird. Sie postulierten daher, dass EphB4 ein wichtiger Mediator der VEGF-abhängigen Angiogenese *in vivo* ist [MARTINY-BARON et al., 2010]. Ergänzend zeigten YOU et al. [2017], dass die Behandlung mit NVP-BHG712 zu einer Reduktion der mikrovaskulären Dichte von implantierten Endothelzell-Sphäroiden in den Flanken von Mäusen führt.

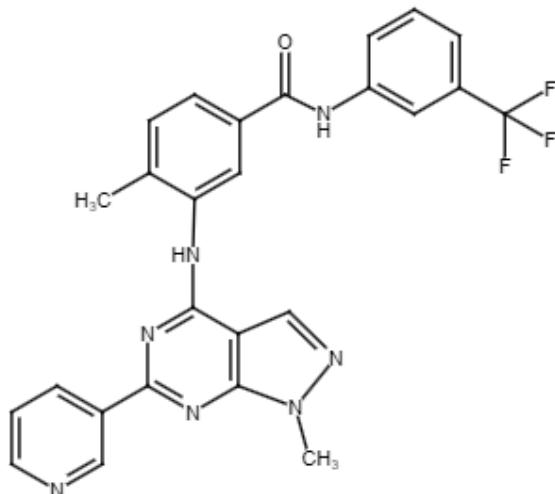


Abbildung 8: Strukturformel von 4-Methyl-3-[[1-methyl-6-(3-pyridinyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-yl]amino]-N-[3-(trifluoromethyl)phenyl]-benzamide (NVP-BHG712).

Basierend auf diesen Kenntnissen wurde die vorliegende Arbeit konzipiert. Zur Hemmung des EphB4-Signalwegs in Endometrioseherden wurde in Anlehnung an die Studie von MARTINY-BARON et al. [2010] der niedermolekulare Kinase-Inhibitor NVP-BHG712 verwendet. Von niedermolekularen, selektiven Eph-Kinase-Inhibitoren erhofft man sich weniger Nebenwirkungen. Sie binden an die intramolekulare Adenosintriphosphat (ATP)-Bindungstasche der Tyrosin-Kinasedomäne und hemmen die Autophosphorylierung des Eph-Rezeptors [UNZUE et al., 2016; CHEN et al., 2019; DU et al., 2020]. Die Selektivität von NVP-BHG712 für phosphorylierte Tyrosinkinasen wurde von MARTINY-BARON et al. [2010] in verschiedenen *in vitro* Kinase-Assays und zellbasierten enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) getestet. Die Substanz entfaltet ihre inhibitorische Wirkung im nanomolaren Bereich mit einer mittleren effektiven Wirkdosis (ED_{50}) von 25 nM für EphB4 und einer marginalen Hemmung von Off-Targets, wie dem co-lokalisierten VEGF-Rezeptor ($ED_{50} = 4200$ nM). NVP-BHG712 wird daher als potenter EphB4-Kinase-Hemmer angesehen [MARTINY-BARON et al., 2010].

4. Zielstellung

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig untersucht, ob die Blockade des EphB4-Signalwegs die angiogene Aktivität von Endothelzellen sowie die Vaskularisierung und das Wachstum von Endometrioseherden in der Rückenhautkammer bzw. in der Bauchhöhle von weiblichen BALB/c Mäusen hemmt. Die *in vivo* Analysen wurden mittels repetitiver, intravitaler Fluoreszenzmikroskopie und hochauflösendem Ultraschall sowie histologischen und immunhistochemischen Techniken durchgeführt. Hierbei sollten folgende Hypothesen geprüft werden:

1. NVP-BHG712 hemmt die angiogene Aktivität von humanen und murinen Endothelzellen.
2. NVP-BHG712 hemmt die Vaskularisierung und das Größenwachstum von induzierten Endometrioseherden in der Rückenhautkammer.
3. NVP-BHG712 hemmt die Vaskularisierung und das Größenwachstum von intraperitoneal induzierten Endometrioseherden.
4. NVP-BHG712 hemmt die Angiogenese von intraperitoneal induzierten Endometrioseherden insbesondere in der frühen Entwicklungsphase.
5. NVP-BHG712 reduziert die EphB4-messenger-Ribonukleinsäuren (mRNA)-Expression in intraperitoneal induzierten Endometrioseherden.

5. Material und Methoden

5.1. *In vitro* Experimente

5.1.1. Zelllinie

Für die *in vitro* Experimente der vorliegenden Arbeit wurden humane Endothelzellen (Cat# C-12210), engl. human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC), aus der Dermis juveniler Vorhaut bzw. adulter Haut verwendet (PromoCell, Heidelberg, Deutschland).

5.1.2. Zellkultur

Die verwendete Zelllinie wurde in endothelial cell growth (ECGM-MV)-Medium (PromoCell) in einem Brutschrank unter Standardbedingungen bei 37°C, 5% Kohlenstoffdioxid (CO₂) und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Medium enthielt 0,05 ml/ml fetales Kälberserum (FCS), 0,004 ml/ml Wachstums-Ergänzungsmittel für Endothelzellen, 10 ng/ml rekombinanter humaner epidermaler Wachstumsfaktor und 90 µg/ml Heparin sowie 1 µg/ml Hydrocortison. Es wurde eine 10 mM Stammlösung der Testsubstanz NVP-BHG712 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in 100% Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma-Aldrich) hergestellt und bei - 20°C gelagert. Zur Durchführung der Experimente wurde die Stammlösung mit DMSO und Zellkulturmedium verdünnt, um Konzentrationen von 1, 2, 5, 10 und 50 µM zu erzielen, wobei identische Konzentrationen von 0,1% DMSO (Vehikel) für die mit NVP-BHG712 und Vehikel behandelten Zellen eingesetzt wurden.

5.1.3. Viabilitäts- und Zytotoxizitäts-Assays

Um den Effekt von NVP-BHG712 auf die Viabilität von HDMEC bzw. die Zytotoxizität des Wirkstoffs zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein water-soluble tetrazolium (WST)-1-Assay (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) und ein Laktatdehydrogenase (LDH)-Assay (Cytotoxicity Detection KitPLUS; Roche Diagnostics) durchgeführt. Wasserlösliche Tetrazolium-Assays, wie der WST-1-Assay, werden zu spektralphotometrischen Analysen der Zellproliferation, z.B. nach Behandlung mit wachstumshemmenden Substanzen, verwendet [XIE et al., 2018]. Im WST-1-Assay produzieren mitochondriale Dehydrogenasen der metabolisch aktiven Zellen im Nährmedium Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Hydrid (NADH). Dieses katalysiert die Umwandlung des zugeführten, schwach gefärbten Tetrazolium-Salzes WST-1 in ein sehr gut wasserlösliches Formazan mit der Indikatorfarbe Rot [XIE et al., 2018].

LDH ist ein Enzym, das in den Zellen nahezu aller Gewebearten vorkommt. In einer Nährstoff- und Sauerstoffmangelsituation sowie unter dem Einfluss toxischer Substanzen kommt es zur Lyse der Zellen und damit zur Freisetzung zytoplasmatischer Bestandteile, inklusive

LDH [FARHANA und LAPPIN, 2020]. Im Zytotoxizitäts-Assay katalysiert freigesetzte LDH die Oxidation von Laktat zu Pyruvat, wodurch NADH entsteht und ein gelbes Tetrazoliumsalz in ein rot-orangenes Formazan umgewandelt wird [FARHANA und LAPPIN, 2020]. Der Farbumschlag wird in beiden Assays photometrisch gemessen. Dabei ist die Intensität der Rotfärbung proportional zur Anzahl der metabolisch aktiven (WST-1-Assay) bzw. lysierten Zellen (LDH-Assay) in der Kultur [XIE et al., 2018].

In dieser Arbeit wurden HDMEC mit verschiedenen Konzentrationen von NVP-BHG712 und Vehikel kultiviert. Hierzu wurden in einer 96-Well-Gewebekulturplatte (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) 1×10^4 HDMEC/Well in 100 μl Kulturmedium für 24 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert. Dabei wurden sie mit 0,1% DMSO als Kontrolle oder 1, 2, 5, 10 und 50 μM NVP-BHG712 behandelt. Nach 24 Stunden wurden zur Durchführung des LDH-Assays zusätzliche Wells mit 1% Triton X-100 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) inkubiert. Dies löst eine komplette Lyse der Zellen aus und dient damit zur Bestimmung der zytotoxischen Obergrenze (Positivkontrolle). Anschließend wurde das WST-1-Reagenz bzw. die LDH-Reaktionsmischung sowie die Stopplösung in jedes Well zugefügt und nach Protokoll des Herstellers inkubiert. Anschließend wurde eine Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 450 nm im WST-1-Assay bzw. 492 nm im LDH-Assay (Referenzwellenlänge jeweils 620 nm) mittels einem Photometer „PhoMo“ (Anthos Mikrosystem GmbH, Krefeld, Deutschland) durchgeführt. Jeder der voneinander unabhängig durchgeführten Versuche ($n = 5$) erfolgte mit vierfachen Replikaten.

5.1.4. Zellmigrations-Assay

Die Migration von Zellen ist essentiell bei vielen Prozessen, wie z.B. der Angiogenese [LAUFFENBURGER und HORWITZ, 1996; POTENTE et al., 2011]. Um den Einfluss von NVP-BHG712 auf die Migrationsfähigkeit von Endothelzellen zu analysieren, kam ein Transwell-Migrations-Assay zum Einsatz. Dieser Assay besteht aus zwei Kompartimenten, die durch eine Membran mit Poren getrennt sind. Durch diese Poren können Zellen entlang eines chemotaktischen Gradienten von einem Kompartiment zum anderen Kompartiment wandern, sodass die Anzahl der migrierten Zellen mikroskopisch erfasst werden kann [JUSTUS et al., 2014].

In der vorliegenden Arbeit wurde eine 24-Well-Chemotaxis-Kammer mit einer Membran aus Polykarbonat und einer Porengröße von 8 μm (Corning Costar, VWR, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Vor dem Versuch wurden die Zellen zunächst für 24 Stunden mit 1 bzw. 2 μM NVP-BHG712 oder Vehikel (0,1% DMSO) inkubiert. Anschließend wurden 1×10^5 vorbehandelte Zellen in die 24-Well-Einsätze des oberen Kammerteils, die 250 μl FCS-freies ECGM-MV-Medium enthielten, pipettiert. Die Einsätze der unteren Kammer wurden mit 750 μl ECGM-MV-Medium, das mit 1% FCS (Biochrom, Berlin, Deutschland) supplementiert

wurde, gefüllt. Danach wurde die Kammer für 24 Stunden bei 37°C unter Standardbedingungen inkubiert. Die nicht-migrierten Zellen wurden nach Ablauf der Inkubationszeit von der oberen Filterfläche mit einem Baumwolltupfer entfernt. Die anschließende Fixierung der migrierten Zellen erfolgte mit Methanol, die Färbung mittels Dade Diff-Quick (Dade Diagnostika GmbH, München, Deutschland). Mit Hilfe eines Lichtmikroskops (BZ-8000; Keyence, Osaka, Japan) erfolgte dann die Auszählung der migrierten Zellen in 400-facher Vergrößerung in 20 randomisierten Gesichtsfeldern pro Membran. Die Ergebnisse wurden als Zellen pro mm² angegeben. Jeder der voneinander unabhängig durchgeführten Versuche (n = 5) erfolgte mit vierfachen Replikaten.

5.1.5. Tube-Formation-Assay

Um den Effekt von NVP-BHG712 auf die Fähigkeit von HDMEC, gefäßähnliche Strukturen auszubilden, zu analysieren, wurde ein Tube-Formation-Assay eingesetzt. Bei diesem Assay werden Endothelzellen auf einem biologisch aktiven Basalmembran-Layer platziert, wo sie zügig adhärieren und kapillarähnliche Strukturen ausbilden (engl. tube formation) [KUBOTA et al., 1988].

In der vorliegenden Arbeit wurden hierzu 50 µl/Well einer wachstumsfaktorreduzierten Basalmembran-Matrix namens Matrigel (VWR) in eine 96-Well-Platte (Greiner Bio-One GmbH) gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Währenddessen erfolgte eine Polymerisation des Matrigels, sodass im nächsten Schritt 1,5×10⁴ HDMEC in ECGM-MV-Medium in jedes der Wells hinzugegeben werden konnte. Die Zellen wurden dann mit 1 bzw. 2 µM NVP-BHG712 oder Vehikel (0,1% DMSO) unter Standardbedingungen inkubiert. Nach 24 Stunden konnte mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops (BZ-8000; Keyence) die Ausbildung von Endothelzell-Tubes beobachtet werden. Zur Auswertung der Anzahl der Tubes kam das Softwareprogramm Image J mit einem Angiogenese-Analyse-Zusatzprogramm (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) zum Einsatz. Jeder der voneinander unabhängig durchgeführten Versuche (n = 5) erfolgte mit sechsfachen Replikaten.

5.1.6. Sphäroid-Sprouting-Assay

In der vorliegenden Arbeit wurden Endothelzell-Sphäroide mittels der Liquid-Overlay-Methode hergestellt. Hierzu wurde eine nicht-adhärierende 96-Well Platte mit rundem Bodeneinsatz (Greiner Bio-One GmbH) mit 100 µl ECGM-MV-Medium, welches mit 20% (w/v) Methylcellulose (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) supplementiert wurde, verwendet. Jedes Well wurde mit 500 Zellen beimpft. Es erfolgte eine 24-stündige Inkubation unter Standardbedingungen, sodass sich einzelne Sphäroide ausbilden konnten. Danach wurden acht Volumenanteile einer säurehaltigen Kollagenlösung, extrahiert aus Ratten-

schwänzen (2 mg/ml, 4°C; Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland), mit einem Volumenanteil von 10×M199 (Sigma-Aldrich) gemischt. Durch Hinzugabe von 0,2 M Natronlauge wurde ein pH-Wert von 7,4 eingestellt. Die kollagenhaltige Stammlösung wurde dann in einem Verhältnis von 1:2 mit ECGM-MV-Medium, das mit 20% FCS (Biochrom) und 0,5% (w/V) Methylcellulose (Thermo Fisher Scientific) supplementiert wurde, gemischt. Anschließend wurden je 300 µl der kollagenhaltigen Mischung in jedes Well einer vorgewärmten 24-Well-Platte (Greiner Bio-One GmbH) gegeben. Auf diese Art wurde eine 45-minütige Polymerisation der Stammlösung erwirkt, um eine Sedimentbildung der Sphäroide zu verhindern. Ergänzend wurden 300 µl einer mit ca. 60 Sphäroiden angereicherten Kollagenmischung auf die Oberseite des polymerisierten, kollagenhaltigen Gels pipettiert. Anschließend wurden 0,4 ml ECGM-MV-Medium mit 1 und 2 µM NVP-BHG712 oder Vehikel (0,1% DMSO) zu jedem Well hinzugefügt und für 24 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurde die kumulative Sprosslänge von insgesamt 10 Sphäroiden pro Gruppe (n = 5) quantitativ mit der Software LAS V4.8 (Leica DFC450 C; Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) ausgewertet.

5.1.7. *Ex vivo* Aortenring-Assay

Zur Analyse des Effekts von NVP-BHG712 auf murine Endothelzellen wurde ein Aortenring-Assay eingesetzt. Bei diesem Assay werden Ringe aus der thorakalen Aorta von Mäusen entnommen und *ex vivo* kultiviert. Die Gefäße, die aus den murinen Aortensegmenten herauswachsen, ähneln in ihrem Aufbau neugebildeten Gefäßsprossen, die unter *in vivo* Bedingungen entstehen [GOODWIN, 2007].

Analog zu GU et al. [2016] wurden in der vorliegenden Arbeit jeweils 18 Ringe pro Tier aus der thorakalen Aorta von 5 BALB/c Mäusen entnommen. Jeder Ring wurde in ein Well, das 200 µl Matrikel enthielt, einer 48-Well-Platte (Greiner Bio-One GmbH) eingebettet. Das Matrikel wurde zur Polymerisierung 20 Minuten bei 37°C unter Standardbedingungen in einem Brutschrank gelagert und anschließend mit 800 µL Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland) mit 10% FCS (Biochrom), 100 U/ml Penicillin (Biochrom) und 0,1 mg/ml Streptomycin (Biochrom), überdeckt. Dieses enthielt entweder Vehikel (0,1% DMSO; n = 5, jeweils sechsfache Replikate) oder 1 bzw. 2 µM NVP-BHG712 (n = 5, jeweils sechsfache Replikate). Die Platten mit den Aortenringen wurden dann für sechs Tage unter Standardbedingungen kultiviert. An Tag 3 erfolgte ein Austausch des Mediums. An Tag 6 wurde die Fläche der herauswachsenden Gefäßsprossen (mm²) jedes Aortenrings mittels Phasenkontrastmikroskop (BZ-8000; Keyence) vermessen.

5.2. *In vivo* Experimente

5.2.1. Versuchstiere

In der vorliegenden Arbeit wurden weibliche BALB/c Mäuse aus der Zucht des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes (Standort Homburg/Saar, Deutschland) eingesetzt. Die Spender- und Empfängertiere waren 12-20 Wochen alt und wogen zwischen 18-25 g. Das Gewicht wurde wöchentlich kontrolliert. Die Haltung der Tiere erfolgte unter klimatisierten Bedingungen mit einem 12 Stunden-Tag/Nachtrhythmus. Dabei wurden die Tiere für das intraperitoneale Endometriosemodell in Gruppen von vier bis sechs Tieren und die Mäuse für das Modell der Rückenhautkammer einzeln gehalten. Alle Tiere hatten jederzeit freien Zugang zu Trinkwasser und Standardpelletfutter (Altromin, Lage, Deutschland). Der Allgemeinzustand sowie das Schlaf- und Fressverhalten der Tiere wurden während der Experimente streng überwacht.

Die Durchführung der Tierversuche erfolgte nach EU-Richtlinien (2010/63/EU) und ausschließlich am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes. Eine Genehmigung lag durch das Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz (Saarbrücken, Deutschland) unter der Zulassungsnummer 47/2016 vor.

5.2.2. Zyklusbestimmung

Der Zyklus von Mäusen dauert vier bis fünf Tage und wird in vier Stadien unterteilt: Proöstrus, Östrus, Metöstrus und Diöstrus [EKAMBARAM et al., 2017]. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Bestimmung des jeweiligen Zyklusstadiums eine Vaginallavage durchgeführt. Hierfür wurde das wache Tier in Rückenlage fixiert und 15 µL isotonische Kochsalzlösung (B. Braun Melsungen AG; Melsungen, Deutschland) in die Vagina pipettiert. Anschließend wurde die gewonnene Zellsuspension auf einem Objekträger aufgetragen und mikroskopisch (CH-2; Olympus, Hamburg, Deutschland) untersucht [RUDZITIS-AUTH et al., 2016]. Die vier Zyklusstadien weisen unterschiedliche Zelltypen auf, wodurch das jeweils vorliegende Zyklusstadium mikroskopisch bestimmt werden kann [EKAMBARAM et al., 2017]. Der Proöstrus ist hauptsächlich durch das Vorhandensein von Parabasalzellen und Intermediärzellen charakterisiert. In der Anfangsphase des Proöstrus finden sich noch vereinzelt Leukozyten, in der Spätphase steigt die Anzahl der Superfizialzellen. Im Östrus finden sich typischerweise große, kernlose, keratinisierte Epithelzellen. Der Vaginalabstrich im Metöstrus weist ein Mischbild aus Leukozyten, keratinisierten Epithelzellen und vereinzelten Intermediärzellen auf. Im Diöstrus hingegen finden sich hauptsächlich Leukozyten.

5.2.3. Gewinnung von Transplantaten

In allen Experimenten wurde auf eine Synchronisierung des Zyklusstadiums der Spender- und Empfängertiere geachtet, da auf diese Weise ausgeschlossen werden sollte, dass hormonelle Schwankungen zwischen individuellen Tieren das Wachstumsverhalten des östrogensensitiven, transplantierten Gewebes beeinflussen [LASCHKE et al., 2005; LASCHKE et al., 2011b]. Alle Spendermäuse befanden sich zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme im Östrus. Im Rückenhautkammermodell erfolgte die Präparation der Rückenhautkammer zwei Tage vor Transplantation der gewonnenen Endometriumfragmente, sodass hierfür nur Empfängertiere ausgewählt wurden, die sich am Tag der Präparation im Diöstrus befanden und somit am Tag der Gewebetransplantation im Östrus [LASCHKE et al., 2011b]. Im intraperitonealen Endometriosemodell befanden sich sowohl die Empfänger- als auch die Spendertiere im Östrus, da die Gewinnung und Transplantation der Uterusfragmente am gleichen Tag erfolgte [RUDZITIS-AUTH et al., 2016].

In beiden Modellen wurden die Spendertiere mit Ketamin (75 mg/kg; Ursotamin; Serumwerke Bernburg, Bernburg, Deutschland) und Xylazin 2% (15 mg/kg; Rompun; Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) durch eine intraperitoneale Injektion narkotisiert [RUDZITIS-AUTH et al., 2012]. Zur Gewinnung der Endometrium- bzw. Uterusfragmente wurde der Bauchraum durch eine mediane Laparotomie eröffnet und danach der Darm ausgelagert, um die weiblichen Geschlechtsorgane gut einsehen zu können. Dann wurden die beiden Uterushörner vorsichtig entnommen und in einer Petrischale mit 37°C warmem DMEM (PAN-Biotech) zwischengelagert [RUDZITIS-AUTH et al., 2012]. Anschließend wurden die Spendertiere durch zervikale Dislokation getötet. Im nächsten Schritt erfolgte mit Hilfe einer Mikroschere unter einem Operationsmikroskop (M651; Leica Microsystems GmbH) eine Längseröffnung der isolierten Uterushörner. Die eröffneten Hörner wurden aufgespannt und fixiert [FENG et al., 2012; RUDZITIS-AUTH et al., 2012].

Für das Rückenhautkammermodell wurden Endometriumfragmente mit einer standardisierten Größe von ca. 0,6 mm² vom darunterliegenden Myometrium abpräpariert. Um die Transplantate später in der Rückenhautkammer mittels Fluoreszenzmikroskopie von dem ungefärbten Umgebungsgewebe differenzieren zu können, wurde in diesem Versuchsabschnitt zusätzlich der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 (200 µg/ml; Sigma-Aldrich) für drei Minuten in das Medium hinzugegeben. Dieser Farbstoff bindet an die Desoxyribonukleinsäure (DNA) von lebenden Zellen, sodass diese unter ultraviolettem (UV)-Licht fluoreszieren [LASCHKE et al., 2005; FENG et al., 2012].

Im Modell der intraperitonealen Endometriose wurden ganze Uterusfragmente mit Hilfe einer 2 mm-Biopsiestanze (Stiefel Laboratorium GmbH, Offenbach am Main, Deutschland) aus den Uterushörnern exzidiert [RUDZITIS-AUTH et al., 2012] (Abb. 9).

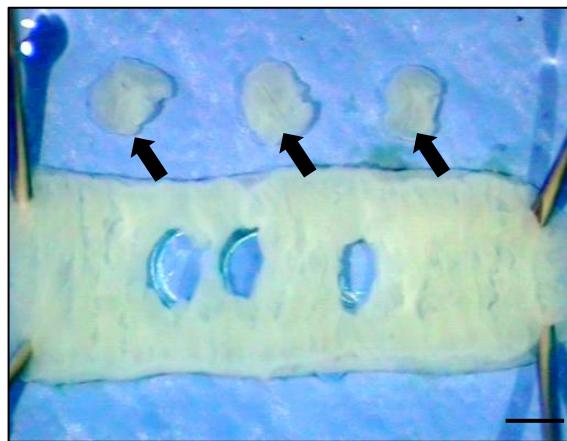


Abbildung 9: Ausgestanzte Uterusfragmente (schwarze Pfeile) aus einem längseröffneten Uterushorn für die Induktion intraperitonealer Endometrioseherde. Maßstab: 1,5 mm.

5.2.4. Modell der Rückenhautkammer

Um den Effekt von NVP-BHG712 (Sigma-Aldrich) bzw. des Vehikels 10% N-methyl-2-pyrrolidone (NMP; Sigma-Aldrich) auf die Angiogenese von Endometrioseherden zu untersuchen, wurde zunächst das etablierte Modell der Rückenhautkammer an der Maus verwendet [LASCHKE et al., 2005; NENICU et al., 2014]. In diesem Modell wird Mäusen eine Titan-Kammer auf die Rückenhautfalte implantiert [LASCHKE et al., 2011b]. Diese enthält quergestreifte Skelettmuskulatur als Empfängergewebe sowie subkutanes Fettgewebe und Haut. In diesem Modell können Analysen von sich neu entwickelnden Endometrioseherden mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie über einen Beobachtungszeitraum von 14 Tagen durchgeführt werden [LASCHKE et al., 2005].

Hierzu wurden die Tiere mit Ketamin (75 mg/kg; Ursotamin; Serumwerke Bernburg) und Xylazin 2% (15 mg/kg; Rompun; Bayer AG) durch eine intraperitoneale Injektion narkotisiert. Als Schutz vor Austrocknung der Hornhaut wurde Bepanthen Augen- und Nasensalbe (Bayer Health Care, Leverkusen, Deutschland) auf die Augen der Tiere aufgetragen. Das Rückenfell wurde durch elektrische Rasur (Elektra II GH 204; Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) und chemische Depilation (Elca med Creme; Asid Bonz, Herrenberg, Deutschland) entfernt. Danach erfolgte eine Säuberung mit lauwarmem Wasser und eine Desinfektion mit alkoholischer Lösung (Softasept; B. Braun Melsungen AG).

Im nächsten Schritt wurde die Rückenhautfalte der Tiere in Bauchlage unter Gegenlichtkontrolle (KL1500 LCD; Zeiss, Jena, Deutschland) angehoben, um jeweils kranial und kaudal die zwei Hauptgefäßstämme zu identifizieren und zur Deckung zu bringen. Danach wurde die Hautfalte mit zwei Haltefäden an der Mittellinie senkrecht aufgespannt (Abb. 10A). Die Rückenhautkammer (Titan, Gewicht: 2 g; Irola Industriekomponenten GmbH & Co. KG, Schonach, Deutschland), bestehend aus einem Doppelrahmen, wurde wie folgt implantiert: Zuerst wurde der hintere Rahmen am oberen Hautfaltenrand angenäht und am unteren Rand nach vorsichtiger Inzision durch zwei Verbindungsschrauben fixiert (Abb. 10B). Danach wurde das Tier in Seitenlage gebracht und für die nachfolgende Präparation des Kammer-Beobachtungsfensters unter ein Stereo-Operationsmikroskop (Leica M651; Leica Microsystems GmbH) platziert.

Zur Freilegung des quergestreiften Hautmuskels und der Subcutis wurden zunächst die im Bereich des Kammer-Beobachtungsfensters gelegene Cutis, Subcutis mit Hautmuskel und die beiden Schichten des Retraktormuskels entfernt und wiederholt mit physiologischer Kochsalzlösung gespült (Abb. 10B). Bei der Entfernung der zweiten Retraktorschicht wurde besonders vorsichtig und präzise gearbeitet, da die darunterliegende Muskelschicht (*Musculus panniculus carnosus*) zu den späteren mikroskopischen Untersuchungen herangezogen wurde [LASCHKE et al., 2011b].

Im nächsten Schritt wurde der vordere Rahmen der Kammer mit Hilfe von Muttern an den Schrauben fixiert und ein passendes Deckglas eingesetzt, das mit einem Sprengring im Titanrahmen fixiert wurde (Abb. 10C, D). Die überschüssige Flüssigkeit wurde mit Kompressen vorsichtig abgesaugt. Durch Abnehmen des Sprenglings und des Deckglases war es möglich, sich während des Versuches Zugang zur präparierten Fläche zu verschaffen.

Um sicherzustellen, dass die Rückenhautkammer gut von den Mäusen toleriert wurde, erfolgte eine Überwachung des Schlaf- und Wachrhythmus sowie des Putz- und Fressverhaltens. Eine postinterventionelle Analgesie, die später potentiell die Mikrozirkulation hätte beeinflussen können, war nicht notwendig [LASCHKE et al., 2011b]. Im Anschluss an die Präparation der Rückenhautkammer erfolgte eine 48-stündige Erholungsphase der Tiere, bevor die aus Spendertieren gewonnenen Endometriumfragmente in die Rückenhautkammer transplantiert wurden.

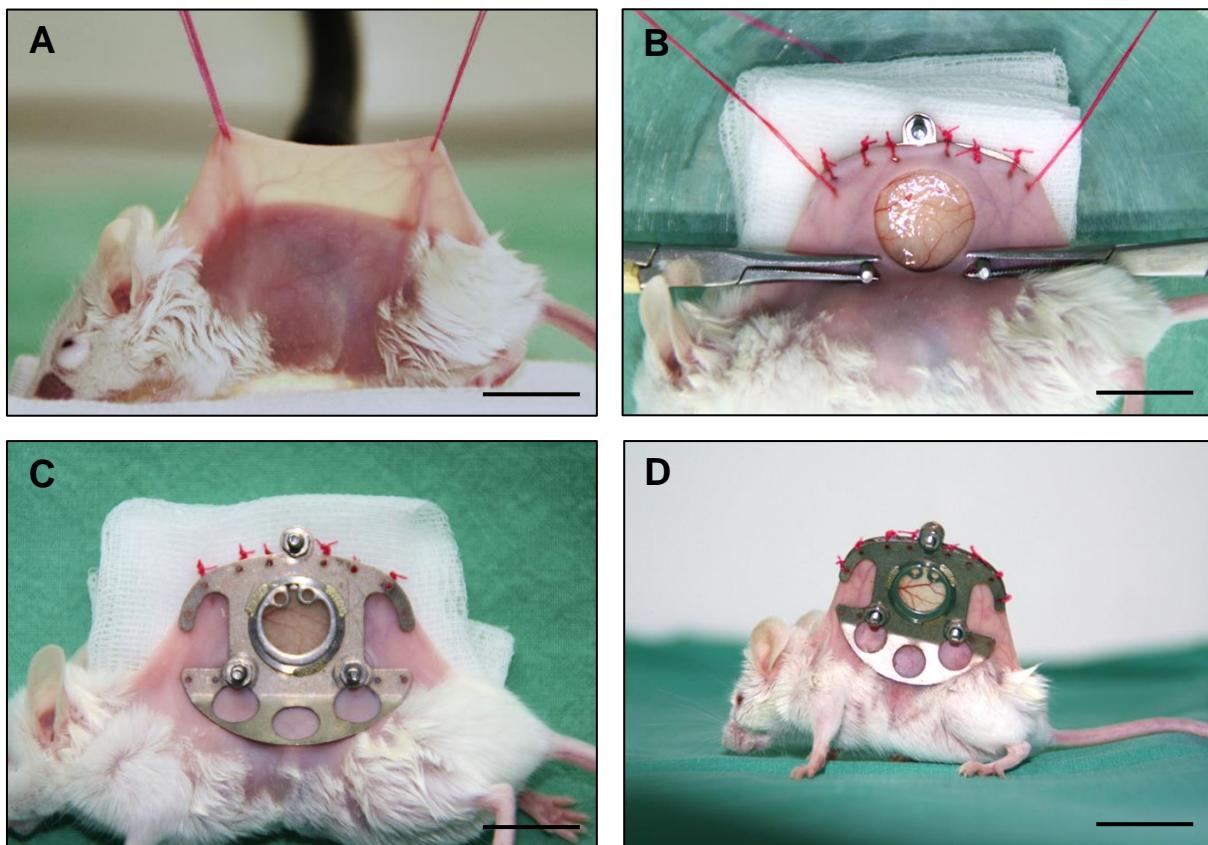


Abbildung 10: Präparation der Rückenhautkammer. (A) Anheben der Rückenhaut und Darstellung der Hauptgefäßstämme unter Gegenlicht. (B) Präparation des Beobachtungsfeldes und Befestigung des hinteren Kammerteils. (C) Nach Präparation des Beobachtungsfeldes Befestigung des vorderen Kammerteils mit Deckglas und Sprengring. (D) Rückenhautkammer in situ. Maßstab (A-C): 15 mm, (D): 25 mm.

Vor Transplantation der Endometriumfragmente in die Rückenhautkammer wurden die Empfängerterie wie zuvor narkotisiert. Nach Abnehmen des Sprengangs und des Deckglases wurden die Kammern mit vorgewärmer Kochsalzlösung gespült und pro Tier zwei Endometriumfragmente auf den *Musculus panniculus carnosus* transplantiert. Die beiden Transplantate wurden mit dem größtmöglichen Abstand zueinander eingesetzt, um mögliche Wechselwirkungen zwischen den Transplantaten während des Anwachsprozesses zu vermeiden [LASCHKE et al., 2005] (Abb. 11).

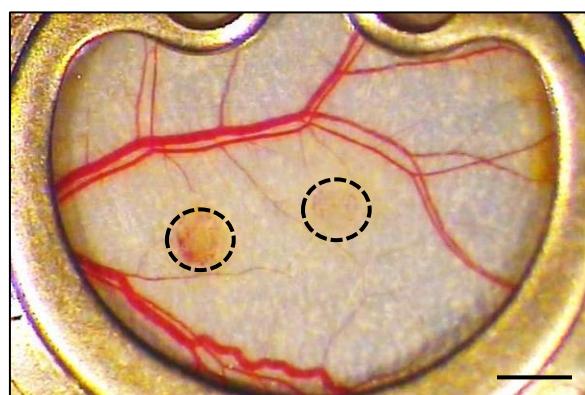


Abbildung 11: Lichtmikroskopische Aufnahme sich entwickelnder Endometrioseherde (schwarz gestrichelte Linie) in der Rückenhautkammer. Maßstab: 1,5 mm.

5.2.4.1. *Intravitale Fluoreszenzmikroskopie*

Die repetitiven, intravitalfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der sich entwickelnden Endometrioseherde in der Rückenhautkammer erfolgten wie durch FENG et al. [2012] und KÖRBEL et al. [2018] beschrieben am Tag der Transplantation (Tag 0) sowie an Tag 3, 6, 10 und 14. Dazu wurden die Tiere in Seitenlage auf einer Plexiglasbühne fixiert. Um die Blutgefäße zu kontrastieren, wurde den Mäusen der Fluoreszenzfarbstoff 5% Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-Dextran (0,1 ml/Tier; Molekulargewicht 150.000 Dalton, Sigma-Aldrich) in den retrobulbären Venenplexus injiziert. Dieser Farbstoff hat ein hohes Molekulargewicht, sodass er unter physiologischen Bedingungen intravasal verbleibt und so das Blutplasma anfärbt [LASCHKE et al., 2011b]. Im Anschluss wurde die Rückenhautkammer mit den Endometrioseherden unter einem Zeiss Axiotech-Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) platziert, das mit einem 4-fach, 10-fach und 20-fach Objektiv (Zeiss) ausgestattet war. Als Lichtquelle diente eine 100 Watt Quecksilberdampf-Lampe mit einem Filterblock für blaues, grünes und ultraviolettes Licht. Die *in vivo* Aufnahmen erfolgten über eine charged-coupled device (CCD)-Videokamera (FK 6990; Pieper, Schwerte, Deutschland) und wurden über einen Bildschirm (PVM 1371-QM; Sony Corp., Tokio, Japan) an einen DVD-Rekorder (DVD R121; Samsung Electronics GmbH, Schwalbach, Deutschland) übertragen. Dadurch konnten sämtliche Parameter im Anschluss offline, wie im nächsten Kapitel beschrieben, analysiert werden. Nach der letzten mikroskopischen Untersuchung wurden die narkotisierten Tiere durch zervikale Dislokation getötet und das Rückenhautkammergewebe mit den transplantierten Endometrioseherden für histologische und immunhistochemische Untersuchungen entnommen.

5.2.4.2. *Mikrozirkulatorische Parameter*

Die quantitative offline Analyse der mikroskopischen Bilder erfolgte mit Hilfe des Computer-assistierten Bildverarbeitungssystems Cap-Image (Version 8.5; Zeintl, Heidelberg, Deutschland). Dabei wurden folgende Parameter analysiert:

1. Herdgröße (mm²)
2. Vaskularisierte Fläche (%)
3. Funktionelle Kapillardichte (cm/cm²)
4. Gefäßdurchmesser (µm)
5. Blutzellgeschwindigkeit (µm/s)

Die Größe der Endometrioseherde wurde in einer Übersichtsaufnahme nach der Hoechst-Färbung (Sigma-Aldrich) im UV-Filter bestimmt. Durch die Färbung waren die Herde unter

dem Mikroskop gut sichtbar, sodass die Herdgrenzen präzise am Bildschirm bestimmt und der Flächeninhalt planimetrisch in mm^2 ermittelt werden konnte.

Die vaskularisierte Fläche ist als jene Fläche in den Endometrioseherden definiert, welche zum Zeitpunkt der Analyse bereits perfundierte Mikrogefäße enthält. Diese Fläche wurde durch die Gesamtfläche des zu untersuchenden Herds dividiert und in Prozent angegeben.

Die funktionelle Kapillardichte gibt die Dichte der bereits mit Blut perfundierten Mikrogefäße in cm/cm^2 eines Endometrioseherds an. Zur Ermittlung der funktionellen Kapillardichte wurde der zu untersuchende Herd in vier Quadranten eingeteilt und alle FITC-Dextran-markierten Gefäße in den jeweiligen Quadranten im Standbild nachgezeichnet. Anschließend wurde die Gesamtstrecke aller perfundierten Gefäße berechnet und in Relation zu der zuvor ermittelten Herdfläche gesetzt.

Für die Ermittlung der Durchmesser einzelner Mikrogefäße, wurden zwei Randpunkte des jeweiligen Gefäßes durch eine senkrecht zum Verlauf des Gefäßes liegende Strecke auf dem Auswertemonitor miteinander verbunden. Um standardisierte und randomisierte Bedingungen zu schaffen, wurde ein Achsenkreuz auf eine Folie aufgezeichnet und auf den Monitor aufgelegt. Es wurden dann ausschließlich Gefäße gemessen, welche die waagrechte und senkrechte Mittelachse des virtuellen Achsenkreuzes auf dem Auswertemonitor schnitten. Die Messung erfolgte in μm .

Die Blutzellgeschwindigkeit wurde mit Hilfe der Line-Shift-Diagramm-Methode bestimmt [DE VRIESE et al., 2000]. Dabei wurden nur Gefäße in die Messung miteinbezogen, deren Durchmesser bestimmt wurde. Hierfür wurde eine Messlinie festgelegt, die zentral im Lumen des zu messenden Gefäßes und in Richtung des Blutflusses lag. Die Videoaufnahme wurde dann für 10 Sekunden in Echtzeit wiedergegeben. Dabei wurde entlang der Messlinie ein Grauwertprofil erstellt, das in einem Bildspeicher aufgenommen wurde. Dabei entstanden dunkle Linien durch Erythrozyten, die während der Messung entlang der Messlinie strömten, bzw. helle Linien durch vorbeiströmendes Blutplasma [DE VRIESE et al., 2000]. Die Berechnung der Blutzellgeschwindigkeit erfolgte dann aus der Steigung dieser Linien in $\mu\text{m}/\text{s}$.

5.2.5. Modell der intraperitonealen Endometriose

Um den Effekt von NVP-BHG712 bzw. des Vehikel NMP auf das Wachstum und die Vaskularisierung von Endometrioseherden in der Bauchhöhle von Mäusen zu untersuchen, kam das etablierte intraperitoneale Modell zum Einsatz [LASCHKE et al., 2010; RUDZITIS-AUTH et al., 2012, 2016]. Hierzu wurden Uterusfragmente von Spendermäusen an das Peritoneum von Empfängermausen genäht und die Größenentwicklung der Transplantate wiederholt

über einen Zeitraum von 28 Tagen sonographisch untersucht [RUDZITIS-AUTH et al., 2012]. Um den anti-angiogenen Effekt von NVP-BHG712 in einer früheren Phase zu beurteilen, wurden zusätzliche Tiere über 7 Tage täglich mit dem Inhibitor behandelt und die sich entwickelnden Endometrioseherde danach direkt histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen unterzogen [RUDZITIS-AUTH et al., 2016].

Die Transplantation der Uterusfragmente aus den Spendertieren in die Bauchhöhle der Empfängertiere erfolgte wie bereits beschrieben in tiefer Narkose. Bei den Empfängertieren wurde das Fell der Bauchdecke mittels Enthaarungscreme (Nair hair removal lotion; Church & Dwight Canada Corp., Mississauga, ON, Kanada) entfernt und anschließend der Bauchraum durch eine mediane Laparotomie eröffnet. Danach wurden bei jedem Tier jeweils zwei Uterusfragmente auf der rechten und linken Bauchwandseite an das Peritoneum mittels 6-0 Prolene-Faden (Ethicon Products) fixiert (Abb. 12). Abschließend wurden Muskulatur und Haut wieder mit einer fortlaufenden 6-0 Prolene-Naht (Ethicon Products) verschlossen.

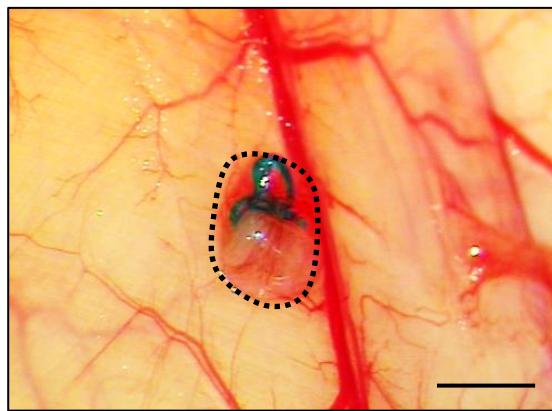


Abbildung 12: Fixierter Endometrioseherd (schwarz gepunktete Linie) am Peritoneum einer BALB/c Maus. Maßstab: 2 mm.

5.2.5.1. Volumenmessung mittels hochauflösendem Ultraschall

Die Ultraschallanalysen (Vevo770; VisualSonics, Toronto, ON, Kanada) der sich entwickelnden Endometrioseherde wurden am Tag der Induktion (Tag 0) sowie an Tag 7, 14, 21 und 28 durchgeführt. Dafür wurden die Mäuse mit 5 Vol-% Isofluran (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) narkotisiert (Abb. 13A), sodass sie anschließend in Rückenlage auf einem Untersuchungstisch fixiert werden konnten (Abb. 13B). Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte mittels 2 Vol-% Isofluran (Baxter Deutschland GmbH). Die Atem- und Herzfrequenz wurde durch Elektroden (THM100; Indus Instruments, Houston, TX, USA) überwacht. Vor den Aufnahmen wurden die Tiere am Bauch enthaart. Nach Applikation des Ultraschallgels (Aquasonic 100; Parker, Fairfield, NJ, USA) wurden mit einem 704 real-time microvisualization (RMW)-Schallkopf (VisualSonics) zweidimensionale (2D) Schnittbilder mit

einer Frequenz von 40 MHz und einer Fokustiefe von 6 mm angefertigt (Abb. 13B). Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit Hilfe eines linearen Motors im Abstand von 50 μm über die gesamte Länge der Endometrioseherde. Um aus den 2D-Darstellungen der Herde sowohl das Gesamtvolumen als auch das Volumen der zystisch-dilatierten Düsen (im Folgenden Zysten genannt) zu bestimmen, wurden die Grenzen der Herde und der enthaltenen Zysten in definierten, parallelen Ebenen in 200 μm Schritten manuell umfahren (Abb. 13C). Basierend auf den umrandeten Flächen konnte dann mit Hilfe der VisualSonics-Software (Veo770 V2.3.0; VisualSonics) eine 3D-Darstellung der Endometrioseherde erfolgen und das entsprechende Volumen berechnet werden [LASCHKE et al., 2010] (Abb. 13D).

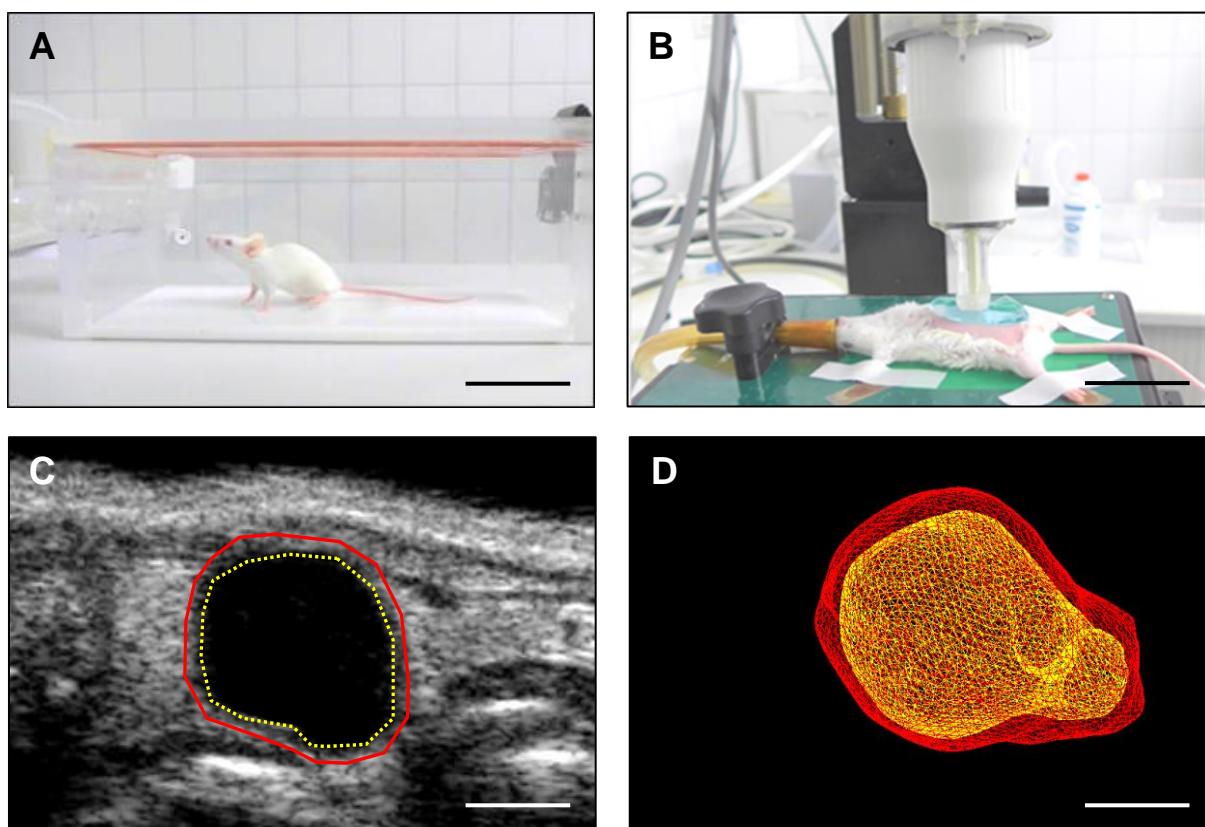


Abbildung 13: Durchführung der hochauflösenden Ultraschallanalysen. (A) BALB/c Maus in einer Box zur Narkoseeinleitung mittels 5% Isofluran. (B) Abdomenultraschall der narkotisierten Maus. (C) Endometrioseherd in der Rekonstruktionssoftware (gelb gepunktete Linie: Zystengrenze, rote Linie: Herdgrenze). (D) 3D-Rekonstruktion (gelb: Zyste, rot: Gesamtherd). Maßstab: (A) 5,5 cm (B) 4,2 cm (C) 1 mm (D) 1,25 mm.

Bei den Ultraschalluntersuchungen wurden folgende Parameter erhoben:

1. Gesamtvolumen der Herde (mm^3)
2. Stromavolumen (mm^3)
3. Zystenvolumen (mm^3)
4. Wachstumsrate der Endometrioseherde (%) =

$$\text{Gesamtvolumen Untersuchungstag / Gesamtvolumen Tag 0} \times 100 - 100$$

5. Wachstumsrate des Stromagewebes (%) =
Stromavolumen Untersuchungstag / Stromavolumen Tag 0 \times 100 - 100
6. Prozentualer Anteil zystenenthaltender Herde pro Tier (%) =
Anzahl der zystenenthaltenden Herde / Gesamtzahl der Herde \times 100

5.2.5.2. Größenmessung mittels digitalem Messschieber

Am 28. Untersuchungstag erfolgte unmittelbar nach der letzten Ultraschall-Untersuchung eine ergänzende Größenmessung der Endometrioseherde mittels digitalen Messschiebers (0 bis 150 mm; Technologiezentrum W-tec, Wuppertal, Deutschland) [LASCHKE et al., 2010] (Abb. 14). Hierzu wurden die Mäuse durch eine intraperitoneale Injektion mit Ketamin (75 mg/kg; Ursotamin; Serumwerke Bernburg) und Xylazin (15 mg/kg; Rompun; Bayer AG) narkotisiert. Das Abdomen wurde unter einem Stereo-Operationsmikroskop (M651; Leica Microsystems GmbH) entlang der Linea alba eröffnet, um die am Peritoneum fixierten Endometrioseherde einsehen zu können. Es wurde sowohl der Längs- als auch der Querdurchmesser der Herde bestimmt und die Größe (mm^2) mit Hilfe der Formel $D1 \times D2 \times \pi / 4$ berechnet [BECKER et al., 2008]. Dabei entsprach D1 dem kleineren und D2 dem größeren Durchmesser. Nach der Messung wurden die narkotisierten Tiere unverzüglich durch zervikale Dislokation getötet und die Endometrioseherde mit dem umliegenden Gewebe für weitere histologische und immunhistochemische Analysen exzidiert.

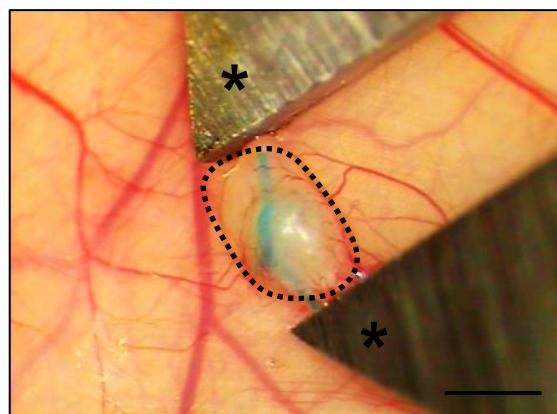


Abbildung 14: Messung eines intraperitoneal fixierten Endometrioseherds (schwarz gepunktete Linie) mit Hilfe eines Messschiebers (Sternchen). Maßstab: 2 mm.

5.2.6. Histologie und Immunhistochemie

5.2.6.1. Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Für die histomorphologische Untersuchung wurden am Ende der jeweiligen Versuchsreihe die entnommenen Endometrioseherde für 24 Stunden in 4% Paraformaldehyd fixiert. Im Anschluss erfolgte die Einbettung in Paraffin und die Anfertigung von 3 µm-dicken Serienschnitten mit Hilfe eines Mikrotoms (Cut 5062; SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland). Die Schnitte wurden dann nach Standardprotokoll mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt, wobei saure Molekülgruppen blau und basische rot markiert wurden [CHAN, 2014]. Für die nachfolgenden immunhistochemischen Analysen wurden nur Schnitte mit typischer Endometriosemorphologie (vaskularisiertes Stromagewebe und zystisch-dilatierte Drüsen) ausgewählt.

5.2.6.2. CD31-Färbung

Um die Gefäßdichte der Endometrioseherde zu bestimmen, erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung gegen CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule, PE CAM-1). Als Primärantikörper kam zur Markierung des Endothels ein monoklonaler Ratte-anti-Maus-CD31-Antikörper (1:100; Dianova, Hamburg, Deutschland) zum Einsatz. Als Sekundärantikörper wurde ein Ziege-anti-Ratte-IgG-Alexa555-Antikörper (1:200; Thermo Fisher Scientific) eingesetzt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (2 µg/ml; Sigma-Aldrich) gefärbt. Zur Bestimmung der Gefäßdichte wurden innerhalb des Stromagewebes des jeweiligen Endometrioseherds alle CD31⁺ Mikrogefäße sowie die Gesamtfläche des Stromas (in mm²) ermittelt. Anschließend wurde die Anzahl der Gefäße durch die ermittelte Fläche des Stromagewebes dividiert. Für die Analysen wurde ein BZ-8000-Mikroskop (Keyence) verwendet. Die Fläche wurde mittels der Biozero Analysis-Software (Version 3.60; Keyence) ausgemessen.

5.2.6.3. CD31/α-smooth muscle actin (SMA)-Doppelfärbung

Reife Gefäße zeichnen sich im Vergleich zu heranwachsenden unreifen Gefäßen u.a. durch die Anheftung von Perizyten aus, welche α-SMA exprimieren [HULL et al., 2003]. Zur Bestimmung des Anteils reifer Mikrogefäße in den Endometrioseherden wurden Gewebeschnitte mit einem monoklonalen Ratte-anti-Maus-CD31-Antikörper (1:100; Dianova) und einem polyklonalen Kaninchen-anti-Human-α-SMA-Antikörper (1:100; Abcam, Cambridge, England) angefertigt. Als Sekundärantikörper dienten ein Ziege-anti-Ratte-IgG-Alexa555-Antikörper (1:200; Thermo Fisher Scientific) und ein Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Alexa488-Antikörper (1:200; Thermo Fisher Scientific). Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (2 µg/ml; Sigma-Aldrich) angefärbt. Die Gewebeschnitte wurden mit Hilfe eines BX60-Mikroskops (Olympus) analysiert. Zur Berechnung des prozentualen Anteils an reifen Mikrogefäßen innerhalb des Stromagewebes eines Endometrioseherds wurde die Anzahl an CD31⁺/α-SMA⁺ Gefäßen

durch die Gesamtanzahl aller CD31⁺ Gefäße im Stroma des jeweiligen Endometrioseherds geteilt.

5.2.6.4. Ki67- und cleaved Caspase (Casp)-3-Färbung

Zur immunhistochemischen Darstellung von proliferierenden bzw. apoptotischen Zellen im Stromagewebe der Endometrioseherde wurden die Schnitte mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-Ki67-Antikörper (1:100; Abcam) zur Detektion der proliferierenden Zellen bzw. einem polyklonalen Kaninchen-anti-Casp-3-Antikörper (1:100; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) zur Detektion der apoptotischen Zellen angefärbt. Ein biotinylierter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (ready-to-use; Abcam) wurde als Sekundärantikörper eingesetzt. Danach wurde Avidin-Peroxidase (ready-to-use; Abcam) hinzugefügt. Als Chromogen diente 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC Substrate System; Abcam). Zur Analyse der Gewebe- schnitte unter dem Lichtmikroskop (BX60; Olympus) wurde eine Gegenfärbung mit Häma- laun durchgeführt. Dann wurden in vier ausgewählten Regionen pro Herd die Ki67⁺ bzw. Casp-3⁺ Zellen im Stroma- und Drüsengewebe und die jeweilige Gesamtzellzahl ausgezählt. Anschließend wurde der prozentuale Anteil der Ki67⁺ bzw. Casp-3⁺ Zellen an der Gesamt- zellzahl der betreffenden Gewebefraktion ermittelt.

5.2.7. Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Zur Quantifizierung der Expression der EphB4-mRNA unter der Behandlung mit NVP-BHG712 wurden in einem weiteren Versuchsabschnitt intraperitoneale Endometrioseherde induziert. Nach Explantation der Herde an Tag 28 wurde eine qRT-PCR durchgeführt. In diesem Verfahren kann die Menge der Amplifikate durch die Verwendung eines Fluoreszenz- farbstoffes während der einzelnen Zyklen in Echtzeit quantifiziert werden [NAVARRO et al., 2015]. Dieses Verfahren lässt somit ausgehend von dem mRNA-Gehalt eines Genes Rück- schlüsse auf dessen Expression zu.

In der vorliegenden Studie wurde zunächst die RNA mit Hilfe eines RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben isoliert. Zur Quantifizierung des EphB4-mRNA- Gehalts wurde die RNA durch eine reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Hierfür wurde das QuantiNova Reverse Transcription Kit (Qiagen) verwendet. Pro Probe wurde je 1 µg RNA (Messung mittels eines DeNovix DS-11 Spektrophotometers; Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland) als Template für die cDNA-Synthese eingesetzt. Anschließend wurden die synthetisierten cDNA-Proben in der qRT-PCR analysiert. Dazu wurden 100 ng cDNA mit Hilfe spezifischer Primer-Paare amplifiziert (Tab. 1). Nach Interkalation des hinzugegebenen Fluoreszenzfarbstoffes SYBER Green (QuantiNova SYBR

Green PCR-Kit; Qiagen) in die doppelsträngige DNA wurde die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Zyklenanzahl in einem Amplifikationsblot (MiniOpticon RT-PCR-System; Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) gemessen. Die Signalstärke ist in diesem Verfahren proportional zur Menge des PCR-Produkts während der einzelnen Zyklen [NOLAN et al., 2006]. Hierdurch konnten Rückschlüsse auf die EphB4-mRNA-Menge gezogen werden. Als interne Kontrolle diente Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) (Tab. 1). Anhand der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode wurden die Daten quantitativ analysiert [SCHMITTGEN und LIVAK, 2008].

Tabelle 1: Spezifische Vorwärts- und Rückwärts-Primer für die qRT-PCR-Analysen.

Primer	Sequenz
GAPDH vorwärts rückwärts	5` TGA CCT CAA CTA CAT GGT CTA CA 3` 3` CTT CCC ATT CTC GGC CTT G 5`
EpHB4 vorwärts rückwärts	5` GGA AAC GGC GGA TCT GAA ATG 3` 3` TGG ACG CTT CAT GTC GCA C 5`

5.3. Experimentelles Protokoll

5.3.1. Substanzapplikation

Anlehnend an die Studie von MARTINY-BARON et al. [2010] wurde in allen *in vivo* Experimenten der vorliegenden Arbeit 10 mg/kg NVP-BHG712 eingesetzt. Die jeweils randomisiert in zwei Gruppen aufgeteilten Tiere wurden entweder mit 10 mg/kg NVP-BHG712, gelöst in 0,1 ml 10% NMP, oder mit dem Vehikel (10% NMP) behandelt. Die Applikation des Wirkstoffes bzw. des Vehikels erfolgte in allen Experimenten über den gesamten Beobachtungszeitraum einmal täglich intragastral (i.g.) über eine Schlundsonde.

5.3.2. Modell der Rückenhautkammer

Im ersten Versuchsabschnitt wurden 48 Stunden nach Implantation der Rückenhautkammer 24 Endometriumfragmente aus den Uterushörnern von 5 Spendermäusen isoliert und jeweils 2 Fragmente in die Rückenhautkammern von insgesamt 12 Empfängertieren transplantiert. Der Beobachtungszeitraum betrug 14 Tage ab dem Tag der Transplantation (Tag 0). Die Mäuse wurden entweder mit 10 mg/kg NVP-BHG712 (n = 6) oder Vehikel (10% NMP; n = 6) einmal täglich ab Tag 0 wie unter Punkt 5.3.1. beschrieben behandelt. Zur Bestimmung der mikrozirkulatorischen Parameter wurde an Tag 0, 3, 6, 10 und 14 eine intravital-fluoreszenzmikroskopische Untersuchung durchgeführt. Hierzu wurde den Mäusen der Fluor-

reszenzfarbstoff 5% FITC-Dextran in den retrobulbären Venenplexus injiziert (siehe 5.2.4.1.). Nach Aufzeichnung der mikroskopischen Sequenzen wurden die mikrozirkulatorischen Parameter wie unter Punkt 5.2.4.2. beschrieben ermittelt. Am letzten Tag der Untersuchung wurde das Gewebe mit den Endometrioseherden aus der Rückenhautkammer exzidiert (Abb. 15). Von jedem Herd wurde eine HE-Färbung (siehe 5.2.6.1.), eine CD31-Färbung (siehe 5.2.6.2.) und Ki67-Färbung (siehe 5.2.6.4.) angefertigt.

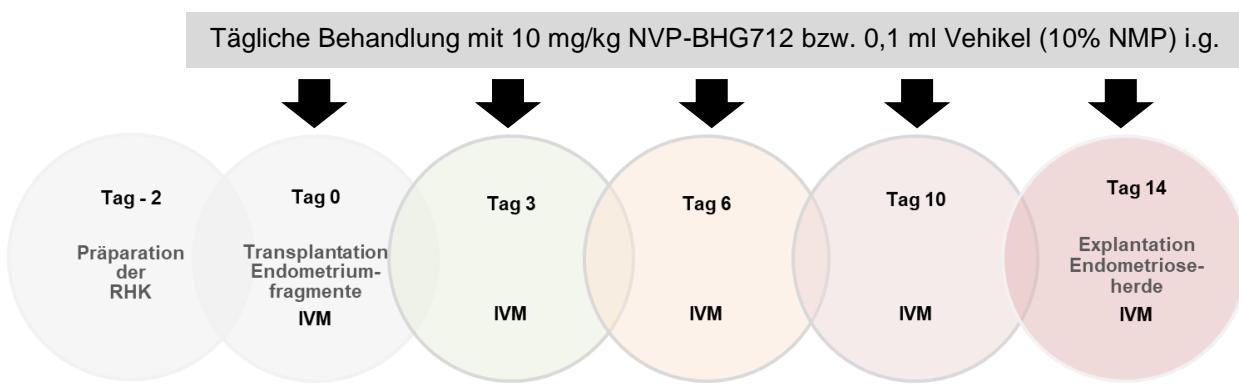


Abbildung 15: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus im Rückenhautkammermodell. Präparation der Rückenhautkammer (RHK) 48 Stunden vor Transplantation der Endometriumfragmente in BALB/c Mäuse (Tag 0). Ab Tag 0 repetitive intravitale Fluoreszenzmikroskopie (IVM). An Tag 14 Entnahme der Endometrioseherde für weitere histologische und immunhistochemische Untersuchungen.

5.3.3. Modell der intraperitonealen Endometriose

In einem zweiten Studienabschnitt wurden 80 Uterusfragmente von 4 Spendermäusen in die Bauchhöhle von 20 Empfängertieren transplantiert. Dabei wurden jeweils 2 Transplantate auf der rechten und der linken Seite des Bauchraumes im Empfängertier fixiert. Die 20 Empfängertiere wurden randomisiert in zwei Gruppen aufgeteilt. Die Applikation von 10 mg/kg NVP-BHG712 ($n = 10$) bzw. des Vehikels (10% NMP; $n = 10$) erfolgte wie unter Punkt 5.3.1. beschrieben über 28 Tage. An Tag 0, 7, 14, 21 und 28 wurden die intraperitoneal induzierten Endometrioseherde sonographisch untersucht und ihr Volumen ermittelt (siehe 5.2.5.1.). An Tag 28 erfolgte außerdem eine Größenbestimmung mittels eines digitalen Messschiebers (siehe 5.2.5.2.). Im Anschluss wurden die Endometrioseherde exzidiert und Gewebeschnitte für angefertigt (Abb. 16). Für die HE-Färbung wurden 3 μ m-dicke Serienschnitte aus jedem Endometrioseherd angefertigt (siehe 5.2.6.1.). Für die CD31-Färbung (siehe 5.2.6.2.), die CD31/ α -SMA-Doppelfärbung (siehe 5.2.6.3.) und die Ki67- und Casp-3-Färbung (siehe 5.2.6.4.) wurde jeweils 1 Gewebeschnitt von 2 verschiedenen Endometrioseherden pro Tier analysiert und aus den Ergebnissen beider Herde der Mittelwert bestimmt.

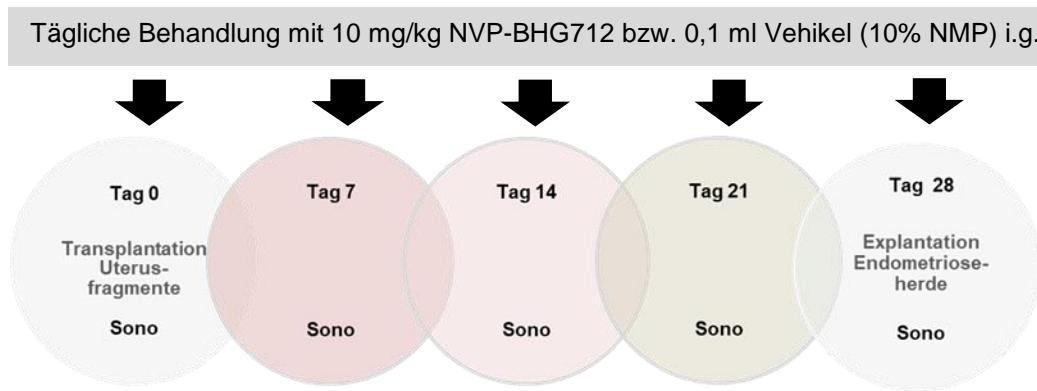


Abbildung 16: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus im intraperitonealen Modell. Transplantation der Uterusfragmente in die Bauchhöhle von BALB/c Mäusen (Tag 0). Ab Tag 0 repetitive Sonographie (Sono)-Analysen. An Tag 28 Entnahme der Endometrioseherde für weitere histologische und immunhistochemische Untersuchungen.

Des Weiteren wurden 72 Uterusfragmente von 3 Spendermäusen in die Bauchhöhle von 18 Empfängertieren transplantiert und diese über 7 Tage wie unter Punkt 5.3.1. beschrieben entweder mit 10 mg/kg NVP-BHG712 ($n = 9$) oder Vehikel (10% NMP; $n = 8$) einmal täglich i.g. behandelt. Durch das Versterben eines Tieres in der Kontrollgruppe unterschieden sich die Gruppengrößen. Am siebten Tag wurden die Herde entnommen und ebenfalls wie oben beschrieben eine HE-, CD31- und Ki67-Färbung sowie eine CD31/α-SMA-Doppelfärbung angefertigt.

Für die qRT-PCR-Analysen wurden 64 Uterusfragmente aus 5 Spendermäusen in die Bauchhöhle von 16 Empfängertieren transplantiert. Die Tiere wurden entweder mit 10 mg/kg NVP-BHG712 ($n = 8$) oder Vehikel (10% NMP; $n = 8$) einmal täglich i.g. behandelt (siehe 5.3.1.). An Tag 28 wurden die Herde entnommen und zur Bestimmung der mRNA-Expression unter der Behandlung mit NVP-BHG712 mittels qRT-PCR aufbereitet (siehe 5.2.7.).

5.4. Statistik

Die deskriptive Statistik wurde mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft Excel 2013 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) erstellt. Sämtliche Werte wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes ($\bar{x} \pm$ SEM) angegeben. Die statistischen Tests und die graphische Darstellung der Daten erfolgte mittels SigmaPlot 13.0 (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA). Die Daten wurden als Balken- bzw. Liniendiagramm dargestellt.

Die Ergebnisse wurden zunächst auf Normalverteilung und Gleichheit der Varianzen geprüft. Lag eine Normalverteilung zweier Gruppen vor, wurde der Student's t-Test für den unver-

bundenen Paarvergleich angewandt. Im Falle von nicht-parametrischen Daten kam der Mann-Whitney-Rank-Sum-Test zum Einsatz.

Der Vergleich mehrerer Gruppen erfolgte bei Vorliegen parametrischer Daten mit einer One-Way-Analysis-of-Variance (ANOVA). Beim Vorliegen nicht-parametrischer Daten kam eine ANOVA on ranks gefolgt von einem Student-Newman-Keuls-Post-hoc-Test zum Einsatz.

Zum Vergleich zeitabhängiger Unterschiede in einer Gruppe wurde eine ANOVA für wiederholte Messungen, gefolgt von dem Student-Newman-Keuls-Post-hoc-Test, angewandt.

Als statistisch signifikant wurden Unterschiede der Messwerte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angesehen.

6. Ergebnisse

6.1. Effekte von NVP-BHG712 auf Endothelzellen

6.1.1. Zellviabilität

Zur Untersuchung des Effekts verschiedener Dosierungen von NVP-BHG712 auf die Viabilität von HDMEC wurde ein WST-1- bzw. LDH-Assay durchgeführt (Abb. 17). Hierzu wurden HDMEC mit NVP-BHG712-Konzentrationen von 1, 2, 5, 10 und 50 μ M behandelt. Als Kontrolle erfolgte eine Absorptionsmessung nach Inkubation mit 0,1% DMSO. Im LDH-Assay wurde zusätzlich 1% Triton X-100 als Positivkontrolle eingesetzt.

Es konnte gezeigt werden, dass Konzentrationen von 1 und 2 μ M NVP-BHG712 keinen signifikanten Effekt auf die Viabilität der Endothelzellen haben. Eine reduzierte Viabilität zeigte sich erst ab einer Konzentration von 5 μ M NVP-BHG712 (Abb. 17A). Ein signifikanter LDH-Anstieg als Ausdruck einer zytotoxischen Wirkung wurde bei 50 μ M NVP-BHG712 beobachtet (Abb. 17B). Geringere Konzentrationen zeigten keinen zytotoxischen Effekt, sodass basierend auf den Ergebnissen der beiden Assays in den nachfolgenden *in vitro* Analysen Konzentrationen von 1 und 2 μ M NVP-BHG712 eingesetzt wurden.

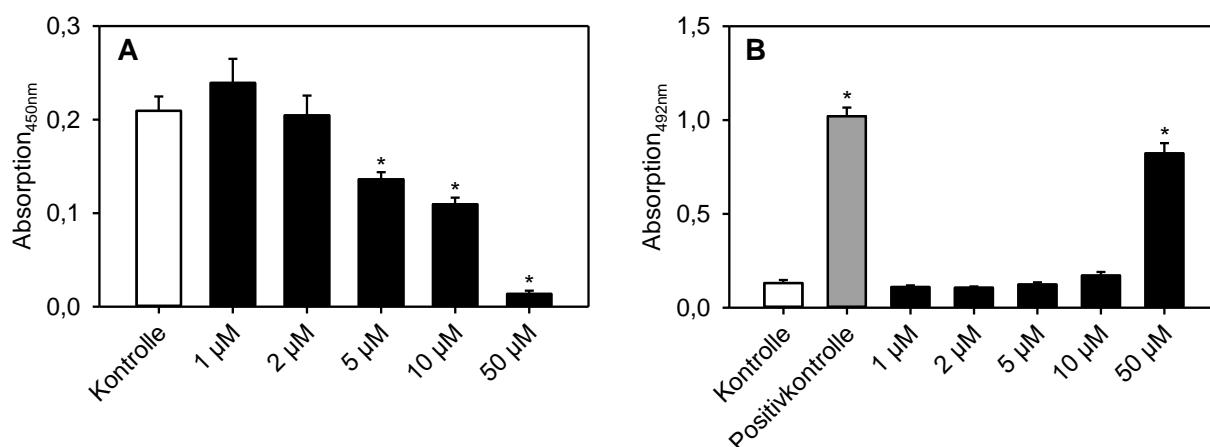


Abbildung 17: Effekt von NVP-BHG712 auf die Viabilität von HDMEC in einem WST-1- und LDH-Assay. (A, B) Zellviabilität (Absorption_{450nm}) von HDMEC (A) und Zytotoxizität (Absorption_{492nm}) von NVP-BHG712 (B). HDMEC wurden für 24 Stunden entweder mit Vehikel (Kontrolle, weißer Balken), Triton X-100 als Positivkontrolle (grauer Balken) oder unterschiedlichen Konzentrationen (1-50 μ M) von NVP-BHG712 (schwarze Balken) behandelt. Mittelwerte \pm SEM ($n = 5$, vierfache Replikate). * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

6.1.2. Zellmigration

Mit Hilfe eines Transwell-Migrations-Assays konnte die Migration von HDMEC nach Behandlung mit NVP-BHG712 und Vehikel (0,1% DMSO, Kontrolle) untersucht werden. Unter dem Einfluss des Vehikels migrierten dabei durchschnittlich $998,4 \pm 110,6$ HDMEC pro mm² durch die Poren der Filtermembran. Im Gegensatz dazu inhibierte NVP-BHG712 die Zellmigration signifikant. Nach der Behandlung mit 1 μ M NVP-BHG712 migrierten durchschnittlich nur

noch $618,7 \pm 110,1$ HDMEC pro mm^2 durch die Poren der Filtermembran. Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich nach der Gabe von $2 \mu\text{M}$ des Inhibitors (Abb. 18).

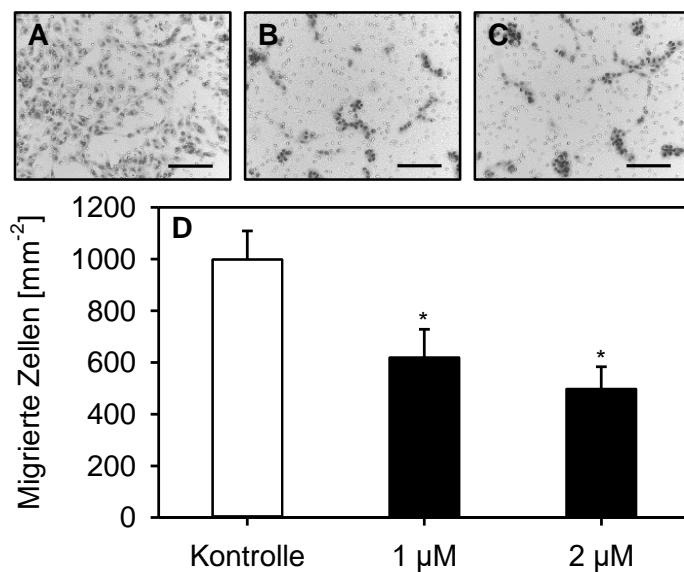


Abbildung 18: Effekt von NVP-BHG712 auf die Migration von HDMEC in einem Transwell-Migrations-Assay. (A-C) Lichtmikroskopische Aufnahmen von HDMEC, die für 24 Stunden entweder mit Vehikel (A, Kontrolle), $1 \mu\text{M}$ (B) oder $2 \mu\text{M}$ NVP-BHG712 (C) behandelt wurden. Maßstab (A-C): $60 \mu\text{m}$. (D) Migrierte Zellen (mm^{-2}) nach Behandlung mit Vehikel (Kontrolle, weißer Balken) oder NVP-BHG712 (schwarze Balken). Mittelwerte \pm SEM ($n = 5$, vierfache Replikate). * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

6.1.3. Tube formation

Der Effekt von NVP-BHG712 auf die Ausbildung von kapillärähnlichen Strukturen (Tubes) durch HDMEC wurde mit dem Tube-Formation-Assay untersucht. Hierzu wurden HDMEC mit 1 oder $2 \mu\text{M}$ Inhibitor oder Vehikel (0,1% DMSO, Kontrolle) behandelt. Es konnte gezeigt werden, dass NVP-BHG712 zu einer Reduktion der ausgebildeten HDMEC-Tubes führt. Dabei wurden unter dem Einfluss von $1 \mu\text{M}$ NVP-BHG712 durchschnittlich nur noch $26,2 \pm 4,1$ HDMEC-Tubes ausgebildet. Nach Inkubation der Zellen mit $2 \mu\text{M}$ NVP-BHG712 wurde eine 58% Reduktion der HDMEC-Tubes ($15,3 \pm 3,4$) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($36,7 \pm 5,9$) nachgewiesen (Abb. 19).

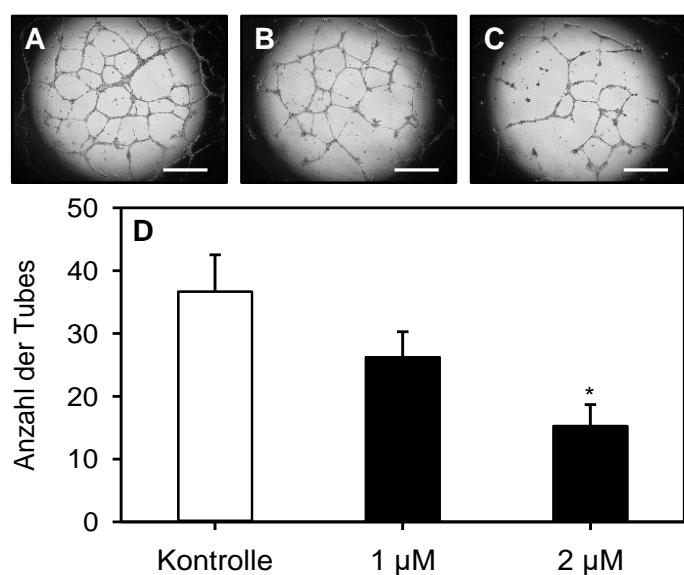


Abbildung 19: Effekt von NVP-BHG712 auf die Bildung von HDMEC-Tubes in einem Tube-Formation-Assay. (A-C) Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen tube-formender HDMEC, die entweder mit Vehikel (A, Kontrolle), $1 \mu\text{M}$ (B) oder $2 \mu\text{M}$ NVP-BHG712 (C) behandelt wurden. Maßstab (A-C): $800 \mu\text{m}$. (D) Anzahl der HDMEC-Tubes nach Behandlung mit Vehikel (Kontrolle, weißer Balken) oder NVP-BHG712 (schwarze Balken). Mittelwerte \pm SEM ($n = 5$, sechsfache Replikate). * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

6.1.4. Sprouting-Aktivität

Zur Analyse der Wirkung von NVP-BHG712 auf die Bildung von Endothelzell-Sprouts wurde ein Sphäroid-Sprouting-Assay durchgeführt und die kumulative Länge der HDMEC-Sprouts von insgesamt 10 Sphäroiden pro Gruppe bestimmt. Dazu wurden 1 bzw. 2 μ M NVP-BHG712 sowie Vehikel (0,1% DMSO, Kontrolle) auf eine Zellkultur mit vollständig ausgebildeten HDMEC-Sphäroiden hinzugegeben.

Nach 24 Stunden Behandlung konnte eine signifikant verringerte kumulative Länge der HDMEC-Sprouts in den mit NVP-BHG712 behandelten Sphäroiden nachgewiesen werden. Die gebildeten Sprouts wiesen nach Behandlung mit 1 μ M NVP-BHG712 eine kumulative Länge von $69,5 \pm 8,2 \mu$ m auf. Nach Behandlung mit 2 μ M NVP-BHG712 betrug diese $61,0 \pm 6,0 \mu$ m. Die kumulative Länge der Vehikel-behandelten HDMEC-Sprouts betrug $121,6 \pm 14,7 \mu$ m (Abb. 20).

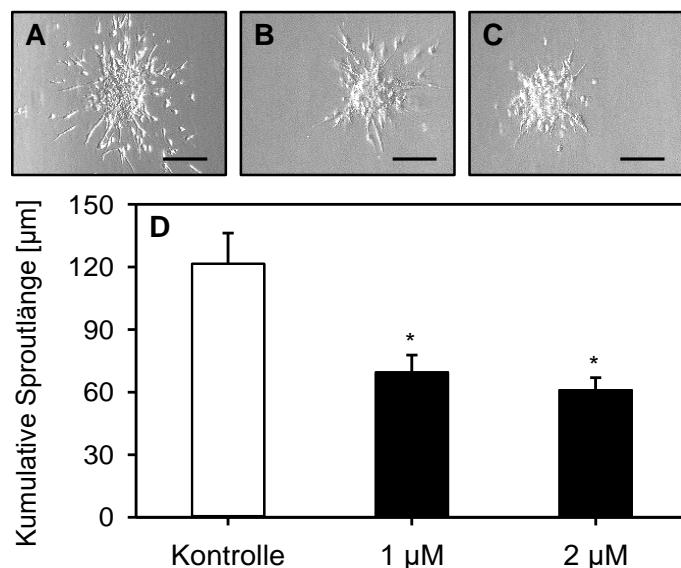
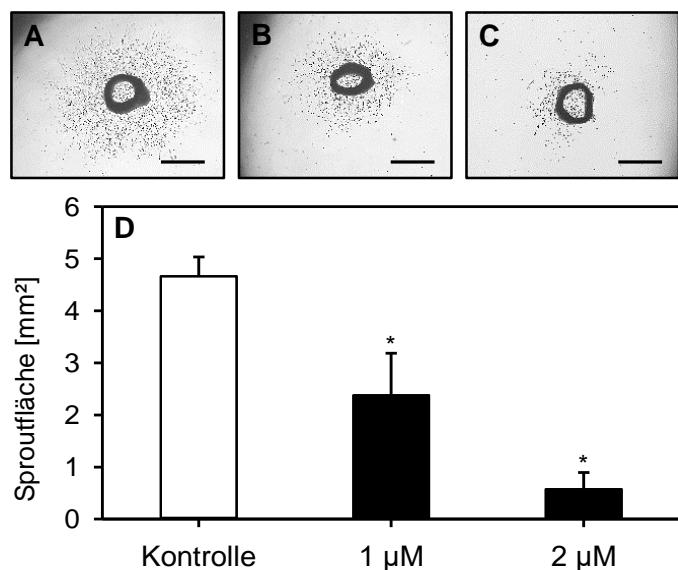


Abbildung 20: Effekt von NVP-BHG712 auf die Bildung von HDMEC-Sprouts in einem Sphäroid-Sprouting-Assay. (A-C) Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von HDMEC-Sphäroiden, die entweder mit Vehikel (A, Kontrolle), 1 μ M (B) oder 2 μ M NVP-BHG712 (C) behandelt wurden. Maßstab (A-C): 125 μ m. (D) Kumulative Sproutlänge (μ m) von HDMEC-Sphäroiden nach Behandlung mit Vehikel (Kontrolle, weißer Balken) oder NVP-BHG712 (schwarze Balken). Mittelwerte \pm SEM ($n = 5$; zehnfache Replikate). * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

6.1.5. Ex vivo Aortenring-Assay

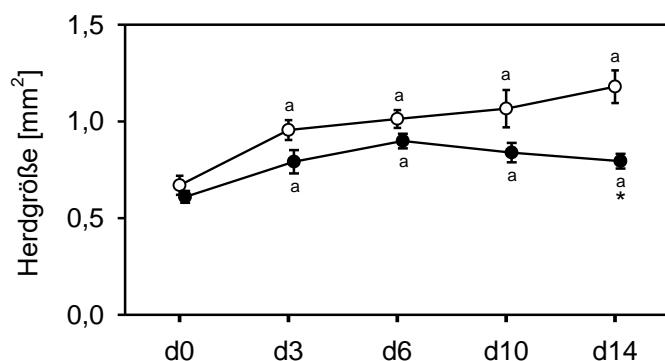
Weiterhin wurde der Effekt von NVP-BHG712 auf kultivierte Aortenringe von BALB/c Mäusen in einem ex vivo Assay untersucht. Nach einer Inkubationszeit von 6 Tagen zeigten die Aortenringe, die mit dem Vehikel (0,1% DMSO, Kontrolle) behandelt wurden, ein dichtes Netzwerk an herauswachsenden Endothelzell-Sprouts mit einer Fläche von $4,7 \pm 0,4 \text{ mm}^2$. Dagegen wiesen die Aortenringe, die mit 1 μ M NVP-BHG712 behandelt wurden, eine deutlich verringerte Netzwerkfläche von $2,4 \pm 0,8 \text{ mm}^2$ auf. Die Behandlung mit 2 μ M des Inhibitors führte nahezu zur kompletten Inhibition der herauswachsenden murinen Endothelzell-Sprouts ($0,6 \pm 0,3 \text{ mm}^2$) (Abb. 21).



6.2. Effekte von NVP-BHG712 auf Endometrioseherde in der Rückenhautkammer

6.2.1. Wachstum der Endometrioseherde

Im Rückenhautkammermodell wurden das Wachstum und die Vaskularisierung von sich entwickelnden Endometrioseherden unter der Behandlung mit 10% NMP (Vehikel; Kontrolle) oder 10 mg/kg NVP-BHG712 zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert. An Tag 0 wiesen die transplantierten Endometriumfragmente eine vergleichbare Initialgröße auf. In der Kontrollgruppe kam es zu einem stetigen Wachstum der sich entwickelnden Endometrioseherde, wohingegen in der NVP-BHG712-behandelten Gruppe an Tag 14 eine signifikant reduzierte Herdgröße im Vergleich zur Kontrollgruppe ($0,8 \pm 0,0 \text{ mm}^2$ vs. $1,2 \pm 0,1 \text{ mm}^2$) nachgewiesen werden konnte (Abb. 22).



6.2.2. Vaskularisierte Fläche der Endometrioseherde

Ab dem sechsten Tag kam es in beiden Gruppen zu einer statistisch signifikanten Zunahme der vaskularisierten Herdfläche verglichen mit Tag 0. An Tag 6 betrug der Anteil der vaskularisierten Fläche in der NVP-BHG712-Gruppe $45,1 \pm 19,4\%$ und in der Kontrollgruppe $30,5 \pm 10,2\%$. Signifikante Unterschiede zwischen den mit Inhibitor und Vehikel behandelten Endometrioseherden konnten nicht nachgewiesen werden (Abb. 23).

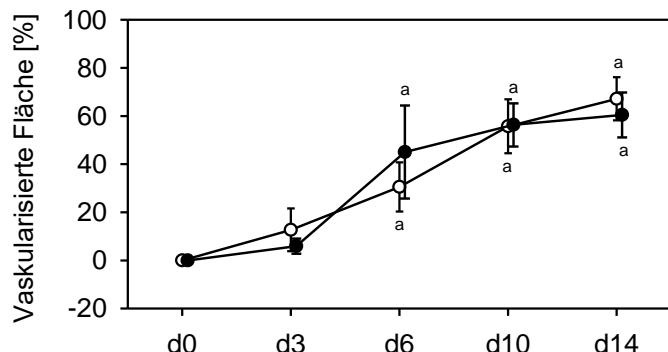


Abbildung 23: Effekt von NVP-BHG712 auf die Vaskularisierung von Endometrioseherden in der Rückenhautkammer. Vaskularisierte Fläche (%) von Endometrioseherden in Vehikel-behandelten (Kontrolle, weiße Kreise, $n = 6$) und NVP-BHG712-behandelten BALB/c Mäusen (schwarze Kreise, $n = 6$). Mittelwerte \pm SEM. $^a p < 0,05$ vs. Tag 0.

6.2.3. Funktionelle Kapillardichte in den Endometrioseherden

Ab dem dritten Untersuchungstag konnten in den sich neu entwickelnden Endometrioseherden vereinzelt Mikrogefäße gefunden werden. Ab Tag 6 wurde eine höhere funktionelle Kapillardichte in beiden Gruppen verglichen mit Tag 0 beobachtet. An Tag 14 war die funktionelle Kapillardichte in der NVP-BHG712-behandelten Gruppe jedoch mit $194,9 \pm 33,0 \text{ cm/cm}^2$ im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $272,6 \pm 17,5 \text{ cm/cm}^2$ signifikant reduziert, was die anti-angiogene Wirkung von NVP-BHG712 auf die Endometrioseherde zeigt (Abb. 24).

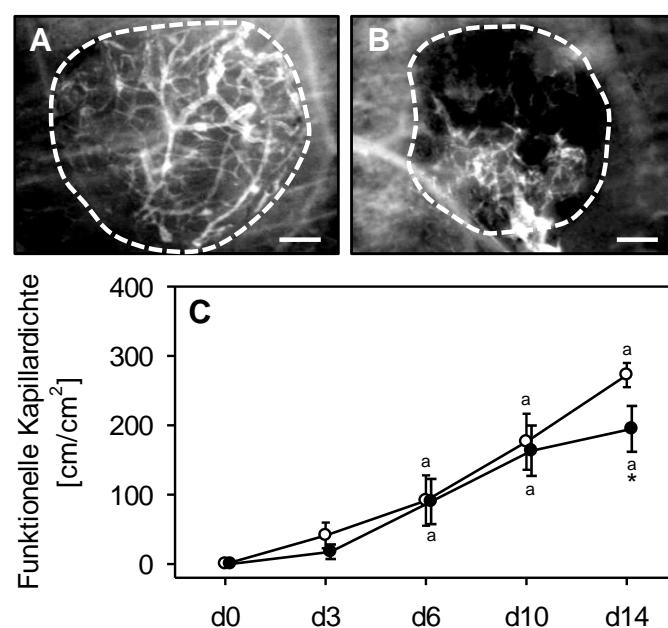


Abbildung 24: Effekt von NVP-BHG712 auf die Netzwerkausbildung von Endometrioseherden in der Rückenhautkammer. (A, B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Endometrioseherden (gestrichelte Linien) 14 Tage nach Transplantation von Endometriumfragmenten in die Rückenhautkammer einer Vehikel-behandelten (A) und einer NVP-BHG712-behandelten BALB/c Maus (B). Maßstab (A, B): $150 \mu\text{m}$. (C) Funktionelle Kapillardichte (cm/cm^2) von Endometrioseherden in Vehikel-behandelten (Kontrolle, weiße Kreise, $n = 6$) und NVP-BHG712-behandelten BALB/c Mäusen (schwarze Kreise, $n = 6$). Mittelwerte \pm SEM. $^a p < 0,05$ vs. Tag 0; $^* p < 0,05$ vs. Kontrolle.

6.2.4. Mikrohämodynamik in den Endometrioseherden

Die Durchmesser der Gefäße in den Endometrioseherden unterschieden sich während des 14-tägigen Beobachtungszeitraumes signifikant. In den NVP-BHG712-behandelten Endometrioseherden wurden an Tag 3, 10 und 14 größere Gefäßdurchmesser im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen (Tab. 2). Hinsichtlich der zentralen Blutzellgeschwindigkeit konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Tab. 2).

Tabelle 2: Durchmesser (μm) und zentrale Blutzellgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$) von Mikrogefäßen in Endometrioseherden in der Rückenhautkammer von NVP-BHG712-behandelten ($n = 6$) und Vehikelbehandelten BALB/c Mäusen ($n = 6$).

Gefäßdurchmesser (μm)	d3	d6	d10	d14
Kontrolle	$18,6 \pm 1,9$	$15,0 \pm 1,5^{\text{a}}$	$11,7 \pm 0,7^{\text{a}}$	$10,1 \pm 0,3^{\text{a}}$
NVP-BHG712	$25,2 \pm 1,3^{\text{*}}$	$18,5 \pm 2,1^{\text{a}}$	$14,4 \pm 1,1^{\text{*a}}$	$12,2 \pm 0,6^{\text{*a}}$
Blutzellgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)	d3	d6	d10	d14
Kontrolle	$60,9 \pm 25,6$	$108,2 \pm 20,5$	$150,7 \pm 32,4$	$210,2 \pm 44,2^{\text{a}}$
NVP-BHG712	$75,4 \pm 35,5$	$92,2 \pm 27,6$	$150,5 \pm 25,5^{\text{a}}$	$136,4 \pm 24,1$

Mittelwerte \pm SEM. $^{\text{a}}p < 0,05$ vs. Tag 3 innerhalb einer Gruppe; $^{\text{*}}p < 0,05$ vs. Kontrolle.

6.2.5. Mikrogefäßdichte in den Endometrioseherden

Der anti-angiogene Effekt von NVP-BHG712 auf die Endometrioseherde in der Rückenhautkammer konnte durch eine Immunfluoreszenzfärbung mit dem Endothelzellmarker CD31 bestätigt werden (Abb. 25A, B). An Tag 14 zeigte sich, dass die Mikrogefäßdichte mit $138,2 \pm 22,1 \text{ mm}^{-2}$ in den Endometrioseherden der NVP-BHG712-behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $256,2 \pm 40,0 \text{ mm}^{-2}$ signifikant reduziert war (Abb. 25C).

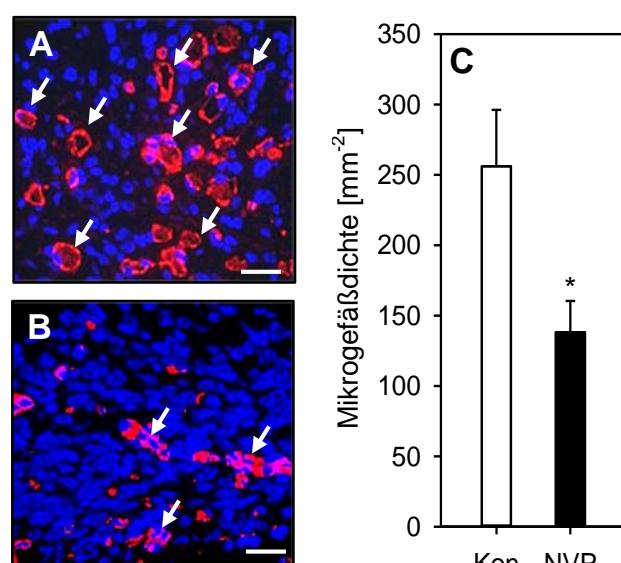


Abbildung 25: Effekt von NVP-BHG712 auf die Mikrogefäßdichte in Endometrioseherden in der Rückenhautkammer. (A, B) Detektion von CD31⁺ Gefäßen (weiße Pfeile) in Endometrioseherden 14 Tage nach Transplantation von Endometriumfragmenten in die Rückenhautkammer einer Vehikelbehandelten (A) und einer NVP-BHG712-behandelten BALB/c Maus (B). Maßstab (A, B): 20 μm . (C) Mikrogefäßdichte (mm^{-2}) in Endometrioseherden Vehikel-behandelter (Kontrolle, weißer Balken, $n = 6$) und NVP-BHG712-behandelter BALB/c Mäuse (schwarzer Balken, $n = 6$). Mittelwerte \pm SEM. $^{\text{*}}p < 0,05$ vs. Kontrolle.

6.2.6. Zellproliferation in den Endometrioseherden

Die Proliferationsrate der Stromazellen in den sich entwickelnden Endometrioseherden an Tag 14 wurde mittels Ki67-Färbung bestimmt (Abb. 26A, B). Nach Behandlung mit NVP-BHG712 konnte eine tendenziell reduzierte Proliferationsrate festgestellt werden. Sie betrug $19,3 \pm 2,0\%$ in der NVP-BHG712-Gruppe und $22,4 \pm 4,4\%$ in der Kontrollgruppe (Abb. 26C). Der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant.

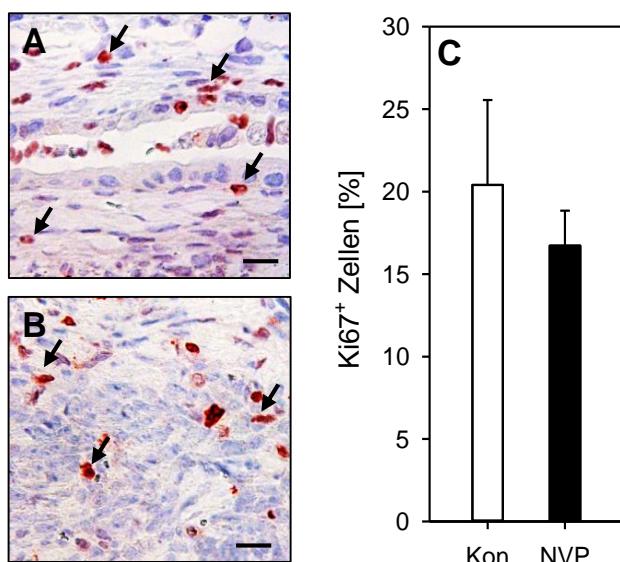


Abbildung 26: Effekt von NVP-BHG712 auf die Proliferation der Stromazellen in Endometrioseherden in der Rückenhautkammer. (A, B) Detektion von Ki67⁺ Zellen (schwarze Pfeile) in Endometrioseherden 14 Tage nach Transplantation von Endometriumfragmenten in die Rückenhautkammer einer Vehikel-behandelten (A) und einer NVP-BHG712-behandelten BALB/c Maus (B). Maßstab (A, B): 20 µm. (C) Ki67⁺ Zellen (%) in Endometrioseherden Vehikel-behandelter (Kontrolle, weißer Balken, $n = 6$) und NVP-BHG712-behandelter BALB/c Mäuse (schwarzer Balken, $n = 6$). Mittelwerte \pm SEM.

6.3. Effekte von NVP-BHG712 auf intraperitoneale Endometrioseherde

6.3.1. Wachstum der Endometrioseherde

In einem zweiten tierexperimentellen Modell wurde der Einfluss von NVP-BHG712 auf intraperitoneal induzierte Endometrioseherde untersucht. Während des 28-tägigen Beobachtungszeitraums entwickelten sich die transplantierten Uterusfragmente zu typischen Endometrioseherden, die einen echoreichen, homogenen Stromaanteil und echoarme, zystisch-dilatierte Drüsen enthielten (Abb. 27A-D). Die Herde wiesen in der Kontroll- und Substanzgruppe mit ca. $1,2 \text{ mm}^3$ vergleichbare Initialvolumina auf (Abb. 27E). Während des 28-tägigen Beobachtungszeitraumes wuchsen die Herde in den Vehikel-behandelten Mäusen kontinuierlich bis zu einem Endvolumen von ca. $3,3 \text{ mm}^3$ (Abb. 27E). Im Gegensatz dazu wiesen die Herde in der NVP-BHG712-Gruppe mit ca. $1,7 \text{ mm}^3$ ein signifikant kleineres Gesamtvolumen an Tag 28 auf (Abb. 27E). Dies war hauptsächlich auf einen reduzierten Stromaanteil zurückzuführen (Abb. 27G). Infolgedessen zeigten die Herde der NVP-BHG712-Gruppe an Tag 28 eine verminderte Wachstumsrate des Gesamtvolumentens ($33,8 \pm 13,7\%$ vs. $145,7 \pm 48,0\%$) und des Stromaanteils ($-9,6 \pm 7,5\%$ vs. $48,2 \pm 21,2\%$) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 27F, H). Ein Effekt von NVP-BHG712 auf die Ausbildung zystisch-dilatierter Drüsen konnte nicht beobachtet werden (Abb. 27I, J).

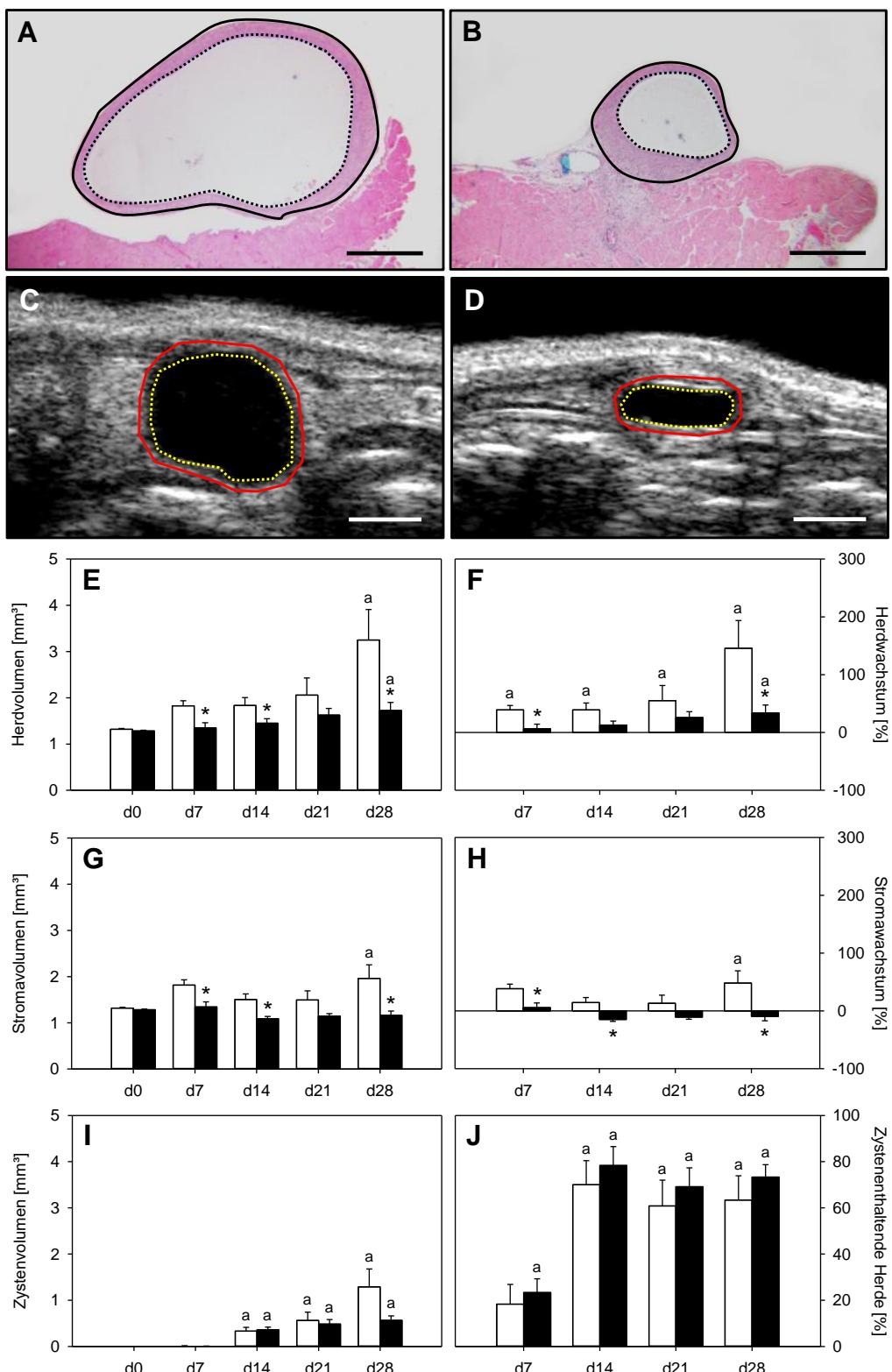


Abbildung 27: Effekt von NVP-BHG712 auf das Wachstum und die Zystenbildung von intraperitonealen Endometrioseherden. (A, B) HE-Färbung und (C, D) hochauflösende Ultraschallbilder von Endometrioseherden (durchgezogene Linie) mit zystisch dilatierten Drüsen (gepunktete Linien) 28 Tage nach Transplantation von Uterusfragmenten in die Bauchhöhle einer Vehikel-behandelten (A, C) und einer NVP-BHG712-behandelten BALB/c Maus (B, D). Maßstab (A, B): 420 μ m, (C, D): 1 mm. (E-J) Gesamtvolumen der Herde (mm³) (E), Wachstum der Herde (%) (F), Stromavolumen (mm³) (G), Wachstum des Stomas (%) (H), Volumen der Zysten (mm³) (I) und Anteil der zystenenthaltenden Herde (%) (J) in Vehikel-behandelten (Kontrolle, weiße Balken, n = 10) oder NVP-BHG712-behandelten BALB/c Mäusen (schwarze Balken, n = 10). Mittelwert \pm SEM. ^ap < 0,05 vs. Tag 0; *p < 0,05 vs. Kontrolle.

Nach 28 Tagen erfolgte eine zusätzliche Größenmessung der Endometrioseherde mit Hilfe eines digitalen Messschiebers. Diese Messung ergab in der NVP-BHG712-behandelten Gruppe eine Herdgröße von $1,9 \pm 0,1 \text{ mm}^2$ und in der Kontrollgruppe von $2,5 \pm 0,3 \text{ mm}^2$. Der Größenunterschied war jedoch statistisch nicht signifikant.

6.3.2. Mikrogefäßdichte in den Endometrioseherden

Zur Untersuchung des Effekts von NVP-BHG712 auf die Mikrogefäßdichte wurde nach Entnahme der Herde an Tag 7 oder Tag 28 eine Färbung mit dem Endothelzellmarker CD31 durchgeführt (Abb. 28A-D). Dadurch konnte gezeigt werden, dass NVP-BHG712 die Bildung neuer Blutgefäße während der frühen Entwicklungshase an Tag 7 inhibiert, jedoch keinen signifikanten Effekt mehr auf die Angiogenese der Herde nach 28 Tagen ausübt. An Tag 7 lag eine signifikant reduzierte Mikrogefäßdichte in der NVP-BHG712-behandelten Gruppe ($124,7 \pm 14,1 \text{ mm}^{-2}$) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($191,4 \pm 13,0 \text{ mm}^{-2}$) vor, wohingegen an Tag 28 kein Unterschied zwischen den Gruppen ($257,7 \pm 34,2 \text{ mm}^{-2}$ vs. $273,2 \pm 21,3 \text{ mm}^{-2}$) nachgewiesen werden konnte (Abb. 28E).

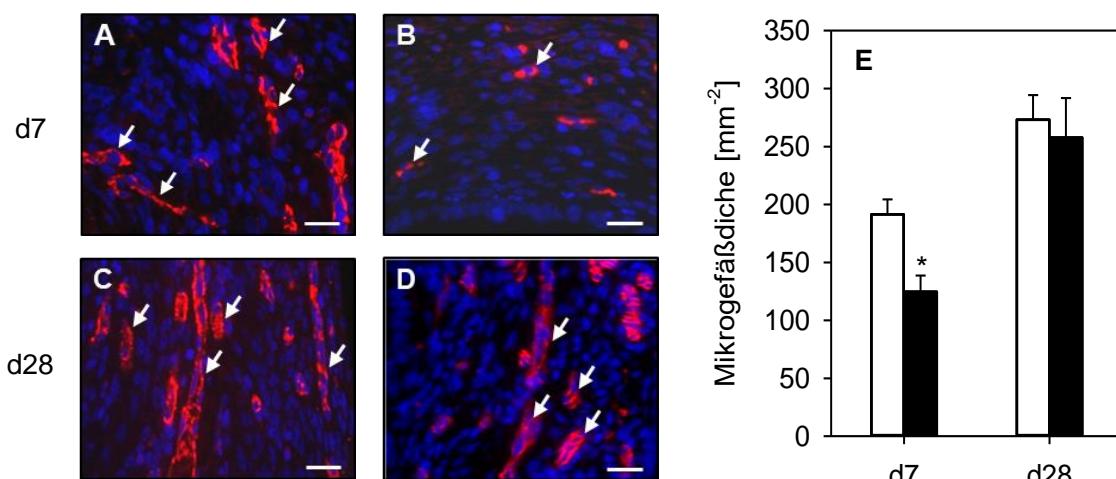


Abbildung 28: Effekt von NVP-BHG712 auf die Mikrogefäßdichte in intraperitonealen Endometrioseherden. (A-D) Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung zur Detektion von Mikrogefäßen (weiße Pfeile) an Tag 7 (A, B) und Tag 28 (C, D) nach Transplantation von Uterusfragmenten in die Bauchhöhle von Vehikel-behandelten (A, C) und NVP-BHG712-behandelten (B, D) BALB/c Mäusen. Maßstab (A-D): 20 μm . (E) Mikrogefäßdichte (mm^{-2}) in Endometrioseherden von Vehikel-behandelten (weiße Balken, $n = 8-10$) und NVP-BHG712-behandelten BALB/c Mäusen (schwarze Balken, $n = 9-10$). Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

6.3.3. Mikrogefäßreife in den Endometrioseherden

Eine CD31/α-SMA-Doppelfärbung diente zur Detektion von reifen Mikrogefäßen in den Endometrioseherden (Abb. 29A-D). An Tag 7 wurde mit $23,0 \pm 3,4\%$ ein signifikant höherer Anteil an CD31⁺/α-SMA⁺ Mikrogefäßen in der NVP-BHG712-behandelten Gruppe verglichen mit $13,2 \pm 2,6\%$ in der Kontrollgruppe beobachtet. Im Gegensatz dazu war der Anteil an reifen Mikrogefäßen an Tag 28 in der NVP-BHG712-Gruppe mit $17,4 \pm 3,9\%$ tendenziell geringer als in der Kontrollgruppe mit $25,8 \pm 4,6\%$ (Abb. 29E).

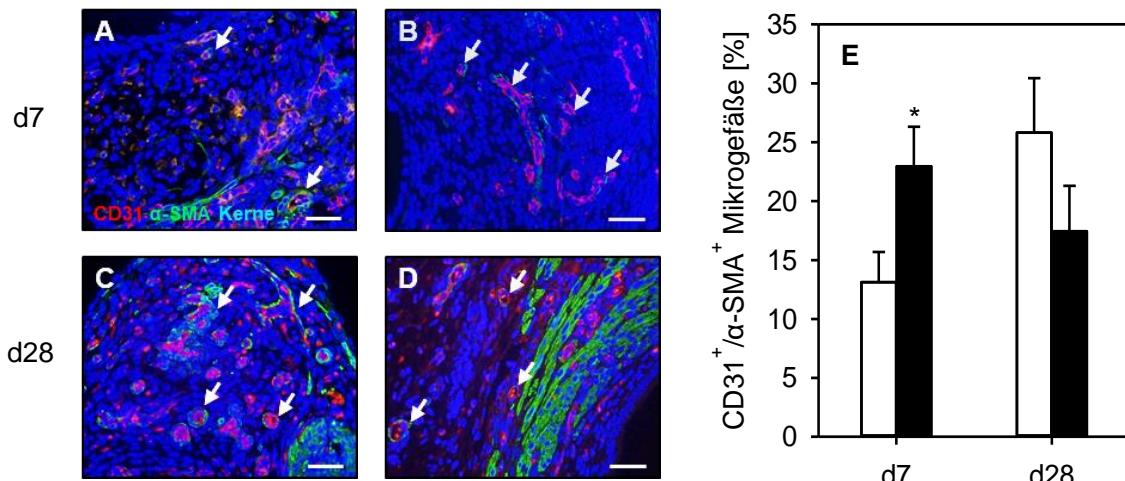


Abbildung 29: Effekt von NVP-BHG712 auf die Mikrogefäßreifung von intraperitonealen Endometrioseherden. (A-D) Immunhistochemische Detektion von CD31⁺/α-SMA⁺ Mikrogefäßen (weiße Pfeile) in Endometrioseherden an Tag 7 (A, B) und Tag 28 (C, D) nach Transplantation von Uterusfragmenten in die Bauchhöhle von Vehikel-behandelten (A, C) und NVP-BHG712-behandelten (B, D) BALB/c Mäusen. Maßstab (A-D): 40 µm. (E) CD31⁺/α-SMA⁺ Mikrogefäße (%) in Endometrioseherden von Vehikel-behandelten (weiße Balken, n = 8-10) und NVP-BHG712-behandelten BALB/c Mäusen (schwarze Balken, n = 9-10). Mittelwert ± SEM. *p < 0,05 vs. Kontrolle.

6.3.4. Zellproliferation in den Endometrioseherden

Die Wirkung von NVP-BHG712 auf die Proliferationsrate der Stroma- und Drüsenzellen in den intraperitoneal induzierten Endometrioseherden wurde mit Hilfe einer Ki67-Färbung untersucht (Abb. 30A-D). Die Behandlung mit NVP-BHG712 führte an Tag 7 mit $19,0 \pm 1,3\%$ zu einer signifikanten Reduktion der Proliferationsrate im Stromagewebe verglichen mit $35,8 \pm 2,4\%$ in der Kontrollgruppe. An Tag 28 hingegen ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($13,0 \pm 1,1\%$ in der NVP-BHG712-Gruppe vs. $15,2 \pm 1,4\%$ in der Kontrollgruppe) (Abb. 30E). Die Proliferationsrate der Drüsenzellen unterschied sich in Übereinstimmung mit den Ultraschallanalysen zu keinem der beiden Untersuchungszeitpunkte (Abb. 30E).

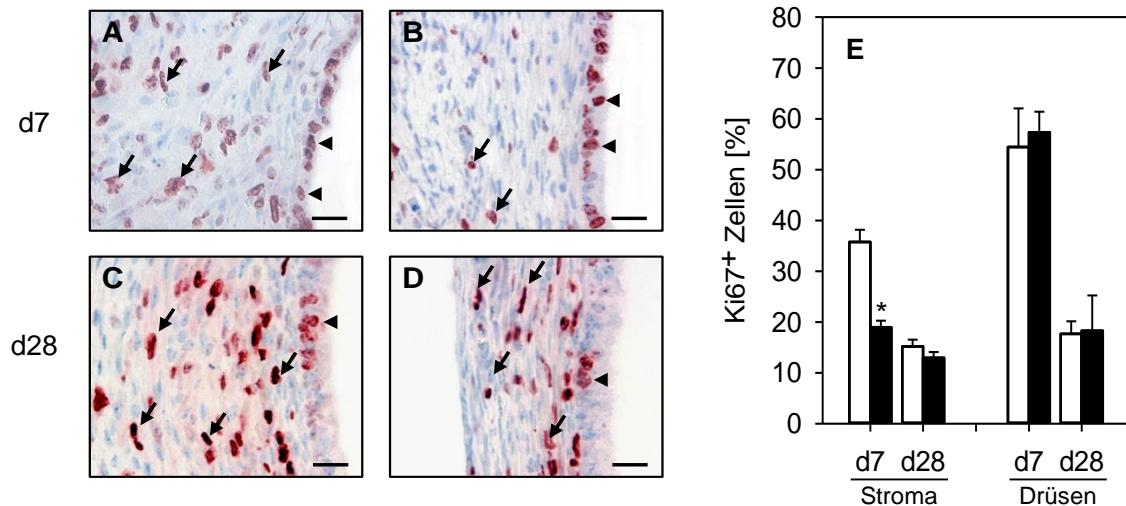


Abbildung 30: Effekt von NVP-BHG712 auf die Proliferation von Stroma- und Drüsenzellen in intraperitonealen Endometrioseherden. (A-D) Immunhistochemische Detektion von Ki67⁺ Stromazellen (schwarze Pfeile) und Drüsenzellen (schwarze Pfeilspitzen) an Tag 7 (A, B) und Tag 28 (C, D) nach Transplantation von Uterusfragmenten in die Bauchhöhle von Vehikel-behandelten (A, C) und NVP-BHG712-behandelten (B, D) BALB/c Mäusen. Maßstab (A-D): 20 µm. (E) Ki67⁺ Zellen (%) im Stroma und den Drüsen in Endometrioseherden in Vehikel-behandelten (weiße Balken, n = 8-10) und NVP-BHG712-behandelten BALB/c Mäusen (schwarze Balken, n = 9-10). Mittelwert ± SEM. *p < 0,05 vs. Kontrolle.

6.3.5. Apoptoserate in den Endometrioseherden

Um den Effekt von NVP-BHG712 auf die Zellviabilität in intraperitonealen Endometrioseherden zu untersuchen, wurde die Apoptoserate der Stromazellen anhand einer Casp-3-Färbung an Tag 28 bestimmt. Nach Behandlung der Endometrioseherde mit NVP-BHG712 (n = 10) zeigte sich ein ähnlich geringer Anteil an apoptotischen Zellen verglichen mit der Kontrollgruppe (n = 10) ($1,1 \pm 0,2\%$ vs. $1,2 \pm 0,2\%$).

6.3.6. mRNA-Expression von EphB4 in den Endometrioseherden

Zur Quantifizierung der mRNA-Expression von EphB4 in intraperitoneal induzierten Endometrioseherden unter der Behandlung mit NVP-BHG712 (n = 8) bzw. dem Vehikel (n = 8) wurde nach der Entnahme der Endometrioseherde an Tag 28 eine qRT-PCR-Analyse durchgeführt. Hier betrug die EphB4-mRNA-Expressionsrate $78,8 \pm 8,6\%$ in der NVP-BHG712-behandelten Gruppe und $100,0 \pm 9,5\%$ in der Kontrollgruppe. Es zeigte sich somit eine tendenziell reduzierte EphB4-mRNA-Expressionsrate durch die Behandlung mit NVP-BHG712. Der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant.

6.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung des EphB4-Inhibitors NVP-BHG712 *in vitro* auf Endothelzellen und *in vivo* auf induzierte Endometrioseherde in der Rückenhautkammer sowie der Bauchhöhle von BALB/c Mäusen untersucht. Hierbei wurden folgende Resultate erzielt:

1. NVP-BHG712-behandelte Endothelzellen wiesen eine reduzierte Migration, Tube-Formation und Sprouting-Aktivität auf. In einem *ex vivo* Modell mit kultivierten Maus-Aortenringen konnte eine nahezu vollständige Unterdrückung der herauswachsenden, murinen Gefäßsprossen beobachtet werden.
2. NVP-BHG712-behandelte Endometrioseherde in der Rückenhautkammer von BALB/c Mäusen wiesen eine signifikant reduzierte funktionelle Kapillardichte und Gesamtgröße an Tag 14 im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Als Zeichen der beeinträchtigten Gefäßreifung wurden größere Gefäßdurchmesser in den Herden gemessen. Der anti-angiogene Effekt von NVP-BHG712 wurde durch eine reduzierte Mikrogefäßdichte in einer Immunfluoreszenzfärbung an Tag 14 bestätigt.
3. NVP-BHG712-behandelte Endometrioseherde in der Bauchhöhle von BALB/c Mäusen wiesen immunhistochemisch an Tag 28 keinen signifikanten Unterschied bezogen auf die Mikrogefäßdichte und Zellproliferation im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Es konnte jedoch ein signifikant reduziertes Wachstum der Endometrioseherde beobachtet werden. Diese Ergebnisse lassen auf eine anti-angiogene Wirkung von NVP-BHG712 in der frühen Phase der Herdentwicklung schließen.
4. NVP-NHG712-behandelte Endometrioseherde in der Bauchhöhle von BALB/c Mäusen wiesen an Tag 7 eine signifikant reduzierte Mikrogefäßdichte und Zellproliferation im Stromagewebe im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Eine Reifegradbestimmung der Mikrogefäße mit Hilfe einer CD31/α-SMA-Doppelfärbung an Tag 7 ergab außerdem einen signifikant höheren Anteil an reifen Gefäßen in den NVP-BHG712-behandelten Endometrioseherden an Tag 7 im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies lässt den Schluss zu, dass der anti-angiogene Effekt von NVP-BHG712 in dieser frühen Phase durch eine Hemmung von neu einwachsenden, unreifen CD31⁺/α-SMA⁻ Mikrogefäßen aus dem Umgebungsgewebe in die Endometrioseherde verursacht wird.
5. NVP-BHG712-behandelte Endometrioseherde in der Bauchhöhle von BALB/c Mäusen wiesen an Tag 28 in qRT-PCR-Analysen eine tendenziell geringere EphB4-mRNA-

Expression auf als die der Kontrollgruppe. Somit kann geschlussfolgert werden, dass die Hemmung der Vaskularisierung und des Wachstums von NVP-BHG712-behandelten, int-raperitonealen Endometrioseherden auch durch eine Blockade der EphB4-mRNA-Expression verursacht werden könnte.

7. Diskussion

7.1. Diskussion von Material und Methoden

Für die Entwicklung von Endometriosherden ist die Ausbildung eines mikrovaskulären Netzwerks zur Sauerstoff- und Nährstoffversorgung essentiell [LASCHKE und MENGER, 2018]. Daher werden im Bereich der Endometrioseforschung zurzeit auch Behandlungsansätze untersucht, die verschiedene Mechanismen der Vaskularisierung gezielt hemmen können [LASCHKE et al., 2006, 2007; VIRANI et al., 2013; CAO et. al., 2017; KÖRBEL et al., 2018; RUDZITIS-AUTH et al., 2018]. Die Wirkung anti-angiogener Substanzen kann *in vitro* an kultivierten Zellen, *ex vivo* in einer Kultur mit explantiertem Gewebe und *in vivo* in tierexperimentellen Studien analysiert werden. Entsprechend wurde in der vorliegenden Arbeit die anti-angiogene Wirkung des EphB4-Kinase-Inhibitors NVP-BHG712 anhand zellbasierter Angiogenese-Assays, einem Aortenring-Assay und zwei verschiedenen Tiermodellen untersucht.

7.1.1. *In vitro* Experimente

In vitro Assays haben den Vorteil, dass sie mit einem relativ geringen technischen und finanziellen Aufwand durchgeführt werden können. Durch die Kombination mehrerer Assays kann außerdem der Einfluss auf verschiedene Einzelschritte im Prozess der Angiogenese gut beurteilt werden [MOLEIRO et al., 2017]. In der vorliegenden Arbeit wurde anhand eines WST-1- und LDH-Assays zunächst der Effekt von NVP-BHG712 auf die Viabilität von Endothelzellen getestet. Nach Identifikation einer nicht zytotoxischen Dosierung des Inhibitors konnte seine anti-angiogene Wirkung auf die Zellen in einem Migrations-Assay, Tube-Formation-Assay und Sphäroid-Sprouting-Assay analysiert werden. Bei der Durchführung dieser Assays ist die Wahl des richtigen Zelltyps von entscheidender Bedeutung, da im menschlichen Organismus unterschiedliche Endothelzelltypen vorhanden sind [MOLEIRO et al., 2017]. So unterscheidet sich zum Beispiel das Endothel von Mikro- und Makrogefäßen in seiner Morphologie, Proteinexpression und der zellulären Antwort auf angiogene Stimuli [KUMAR et al., 1987]. Die Angiogenese geht von Mikrogefäßen aus [JACKSON und NGUYEN, 1997]. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit mit humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen aus juveniler Vorhaut und adulter Haut gearbeitet.

Ein Nachteil von Monozellkulturen ist die Tatsache, dass damit die Auswirkungen physiologischer Interaktionen mit wandbildenden Zellen oder der Extrazellulärmatrize nicht berücksichtigt werden und somit die natürlichen Bedingungen der Blutgefäßentstehung nur begrenzt nachgeahmt werden können [POTENTE et al., 2011; MOLEIRO et al., 2017]. *Ex vivo* Assays

sind in dieser Hinsicht aussagekräftiger, da ganze Gewebe entnommen werden, sodass die Gewebearchitektur erhalten bleibt und zelluläre Interaktionen, wie z.B. mit der Extrazellulär-matrix, möglich sind [BELLACEN und LEWIS, 2009].

Eines der ersten *ex vivo* Modelle zur Untersuchung der Angiogenese wurde von NICOSIA et al. [1982] entwickelt. Hierzu wurden explantierte Aortenringe von Ratten in eine dreidimensionale Matrix eingebettet und das Wachstum von Gefäßsprossen aus der Aorta in die Umgebung über eine definierte Zeitspanne untersucht [NICOSIA et al., 1982]. Dieses Modell eignet sich auch, um die Wirkung anti-angiogener Substanzen zu testen [APLIN und NICOSIA, 2016]. Im Verlauf wurde das Modell auch an Mäusen angewandt. Der Maus-Aortenring-Assay ist vergleichsweise kostengünstiger [BAKER et al., 2011]. In der vorliegenden Arbeit wurden Aortenringe aus 12-16 Wochen alten BALB/c Mäusen isoliert, da dieser Maus-Stamm auch für die *in vivo* Experimente verwendet wurde. Allerdings bietet der Aortenring-Assay auch nicht die Möglichkeit, den komplexen Prozess der Angiogenese und somit die Wirkung einer anti-angiogenen Substanz vollständig abzubilden. Die Explantate sind z.B. nicht perfundiert, wodurch es nach ca. neun Tagen zu einer Regression der Gefäßsprossen kommt. Damit ist der Untersuchungszeitraum limitiert [BAKER et al., 2011].

7.1.2. *In vivo* Experimente

Um die anti-angiogene Wirkung einer Substanz auf Endometrioseherde *in vivo* zu analysieren, stehen verschiedene tierexperimentelle Modelle zur Verfügung [LASCHKE und MENGER, 2007]. Dabei können prinzipiell Primaten oder Nager als Versuchstiere eingesetzt werden. Primatenmodelle bieten den Vorteil, dass die anatomischen und immunologischen Verhältnisse dem Menschen sehr ähnlich sind [GRÜMMER, 2006]. Die Weibchen menstruieren, wodurch sich spontan Endometrioseherde entwickeln können [DICK et al., 2003]. Nachteilig ist jedoch, dass man die Tiere wiederholten Laparotomien unterziehen muss, um die Entwicklung der Gefäßnetzwerke in den Endometrioseherden im Zeitverlauf exakt zu beurteilen [LASCHKE und MENGER, 2007]. Ihr Einsatz ist zudem aus ethischen Gründen und hohe Kosten limitiert, weshalb oft weniger aufwendige Nagermodelle verwendet werden [GRÜMMER, 2006]. In den letzten Jahren wurden verschiedene Endometriosemodelle für Ratten, Hamster und Mäuse etabliert [LASCHKE und MENGER, 2007]. Nachteilig erweist sich bei den Nagermodellen, dass die Gebärmutterhaut der Tiere während des Östrus nur umgebaut und nicht abgestoßen wird, sodass eine Endometriose durch die Transplantation von Endometriumfragmenten oder ganzen Uterusfragmenten an einen ektopen, Uterus-fernen Ort künstlich induziert werden muss [CUMMINGS und METCALF, 1995; GRÜMMER, 2006]. CUMMINGS und METCALF [1995] konnten zeigen, dass transplantiertes Uterusgewebe in Mäusen zu vaskularisierten Herden mit endometrialen Drüsen- und

Stromazellen heranwächst und somit histologische Merkmale humaner Endometrioseherde aufweist. In der vorliegenden Arbeit wurde die Erkrankung durch die syngene Transplantation von Endometriumfragmenten in die Rückenhautkammer bzw. von ganzen Uterusfragmenten in die Bauchhöhle von weiblichen BALB/c Mäusen induziert [LASCHKE et al., 2005; LASCHKE et al., 2010; RUDZITIS-AUTH et al., 2012].

In ersten Experimenten wurde die Wirkung von NVP-BHG712 auf die Angiogenese von murinen Endometrioseherden im Rückenhautkammermodell analysiert. LASCHKE et al. [2005] setzten das Modell erstmalig für die Induktion von Endometrioseherden bei Syrischen Goldhamstern ein. Durch das Beobachtungsfenster der Titankammern konnte das Wachstum, die Entstehung von kapillären Netzwerken sowie die Mikrozirkulation der heranwachsenden Endometrioseherde mit Hilfe von intravitalfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen über einen Zeitraum von 14 Tagen analysiert werden. Mittlerweile wurde die Wirkung verschiedener anti-angiogener Substanzen auf murine Endometrioseherde in der Rückenhautkammer von Mäusen untersucht [FENG et al., 2012; KÖRBEL et al., 2018]. Die Präparation des Beobachtungsfensters erfordert die Entfernung der Cutis, Subcutis mit Hautmuskel und der beiden Schichten des *Musculus retractor*, sodass der gut durchblutete, quergestreifte Hautmuskel auf der Gegenseite freiliegt [LASCHKE et al., 2011b]. Zur Darstellung der Gefäße kommen verschiedene Fluoreszenzmarker zum Einsatz. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete, 150 Kilodalton schwere FITC-Dextran wurde vor der jeweiligen Untersuchung in den retrobulbären Venenplexus der narkotisierten Tiere injiziert, sodass das Blutplasma kontrastiert wurde [LASCHKE et al., 2011b]. Sein hohes Molekulargewicht hat den Vorteil, dass es nur im Falle einer erhöhten Gefäßpermeabilität ins Interstitium austritt [GERLOWSKI und JAIN, 1986]. Um die Untersuchungszeiten unter dem Fluoreszenzmikroskop so kurz wie möglich zu halten, wurden Videosequenzen während der Mikroskopie in verschiedenen Vergrößerungen und Filtern auf eine DVD aufgezeichnet. Mit Hilfe eines speziellen Computer-assistierten Auswertesystems konnten diese dann offline zu einem späteren Zeitpunkt abgespielt und die Transplantatgröße, Gefäßdichte, die Gefäßdurchmesser und Blutzellgeschwindigkeiten von einzelnen Gefäßen quantitativ analysiert werden [LASCHKE et al., 2005; LASCHKE und MENGER, 2007].

Während das Rückenhautkammermodell eine gute Möglichkeit bietet, die Angiogenese und die damit verbundenen mikrozirkulatorischen Parameter im Detail zu beurteilen, muss beachtet werden, dass hierbei Endometriumfragmente auf quergestreifte Muskulatur außerhalb der Bauchhöhle transplantiert werden. Das Milieu innerhalb der Rückenhautkammer repräsentiert dabei nicht das physiologische Milieu im Bauchraum, in dem die Konzentrationen von pro- und anti-angiogenen Faktoren und Entzündungsmediatoren möglicherweise völlig

anders sind [LASCHKE und MENGER, 2007]. Besonders Interaktionen zwischen ektopem Endometriumgewebe in der Bauchhöhle und Zytokinen, Steroidhormonen, Wachstumsfaktoren und Angiogenesefaktoren aus der Peritonealflüssigkeit sind jedoch bei der Krankheitsentwicklung von Bedeutung [KONINCKX et al., 1999]. Daher wurde in einem zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit zusätzlich das Modell der intraperitonealen Endometriose eingesetzt.

Eines der ersten intraperitonealen Mausmodelle zur Endometriose entwickelten CUMMINGS und METCALF [1995]. Sie fixierten autolog transplantierte (aus demselben Tier stammende) Uterusfragmente an das gut durchblutete, intestinale Mesenterium und konnten beobachten, wie sich die Transplantate innerhalb von drei Wochen zu typischen Endometrioseherden mit zystenähnlichen Strukturen entwickelten [CUMMINGS und METCALF, 1995; GRÜMMER, 2006]. Da in dieser Lokalisation die Transplantate der Peristaltik des Darms unterworfen und somit für die nachfolgenden Untersuchungen schwerer zu lokalisieren sind [RUDZITIS-AUTH et al., 2012], wurden die Uterusfragmente in der vorliegenden Arbeit an das Peritoneum der Bauchwand fixiert. Die Induktion von Endometrioseherden erfolgte außerdem durch eine syngene Transplantation von Uterusfragmenten (Übertragung aus einem genetisch identischen Spendertier in ein Empfängertier). Diese Methode hat den Vorteil, dass keine zusätzlichen Gewebefekte durch die Entnahme der Uterushörner aus demselben Tier entstehen, die zu Veränderungen der Peritonealflüssigkeit durch eine Ausschüttung von Entzündungsmediatoren führen könnten [KÖRBEL et al., 2010]. Um hormonelle Schwankungen, die zwischen den Spender- und Empfängertieren im syngenen Transplantationsverfahren vorliegen könnten, auf ein Minimalmaß zu reduzieren, wurde das Zyklusstadium aller Tiere mittels vaginaler Lavage vorher bestimmt und ausschließlich Tiere im gleichen Zyklusstadium verwendet [RUDZITIS-AUTH et al., 2016]. Die Wirkung anti-angiogener Substanzen auf murine, intraperitoneale Endometrioseherde wurde in früheren Studien bereits im identischen Modell analysiert. RUDZITIS-AUTH et al. [2012] untersuchten über einen 28-tägigen Zeitraum das Größenwachstum, die Zystenbildung und die Vaskularisierung von Endometrioseherden unter der Behandlung des pleiotropen Flavonoids Xanthohumol [RUDZITIS-AUTH et al., 2012]. LASCHKE et al. [2010] konnten in einer weiteren Studie zeigen, dass sich ein Beobachtungszeitraum von vier Wochen gut eignet, um typische Veränderungen im Wachstumsverhalten des Stroma- und Drüsengewebes in den heranwachsenden Endometriosherden zu analysieren. Um den Effekt von NVP-BHG712 auf die Entwicklung der induzierten Endometrioseherde zu untersuchen, wurden wie durch LASCHKE et al. [2010] beschrieben, in einem 28-tägigen Experiment sonographische Analysen an den Tagen 0, 7, 14, 21 und 28 durchgeführt. Die Sonographie hat den Vorteil, dass keine wiederholten Laparotomien für die repetitiven Messungen vonnöten sind, die Wundheilungsprozesse induzieren und somit die Trans-

plantatentwicklung beeinträchtigen könnten [LASCHKE et al., 2010]. In der vorliegenden Studie erfolgte am letzten Untersuchungstag ergänzend zu den Ultraschallmessungen eine Ausmessung der Herde mittels digitalem Messschieber, da beide Verfahren in früheren Studien ebenfalls eine gute Korrelation zeigten [LASCHKE et al., 2010].

Eine Alternative zu den in dieser Arbeit verwendeten homologen Mausmodellen sind heterologe Modelle, bei denen die Erkrankung durch Transplantation von humanem Endometrium oder Fragmenten aus Endometrioseherden erkrankter Frauen induziert wird [ZAMAH et al., 1984; GRÜMMER et al., 2001]. Ein Vorteil von heterologen Modellen ist, dass der Effekt einer anti-angiogenen Substanz direkt auf menschliches Gewebe untersucht werden kann. Zur Vermeidung einer Abstoßungsreaktion des humanen Gewebes müssen in diesem Fall jedoch immunkompromittierte Mäuse eingesetzt werden [AWWAD et al., 1999]. Dies hat zur Folge, dass Interaktionen zwischen dem Immunsystem und den Transplantaten nicht vollständig untersucht werden können. Gerade aber Wachstumsfaktoren, Zytokine und Angiogenesefaktoren, die u.a. von Immunzellen sezerniert werden, tragen maßgeblich zur Krankheitsentwicklung bei [GIUDICE und KAO, 2004].

In der vorliegenden Arbeit wurde daher das homologe Mausmodell der Rückenhautkammer und der intraperitonealen Endometriose eingesetzt, um den Effekt des Angiogenese-Inhibitors NVP-BHG712 auf Endometrioseherde zu untersuchen. Durch die Kombination beider Modelle konnte die Wirkung von NVP-BHG712 auf die Mikrozirkulation in den Endometrioseherden in der Rückenhautkammer einerseits und andererseits auf deren Größenentwicklung in der Bauchhöhle, welche die häufigste Krankheitslokalisierung darstellt [LASCH, 2017], detailliert untersucht werden.

7.2. Diskussion der Ergebnisse

Die Erforschung molekularer Signalwege bei der Angiogenese bildet die Basis für die Entwicklung von gezielten, anti-angiogenen Therapien [HANAHAN und FOLKMAN, 1996; HULL et al., 2003; NAP et al., 2004; DJOKOVIC und CALHAZ-JORGE, 2014; LASCHKE und MENGER, 2018]. In diesem Kontext erscheint EphB4 von großem Interesse, da bereits gezeigt werden konnte, dass der Ephrin-Rezeptor in der Krankheitsentstehung der Endometriose von Bedeutung ist. Die Genexpression von EphB4 ist in ektopen Endometrioseherden hochreguliert und korreliert mit einer erhöhten Expression der Angiogenesefaktoren HIF-1 α , VEGFR-2 und PDGF-B [YERLIKAYA et al., 2016]. Weiterhin wurde der EphB4/EphrinB2-Signalweg in früheren Studien bereits als wichtiger Regulator der Gefäßneubildung identifiziert [FÜLLER et al., 2003; MARTINY-BARON et al., 2010]. EphB4 ist auch unter pathologi-

schen Bedingungen, wie z.B. bei dem Wachstum von Tumoren, für die Ausbildung eines intakten kapillären Netzwerks notwendig [NOREN et al., 2004; PASQUALE, 2008]. Die Interaktion von EphB4-exprimierenden Endothelzellen mit Endothelzellen, die den Liganden EphrinB2 exprimieren, stimuliert die Ausbildung neuer Gefäß-Sprossen [WERNER et al., 2015]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition des EphB4-Signalweges mit dem Kinase-Inhibitor NVP-BHG712 die Vaskularisierung von Endometrioseherden in der Rückenhautkammer und der Bauchhöhle von weiblichen BALB/c Mäusen hemmt. Die dadurch verringerte Proliferationsrate der Stromazellen führte zu einer Reduktion der Herdgröße.

In einem ersten Schritt wurde die anti-angiogene Wirkung des selektiven EphB4-Kinase-Hemmers NVP-BHG712 auf humane Endothelzellen untersucht. Zur Festlegung des therapeutischen Fensters wurden zuvor mehrere Dosierungen (1, 2, 5, 10 und 50 μ M) in einem WST-1-(Viabilitäts)- bzw. LDH-(Zytotoxizitäts)-Assay getestet. Basierend auf den Ergebnissen dieser Assays wurde in den anschließenden Angiogenese-Assays mit einer Konzentration von 1 bzw. 2 μ M NVP-BHG712 weitergearbeitet. Unter diesen nicht-zytotoxischen Konzentrationen konnte eine reduzierte Migration, Tube Formation und Sprouting-Aktivität von HDMEC festgestellt werden. Zusätzlich wurde eine signifikant geringere Anzahl an Gefäßsprossen in einem Maus-Aortenring-Assay im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet. Demzufolge wurde gezeigt, dass die Blockade des EphB4-Signalweges verschiedene Mechanismen der Angiogenese hemmt. Andere *in vitro* Studien konnten zeigen, dass der anti-angiogene Effekt von NVP-BHG712 auf molekularer Ebene wahrscheinlich über die Hemmung des Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalwegs vermittelt wird [STEINLE et al., 2002; MAEKAWA et al., 2003]. Dieser Signalweg wird in der Literatur sowohl als Teil der EphB4-Kaskade (vorwärtsgerichtete Signaltransduktion) als auch der EphrinB2-Kaskade (reverse Signaltransduktion) beschrieben und soll unter anderem die VEGF-Transkription in der EphB4-exprimierenden Zelle stimulieren. Durch eine Interaktion von VEGF mit den zugehörigen Rezeptoren auf der Zellmembran kommt es zur Dimerisierung der VEGF-Rezeptoren, wodurch diese aktiviert werden und ihre Aufnahme in die Zelle via Endozytose stimuliert wird. Im Rahmen eines positiven Feedback-Mechanismus wird durch die internalisierten VEGF-Rezeptoren wiederum die Akt-abhängige Endothelzelle-Migration bzw. -Proliferation stimuliert [DU et al., 2020]. Der PI3K/Akt-Signalweg wurde auch als wichtiger Regulator der Zellproliferation und der Angiogenese in Endometrioseherden *in vivo* identifiziert [BARRA et al., 2018; RUDZITIS-AUTH et al., 2018]. CAO et al. [2017] konnten zum Beispiel in einer Studie zeigen, dass das pflanzliche Ginsenosid Rg3 dosisabhängig die Angiogenese und das Wachstum von Endometrioseherden in der Bauchhöhle von Ratten hemmt. Dabei fanden sie eine signifikant reduzierte Protein- und Genexpression von VEGF,

die mit einer reduzierten Phosphorylierung von Akt und mTOR in den Endometrioseherden einherging und postulierten daher, dass der Wirkstoff über eine Hemmung des VEGFR-2-induzierten PI3K/Akt/mTor-Signalwegs wirkt [CAO et al., 2017]. Auch der in der vorliegenden Arbeit verwendete Wirkstoff NVP-BHG712 wurde in einer früheren Studie bereits als ein Inhibitor der VEGF-induzierten Angiogenese beschrieben [MARTINY-BARON et al., 2010]. In den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten *in vivo* Untersuchungen wurden die Tiere daher in Anlehnung an die Studie von MARTINY-BARON et al. [2010] entweder mit 10 mg/kg NVP-BHG712 oder Vehikel (10% NMP) behandelt. Anhand einer Casp-3-Färbung konnte nachgewiesen werden, dass die Viabilität der Stromazellen in Endometrioseherden unter dieser Dosierung nicht signifikant gehemmt wird.

Zunächst wurde die Wirkung des EphB4-Inhibitors auf die Vaskularisierung und die Größe von sich neu entwickelnden Endometrioseherden in der Rückenhautkammer von weiblichen BALB/c Mäusen mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Das Modell hat den Vorteil, dass mit Hilfe der intravitalen Floureszenzmikroskopie die Entwicklung von Gefäßnetzwerken in den Endometriosherden durch das Beobachtungsfenster der Rückenhautkammer zu verschiedenen Zeitpunkten nicht-invasiv untersucht werden kann [LASCHKE et al., 2011b]. Dabei können mikrohämodynamische Parameter, wie der Durchmesser und die mittlere Blutzellgeschwindigkeit einzelner Gefäße, aber auch die Perfusion des heranwachsenden mikrovaskulären Netzwerkes analysiert werden [LASCHKE und MENGER, 2016]. In dieser Arbeit wiesen die Herde der NVP-BHG712- und Kontrollgruppe zwar einen ähnlich großen prozentualen Anteil an vaskularisierter Fläche auf, an Tag 14 zeigte sich jedoch in der NVP-BHG712-Gruppe eine deutlich reduzierte funktionelle Kapillardichte verglichen mit der Kontrollgruppe. Immunhistochemisch konnte ergänzend eine niedrige Mikrogefäßdichte innerhalb der Herde in der NVP-BHG712-Gruppe nachgewiesen werden. Die anti-angiogene Wirkung von NVP-BHG712 ging mit einer signifikant reduzierten Transplantatgröße und einer tendenziell reduzierten Proliferationsrate der Stromazellen einher. Vor Tag 14 wurden interessanterweise keine Unterschiede in der funktionellen Kapillardichte beobachtet. Eine Erklärung dafür könnten die verschiedenen Mechanismen sein, die bei der Entwicklung eines neuen Gefäßnetzwerkes in Endometrioseherden involviert sind [LASCHKE und MENGER, 2018]. Die transplantierten Endometriumfragmente enthalten bereits Mikrogefäß und können durch Anastomosenbildung mit den Gefäßen aus der Umgebung schon während der ersten drei Tage reperfundiert werden (Inoskulation) [FENG et al., 2014; MACHADO et al., 2014; LASCHKE und MENGER, 2018]. CHENG et al. [2011] beschreiben, dass hierfür Endothelzellen aus einem bereits bestehenden Gefäß im Transplantat ein perfundiertes Wirt-Gefäß aus der Umgebung umhüllen. Durch die Freisetzung von MMP-9 und MMP-14 wird die Wand des Wirt-Gefäßes degradiert, sodass Blut in das Transplantat-Gefäß einströmen

kann. Dieser Mechanismus wird auch als „wrapping and tapping (WAT)-Anastomose“ bezeichnet. Diese weist zunächst durch die degradierte Basalmembran und Zellwand eine un dichte, veränderte Morphologie auf und reift mit der Zeit durch Reorganisation des Endothels und der Anlagerung von stabilisierenden Perizyten zu einem dichten Gefäß heran [CHENG et al., 2011]. Vermutlich wurde dieser Prozess in der vorliegenden Arbeit nicht vollständig durch NVP-BHG712 inhibiert, was die vergleichbare funktionelle Kapillardichte zwischen den beiden Gruppen während der ersten Tage nach Transplantation der Endometriumfragmente erklären könnte. Vorstellbar wäre, dass bereits eine einzige Gefäßanastomose die Reperfusion von großen Teilen des Transplantat-Netzwerkes ermöglicht haben könnte [RUDZITIS-AUTH et al., 2020]. Weiterhin können sich neue Gefäßsprossen aus den Mikrogefäßen der transplantierten Endometriumfragmente bilden und zunehmend in das Umgebungsgewebe einwachsen (Angiogenese) [LASCHKE et al., 2008]. Da für die Angiogenese viele koordinierte Einzelschritte mit verschiedenen humoralen und zellulären Interaktionen vonnöten sind, ist diese Art der Gefäßneubildung ein zeitaufwendigerer Prozess [RISAU, 1997; CARMELIET, 2000; LASCHKE et al., 2008]. Dieser Mechanismus könnte durch NVP-BHG712 während der *in vivo* Experimente gehemmt worden sein und die reduzierte Kapillardichte an Tag 14 in der NVP-BHG712-behandelten Gruppe erklären [RUDZITIS-AUTH et al., 2020]. Außerdem konnten in den Endometrioseherden unter NVP-BHG712-Behandlung signifikant größere Durchmesser einzelner Gefäße verglichen mit solchen aus Vehikel-behandelten Tieren beobachtet werden. Dies ist ein typisches Zeichen für eine beeinträchtigte Gefäßstabilisierung und -reifung während der Entwicklung neuer mikrovaskulärer Netzwerke [LASCHKE et al., 2014]. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen wurde in anderen Studien gezeigt, dass der EphB4/EphrinB2-Signalweg in die Regulierung der Gefäßreifung involviert ist [YANG et al., 2016]. So führt die Unterbrechung des Signalwegs zu einer Ablösung von Perizyten vom mikrovaskulären Endothel [DIMOVA et al., 2013].

In weiteren Experimenten wurden intraperitoneal induzierte Endometrioseherde in weiblichen BALB/c Mäusen analysiert. Die Umgebungsbedingungen in der Bauchhöhle ähneln im Gegensatz zur quergestreifte Muskulatur in der Rückenhautkammer eher den Bedingungen einer natürlich vorkommenden, peritonealen Endometriose [LASCHKE und MENGER, 2007]. Mit Hilfe wiederholter Ultraschallanalysen konnte in der Kontrollgruppe ein stetiges Wachstum der Endometrioseherde während des 28-tägigen Experiments beobachtet werden. Die Applikation von NVP-BHG712 hingegen führte zu einer verminderten Wachstumsrate der Endometrioseherde. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Studie von YOU et al. [2017] konnte außerdem eine tendenziell geringere mRNA-Expression von EphB4 in den intraperitonealen Endometrioseherden unter der Behandlung mit 10 mg/kg NVP-BHG712 gemessen werden. YOU et al. [2017] beobachteten sogar unter einer geringeren Dosierung

(8 mg/kg intragastrale Gabe jeden zweiten Tag) ähnliche Effekte auf die mRNA-Expression. Denkbar ist somit, dass die Wirkung von NVP-BHG712 auf die Endometrioseherde nicht nur durch eine Hemmung der EphB4-Kinasen-Aktivität verursacht wurde, sondern möglicherweise auch die Genexpression von EphB4 beeinflusste [MARTINY-BARON et al., 2010; RUDZITIS-AUTH et al., 2020].

Immunhistochemische Analysen an Tag 28 zeigten jedoch, dass trotz der reduzierten Transplantatgröße keine signifikanten Unterschiede in der Mikrogefäßdichte und der Proliferationsrate der Stromazellen und des Drüsengewebes zwischen den NVP-BHG712- und Vehikelbehandelten Tiere vorlagen. Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass die Endometrioseherde zu diesem Zeitpunkt bereits am Peritoneum der Bauchwand angewachsen sind und es vermehrt zur Fibrose in den Endometrioseherden statt zu einer ausgeprägten Angiogenese und einem hohen Zellumsatz kommt [RUDZITIS-AUTH et al., 2016, 2018]. Aus diesem Grund wurden zusätzliche immunhistochemische Untersuchungen der Endometrioseherde bereits nach sieben Tagen durchgeführt. Zu diesem frühen Zeitpunkt konnte sowohl eine signifikant reduzierte Mikrogefäßdichte als auch Stromazell-Proliferation unter der NVP-BHG712-Behandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Somit kann geschlussfolgert werden, dass die Blockade des EphB4-Signalswegs mit NVP-BHG712 die Vaskularisierung und das Größenwachstum insbesondere von frischen, mitotisch und vaskular aktiven Endometrioseherden hemmt. Immunhistochemische Analysen des Reifegrads der einzelnen Mikrogefäße konnten ergänzend zeigen, dass NVP-BHG712-behandelte Endometrioseherde eine signifikant höhere Anzahl an reifen CD31⁺/α-SMA⁺ Mikrogefäßen an Tag 7 verglichen mit der Kontrollgruppe aufweisen. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass das Einwachsen von unreifen, CD31⁺/α-SMA⁻ Mikrogefäßen in die Endometrioseherde aus dem Umgebungsgewebe durch NVP-BHG712 gehemmt wurde. Folglich war zu diesem Zeitpunkt der relative Anteil an reifen Mikrogefäßen, die ursprünglich aus dem transplantierten Uterusgewebe stammen, erhöht. An Tag 28 enthielten die NVP-BHG712-behandelten Endometrioseherde entsprechend weniger reife CD31⁺/α-SMA⁺ Mikrogefäße als die Herde der Kontrollgruppe. Daher kann außerdem geschlussfolgert werden, dass NVP-BHG712 in den heranwachsenden Endometrioseherden wahrscheinlich nicht nur das Gefäß-Sprouting hemmt, sondern auch die anschließende Gefäßreifung und –stabilisierung [RUDZITIS-AUTH et al., 2020].

Darüber hinaus wird in einigen Studien berichtet, dass auch die Vaskulogenese wesentlich zur Entstehung neuer Gefäßnetzwerke in Endometrioseherden beiträgt. Bei dieser Art der Vaskularisierung werden aus dem Knochenmark stammende, zirkulierende EPCs in das mikrovaskuläre Endothel der Endometrioseherde eingebaut [BECKER et al., 2011; LASCHKE et

al., 2011a]. Dieser Prozess wird maßgeblich durch eine Interaktion des chemotaktischen Zytokins SDF-1 in den Endometrioseherden mit seinem Rezeptor CXCR4 auf den EPCs reguliert [VIRANI et al., 2013]. Die Hemmung dieser Interaktion mit AMD3100 (Plexifaktor) führt folglich zu einer geringeren Rekrutierung von EPCs in die Endometrioseherde und geht mit einer reduzierten Vaskularisierung an Tag 14 einher [LASCHKE et al., 2011a]. SALVUC-Cl et al. [2006] konnten in einer Studie zeigen, dass die Aktivierung des EphB4/EphrinB2-Signalwegs die SDF-1-abhängige Migration von Endothelzellen steigert. DIMOVA et al. [2013] zeigten außerdem, dass die Expression von SDF-1 und CXCR4 auf der Chorioallantoismembran (CAM) von Hühnerembryonen unter der Behandlung mit NVP-BHG712 herunter reguliert wird. In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung des EphB4-Kinase-Inhibitors auf die SDF-1/CXCR4-Achse nicht untersucht. Daher kann nur spekuliert werden, dass die verminderte Vaskularisierung in den Endometrioseherden in der Rückenhaukammer bzw. der Bauchhöhle der NVP-BHG712-behandelten BALB/c Mäuse zumindest teilweise auch durch eine Blockade dieses Signalweges mit verursacht wurde [RUDZITIS-AUTH et al., 2020].

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Blockade des EphB4-Signalwegs mit NVP-BHG712 die Vaskularisierung und das Wachstum von Endometrioseherden hemmt. Daher stellt EphB4 ein vielversprechendes Target in der Therapie der Endometriose dar. Seit einigen Jahren ist eine geringe Anzahl anderer EphB4-Inhibitoren im Rahmen der Tumortherapie in Entwicklung und zu klinischen Studien zugelassen. Diese nutzen in der Regel mehrere Moleküle als Target [CHEN et al., 2019]. Tesevatinib (XL-647) beispielsweise ist ein Multi-Tyrosinkinase-Inhibitor, der neben EphB4 auch RTKs wie epidermal growth factor receptor (EGFR), VEGFR-2 und human epidermal growth factor receptor (HER)-2 inhibiert und dessen Wirkung und Sicherheitsprofil initial im Rahmen einer offenen, multizentrischen Phase-II-Studie für eine Erstlinien-Behandlung des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms getestet wurde. Die Ansprechraten von Tesevatinib bei Patienten mit EGFR-Mutation betrug 57%, das progressionsfreie Überleben 9,3 Monate [PIETANZA et al., 2012]. Neben den Daten aus onkologischen Studien werden aktuell auch Daten zu Tesevatinib bei Patienten mit autosomal-dominanter polyzystischer Nierenerkrankung (ADPKD) erhoben. In einer placebokontrollierten Studie wird der Effekt von 50 mg Tesevatinib über 24 Monate auf das renale Volumen von ADPKD-Patienten untersucht [National Library of Medicine, 2023]. Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wäre es somit sehr interessant, die Wirkung von EphB4-Inhibitoren auch auf Endometrioseherde in klinischen Studien zu untersuchen.

7.3. Schlussfolgerungen und klinische Perspektiven

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass der EphB4-Kinase-Inhibitor NVP-BHG712 die Vaskularisierung und das Wachstum von Endometrioseherden hemmt. Dabei inhibiert NVP-BHG712 verschiedene Mechanismen der Angiogenese wie die Zellmigration, das Gefäß-Sprouting und die Tube Formation. Eine signifikante Reduktion der Mikrogefäßdichte und Stromazellproliferation in intraperitonealen Endometrioseherden zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe an Tag 7. Zu diesem frühen Zeitpunkt befinden sich die Herde in der Wachstumsphase und weisen dementsprechend eine hohe Mitoserate und vaskuläre Aktivität auf. Daher könnte EphB4 insbesondere ein vielversprechendes pharmakologisches Ziel für sich neu entwickelnde, makroskopisch rote Endometrioseherde darstellen. EphB4-Inhibitoren könnten z.B. im Rahmen eines adjuvanten Therapieansatzes nach operativer Entfernung der Endometrioseherde eingesetzt werden, um Rezidive, die sowohl nach dem Absetzen von Ovulationshemmern als auch nach chirurgischer Entfernung der Herde häufig entstehen, vorzubeugen. Da sich die Mehrheit der Endometriose-Patientinnen im gebärfähigen Alter befindet, ist eine zielgerichtete Therapie, die ausschließlich die Angiogenese in Endometrioseherden hemmt und das eutope Endometrium im Uterus nicht beeinflusst, von großer Bedeutung. Vor klinischem Einsatz von EphB4-Inhibitoren sollte daher in weiteren Studien untersucht werden, ob die Angiogenese der weiblichen Geschlechtsorgane unter dieser Therapie unbeeinträchtigt bleibt.

8. Literaturverzeichnis

1. **Acién P, Velasco I (2013)** Endometriosis: A disease that remains enigmatic. *ISRN Obstet Gynecol* 2013:1–12
2. **Adamson GD, Pasta DJ (2010)** Endometriosis fertility index: The new, validated endometriosis staging system. *Fertil Steril* 94:1609–1615
3. **Alimi Y, Iwanaga J, Loukas M, Tubbs RS (2018)** The clinical anatomy of endometriosis: A review. *Cureus* 10:e3361
4. **Aplin AC, Nicosia RF (2016)** The aortic ring assay and its use for the study of tumor angiogenesis. *Methods Mol Biol* 1464:63–72
5. **Asante A, Taylor RN (2011)** Endometriosis: The role of neuroangiogenesis. *Annu Rev Physiol* 73:163–182
6. **AWMF (2020)** Diagnostik und Therapie der Endometriose. URL: <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/015-045.html>
7. **Awwad JT, Sayegh RA, Tao XJ, Hassan T, Awwad ST, Isaacson K (1999)** The SCID mouse: An experimental model for endometriosis. *Hum Reprod* 14:3107–3111
8. **Baker M, Robinson SD, Lechertier T, Barber PR, Tavora B, D'Amico G, Jones DT, Vojnovic B, Hodivala-Dilke K (2011)** Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis. *Nat Protoc* 7:89–104
9. **Barra F, Ferro Desideri L, Ferrero S (2018)** Inhibition of PI3K/AKT/mTOR pathway for the treatment of endometriosis. *Br J Pharmacol* 175:3626–3627
10. **Bazot M, Thomassin I, Hourani R, Cortez A, Darai E (2004)** Diagnostic accuracy of transvaginal sonography for deep pelvic endometriosis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 24:180–185
11. **Becker CM, Rohwer N, Funakoshi T, Cramer T, Bernhardt W, Birsner A, Folkman J, D'Amato RJ (2008)** 2-Methoxyestradiol inhibits hypoxia-inducible factor-1 α and suppresses growth of lesions in a mouse model of endometriosis. *Am J Pathol* 172:534–544
12. **Becker CM, Beaudry P, Funakoshi T, Benny O, Zaslavsky A, Zurakowski D, Folkman J, D'Amato RJ, Ryeom S (2011)** Circulating endothelial progenitor cells are up-regulated in a mouse model of endometriosis. *Am J Pathol* 178:1782–1791
13. **Bellacen K, Lewis EC (2009)** Aortic ring assay. *J Vis Exp* 33:1564
14. **Blanco R, Gerhardt H (2013)** VEGF and notch in tip and stalk cell selection. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3:a006569
15. **Bochenek ML, Dickinson S, Astin JW, Adams RH, Nobes CD (2010)** Ephrin-B2 regulates endothelial cell morphology and motility independently of Eph-receptor binding. *J Cell Sci* 123:1235–1246
16. **Bourlev V, Volkov N, Pavlovitch S, Lets N, Larsson A, Olovsson M (2006)** The

- relationship between microvessel density, proliferative activity and expression of vascular endothelial growth factor-A and its receptors in eutopic endometrium and endometriotic lesions. *Reproduction* 132:501–509
- 17. **Boyd AW, Bartlett PF, Lackmann M (2014)** Therapeutic targeting of EPH receptors and their ligands. *Nat Rev Drug Discov* 13:39–62
 - 18. **Brown J, Crawford TJ, Allen C, Hopewell S, Prentice A (2017)** Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for pain in women with endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2017:CD004753
 - 19. **Burney RO, Giudice LC (2012)** Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril* 98:511–519
 - 20. **Canis M, Donnez JG, Guzick DS, Halme JK, Rock JA, Schenken RS, Vernon MW (1997)** Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 67:817–821
 - 21. **Cao Y, Ye Q, Zhuang M, Xie S, Zhong R, Cui J, Zhou J, Zhu Y, Zhang T, Cao L (2017)** Ginsenoside Rg3 inhibits angiogenesis in a rat model of endometriosis through the VEGFR-2-mediated PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *PLoS One* 12:e0186520
 - 22. **Carmeliet P (2000)** Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6:389–395
 - 23. **Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC (2004)** Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 10:858–864
 - 24. **Ceyhan ST, Onguru O, Baser I, Gunhan O (2008)** Expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in ovarian endometriotic cysts and their relationship with angiogenesis. *Fertil Steril* 90:988–993
 - 25. **Chan JKC (2014)** The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology. *Int J Surg Pathol* 22:12–32
 - 26. **Chantalat E, Valera MC, Vaysse C, Noirrit E, Rusidze M, Weyl A, Vergriete K, Buscail E, Lluel P, Fontaine C, Arnal JF, Lenfant F (2020)** Estrogen receptors and endometriosis. *Int J Mol Sci* 21:2815
 - 27. **Chen Y, Zhang H, Zhang Y (2019)** Targeting receptor tyrosine kinase EphB4 in cancer therapy. *Semin Cancer Biol* 56:37–46
 - 28. **Cheng G, Liao S, Wong HK, Lacorre DA, Di Tomaso E, Au P, Fukumura D, Jain RK, Munn LL (2011)** Engineered blood vessel networks connect to host vasculature via wrapping-and-tapping anastomosis. *Blood* 118:4740–4749
 - 29. **Culley L, Law C, Hudson N, Denny E, Mitchell H, Baumgarten M, Raine-Fenning**

- N (2013)** The social and psychological impact of endometriosis on women's lives: A critical narrative review. *Hum Reprod Update* 19:625–639
30. **Cummings AM, Metcalf JL (1995)** Induction of endometriosis in mice: A new model sensitive to estrogen. *Reprod Toxicol* 9:233–238
31. **De Vriese AS, Verbeuren TJ, Vallez M-O, Lameire NH, De Buyzere M, Vanhoutte PM (2000)** Offline analysis of red blood cell velocity in renal arterioles. *J Vasc Res* 37:26–31
32. **Dick EJ, Hubbard GB, Martin LJ, Leland MM (2003)** Record review of baboons with histologically confirmed endometriosis in a large established colony. *J Med Primatol* 32:39–47
33. **Dimova I, Hlushchuk R, Makanya A, Styp-Rekowska B, Ceausu A, Flueckiger S, Lang S, Semela D, Le Noble F, Chatterjee S, Djonov V (2013)** Inhibition of notch signaling induces extensive intussusceptive neo-angiogenesis by recruitment of mononuclear cells. *Angiogenesis* 16:921–937
34. **Djokovic D, Calhaz-Jorge C (2014)** Angiogenesis as a therapeutic target in endometriosis. *Acta Med Port* 27:489–497
35. **Du E, Li X, He S, Li X, He S (2020)** The critical role of the interplays of EphrinB2/EphB4 and VEGF in the induction of angiogenesis. *Mol Biol Rep* 47:4681–4690
36. **Du H, Taylor HS (2007)** Contribution of bone marrow-derived stem cells to endometrium and endometriosis. *Stem Cells* 25:2082–2086
37. **Ebert A, David M (2017)** „Biologie und Pathologie des Weibes“ – zur Erinnerung an Josef von Halban (1870 – 1937) anlässlich seines 80. Todesstages. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 77:462–464
38. **Ekambaram G, Kumar SKS, Joseph LD (2017)** Comparative study on the estimation of estrous cycle in mice by visual and vaginal lavage method. *J Clin Diagnostic Res* 11:AC05–AC07
39. **Falcone T, Flyckt R (2018)** Clinical management of endometriosis. *Obstet Gynecol* 131:557–571
40. **Farhana A, Lappin SL (2020)** Biochemistry, lactate dehydrogenase (LDH). StatPearls PublishingURL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32491468>
41. **Feng D, Welker S, Körbel C, Rudzitis-Auth J, Menger MD, Montenarh M, Laschke MW (2012)** Protein kinase CK2 is a regulator of angiogenesis in endometriotic lesions. *Angiogenesis* 15:243–252
42. **Feng D, Menger MD, Wang H, Laschke MW (2014)** Luminal epithelium in endometrial fragments affects their vascularization, growth and morphological development into endometriosis-like lesions in mice. *DMM Dis Model Mech* 7:225–

- 232
43. **Ferrero S, Barra F, Leone Roberti Maggiore U (2018)** Current and emerging therapeutics for the management of endometriosis. *Drugs* 78:995–1012
 44. **Fong GH (2009)** Regulation of angiogenesis by oxygen sensing mechanisms. *J Mol Med* 87:549–560
 45. **Foo SS, Turner CJ, Adams S, Compagni A, Aubyn D, Kogata N, Lindblom P, Shani M, Zicha D, Adams RH (2006)** Ephrin-B2 controls cell motility and adhesion during blood-vessel-wall assembly. *Cell* 124:161–173
 46. **Füller T, Korff T, Kilian A, Dandekar G, Augustin HG (2003)** Forward EphB4 signaling in endothelial cells controls cellular repulsion and segregation from ephrinB2 positive cells. *J Cell Sci* 116:2461–2470
 47. **Gargett CE, Rogers PAW (2001)** Human endometrial angiogenesis. *Reproduction* 121:181–186
 48. **Gerety SS, Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ (1999)** Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development. *Mol Cell* 4:403–414
 49. **Gerety SS, Anderson DJ (2002)** Cardiovascular ephrinB2 function is essential for embryonic angiogenesis. *Development* 129:1397–1410
 50. **Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D, Betsholtz C (2003)** VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 161:1163–1177
 51. **Gerlowski LE, Jain RK (1986)** Microvascular permeability of normal and neoplastic tissues. *Microvasc Res* 31:288–305
 52. **Germain S, Eichmann A (2010)** VEGF and ephrin-B2: A bloody duo. *Nat Med* 16:753–754
 53. **Giudice LC, Kao LC (2004)** Endometriosis. *Lancet* 364:1789–1799
 54. **Giudice LC (2010)** Clinical practice: Endometriosis. *N Engl J Med* 362:2389–2398
 55. **Goodwin AM (2007)** In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents. *Microvasc Res* 74:172–183
 56. **Gordts S, Koninckx P, Brosens I (2017)** Pathogenesis of deep endometriosis. *Fertil Steril* 108:872–885.e1
 57. **Grasso RF, Di Giacomo V, Sedati P, Sizzi O, Florio G, Faiella E, Rossetti A, Del Vescovo R, Zobel BB (2010)** Diagnosis of deep infiltrating endometriosis: Accuracy of magnetic resonance imaging and transvaginal 3D ultrasonography. *Abdom Imaging* 35:716–725
 58. **Grümmer R, Schwarzer F, Bainczyk K, Hess-Stumpf H, Regidor PA, Schindler AE, Winterhager E (2001)** Peritoneal endometriosis: Validation of an in-vivo model.

- Hum Reprod 16:1736–1743
59. **Grümmer R (2006)** Animal models in endometriosis research. *Hum Reprod Update* 12:641–649
60. **Gu Y, Körbel C, Scheuer C, Nenicu A, Menger MD, Laschke MW (2016)** Tubeimoside-1 suppresses tumor angiogenesis by stimulation of proteasomal VEGFR2 and Tie2 degradation in a non-small cell lung cancer xenograft model. *Oncotarget* 7:5258–5272
61. **Haas D, Shebl O, Shamiyah A, Oppelt P (2013)** The rASRM score and the Enzian classification for endometriosis: Their strengths and weaknesses. *Acta Obstet Gynecol Scand* 92:3–7
62. **Halis G, Mechsner S, Ebert AD (2010)** The diagnosis and treatment of deep infiltrating endometriosis. *Dtsch Aerzteblatt Online* 107:446–456
63. **Hanahan D, Folkman J (1996)** Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86:353–364
64. **Henriet E, Sala M, Abou Hammoud A, Tuarihionoa A, Di Martino J, Ros M, Saltel F (2018)** Multitasking discoidin domain receptors are involved in several and specific hallmarks of cancer. *Cell Adhes Migr* 12:363–377
65. **Hirai H, Maru Y, Hagiwara K, Nishida J, Takaku F (1987)** A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene. *Science* 238:1717–1720
66. **Hull ML, Charnock-Jones DS, Chan CLK, Bruner-Tran KL, Osteen KG, Tom BDM, Fan T-PD, Smith SK (2003)** Antiangiogenic agents are effective inhibitors of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2889–2899
67. **Jackson CJ, Nguyen M (1997)** Human microvascular endothelial cells differ from macrovascular endothelial cells in their expression of matrix metalloproteinases. *Int J Biochem Cell Biol* 29:1167–1177
68. **Justus CR, Leffler N, Ruiz-Echevarria M, Yang L V (2014)** In vitro cell migration and invasion assays. *J Vis Exp* 88:51046
69. **Klemmt PA, Starzinski-Powitz A (2018)** Molecular and cellular pathogenesis of endometriosis. *Curr Womens Health Rev* 14:106–116
70. **Koninckx PR, Kennedy SH, Barlow DH (1999)** Pathogenesis of endometriosis: The role of peritoneal fluid. *Gynecol Obstet Invest* 47:23–33
71. **Körbel C, Menger MD, Laschke MW (2010)** Size and spatial orientation of uterine tissue transplants on the peritoneum crucially determine the growth and cyst formation of endometriosis-like lesions in mice. *Hum Reprod* 25:2551–2558
72. **Körbel C, Gerstner MD, Menger MD, Laschke MW (2018)** Notch signaling controls sprouting angiogenesis of endometriotic lesions. *Angiogenesis* 21:37–46
73. **Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR, Lawley TJ (1988)** Role of laminin and

- basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J Cell Biol* 107:1589–1598
74. **Kumar S, West DC, Ager A (1987)** Heterogeneity in endothelial cells from large vessels and microvessels. *Differentiation* 36:57–70
75. **Lasch L (2017)** Endometriose. Berlin, Heidelberg: SpringerURL: http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-52809-9_7
76. **Laschke MW, Elitzsch A, Vollmar B, Menger MD (2005)** In vivo analysis of angiogenesis in endometriosis-like lesions by intravital fluorescence microscopy. *Fertil Steril* 84:1199–1209
77. **Laschke MW, Elitzsch A, Vollmar B, Vajkoczy P, Menger MD (2006)** Combined inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor, but not inhibition of VEGF alone, effectively suppresses angiogenesis and vessel maturation in endometriotic lesions. *Hum Reprod* 21:262–268
78. **Laschke MW, Elitzsch A, Scheuer C, Vollmar B, Menger MD (2007)** Selective cyclo-oxygenase-2 inhibition induces regression of autologous endometrial grafts by down-regulation of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis and stimulation of caspase-3-dependent apoptosis. *Fertil Steril* 87:163–171
79. **Laschke MW, Menger MD (2007)** In vitro and in vivo approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis. *Hum Reprod Update* 13:331–342
80. **Laschke MW, Rücker M, Jensen G, Carvalho C, Mülhaupt R, Gellrich N-C, Menger MD (2008)** Improvement of vascularization of PLGA scaffolds by inosculation of in situ-preformed functional blood vessels with the host microvasculature. *Ann Surg* 248:939–948
81. **Laschke MW, Körbel C, Rudzitis-Auth J, Gashaw I, Reinhardt M, Hauff P, Zollner TM, Menger MD (2010)** High-resolution ultrasound imaging: A novel technique for the noninvasive in vivo analysis of endometriotic lesion and cyst formation in small animal models. *Am J Pathol* 176:585–593
82. **Laschke MW, Giebels C, Nickels RM, Scheuer C, Menger MD (2011a)** Endothelial progenitor cells contribute to the vascularization of endometriotic lesions. *Am J Pathol* 178:442–450
83. **Laschke MW, Vollmar B, Menger MD (2011b)** The dorsal skinfold chamber: Window into the dynamic interaction of biomaterials with their surrounding host tissue. *Eur Cells Mater* 22:147–167
84. **Laschke MW, Menger MD (2012a)** Anti-angiogenic treatment strategies for the therapy of endometriosis. *Hum Reprod Update* 18:682–702

85. **Laschke MW, Menger MD (2012b)** Vascularization in tissue engineering: Angiogenesis versus inosculation. *Eur Surg Res* 48:85–92
86. **Laschke MW, Grässer C, Kleer S, Scheuer C, Eglin D, Alini M, Menger MD (2014)** Adipose tissue-derived microvascular fragments from aged donors exhibit an impaired vascularisation capacity. *Eur Cells Mater* 28:287–298
87. **Laschke MW, Menger MD (2016)** The dorsal skinfold chamber: A versatile tool for preclinical research in tissue engineering and regenerative medicine. *Eur Cells Mater* 32:202–215
88. **Laschke MW, Menger MD (2018)** Basic mechanisms of vascularization in endometriosis and their clinical implications. *Hum Reprod Update* 24:207–224
89. **Lauffenburger DA, Horwitz AF (1996)** Cell migration: A physically integrated molecular process. *Cell* 84:359–369
90. **Leyendecker G, Wildt L (2011)** A new concept of endometriosis and adenomyosis: Tissue injury and repair (TIAR). *Horm Mol Biol Clin Investig* 5:125–142
91. **Leyendecker G, Wildt L (2012)** Neue Erkenntnisse zur Pathophysiologie von Endometriose und Adenomyose: Tissue injury and repair (TIAR). Lampertheim: Exzellenzforschung in der Medizin, Nr.3 URL: http://www.gerhard-leyendecker.de/fileadmin/pdf/2012_1_forMed.pdf
92. **Luque-González MA, Reis RL, Kundu SC, Caballero D (2020)** Human microcirculation-on-chip models in cancer research: Key integration of lymphatic and blood vasculatures. *Adv Biosyst* 4:2000045
93. **Lv JH, Xia QY, Wang JJ, Shen Q, Zhang J, Zhou XJ (2016)** EphB4 promotes the proliferation, invasion, and angiogenesis of human colorectal cancer. *Exp Mol Pathol* 100:402–408
94. **Macer ML, Taylor HS (2012)** Endometriosis and infertility. A review of the pathogenesis and treatment of endometriosis-associated infertility. *Obstet Gynecol Clin North Am* 39:535–549
95. **Machado DE, Palumbo A, Santos JM, Mattos RM, Dos Santos TA, Seabra SH, Boldrini L da C, Perini JA, Nasciutti LE (2014)** A GFP endometriosis model reveals important morphological characteristics of the angiogenic process that govern benign and malignant diseases. *Histol Histopathol* 29:903–912
96. **Maekawa H, Oike Y, Kanda S, Ito Y, Yamada Y, Kurihara H, Nagai R, Suda T (2003)** Ephrin-B2 induces migration of endothelial cells through the phosphatidylinositol-3 kinase pathway and promotes angiogenesis in adult vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:2008–2014
97. **Marjoribanks J, Ayeleke RO, Farquhar C, Proctor M (2015)** Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for dysmenorrhoea. *Cochrane Database Syst Rev*

- 2015:CD001751
98. **Martiny-Baron G, Holzer P, Billy E, Schnell C, Brueggen J, Ferretti M, Schmiedeberg N, Wood JM, Furet P, Imbach P (2010)** The small molecule specific EphB4 kinase inhibitor NVP-BHG712 inhibits VEGF driven angiogenesis. *Angiogenesis* 13:259–267
99. **McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Smith SK (1996)** Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Hum Reprod* 11:220–223
100. **Meuleman C, Vandenabeele B, Fieuws S, Spiessens C, Timmerman D, D'Hooghe T (2009)** High prevalence of endometriosis in infertile women with normal ovulation and normospermic partners. *Fertil Steril* 92:68–74
101. **Moleiro AF, Conceição G, Leite-Moreira AF, Rocha-Sousa A (2017)** A critical analysis of the available in vitro and ex vivo methods to study retinal angiogenesis. *J Ophthalmol* 2017:3034953
102. **Nap AW, Griffioen AW, Dunselman GAJ, Bouma-Ter Steege JCA, Thijssen VLJL, Evers JLH, Groothuis PG (2004)** Antiangiogenesis therapy for endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 89:1089–1095
103. **National Library of Medicine (2023)** Study of the efficacy and safety of Tesevatinib in subjects with ADPKD. ClinicalTrials.gov URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03203642?tab=results#study-record-dates>
104. **Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J (2015)** Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta* 439:231–250
105. **Nenicu A, Körbel C, Gu Y, Menger MD, Laschke MW (2014)** Combined blockade of angiotensin II type 1 receptor and activation of peroxisome proliferator-activated receptor-γ by telmisartan effectively inhibits vascularization and growth of murine endometriosis-like lesions. *Hum Reprod* 29:1011–1024
106. **Nezhat C, Vang N, Tanaka PP, Nezhat C (2019)** Optimal management of endometriosis and pain. *Obstet Gynecol* 134:834–839
107. **Nicosia RF, Tchao R, Leighton J (1982)** Histotypic angiogenesis in vitro: Light microscopic, ultrastructural, and radioautographic studies. *In Vitro* 18:538–549
108. **Nisolle M, Casanas-Roux F, Anaf V, Mine JM, Donnez J (1993)** Morphometric study of the stromal vascularization in peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 59:681–684
109. **Nisolle M, Donnez J (1997)** Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril* 68:585–596
110. **Nolan T, Hands RE, Bustin SA (2006)** Quantification of mRNA using real-time RT-

- PCR. Nat Protoc 1:1559–1582
111. **Noren NK, Lu M, Freeman AL, Koolpe M, Pasquale EB (2004)** Interplay between EphB4 on tumor cells and vascular ephrin-B2 regulates tumor growth. Proc Natl Acad Sci U S A 101:5583–5588
112. **Parazzini F, Cipriani S, Moroni S, Crosignani PG, Ciavattini A, Garzetti G, Dolcetta G, Scollo M, Vicino M, Loverro G, Sabatelli S, Decca L, Falsetti L, Giacomucci E, Flamigni C, Mais V, Guerriero S, Boscia F, Sangiorgio G, Scollo P, Muriana A, La Greca M, Distefano C, Belloni C, Spolaor L, Bianchi A, Aretini M, Franchini M, Bracco GL, Coccia ME, Scarselli GF, Ciuffreda F, Fiscella C, Tinelli F, Demarzi CA, Bianco B, Iannelli A, Radaelli U, Meroni N, Federici D, Calia C, Vercellini P, Bertulessi C, Hanozet F, Busacca M, Dal Pozzo G, Pieroni A, Lita P, Bracciante R, Baiocchi G, Congiu MA, Fanfani R, Sesti F, Bonifacio S, Porpora MG, Pittino M, Del Frate G, Dessole S, Capobianco G, Montanino Oliva M, Primilerio M, Micalef S, Ansaldi E, Massobrio M, Guidetti D, Rosati M, Di Dionisio A, Bracalente G, Guaschino S, Troiano L, De Seta F, Santuz M, Petraglia F, Canducci E, Beretta P, De Santo D (2001)** Relationship between stage, site and morphological characteristics of pelvic endometriosis and pain. Hum Reprod 16:2668–2671
113. **Pasquale EB (2008)** Eph-Ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. Cell 133:38–52
114. **Pietanza MC, Gadgeel SM, Dowlati A, Lynch TJ, Salgia R, Rowland KM, Wertheim MS, Price KA, Riely GJ, Azzoli CG, Miller VA, Krug LM, Kris MG, Beumer JH, Tonda M, Mitchell B, Rizvi NA (2012)** Phase II study of the multitargeted tyrosine kinase inhibitor XL647 in patients with non-small-cell lung cancer. J Thorac Oncol 7:856–865
115. **Polyzos NP, Fatemi HM, Zavos A, Grimbizis G, Kyrou D, Velasco JG, Devroey P, Tarlatzis B, Papanikolaou EG (2011)** Aromatase inhibitors in post-menopausal endometriosis. Reprod Biol Endocrinol 9:90
116. **Pop-Trajkovic Dinic S, Popovic J, Zivadinovic R, Mitic D, Antic V, Trenkic M (2017)** Laparoscopic surgery in the treatment of endometriosis. IntechOpen, Rijeka, Croatia. URL: <http://dx.doi.org/10.5772/65544>
117. **Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P (2011)** Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. Cell 146:873–887
118. **Prescott J, Farland L V., Tobias DK, Gaskins AJ, Spiegelman D, Chavarro JE, Rich-Edwards JW, Barbieri RL, Missmer SA (2016)** A prospective cohort study of endometriosis and subsequent risk of infertility. Hum Reprod 31:1475–1482
119. **Reis FM, Coutinho LM, Vannuccini S, Batteux F, Chapron C, Petraglia F (2020)**

- Progesterone receptor ligands for the treatment of endometriosis: The mechanisms behind therapeutic success and failure. *Hum Reprod Update* 26:565–585
120. **Risau W, Flamme I (1995)** Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:73–91
121. **Risau W (1997)** Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386:671–674
122. **Rudzitis-Auth J, Körbel C, Scheuer C, Menger MD, Laschke MW (2012)** Xanthohumol inhibits growth and vascularization of developing endometriotic lesions. *Hum Reprod* 27:1735–1744
123. **Rudzitis-Auth J, Nenicu A, Nickels RM, Menger MD, Laschke MW (2016)** Estrogen stimulates homing of endothelial progenitor cells to endometriotic lesions. *Am J Pathol* 186:2129–2142
124. **Rudzitis-Auth J, Nickels RM, Menger MD, Laschke MW (2018)** Inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses the recruitment of endothelial progenitor cells in the microvasculature of endometriotic lesions. *Am J Pathol* 188:450–460
125. **Rudzitis-Auth J, Fuß SA, Becker V, Menger MD, Laschke MW (2020)** Inhibition of erythropoietin-producing hepatoma receptor B4 (EphB4) signalling suppresses the vascularisation and growth of endometriotic lesions. *Br J Pharmacol* 177:3225–3239
126. **Salvucci O, Sierra MDLL, Martina JA, McCormick PJ, Tosato G (2006)** EphB2 and EphB4 receptors forward signaling promotes SDF-1-induced endothelial cell chemotaxis and branching remodeling. *Blood* 108:2914–2922
127. **Sampson JA (1927)** Metastatic or embolic endometriosis, due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the venous circulation. *Am J Pathol* 3:93–110
128. **Saunders PTK, Horne AW (2021)** Endometriosis: Etiology, pathobiology, and therapeutic prospects. *Cell* 184:2807–2824
129. **Schmitt F, Nguyen PH, Gupta N, Mayer D (2013)** Eph receptor B4 is a regulator of estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *J Recept Signal Transduct* 33:244–248
130. **Schmittgen TD, Livak KJ (2008)** Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc* 3:1101–1108
131. **Simoens S, Dunselman G, Dirksen C, Hummelshøj L, Bokor A, Brandes I, Brodszky V, Canis M, Colombo GL, Deleire T, Falcone T, Graham B, Halis G, Horne A, Kanj O, Kjer JJ, Kristensen J, Lebovic D, Mueller M, Vigano P, Wullschleger M, Dhooghe T (2012)** The burden of endometriosis: Costs and quality of life of women with endometriosis and treated in referral centres. *Hum Reprod* 27:1292–1299
132. **Somigliana E, Vigano' P, Parazzini F, Stoppelli S, Giambattista E, Vercellini P (2006)** Association between endometriosis and cancer: A comprehensive review and a critical analysis of clinical and epidemiological evidence. *Gynecol Oncol* 101:331–

- 341
133. **Sourial S, Tempest N, Hapangama DK (2014)** Theories on the pathogenesis of endometriosis. *Int J Reprod Med* 2014:179515
134. **Steinle JJ, Meininger CJ, Forough R, Wu G, Wu MH, Granger HJ (2002)** Eph B4 receptor signaling mediates endothelial cell migration and proliferation via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem* 277:43830–43835
135. **Taylor RN, Lebovic DI, Mueller MD (2002)** Angiogenic factors in endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 955:89–100
136. **Tung JJ, Tattersall IW, Kitajewski J (2012)** Tips, stalks, tubes: Notch-mediated cell fate determination and mechanisms of tubulogenesis during angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a006601
137. **Tuttlies F, Keckstein J, Ulrich U, Possover M, Schweppe KW, Wustlich M, Buchweitz O, Greb R, Kandolf O, Mangold R, Masetti W, Neis K, Rauter G, Reeka N, Richter O, Schindler AE, Sillem M, Terruhn V, Tinneberg HR (2005)** ENZIAN-Score, eine Klassifikation der tief infiltrierenden Endometriose. *Zentralbl Gynakol* 127:275–281
138. **Unzue A, Lafleur K, Zhao H, Zhou T, Dong J, Kolb P, Liebl J, Zahler S, Caflisch A, Nevado C (2016)** Three stories on Eph kinase inhibitors: From in silico discovery to in vivo validation. *Eur J Med Chem* 112:347–366
139. **Virani S, Edwards AK, Thomas R, Childs T, Tayade C (2013)** Blocking of stromal cell-derived factor-1 reduces neoangiogenesis in human endometriosis lesions in a mouse model. *Am J Reprod Immunol* 70:386–397
140. **Wang Y, Nakayama M, Pitulescu ME, Schmidt TS, Bochenek ML, Sakakibara A, Adams S, Davy A, Deutsch U, Lüthi U, Barberis A, Benjamin LE, Mäkinen T, Nobes CD, Adams RH (2010)** Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature* 465:483–486
141. **Werner TL, Wade ML, Agarwal N, Boucher K, Patel J, Luebke A, Sharma S (2015)** A pilot study of JI-101, an inhibitor of VEGFR-2, PDGFR- β , and EphB4 receptors, in combination with everolimus and as a single agent in an ovarian cancer expansion cohort. *Invest New Drugs* 33:1217–1224
142. **Wu D, Hu M, Hong L, Hong S, Ding W, Min J, Fang G, Guo W (2014)** Clinical efficacy of add-back therapy in treatment of endometriosis: A meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet* 290:513–523
143. **Xie L, Dai Z, Pang C, Lin D, Zheng M (2018)** Cellular glucose metabolism is essential for the reduction of cell-impermeable water-soluble tetrazolium (WST) dyes. *Int J Biol Sci* 14:1535–1544
144. **Yang D, Jin C, Ma H, Huang M, Shi GP, Wang J, Xiang M (2016)** EphrinB2/EphB4

- pathway in postnatal angiogenesis: A potential therapeutic target for ischemic cardiovascular disease. *Angiogenesis* 19:297–309
145. **Yang L, Liu HY (2014)** Small RNA molecules in endometriosis: Pathogenesis and therapeutic aspects. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 183:83–88
146. **Yerlikaya G, Balandran S, Pröstling K, Reischer T, Birner P, Wenzl R, Kuessel L, Streubel B, Husslein H (2016)** Comprehensive study of angiogenic factors in women with endometriosis compared to women without endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 204:88–98
147. **You C, Zhao K, Dammann P, Keyvani K, Kreitschmann-Andermahr I, Sure U, Zhu Y (2017)** EphB4 forward signalling mediates angiogenesis caused by CCM3/PDCD10-ablation. *J Cell Mol Med* 21:1848–1858
148. **Zamah NM, Dodson MG, Clifton Stephens L, Buttram VC, Besch PK, Kaufman RH (1984)** Transplantation of normal and ectopic human endometrial tissue into athymic nude mice. *Am J Obstet Gynecol* 149:591–597

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt haben. Insbesondere gilt mein Dank den folgenden Personen, ohne deren Hilfe die Anfertigung dieser Doktorarbeit niemals zustande gekommen wäre:

Ich danke Herrn Prof. Dr. Michael D. Menger für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie in Homburg tätig sein zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Matthias W. Laschke danke ich ganz herzlich für die inhaltliche Unterstützung während der gesamten Arbeit und für die Präparation des Aortenring-Assays. Seine Beratung und Kritik haben ganz wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Jeannette Rudzitis-Auth für ihre hervorragende Betreuung. Dies umfasst nicht nur die Anleitung im Erlernen der chirurgischen Techniken und ihre Mithilfe bei der Durchführung der Tierexperimente, deren Auswertungen und die Statistikanalysen, sondern auch viele motivierenden Worte während der gesamten Arbeit. Außerdem danke ich ihr ganz herzlich für die Übernahme der Ultraschallanalysen.

Ich danke Frau Vivien Becker für die Durchführung der PCR-Analysen und für die Hilfestellung im molekularbiologischen Teil.

Frau Dr. Claudia Scheuer, Julia Parakenings und Sandra Hans danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der WST- und LDH-Assays.

Ruth Nickels und Caroline Bickelmann danke ich für ihre Mithilfe bei den *in vivo* Experimenten und für die histologische Aufarbeitung der Gewebepräparate. Ebenso danke ich Janine Becker für ihre Hilfe bei der Anfertigung der immunhistochemischen Präparate.

Ich danke allen Tierpfleger/-innen und Mitarbeiter/-innen des Instituts für ihre freundliche Unterstützung, Hilfsbereitschaft und ihren Teamgeist während der gesamten Zeit.

Meiner Familie und insbesondere meiner Mutter, die bedingungslos meinen Werdegang unterstützt und für mich da sind, danke ich von ganzem Herzen.

10. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

11. Publikation

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind in folgender Publikation zusammengefasst:

Rudzitis-Auth J, **Fuß SA**, Becker V, Menger MD, Laschke MW (2020) Inhibition of erythropoietin-producing hepatoma receptor B4 (EphB4) signalling suppresses the vascularisation and growth of endometriotic lesions. *Br J Pharmacol* 177:3225–3239

Datum: 26. November 2025
Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. M. Hannig
Berichterstatter: Prof. Dr. Matthias Werner Laschke
Prof. Dr. Erich Solomayer