

**Untersuchung der funktionellen Rolle von mesenchymalen Stroma-
/Stammzellen in der Entwicklung der humanen Plazenta mit weiterer
Exploration ihrer Funktion in der Pathogenese der Präeklampsie**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Sophia Indira Romberg, 25.06.1996
aus Berlin

Gießen 2025

**Untersuchung der funktionellen Rolle von mesenchymalen Stroma-
/Stammzellen in der Entwicklung der humanen Plazenta mit weiterer
Exploration ihrer Funktion in der Pathogenese der Präeklampsie**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Sophia Indira Romberg
aus Berlin

Gießen 2025

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Biochemisches Institut

Gutachterin: Prof. Dr. Tikkanen, Ritva

Gutachterin: Prof. Dr. Yuan, Juping

Tag der Disputation: 06.11.2025

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Plazentaentwicklung.....	1
1.1.1	Extravillöser Trophoblast/ invasiver Trophoblast.....	5
1.1.2	Umbau der Spiralarterien	8
1.1.3	Synzytiotrophoblast.....	9
1.2	Mesenchymale Stroma-/ Stammzellen (MSCs)	10
1.2.1	MSCs der Plazenta	12
1.3	Präeklampsie.....	14
1.4	Primäres Zilium	21
1.4.1	Hedgehog Signalweg.....	23
1.4.2	Primäres Zilium der Mesenchymalen Stammzellen.....	25
1.5	Trophoblastorganoide	25
1.6	Ziele der Arbeit.....	26
2	Material und Methoden.....	27
2.1	Patientinnenkollektiv	27
2.2	Material.....	28
2.2.1	Laborgeräte.....	28
2.2.2	Programmausstattung	29
2.2.3	Puffer und Lösungen	29
2.2.4	Zellkultur.....	32
2.2.5	Zelllinien	33
2.2.6	Primärisolation	34
2.2.7	Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenzfärbung.....	34
2.2.8	RNA-Isolation und Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion	35
2.2.9	In-vitro-Versuche	35
2.2.10	ELISA.....	36
2.3	Methoden, Messmethoden.....	36
2.3.1	Zellkultur.....	36
2.3.2	Isolation von Mesenchymalen Zellen aus humanen Plazentazotten (hCV-MSCs).....	37
2.3.3	Isolation von humanen Endothelzellen der V. umbilicalis (HUVECs)	38
2.3.4	Immunfluoreszenz.....	39
2.3.5	RNA-Isolation und Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion	40
2.3.6	Charakterisierung der hCV-MSCs	40
2.3.7	Standardisierter Überstand	41
2.3.8	Funktionelle Assays der hCV-MSCs	41
2.3.9	Interaktion zwischen hCV-MSCs und EVT, indirekte Ko-Kultivierung	44
2.3.10	Interaktion zwischen hCV-MSCs und EVT, direkte Ko-Kultivierung ...	47
2.3.11	Tube-formation-Assay	48
2.3.12	ELISA.....	48
2.3.13	Trophoblastorganoide.....	48
2.3.14	Statistische Tests	49
3	Ergebnisse.....	50

3.1	Isolation und Charakterisierung von MSCs aus der humanen Plazenta	50
3.1.1	Isolation von MSCs aus Chorionzotten (hCV-MSCs)	50
3.1.2	CD-Marker und Zytoskelett	50
3.1.3	Zellzyklus	51
3.1.4	Viabilität	52
3.2	Funktionelle Eigenschaften von hCV-MSCs	53
3.2.1	Zilien: Länge, Anteil der zilientragenden Zellen, Signalübertragung	53
3.2.2	Motilität	59
3.2.3	Differenzierung	60
3.2.4	Homing-Fähigkeit	63
3.2.5	VEGF-A- und PlGF-Expression und Sekretion der hCV-MSCs	64
3.3	Interaktion mit extravillösen Trophoblasten	66
3.3.1	Die Zilienausbildung von HTRs wird durch hCV-MSCs beeinflusst	67
3.3.2	Einfluss von hCV-MSCs auf die Funktionalität von EVT-Zelllinien	68
3.3.3	1. Trim-hCV-MSCs fördern die Angiogenese von HTRs und HUVECs	76
3.4	Trophoblastorganoide	78
4	Diskussion	81
4.1	hCV-MSCs bilden Zilien aus, die während der Plazentaentwicklung reguliert werden	81
4.2	Einfluss der hCV-MSCs auf die Plazentaentwicklung	82
4.2.1	Verbesserung der EVT- und HUVEC-Eigenschaften durch hCV-MSCs	83
4.3	PE-hCV-MSCs besitzen defekte primäre Zilien und sind funktionell beeinträchtigt	87
4.4	PE-hCV-MSCs besitzen einen negativen Einfluss auf die Ziliogenese von HTRs und führen wahrscheinlich zur Aufrechterhaltung und weiteren Progression der PE	89
4.5	(Zellkultur-) Modelle zur Plazentaerforschung und ihre Limitationen	92
5	Ausblick	95
5.1	Weiterentwicklung gängiger Zellkulturmodelle und Versuchsprotokolle	95
5.2	MSCs für Zell basierte Therapien der Präeklampsie	96
6	Zusammenfassung	97
7	Verzeichnis und Abkürzungen	99
7.1	Abbildungsverzeichnis	99
7.2	Tabellenverzeichnis	99
7.3	Abkürzungen	100
8	Literaturverzeichnis	102
9	Publikationsverzeichnis	128
10	Danksagung	129
11	Ehrenwörtliche Erklärung	131

1 Einleitung

Die Plazenta ist ein komplexes und hochdifferenziertes Organ, das während der Schwangerschaft für die Entwicklung des menschlichen Fetus unerlässlich ist. Sie ist bei Menschen diskusförmig und besteht aus der Chorionplatte und der Basalplatte, zwischen denen das Zottenkompartiment und der intervillöse Raum liegen. Das mütterliche Blut durchströmt diesen Raum und zirkuliert ohne eigene Gefäßwand direkt um die Plazentazotten. Die Plazenta entsteht aus fötalem und mütterlichem Gewebe und entwickelt sich innerhalb kurzer Zeit (Cindrova-Davies und Sferruzzi-Perri 2022). Sie ermöglicht die Versorgung des Embryos mit Nährstoffen und den Abtransport von toxischen Stoffwechselprodukten. Sie erfüllt auch wichtige endokrine Funktionen und wirkt als selektive Barriere, die den Fötus vor mütterlichen und umweltbedingten Stressfaktoren, wie mütterlichen Hormonen, Xenobiotika (Kotta-Loizou et al. 2024), Krankheitserregern und Parasiten zum Teil abschirmt (Zeldovich et al. 2013).

Aufgrund der komplexen und streng regulierten Entwicklung können Fehler während des gesamten Prozesses schwerwiegende gesundheitliche Probleme verursachen. So kann es beispielsweise zu einer fetalen Wachstumsrestriktion des Ungeborenen kommen (Gumina und Su 2023) oder die Mutter kann durch Präeklampsie oder das HELLP-Syndrom (*engl.* hemolysis, elevated liver enzyme levels, and low platelet levels) gefährdet werden (Aplin et al. 2020; Petca et al. 2022).

Mesenchymale Stroma-/ Stammzellen (MSCs) mit ihren vielfältigen unterstützenden Eigenschaften sind bereits Gegenstand vieler Forschungsfelder. Ihre spezifischen Funktionen in der Plazentaentwicklung und ihre Rolle bei schwangerschaftsassoziierten Erkrankungen bleiben jedoch weitgehend ungeklärt. Die Regulationsmechanismen der MSCs während der Plazentaentwicklung sowie die Ursachen ihrer Dysfunktion in präeklampsischen Plazenten sind zentrale Fragestellungen dieser Doktorarbeit.

1.1 Plazentaentwicklung

Nach der Befruchtung der Eizelle proliferiert die Zygote und wird in das Cavum uteri befördert, wo physiologisch am 6.-7. Tag post conceptionem (p.c.) die Implantation stattfindet. Die äußeren Zellen des Blastomers entwickeln sich zu trophoektodermalen Zellen, den Vorläufern der Trophoblastenzellen, dies stellt die erste Differenzierung der Embryogenese dar. Abzugrenzen ist eine innere Zellmasse, die mit Epi- und Hypoblast

die Vorläuferzellen des Embryos und des Extraembryonalen Mesoderms darstellt (Knöfler et al. 2019). Bei diesem Differenzierungsschritt wird die Pluripotenz der Zellen im Gegensatz zu murinen nicht eingeschränkt, der Epiblast kann auch wieder zu Trophoektoderm differenzieren (Guo et al. 2021).

Am Ende des so genannten Morula-Stadiums, das etwa 16-32 Blastomere enthält, fördern die Blastozysten Flüssigkeit in den extrazellulären Raum. Dadurch entsteht ein Spaltraum, die Blastozystenhöhle, die das Merkmal der Blastozyste ist (Bischof und Irminger-Finger 2005).

Zur Vorbereitung der Adhäsion und Migration von Trophoblastzellen erfolgt eine Progesteron vermittelte Differenzierung des Endometriums. Dieser Prozess ist durch Angiogenese, eine Migration natürlicher Killerzellen in das Endometrium und die Differenzierung endometrialer Stromazellen in sekretorische Dezidualzellen gekennzeichnet (Gellersen et al. 2007). Die Trophoblasten in der Nähe der Embryoblasten leiten die Adhäsion und Invasion. Während der Einnistung proliferiert der jetzt so genannte Zytotrophoblast stark und wird mehrschichtig. Dünne Falten der Zytotrophoblasten, die Invadopodien, dringen bis zur Basalmembran vor und verdauen diese. Nun verschmelzen die äußeren Zytotrophoblasten (CTB) zu einem mehrkernigen Synzytium, dem Synzytiotrophoblast (STB). Das invasive Wachstum setzt sich fort und um den 9. Tag p.c. erscheinen die ersten Vakuolen im primitiven Synzytium und verschmelzen zu lakunären Räumen (Knöfler et al. 2019). Während dieser Phase wächst der Synzytiotrophoblast um den Embryo und umschließt ihn vollständig. Die allmählich wachsenden und verschmelzenden Vakuolen erzeugen trabekelförmige Strukturen des Synzytiotrophoblasten, die sich vom Embryo bis zur mütterlichen Seite fortsetzen. Zytotrophoblasten proliferieren unter dem Synzytiotrophoblast und wandern in das synzytiale Trabekelwerk ein, wodurch primäre Zotten gebildet werden, die zottenartige Phase beginnt (Knöfler et al. 2019). Aus den Zotten dringen die Trophoblasten in die Dezidua ein und sorgen zuerst für den Anschluss von Drüsenausführungsgängen an den Intervillösen Raum, um die histiotopische Ernährung zu gewährleisten. Anschließend wandern sie zu Arterien, Venen und Lymphgefäßen, eröffnen diese und im Fall der Arterien blocken sie diese zunächst als Pfropfen (Silini et al. 2020).

Das extraembryonale Mesoderm breitet sich in die primären Zotten aus und verwandelt sie dadurch in sekundäre Zotten. Die Vaskularisierung ist der nächste Schritt in der

Zottenreifung. Ausgehend vom extraembryonalen Mesoderm entwickeln sich hämangiogene Foci zu primitiven Endothelschläuchen, die eine Basis für die weitere Expansion des plazentaren Gefäßnetzes bilden. Um den 17. Tag p.c. beginnt die Umwandlung in vaskularisierte tertiäre Zotten (Knöfler et al. 2019).

Der hämatogene utero-plazentare Kreislauf ist erst ab dem 32. Tag p.c. etabliert, so dass vorher die plazentare Hämangiogenese und Vaskulogenese vollständig aus dem extraembryonalen Mesoderm der Plazenta stammen (Gumina und Su 2023). Am Ende des ersten Trimenons sind fast alle Zotten vaskularisierte Tertiärzotten. Um die Zotten herum sind die Vakuolen vollständig zu dem Intervillarraum (IVR) verschmolzen. Zunächst ist dieses Kompartiment mit dem nährstoff- und wachstumsfaktorreichen Sekret der Uterusdrüsen gefüllt. Zusätzlich ermöglichen schmale Kanäle in den Trophoblastenpropfen ab der 6.–7.

Schwangerschaftswoche einen begrenzten Fluss maternalen Plasmas in den intervillösen

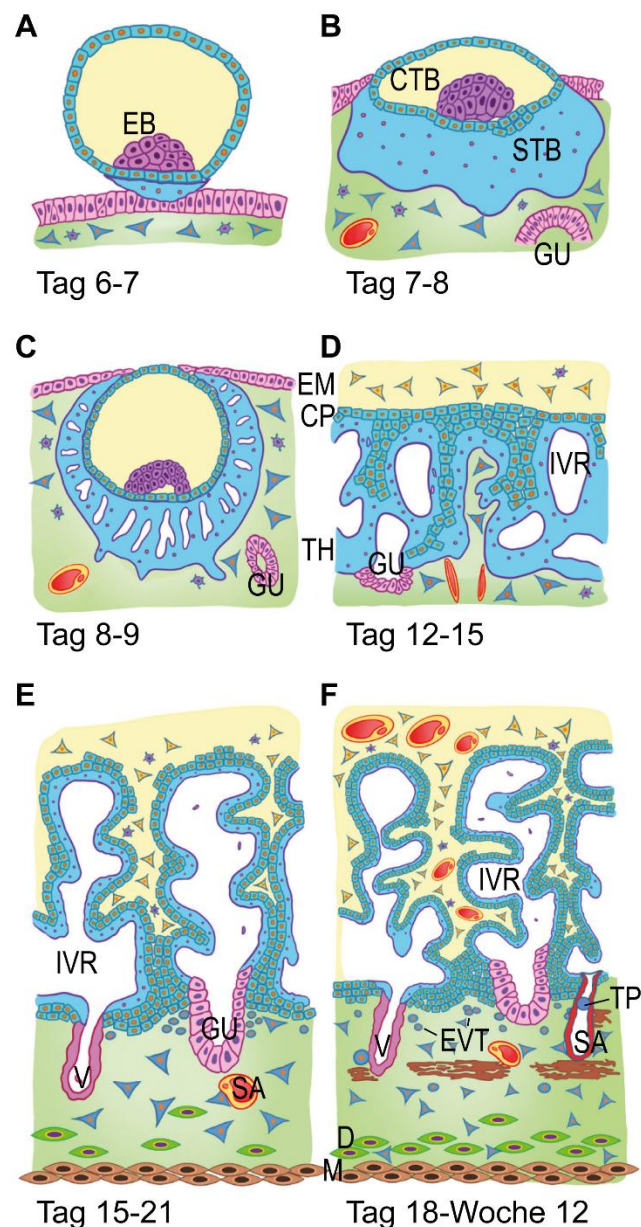


Abbildung 1: Stadien der Plazentaentwicklung (A) Implantation; (B) prälakunäre Periode; (C) Beginn der lakunären Periode; (D) Übergang von der lakunären Periode zum primären Zottenstadium; (E) sekundäres Zottenstadium; (F) tertiäres Zottenstadium. TP, Trophoblastenpropf; CP, primäre Chorionplatte; CTB, Zytotrophoblast; D, Dezidua; EB, Embryoblast; GU, Glandula uterina; EM, extraembryonales Mesoderm; EVT, extravillöser Trophoblast; IVR, Intervillarraum; M, Myometrium; SA, Spinalarterie; STB, Syncytiotrophoblast; TH, Trophoblastenhülle; UV, Nabelvene. Abgeändert aus (Silini et al. 2020).

Raum (Roberts et al. 2017). Zu Beginn des zweiten Trimenons lösen sich die Trophoblastenpfropfen und der IVR füllt sich mit maternalem Blut (Sato 2020).

Die Plazentaschranke zwischen mütterlichem und fötalem Kreislauf besteht aus dem Synzytiotrophoblast mit direktem Kontakt zum mütterlichen Blut, den Zyto, der Basalmembran des villösen Trophoblasten, dem villösen Mesenchym, der Basalmembran des Endothels und den Endothelzellen der Tertiärzotten (Cindrova-Davies und Sferruzzi-Perri 2022). In späteren Phasen der Schwangerschaft werden alle dieser Komponenten modifiziert, um die Diffusionsstrecke zu verringern (Kingdom et al. 2000). Anfangs sind die Nuclei des Synzytiums fast kontinuierlich angereiht, im dritten Trimester sind sie in Gruppen organisiert. Die Zytotrophoblasten bilden zunächst eine durchgehende Schicht und vereinzeln sich später. Auch das mesenchymale Stroma verringert sich dort, wo die Gefäße unter der Trophoblastenmembran liegen, um die Diffusionskapazität in fortgeschrittenem Schwangerschafts-stadium zu optimieren (Arumugasaamy et al. 2020).

Die Zotten, die die mütterliche Dezidua erreichen und mit ihr verbunden sind, werden als Ankerzotten bezeichnet und enthalten an ihren distalen Enden Säulen von Zytotrophoblasten. Aus den proliferativen Zellen innerhalb der Säulen differenzieren sich invasive extravillöse Trophoblasten, die in das mütterliche Gewebe eindringen und Trophoblasten, die die äußere Hülle der Plazenta bilden. Sie ist die Grenzfläche zum maternalen Gewebe und ist für die Verankerung in der Dezidua und den Schutz vor oxidativem Stress zuständig (Burton und Jauniaux 2017). Somit steht der Synzytiotrophoblast nicht in Kontakt mit dem mütterlichen Gewebe. Die Zellen im inneren der Zytotrophoblastenhülle sind undifferenziert, durch Kontakt mit dem Endometrium differenzieren sie hin zu einem mesenchymalen Phänotyp und dringen in das Endometrium vor (Burton et al. 2021). Burton und Jauniaux (2017) bringen eine dünne und bruchstückhafte Ausbildung der Hülle mit Schwangerschaftspathologien wie Abort, Wachstumsrestriktion, Präeklampsie, vorzeitigem Blasensprung und Frühgeburt in Zusammenhang.

Während der gesamten Schwangerschaft wächst der Zottenbaum, da auf der Oberfläche der großen Zotten Synzytialknospen entstehen. Die äußere Schicht der Ausstülpung, der Synzytiotrophoblast, ist mit Zytotrophoblasten gefüllt, sodass ihre Struktur zunächst der von Primärzotten gleicht (Soni et al. 2024). Anschließend wachsen Mesenchym und

Gefäße hinein wodurch sich Tertiärzotten entwickeln. Ankerzotten, die die Dezidua erreichen, können von Schwimmzotten unterschieden werden (Turco und Moffett 2019).

1.1.1 Extravillöser Trophoblast/ invasiver Trophoblast

Die Zytotrophoblasten außerhalb der Zotten, die extravillösen Trophoblasten (EVTs), sind für die physiologische Entwicklung der Plazenta unerlässlich. Zu ihren Hauptaufgaben gehören die Eruption von Drüsen und Gefäßen, die Befestigung der Plazenta an der Gebärmutter sowie die immunologische Akzeptanz des Plazentagewebes (Moser et al. 2017; Ma et al. 2024). Aufgrund ihrer unterschiedlichen Funktionen finden sie sich in verschiedenen Phänotypen. Sie ähneln sich jedoch in ihrem nicht-proliferativen Charakter (Knöfler et al. 2019).

Die Differenzierung zu EVTs erfolgt an den Spitzen der Ankerzotten in den Zellsäulen. Die ersten Schritte der Differenzierung verlaufen gleich und können unter dem Schlagwort epithelial-mesenchymale Transition (EMT) zusammengefasst werden (DaSilva-Arnold et al. 2015; Choudhury et al. 2022). Dieser Prozess ist charakterisiert durch den Verlust der Zellpolarität, Änderungen der Zellmembran- und Zellverbindungsproteine, der extrazellulären Proteinzusammensetzung, der Zytoskelettzusammensetzung und der Hochregulierung von EZM (Extrazellulärmatrix)-zersetzenden Proteinasen. E-Cadherin wird durch N-Cadherin ersetzt. Der Phänotyp verändert sich hin zu einem mesenchymalen mit der Ausbildung von Pseudopodien und mit Vimentin als Zytoskelettbestandteil. Als neue EZM Komponente wird Fibronectin I sezerniert und durch Matrix-Metalloproteinasen (MMP) wird die umgebende Matrixbarriere abgebaut und die EVT können durch das Gewebe migrieren (Lamouille et al. 2014; Huang et al. 2022). Diese Prozesse werden von den EMT-assoziierten Transkriptionsfaktoren Twist, Snail, zinc-finger E-box-binding (ZEB) gesteuert und über unterschiedliche Signalwege wie transforming growth factor- β (TGF- β), Hedgehog und Hippo vermittelt (Huang et al. 2022). Als regulierende Einflüsse auf die EMT in Trophoblasten wurden Hypoxie (Wakeland et al. 2017), Mikro-RNA (miRNA) und weitere epigenetische Veränderungen identifiziert (Choudhury et al. 2022).

Im Gegensatz zu Karzinomzellen, die auch eine EMT durchlaufen, ist die Invasion der EVTs durch verschiedene Faktoren reguliert und sie migrieren physiologischer Weise bis in das erste Drittel des Myometriums (Abbas et al. 2020). Hieran ist unter anderem die Interaktion mit maternalen Immunzellen beteiligt, die über die Major-

Histokompatibilitäts-Komplexe (MHC) Typ-I der EVT verläuft. Durch die einzigartige Kombination von klassischen HLA-C- (humanes Leukozytenantigen) und nicht-klassischen HLA-E-, HLA-F- und HLA-G-Liganden der EVT ist die Kommunikation mit natürlichen Killerzellen gewährleistet (Pollheimer et al. 2018). Auch die proteolytischen Abbauprodukte der MMP beeinflussen die Invasion der EVT (Pollheimer et al. 2018). Darüber hinaus sind temporale und räumliche Faktoren von Bedeutung sowie die Zell-Zell-Interaktion mit weiteren Zellen der Dezidua (Abbas et al. 2020).

Durch eine fehlerhafte oberflächliche Invasion der EVTs entstehen Pathologien wie Präeklampsie (Natenzon et al. 2022) und fetale Wachstumsrestriktion (Meakin et al. 2022). Dagegen resultiert aus fehlerhafter tiefer Invasion das Erkrankungsbild der Plazenta accreta (DaSilva-Arnold et al. 2018). Diese Invasionsanomalien der EVTs können mit einer gestörten EMT in Verbindung gebracht werden. Die genauen Regulationsmechanismen der EMT und EVT-Invasion bedürfen noch weiter Aufschlüsselung (Choudhury et al. 2022).

Etwa in der zweiten Woche p.c. können interstitielle Zytotrophoblasten, die in die Dezidua eindringen, von endoglandulären und endovaskulären Trophoblasten unterschieden werden (Knöfler et al. 2019). Im ersten Trimester sind bereits Komponenten des Drüsensekrets im intervillösen Raum vorhanden (Burton et al. 2007). Daraus kann geschlossen werden, dass die uterinen Drüsen die ersten Strukturen sind, die der extravillöse Trophoblast modifiziert. Die sogenannten endoglandulären Trophoblasten wurden erstmals von Moser et al. (2010) beschrieben. Während des gesamten ersten Trimesters stehen EVTs in engem Kontakt mit den Drüsenausführungsgängen und können auch im Drüsenepithel nachgewiesen werden. Durch den Prozess der Invasion und Eruption der endoglandulären Trophoblasten werden die Uterusdrüsen mit dem intervillösen Raum verbunden, und die histiotrophe Ernährung des Embryos wird sichergestellt (Knöfler et al. 2019). Unter den im Drüsensekret enthaltenen Wachstumsfaktoren befinden sich der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) oder der Leukämie-Inhibitorfaktor (LIF). Diese können eine Rolle bei der Regulierung der Morphogenese der Plazenta spielen (Burton et al. 2007). Somit ist die Plazenta selber an ihrer Morphogenese beteiligt.

Weitere Strukturen, die von den EVTs modifiziert werden, sind Lymphgefäße und Venen, um den Abfluss aus dem IVR und dem umgebenden Gewebe sicherzustellen, und die

Arterien für den Zufluss von nährstoffreichem, maternalen Blut in den IVR. Noch bevor die maternale-plazentare Zirkulation etabliert ist, können EVT-spezifische Enzyme im Serum der Schwangeren nachgewiesen werden, was für eine frühe Modifikation der Lymphgefäße spricht (Moser et al. 2017). Die endoarteriellen Trophoblasten bilden bei der Modifikation der Spiralarterien einen Propfen im Lumen, durch den nur Plasma den IVR erreicht (Roberts et al. 2017). Erst zu Beginn des zweiten Trimesters erlauben enge Kanäle in den Trophoblastenpfropfen einen begrenzten Blutfluss in den IVR (Knöfler et al. 2019). Durch diesen limitierten Blutfluss entsteht ein physiologischer Sauerstoffgradient zwischen der Mutter und der Plazenta. Bis zum Ende des ersten Trimesters liegt der normoxische Sauerstoffgehalt für die Plazenta unter 20 mmHg (Weiss et al. 2016). Dabei ist zu beachten, dass die Trophoblastenpfropfen die Plazenta vor oxidativem Stress schützen (Pollheimer et al. 2018).

Eine weitere wichtige Funktion der EVTs ist die Vermittlung der Immunakzeptanz des Plazentagewebes, indem sie mit verschiedenen Immunzellen interagieren. EVTs exprimieren HLA I, jedoch kein HLA II, sodass die T-Helferzellen (CD4+) nicht mit ihnen interagieren können. Die Expression der HLA-Klasse I umfasst HLA -C, -G und -E. Nur HLA-C unterscheidet sich von dem der Mutter. HLA-G kann an einen inhibitorischen Rezeptor (LILRB1, *engl.* Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 1) binden, der von allen dezidualen antigenpräsentierenden Zellen exprimiert wird. Daher ist die Immunantwort wahrscheinlich eher tolerogen (Moffett et al. 2017).

Der Kontakt der EVTs mit Myometriummzellen induziert einen letzten Differenzierungsschritt zu den vielkernigen Trophoblasten-Riesenzellen und sie verlieren ihre invasive Fähigkeit (Knöfler et al. 2019). Die Expression entsprechender Integrine verankert sie an der EZM, sodass sie nur selten Kontakt zu mütterlichen Zellen haben. Auch Jahre nach einer Schwangerschaft können diese Zellen noch im Myometrium gefunden werden (Baergen et al. 2022).

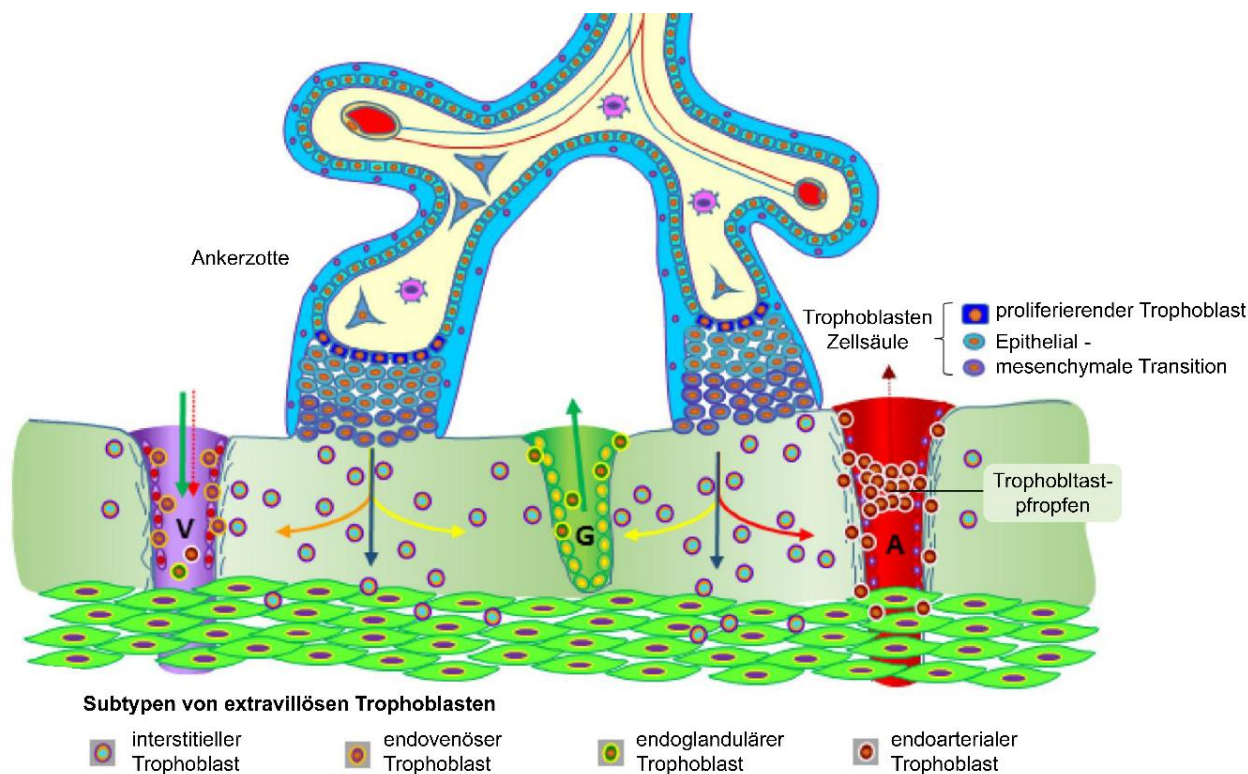


Abbildung 2: Wege der invasiven Trophoblasten im ersten Trimester

An den Spitzen der Ankerzotten proliferieren Trophoblasten zu Zellsäulen. Darin findet die epithelial-mesenchymale Transition statt, die Trophoblasten erlangen einen invasiven Charakter. Die invasiven Trophoblasten dringen in das Gebärmuttergewebe ein und differenzieren sich weiter zu endovaskulären, endoglandulären und endoarteriellen Trophoblasten und modifizieren Venen, Drüsenausgänge und Arterien und ersetzen teilweise ihr Endothel/Epithel. V, Vene; G, Glandula; A, Spiralarterie mit Trophoblastenpfropfen. Abgeändert aus (Silini et al. 2020).

1.1.2 Umbau der Spiralarterien

Die interstitiellen Trophoblasten, die in die Dezidua eindringen, unterstützen den Umbau der Spiralarterien während der Frühschwangerschaft, indem sie die Kontraktionsfähigkeit der glatten Muskelschicht um die Spiralarterien durch Apoptose oder Dedifferenzierung verringern (Knöfler et al. 2019). Zellen, die in die Arterien eindringen, differenzieren sich durch Phänokopie von EVT's zu Endothelzellen (Bischof und Irminger-Finger 2005).

Die Spiralarterien besitzen in ihrer Media glatte Muskelzellen, die sensitiv auf endokrine und vasoaktive Stimuli reagieren. Um eine von der systemischen Vasoregulation entkoppelte arterielle Versorgung der Plazenta sicherzustellen, wird die glatte Muskulatur durch amorphes Fibrinoid ersetzt (Pijnenborg et al. 2006). Diese morphogene Veränderung ändert die Hämodynamik, mit der das Blut in den intervillösen Raum strömt. Der Wechsel zu erweiterten Gefäßen mit niedrigem Widerstand, ausreichendem Blutfluss und angemessen niedriger Flussrate ist notwendig, um eine mechanische

Schädigung der Zotten zu verhindern. Die Erhöhung des Blutvolumens ist dabei von geringerer Bedeutung (Burton et al. 2019).

Dieser Umbau wird durch mütterliche und fetale Faktoren reguliert (Wallace et al. 2012). Leukozyten der Dezidua, die uterine natürliche Killerzellen (uNK) und Makrophagen umfassen, sammeln sich um die Spiralarterien (Sato 2020). Die natürlichen Killerzellen im Uterus unterscheiden sich phänotypisch von denen, die im Blut zirkulieren (Moffett et al. 2017). Die Migration in die Dezidua wird progesteronabhängig durch IL-15 (Interleukin-15) Sekretion vermittelt. Der Umbauprozess wird als enge Interaktion zwischen EVT_s und uNK-Zellen verstanden (Sato 2020). Die uNK-Zellen aus der menschlichen Ersttrimesterplazenta sezernieren nicht nur proangiogene Faktoren wie Angiopoetin-1, Angiopoetin-2, Interferon- γ (IFN- γ) und vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor-C (VEGF-C), sondern auch mehrere Matrix-Metalloproteinasen (MMP-2, MMP-7, MMP-9), die Kollagen IV, Laminin und Elastin abbauen (Harris 2011). Zytokine wie VEGF-A, Plazenta-Wachstumsfaktor (PlGF), IL-8 und Interferon-induzierbares Protein-10 (IP-10) werden von uNK-Zellen sezerniert, um interstitielle Trophoblasten rund um die Arterien zu rekrutieren (Hanna et al. 2006). Bevor die Modifizierungen durch endoarteriale Trophoblasten stattfinden, wird die Abnahme der glatten Muskelzellen in der Tunica media durch lösliche Faktoren von uNK-Zellen induziert (Sato 2020). Die interstitiellen Trophoblasten produzieren die Proteasen MMP-2 und MMP-9, die die EZM in der Media umgestaltet und bei der Gewebemigration beteiligt sind (Abbas et al. 2020). Die Veränderung der Elastinfasern in der Media der Spiralarterien während der ersten Schwangerschaft ist irreversibel und unterstützt die Gefäßdilatation in zukünftigen Schwangerschaften (Wallace et al. 2012).

1.1.3 Synzytiotrophoblast

Das Synzytium überspannt die Zotten und steht in direktem Kontakt mit dem maternalen Blut. Es entsteht durch die Verschmelzung von Zytotrophoblasten. Im Laufe der Plazentaentwicklung wächst es durch die asymmetrische Verschmelzung von einzelnen Zytotrophoblasten mit dem Synzytium. Es stellt die Austauschfläche zwischen Mutter und Fötus dar und sezerniert Hormone wie humanes Choriongonadotropin (hCG) und humanes Plazenta-Laktogen (hPL) zur Aufrechterhaltung der Schwangerschaft (Knöfler et al. 2019). Der menschliche Synzytiotrophoblast exprimiert keine HLA I- oder II-Moleküle, weswegen T-Zellen keine Struktur haben, um an die Plazentaschranke zu binden (Moffett et al. 2017).

Für den Fusionsprozess muss die Trophoblastzelle zunächst ihren proliferativen Charakter verlieren und den Zellzyklus verlassen. Mehrere Faktoren wirken fusionsfördernd: der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), hCG, der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF), der Leukämie-inhibierende Faktor (LIF). Als parakrine Stimulation der Synzytialisierung wird Aktivin-A von mesenchymalen Zellen in den Chorionzotten sezerniert. Verlangsamend auf den Prozess wirken TGF- β (*engl.* transforming growth factor- β) und TNF- α (*engl.* tumor necrosis factor- α) (Gerbaud und Pidoux 2015). Eine autokrine Regulation des Fusionsprozesses erfolgt durch die Sekretion von TGF- β und hCG (Roberts et al. 2021b).

Der Synzytiotrophoblast fungiert als hochaktives Kompartiment und wird ständig mit neuem Zytoplasma und Zellorganellen angereichert. Die Apoptose und die Freisetzung von mit apoptotischem Material gefüllten Vesikeln aus dem Synzytiotrophoblast sind physiologische Merkmale des Synzytiums, um seine Funktionalität zu erhalten (Arumugasaamy et al. 2020). Aus dem Synzytiotrophoblast treten Ausstülpungen der Zellmembran hervor, die mehrere Kerne und andere alte Zellbestandteile enthalten, die sogenannten Synzytialknoten. Nach ihrer Freisetzung in den mütterlichen Kreislauf werden die Vesikel vor allem in der mütterlichen Lunge von Makrophagen abgebaut (Gauster et al. 2022). Wenn die Apoptose erhöht ist, wie bei der Präeklampsie, und der normale apoptotische Prozess zu einer nekrotischen Freisetzung von Zellfragmenten führt, kann diese direkte Exposition gegenüber dem mütterlichen System eine Entzündungsreaktion und Organdysfunktion verursachen. Diese intermediäre Art der Zellfragmentierung wird von Huppertz und Kingdom (2004) als aponekrotische Zerkleinerung bezeichnet.

1.2 Mesenchymale Stroma-/ Stammzellen (MSCs)

Seit der Entdeckung von multipotenten Vorläuferzellen aus dem Knochenmark von Säugetieren vor fast 60 Jahren (Friedenstein et al. 1966) wurden diese Zellen auch aus humanem Gewebe und weiteren mesenchymalen Kompartimenten isoliert (Hass et al. 2011). Anfang der 1990er Jahre erhielten sie die Bezeichnung „Mesenchymale Stammzellen“, die bis heute weit verbreitet ist (Caplan 1991). Durch tiefere Einblicke in ihre komplexe Funktionalität entstand ein Diskurs um die Terminologie dieser Zellpopulation (Bhartiya 2013; Caplan 2017; Boregowda et al. 2018; Bhartiya 2018). Das Akronym MSC steht unter anderem für „multipotente Stammzellen“, „multipotente mesenchymale Stromazellen“, „Mesenchymale Stromazellen“ und „Mesenchymale

Progenitorzellen“, die alle die gleiche/ähnliche Zellpopulation beschreiben. In dieser Arbeit wird der Begriff „Mesenchymale Stroma-/Stammzellen“ verwendet, um sowohl die parakrinen, gewebehomöostatischen Eigenschaften, als auch die Kapazität zur Differenzierung hervorzuheben. Die Internationale Gesellschaft für Zell Therapie (ISCT) definiert die Eigenschaften mesenchymaler Stroma-/Stammzellen mit der Adhäsion an Kunststoff, Expression spezifischer Oberflächenantigene (CD, *engl.* cluster of differentiation) (CD105, CD73, CD90), Fehlen von CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79a oder CD19, HLA II und einem multipotenten Differenzierungspotenzial zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten (Dominici et al. 2006).

Das Interesse an MSCs zum Einsatz in der Zell-Therapie aufgrund ihrer entzündungshemmenden und regenerationsfördernden Eigenschaften ist seit langem hoch. Durch ihre geringe Immunogenität, die immunmodulatorischen Fähigkeiten, die langfristige Kultivierungsmöglichkeit in-vitro und die starke Expansionsfähigkeit sind sie ein interessantes Instrument in der regenerativen Medizin geworden (Zhang et al. 2022). Es sind bereits Knochenmark- und Fettgewebe-MS-C-basierte Therapien zugelassen, unter anderem für M. Chron, Graft-versus-Host-Reaktion, und chronische Gliedmaßenbedrohende Ischämie (Najar et al. 2021). Auch zur pathophysiologischen Erforschung unterschiedlicher Erkrankungen wie der chronisch myeloischen Leukämie (Giallongo et al. 2016), des systemischen Lupus erythematoses (Gao et al. 2017) und der Spondylitis ankylosans (Daoussis et al. 2022) sind die MSCs ein gängiger Forschungsgegenstand.

Die funktionellen Eigenschaften von MSCs umfassen die chemokine Migration zu Gewebeschäden und die dortige Unterstützung der Gewebehomöostase, Immunmodulation und Differenzierungsfähigkeit. Die immunmodulatorischen Funktionen werden sowohl durch ihr vielfältiges Sekretom wie auch über direkte Zell-Zell Kontakte vermittelt (Song et al. 2020). Bei der Unterstützung der Gewebehomöostase ist die Sekretion von proangiogenen Proteinen wie VEGF, FGF (*engl.* fibroblast growth factor) und PlGF (Liang et al. 2014), antiapoptotischen, antifibrotischen Wachstumsfaktoren und auch Stromal-derived Factor-1 (SDF-1) beteiligt (Luo et al. 2016). Jedoch wird die interzelluläre Kommunikation auch über Exosomen, eine Unterklasse von extrazellulären Vesikeln, vermittelt. Diese ermöglichen den Transfer von Proteinen, RNA, DNA und bioaktiven Lipiden, wobei exogene Einflüsse wie Zytokine oder Hypoxie die Zusammensetzung des Exosomeninhalts beeinflussen (Xunian und Kalluri 2020). Auch die Übertragung von Mitochondrien an

geschädigtes Gewebe wurde über extrazelluläre Vesikel beobachtet (Mao et al. 2022). Durch Transdifferenzierung zu Zellen des Stützgewebes können MSCs auch die Geweberegeneration fördern, der Konsens in der Forschung bezüglich stammzellbasierten Therapien ist jedoch, dass die parakrinen Mechanismen klar im Vordergrund stehen (Najar et al. 2021).

In der Kultivierung in Monolage (2D) fehlen den MSCs viele in-vivo-Stimuli. Durch die Anordnung in 3D-Sphäroiden besteht die Möglichkeit, in-vivo-Merkmale nachzuahmen. Es konnte gezeigt werden, dass die Anordnung in Sphäroiden einen positiven Effekt auf die funktionellen Eigenschaften hat (Jauković et al. 2020).

Zwar besitzen fetale Stammzellen, gewonnen aus fetalem Blut, Leber oder Knochenmark, eine größere Multipotentialität, einen stabileren Phänotyp in-vitro und altern langsamer als adulte Stammzellen (Abdulrazzak et al. 2010), jedoch ist ihre Gewinnung ethisch stark konfliktbelastet. Daher verlagerte sich der Fokus auf adulte Stammzellen aus Fettgewebe oder Knochenmark (Brown et al. 2019). Das reiche Vorkommen von MSCs in der Plazenta und die nicht invasive Gewinnung der Gewebeprobe rücken auch seit Mitte der 2000er Jahre dieses Organ in den Fokus für Stammzellforschung (Cetrulo und Cetrulo 2006; La Torre und Flores 2020).

1.2.1 MSCs der Plazenta

Auch MSCs, die aus der Plazenta gewonnen werden, sind bereits für die zellbasierte Therapie von akuten und chronischen Wunden in den Vereinigten Staaten von Amerika zugelassen (Farivar et al. 2019). Für weitere Anwendungsgebiete wie ARDS (*engl.* acute respiratory distress syndrome; akutes Lungenversagen) bei COVID-19 (Hashemian et al. 2021), Diabetes mellitus Typ II (Jiang et al. 2011) und bei schwerer akuter Graft-versus-Host-Krankheit (Ringden et al. 2018) laufen klinische Studien. Zur Grundlagenforschung von Plazentationsstörungen und schwangerschaftsassozierten Erkrankungen werden MSCs seit Anfang der 2010er Jahre isoliert und charakterisiert (Rolfo et al. 2013; Nuzzo et al. 2014).

Die aus der Plazenta isolierten MSCs haben konsistente Eigenschaften gemäß den von Dominici et al. (2006) festgelegten Kriterien und wurden bei dem ersten internationalen Workshop für MSCs aus der Plazenta spezifiziert. Dabei wurde zusätzlich die Bildung fibroblastenähnlicher koloniebildender Einheiten als Merkmal definiert. Als zu exprimierende Oberflächenantigene werden CD90, CD73 und CD105 festgelegt und die

Abwesenheit von hämatopoetischen (CD45, CD34), Monozyten-Marker (CD14) und HLA-DR gefordert (Parolini et al. 2008). Immunhistochemische Analysen von humanen plazentaren MSCs zeigen eine Expression der mesenchymalen zellulären Markerproteine Vimentin, Laminin und Fibronectin und eine ausbleibende Expression des Trophoblastenmarkers Keratin 7 (Fuchi et al. 2017). Die Isolation plazentarer MSCs gelang bereits aus allen anatomischen Kompartimenten der Plazenta: Amnion-Membran (Choi et al. 2017), Chorion-Zotten (Ventura Ferreira et al. 2018), Dezidua und Wharton-Gelee der Nabelschnur (Corsello et al. 2019). Mehrere Studien untersuchten die Heterogenität zwischen MSCs aus verschiedenen Plazentakompartimenten. Choi et al. (2017) zeigten Unterschiede in den Proliferationsraten und Differenzierungspotenzialen. MSCs, die aus dem Choriontrophoblasten ohne Zotten (CT-V), den Chorionzotten (CV), der Chorionmembran (CM) und der Dezidua stammen, haben eine höhere Proliferationskapazität und ein höheres Differenzierungspotenzial, obwohl alle MSCs eine Multilinen-Differenzierung aufweisen. Dieselbe Studie zeigte, dass MSCs mit fetalem Ursprung aus Amnionepithel, Amnionmembran, CM und CV stammen. MSCs mütterlichen Ursprungs wurden im CT-V und in der Dezidua gefunden.

Verglichen mit MSCs aus dem Knochenmark sekretieren plazentare MSCs ein ähnliches Niveau an Chemokinen wie VEGF und bFGF (*engl.* basic fibroblast growth factor) (Liang et al. 2017) und besitzen sogar eine stärkere Fähigkeit zur endothelialen Differenzierung (Meraviglia et al. 2012). Aus der Plazenta isolierte MSCs produzieren proangiogene Faktoren wie VEGF und PlGF, jedoch konnte auch die Expression von antiangiogenen Faktoren wie sFlt-1 (*engl.* soluble Fms-like tyrosine kinase-1) und sEng (*engl.* soluble endoglin) nachgewiesen werden (Di Wu et al. 2020). Auch auf die Immunmodulation zur Toleranz gegenüber fetalen Antigenen haben plazentare MSCs einen Einfluss. Dies läuft sowohl über Zell-Zell-Kontakte als auch über parakrine Sekretionswege ab (Magatti et al. 2019).

In der frühen Schwangerschaft, noch bevor ein Nabelschnurkreislauf etabliert ist, finden im Zottenstroma Vaskulogenese und Hämatopoese statt. Die Vermutung, dass MSCs maßgeblich an diesen Prozessen in hämatogenen Foci beteiligt sind, ist weit verbreitet (Boss et al. 2018; Zhang et al. 2022; Sánchez-Lanzas et al. 2024). Zum einen können MSCs zu den gefäßbildenden Zellen differenzieren (Meraviglia et al. 2012), zum anderen sekretieren sie eine Fülle an angiogenen Faktoren (Mathew et al. 2020).

Fuchi et al. (2017) verglichen die miRNA-Expression von MSCs aus verschiedenen Plazenta-Komponenten während der gesamten Schwangerschaftsentwicklung. Sie kamen zu dem Schluss, dass aus Chorionzotten gewonnene MSCs ein potenzielles Instrument zur Untersuchung von schwangerschaftsbedingten Störungen sind. Das Expressionsniveau von miRNA-323-3p, welches zu dem schwangerschaftsassozierten C14MC (Chromosom 14 miRNA Cluster) gehört, war im dritten Trimenon im Vergleich zum ersten niedriger. Die Expression der plazentaspezifischen C19MC miRNA-518b und miRNA-517a war während der Schwangerschaftsphasen und der ex-vivo-Kultivierung stabil und stellen Biomarker für schwangerschaftsassozierte Erkrankungen dar.

1.3 Präeklampsie

Die Präeklampsie ist eine schwerwiegende systemische Erkrankung der Schwangeren, die eine Gefahr für Mutter und Ungeborenes darstellt. Sie ist charakterisiert durch arterielle Hypertonie in Kombination mit einem Organschaden (Chang et al. 2023). Die Daten zu Morbidität und Mortalität variieren in der Literatur. Die weltweite Prävalenz wird auf 6,7 % geschätzt, wobei große regionale Unterschiede bestehen und reicht von 1,0 % in der ostmediterranen Region bis 5,6 % in der afrikanischen Region (Abalos et al. 2013; Macedo et al. 2020). Die regionalen Unterschiede zwischen dem Auftreten der Komplikation Eklampsie sind unter anderem abhängig von dem Zugang zur geburtshilflichen Versorgung (Hodgins et al. 2016).

Auch über die Schwangerschaft hinaus kann die Präeklampsie die Gesundheit von Mutter und Kind beeinflussen. Für die Mutter besteht unter anderem eine Korrelation zu kardio- und neurovaskulären Erkrankungen sowie der frühen Entwicklung einer arteriellen Hypertonie (Chappell et al. 2021; Yang et al. 2023). Bei den Kindern wurde im Entwicklungsverlauf zum Teil eine Beeinträchtigung der Gefäßfunktion und der kognitiven Funktion beobachtet (Turbeville und Sasser 2020). Es wird jedoch auch der Einfluss auf die Entwicklung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen der Kinder vermutet (Wojczakowski et al. 2021).

Die Erkrankung manifestiert sich ab der 20. Schwangerschaftswoche mit Bluthochdruck und einem Organschaden. Meist sind die Nieren betroffen, wobei sich diagnostisch eine Proteinurie nachweisen lässt. Andere Organschäden oder Funktionseinschränkungen betreffen typischerweise die Leber, das respiratorische System, das hämatologische System, die Plazenta und das zentrale Nervensystem. Die gefürchtete Komplikation der

Eklampsie präsentiert sich als tonisch-klonischer Krampfanfall (Karrar et al. 2024). Nach dem Manifestationszeitpunkt werden zwei Formen unterschieden, der Grenzwert liegt hierbei in der 34. Schwangerschaftswoche. Bis einschließlich 33+6 SSW (Schwangerschaftswoche) liegt eine frühe PE vor, ab 34+0 SSW wird die späte PE definiert. Die frühe PE ist zwar anteilig mit ca. 20 % weniger oft vertreten, jedoch häufiger komplikationsreich (Parada-Niño et al. 2022). Den beiden Subtypen liegen unterschiedliche Pathomechanismen zugrunde (Aneman et al. 2020).

In der Konsens-basierten Leitlinie von 2019 der deutschen Gesellschaften für Gynäkologie und Geburtshilfe in Zusammenarbeit mit der österreichischen und der schweizer Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe wird die Präeklampsie als „jeder (auch vorbestehender) erhöhte Blutdruck > 140/90 mmHg in der Schwangerschaft mit mindestens einer neu aufgetretenen Organmanifestation, die keiner anderen Ursache zugeordnet werden kann“ (Schlembach et al. 2019) definiert. Hiernach kann bei Bluthochdruck in Zusammenschau mit pathologischen Präeklampsie-Markern auch ohne Organmanifestationen von einer Präeklampsie ausgegangen werden.

Anamnestische Risikofaktoren sind hierbei Autoimmunerkrankungen (u.a. Antiphospholipid-Antikörper-Syndrom und systemischer Lupus erythematoses), vorausgegangene Schwangerschaften mit Präeklampsie, vorbestehender arterieller Hypertonus, Adipositas (BMI \geq 30), vorbestehender Diabetes mellitus, chronische Nierenerkrankungen, familiäre Belastung, Erstparität, fortgeschrittenes Alter der Mutter (> 40 Jahre), Mehrlingsschwangerschaft, assistierte Reproduktion und Gestationsdiabetes (Schlembach et al. 2019). Zudem werden von der „International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy classification“ frühere Aborte oder Totgeburten, vorherige intrauterine Wachstumsrestriktion, vorherige Plazentaablösung als Risikofaktoren eingeschlossen (Magee et al. 2022).

Die Früherkennungsuntersuchungen auf Präeklampsie umfassen bei fehlenden Risikofaktoren und unauffälligem Schwangerschaftsverlauf Blutdruck-, Gewichtskontrollen, Urinuntersuchungen und Kontrolle der Beine auf Ödembildung. Bei einer hohen Risikokonstellation werden ergänzend biophysikalische und biochemische Marker bestimmt. Darunter fallen der Pulsindex der A. uterina, die sFlt1, der PIGF und das PAPP-A (*engl.* pregnancy-associated plasma protein A) (Stepan et al. 2023). Mehrere Empfehlungen von nationalen Gesundheitsorganisationen ziehen bei moderatem und

erhöhtem Risiko ab der 24. SSW den sFlt-1/ PIGF-Quotienten hinzu, von dem die anschließende Überwachung abhängt. Unter einem Quotienten von 33 ist die Entwicklung einer PE unwahrscheinlich, über 85 wahrscheinlich. Bei Werten dazwischen werden engmaschige Kontrollen empfohlen (Poon et al. 2021; NICE guideline [DG49] 2021). Der hohe negative Vorhersagewert des sFlt-1/PIGF-Quotienten von 38 oder niedriger wird zum Verdachtsausschluss der Entwicklung einer Präeklampsie innerhalb der nächsten Woche verwendet (Zeisler et al. 2016).

Die bisherige Therapie ist symptomorientiert: Als Antihypertensivum wird α -Methyldopa eingesetzt, und als antikonvulsive Prophylaxe oder Therapie wird Magnesiumsulfat verabreicht (Schlembach et al. 2019). Eine kurative Behandlung besteht bisher allein in der Entbindung des Kindes und der Plazenta. Der Entbindungszeitraum muss individuell unter Abwägung der Reife des Kindes und der Komplikationen für Mutter und Kind festgelegt werden. Deswegen liegt der Fokus auf der Früherkennung durch regelmäßige klinische Kontrollen und Bestimmung von Screeningparametern. Als Maßnahmen zur Senkung von Mortalität und Morbidität wurde die Gabe von niedrig dosiertem Aspirin ab der frühen Schwangerschaft bei hoher Risikokonstellation identifiziert, zudem wirkt die Calciumgabe bei niedrigen Calciumspiegeln präventiv (O'Gorman et al. 2016; Rolnik et al. 2022; Woo Kinshella et al. 2022).

Zu den potenziellen Präeklampsie-Therapiestrategien, für die aktuell klinische Studien laufen, zählen antiinflammatorische Medikamente wie Eculizumab (Morales et al. 2020) und Etanercept (Cunningham et al. 2020). Ein anderer Ansatz ist das Absenken der sFlt-1-Serumkonzentration, z.B. über die Synthesehemmung (Turanov et al. 2018), durch niedermolekulare Peptid-Inhibitoren (Waller et al. 2021) oder gezielte Apherese (Gubenšek et al. 2021). Durch die Gabe von NO (Stickstoffmonoxid)-Vorstufen wie L-Arginin and L-Citrullin und die dadurch geförderte endotheliale NO-Produktion konnte ebenfalls eine symptomatische Besserung erzielt werden (Ortiz-Cerda et al. 2023).

Im Gegensatz zur physiologischen Schwangerschaft ist die PE durch ein niedriges zirkulierendes Blutvolumen, einen hohen Blutdruck und einen hohen Gefäßwiderstand charakterisiert (Thilaganathan und Kalafat 2019). Die Organschäden an Leber, Nebennieren, Herz und Gehirn ähneln denen eines hypovolämischen Schocks. Die Histologie der von PE betroffenen Niere zeigt, dass es sich jedoch nicht nur um die Organmanifestation einer veränderten hämodynamischen Situation handelt, sondern um

eine eigene Entität. Die Endothelschwellung und Störung der Basalmembran und Podozyten sind in keiner anderen Nierenerkrankung so beschrieben (Burton et al. 2019). Zu der Pathogenese der PE bestehen viele Theorien, wobei generalisierte Gefäßspasmen der gemeinsame Nenner sind (Than et al. 2023; Cerdeira et al. 2022; Staff et al. 2022; Melchiorre et al. 2022).

Die zirkulierenden Biomarker lassen Rückschlüsse auf den pathophysiologischen Zustand zu, helfen bei der Entschlüsselung der Ätiopathogenese und einige werden als Vorhersagetests eingesetzt. Niedrige Angiotensin-II-Werte im Serum (Leaños-Miranda et al. 2018) und die erhöhten Spiegel von Autoantikörper gegen Angiotensin I bei präeklampsischen Frauen lassen auf eine gestörte Regulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) schließen (Gathiram und Moodley 2020).

Auf die bestehende übermäßige und fortschreitende Immunaktivierung weisen die erhöhten proinflammatorischen Zytokine und antiangiogenen Faktoren hin (Michalczyk et al. 2020). Als Korrelat der systemischen Inflammation zeigt sich bei Frauen mit PE eine ausgeprägte Infiltration von Neutrophilen in die mütterlichen Blutgefäße (Walsh und Strauss 2022). TNF- α und IL-6 führen zu einem Anstieg der Gefäßpermeabilität und zur Apoptoseinduktion unter anderem von Trophoblasten und wurden, neben weiteren inflammatorischen Zytokinen, in erhöhtem Maße in Plazentagewebe und im Serum von präeklampsischen Frauen nachgewiesen. Für die antiinflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-10, die regulierend auf die Typ2-T-Helferzellen und regulatorischen T-Zellen wirken, wurden erniedrigte Werte gemessen (Szarka et al. 2010; Aggarwal et al. 2019). Eine Zellpopulation, die mit an der Produktion einiger PE assoziierter Zytokine beteiligt ist, sind plazentare MSCs aus dem villösen Kompartiment. Bei ihnen wurde eine vermehrte Expression und Sekretion inflammatorischer Zytokine im Vergleich zu MSCs von komplikationslosen Schwangerschaften gemessen (Rolfo et al. 2013; Hwang et al. 2010). Ein Einfluss beeinträchtigter MSCs auf die Trophoblasten ist anzunehmen, denn das Sekretom präeklampsischer plazentarer MSCs induzierte in villösen Plazenta-Explantaten einen präeklampsieähnlichen Phänotyp (Rolfo et al. 2013).

Ein Biomarker, dem diagnostisch ein großer Wert zukommt, ist sFlt-1. Diese bindet VEGF und PlGF (Lecarpentier et al. 2020) und verringert dadurch die biologische Verfügbarkeit des Wachstumsfaktors. Erhöhte Serumwerte tragen zu einer generalisierten Endotheldysfunktion bei (Lecarpentier et al. 2020; Stepan et al. 2023).

Die Hauptquelle für sFlt-1 stellt die Plazenta, sowohl in physiologischen, als auch bei PE-Schwangerschaften dar. Darüber hinaus wird sFlt-1 auch von glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Monozyten produziert (Cerqueira et al. 2019). In hypoxischem Zustand ist die sFlt-1 Produktion der Plazenta hochreguliert, um durch periphere Vasokonstriktion und die folgende maternale Blutdruckerhöhung den Blutfluss im intervillösen Raum zu erhöhen (Herraiz et al. 2018). Ein weiterer antiangiogener Marker, der in erhöhtem Maß bei PE gemessen wird, ist das sENG. Aufgrund seines fehlenden zusätzlichen Werts findet es jedoch noch keine klinische Anwendung (Stepan et al. 2023).

Ein weiterer Biomarker, der in das Screening bei Frauen mit hohem PE-Risiko mit einbezogen werden kann, ist das vom Syncytiotrophoblast produzierte PAPP-A, eine Protease für das insulinähnliche Wachstumsfaktor-Bindeprotein-4 (IGFBP-4). Bei eingeschränkter plazentarer Funktion ist auch die Konzentration von PAPP-A verringert, was zu einer niedrigen zirkulierenden Konzentrationen des freien insulinähnlichen Wachstumsfaktors (IGF) führt (Narang et al. 2016; Uriel et al. 2023).

Exosomen, Mikrovesikel und apoptotische Körper, die als extrazelluläre Vesikel (EV) zusammengefasst werden, transportieren bioaktive Moleküle wie Lipide, Proteine (Enzyme, Rezeptoren und Zytokine) und Nukleinsäuren (miRNA, lncRNA, mRNA und DNA) (Clayton et al. 2018). Sie sind in der Präeklampsieforschung aktueller Gegenstand mit dem Ziel, diese als nichtinvasiver Screeningparameter einsetzen zu können. Für die Konzentration von Annexin V-positiven EVs wurde bereits ein signifikanter Unterschied beschrieben (Tan et al. 2017; Jadli et al. 2017). EVs maternalen Ursprungs sind vornehmlich endothelialer Genese und prokoagulatorisch (Hu et al. 2018). Daneben weisen auch EVs von Thrombozyten oder Leukozyten Unterschiede zwischen präeklampsischen und komplikationsfreien Schwangerschaften in Konzentration und Zusammensetzung auf (Wang et al. 2021b). Fetoplazentare EVs werden in erhöhtem Maß bei oxidativem und mechanischem Stress, wie es bei PE der Fall ist von dem STB freigesetzt. Diese weisen zudem eine veränderte molekulare Zusammensetzung auf, eine erhöhte sFlt-1 und sEng Beladung, und nehmen in ihren prokoagulatorischen, proinflammatorischen und proangiogenen Eigenschaften zu (Wang et al. 2021b).

Die placentare oder fetale Manifestation resultiert aus einer unzureichend flachen Plazentation der endovaskulären Trophoblasten sowie einem gestörten Umbau der Spiralarterien (Lyall et al. 2013) und präsentiert sich vor allem als frühe PE (Kusuma et

al. 2022). Der unzureichende Umbau resultiert in einem höheren Widerstand der Spiralarterien und in einer höheren Flussgeschwindigkeit, mit der das Blut in den intervillösen Raum strömt. Die daraus hervorgehende veränderte Hämodynamik der uteroplazentaren Perfusion geht häufig mit intrauteriner Wachstumsretardierung einher (Burton et al. 2019). Die Vermittlung zwischen dem hypoxisch und mechanisch gestressten Plazentagewebe und dem mütterlichen Organismus erfolgt über die vom Synzytiotrophoblast abgesonderten Faktoren. Diese schädigen das Endothel und führen zu einer systemischen Entzündungsreaktion im mütterlichen Organismus und zum Syndrom der Präeklampsie. Die vom STB abgesonderten Faktoren umfassen unter anderem proinflammatorische Zytokine, Exosomen, anti-angiogene Substanzen und zellfreie fetale DNA (Tannetta et al. 2017). Neben weiteren Stressfaktoren ist die uteroplazentare Minderperfusion durch unzureichenden Spiralarterienumbau die Hauptursache des plazentaren Subtyps der PE. Daher manifestiert sich der Symptomkomplex erst, wenn der intervillöse Raum mit maternalem Blut durchspült wird, was ab der ca. 20. SSW der Fall ist (Burton et al. 2019). Ein defekter Spiralarterienumbau konnte auch bei weiteren schwangerschaftsassozierten Erkrankungen (Brosens et al. 2011) und bei der physiologischen Schwangerschaft beobachtet werden (Aardema et al. 2001). Daher ist die Annahme der direkten Kausalität zwischen defektem Spiralarterienumbau und PE zu vereinfacht. Neben dem Endothelschaden wird gegen Ende der Schwangerschaft eine akute Atherose bei einigen frühen PE-Plazenten, vor allem bei schwerem Verlauf beobachtet. Die entzündliche Intimaverdickung engt zusätzlich das Lumen ein und führt dadurch zu einer weiteren Progression (Staff et al. 2022).

Auch bei der sogenannten maternalen Manifestation besteht ein genereller Endothelschaden, eine Auswirkung auf die Entwicklung des Fötus besteht dabei nicht. Die maternale endotheliale Dysfunktion kann zu einer allgemeinen Gefäßverengung und einer verminderten Blutzufuhr zu mehreren Organen, einschließlich Herz, Niere und Gehirn, führen (Amaral et al. 2015). Dieser Subtyp präsentiert sich typischerweise als späte PE. Hier liegt die Ursache jedoch eher in einem zunehmenden Missverhältnis zwischen der mütterlichen Durchblutung und den metabolischen Anforderungen der Plazenta und des Fötus, verbunden mit einer mütterlichen Veranlagung zu Entzündungen, einem hohen BMI und einem vorgeschädigten Endothel durch hohen arteriellen Blutdruck (Staff 2019). Die geschätzte physiologische Freisetzung von plazentaren

Faktoren liegt bei 2 g – 3 g pro Tag. Wenn die Kapazität des maternalen Abbaus überschritten wird, führt der nekrotische Debris zu einer Endothel- und Immunsystemaktivierung. Dies ist sowohl bei früher, wie auch bei später PE zu beobachten (Marín et al. 2020). Dadurch wird die Plazenta weiter geschädigt, was an plazentaren Läsionen zu erkennen ist, die mit maternaler Hypoperfusion assoziiert sind (Ogge et al. 2011). Auch der Quotient von sFlt-1/PIGF ist im Gegensatz zu gesunden Kontrollen höher und führt durch die überwiegende antiangiogene Wirkung zu einer weiteren Gefäßschädigung (Soto et al. 2012). Somit kann die Manifestation der späten PE als dekompensierte Reaktion auf den oxidativen Stress in der Plazenta durch ein dysfunktionales mütterliches Endothel verstanden werden (Burton et al. 2019; Melchiorre et al. 2022).

Nicht kodierende miRNA, die an der Regulation der Genexpression und Translation beteiligt sind, rücken seit Jahren in den Fokus der Präeklampsieforschung. Es wurde eine abweichende Expression mehrerer miRNAs bei PE entdeckt (Ning et al. 2023). Das C19MC, in dem 54 miRNAs enthalten sind, wird in Trophoblasten vermehrt im 3. Trimenon exprimiert (Morales-Prieto et al. 2012). Dies zeigt eine dynamische Regulation der miRNA über den Verlauf der Schwangerschaft auf. Zudem werden erhöhte Werte mit Präeklampsie assoziiert, was mit einer vorzeitigen Plazentaalterung bei PE in Verbindung stehen könnte (Martinez-Fierro et al. 2018). Negativ auf die Proliferation, EMT und Invasion einer EVT-Zelllinie wirken die miRNA-146a-5p und miRNA-372-3p, die in PE-Seren in erhöhter Konzentration nachgewiesen wurden (Peng et al. 2021; Li et al. 2022).

Zusammengefasst präsentiert sich die Präeklampsie als Symptomspektrum mit vielfältiger klinischer Präsentation (Roberts et al. 2021a), unterschiedlichen Langzeitverläufen, variablen Laborbefunden (Roberts und Bell 2013), individueller Reaktion auf präventive Therapien und ungenauer Vorhersage. Bisher sind die zwei entgegengesetzten Subtypen frühe und späte PE allgemein anerkannt. Für die Definierung weiterer Subtypen oder die genauere Differenzierung stehen die verbesserte klinische Phänotypisierung, analytische Techniken, große Kohortenstudien und neue Ansätze in Zellkulturmodellen zur Verfügung.

1.4 Primäres Zilium

Das primäre Zilium ist ein auf Mikrotubuli basierendes Zellorganell, das aus der Zelle herausragt, sich in dynamischem Auf- und Abbau befindet und der Signalverarbeitung dient. Die meisten Zelltypen von Säugetieren besitzen primäre Zilien, die zwar zwischen den Arten und Zelltypen variieren, deren Struktur und der Zilienapparat jedoch evolutionär konserviert sind (Mill et al. 2023). Primäre Zilien sind, außer in frühen embryonalen Zellen, unbeweglich (Bernabé-Rubio und Alonso 2017). Die Membran, die das primäre Zilium überspannt, besitzt eine spezielle Zusammensetzung, die sich durch andere Phospholipide (Chávez et al. 2015) sowie durch einen höheren Anteil an lipid rafts, die mit Sphingolipiden und Gangliosiden angereichert sind, von der restlichen Zellmembran unterscheidet (He et al. 2012). Dadurch wird die Rekrutierung und Organisation von Signalproteinen ermöglicht (Dutta und Ray 2022). Das Zilium dient somit als Kommunikationsbereich, durch den chemische oder mechanische Reize in intrazelluläre Signale umgewandelt werden. Die längliche Form bietet ein hohes Oberflächen-Volumen-Verhältnis für die Interaktion von Signalproteinen (Anvarian et al. 2019). Hier sind unter anderem Hedgehog-, Wingless-, Wachstumsfaktor- und G-Proteingekoppelte Rezeptoren lokalisiert, die essenziell für Zellproliferation und Entwicklungsprozesse sind (Dutta und Ray 2022). Der fehlerhafte Auf- und Abbau der Zilien oder Mutationen, die zur Dysfunktion von Zilien führen, resultieren in einer heterogenen Gruppe von Erkrankungen, die als Ziliopathien zusammengefasst werden. Diese können viele unterschiedliche Organsysteme betreffen (Focşa et al. 2021).

Die strukturgebende Komponente des Ziliums ist das aus neun Mikrotubuli-Doupletts bestehende Axonem, das an der Mutterzentriole verankert ist. Versorgung des Ziliums mit Proteinen für die Ziliogenese, Signaltransduktion und Aufrechterhaltung der Struktur erfolgt durch ein bidirektionales System entlang der Mikrotubuli, dem intraflagellaren Transport (IFT). Der anterograde Transport nach distal wird durch Kinesin-2 und IFT-B vermittelt, während Dynein und IFT-A den retrograden Transport vermitteln. ADP-ribosylation factor-like protein 13B (Arl13b) und Smoothed (Smo) werden jedoch durch IFT-A anterograd transportiert (Bernabé-Rubio und Alonso 2017). In Zellen des Bindegewebes liegt das Zilium in einer Membrantasche und die Ziliogenese findet

intrazellulär statt (Molla-Herman et al. 2010). Dem entgegengesetzt befinden sich die Zilien von Epithelzellen im extrazellulären Raum exponiert und die Ziliogenese findet extrazellulär durch Membranausstülpung statt. Die Mutterzentriole, die aus 9 Mikrotubuli-Triplets besteht, wird nach ihrer Verankerung an der Zellmembran mit ihren begleitenden Strukturen als Basalkörper bezeichnet. Distal des Basalkörpers liegt die Transitionszone, welche durch den Wechsel von Basalkörpertripelets zu Mikrotubuli-Douplets des Axonem charakterisiert ist (Garcia-Gonzalo und Reiter 2012). Hier ist das Axonem mit der Zilienmembran über Y-förmige Strukturen verbunden, was eine Diffusionsbarriere darstellt. Diese schränkt den Transport von löslichen, transmembranen und membranassoziierten Proteinen sowie von Lipiden in das Zilium ein. Dadurch erhält das Zilium eine Kompartimentierung (Dutta und Ray 2022). Strukturcluster in der Transitionszone ermöglichen Proteinen, die eine ziliäre Lokalisierungssequenz besitzen diese Barriere zu überwinden (Takao und Verhey 2016).

Der kontrollierte Auf- und Abbau des primären Ziliums ist essenziell für den ungestörten Ablauf des Zellzyklus und wird durch mehrere Signalwege koordiniert. Vor jeder Mitose wird das primäre Zilium abgebaut, damit die Zentriolen für die Bildung des Spindelapparats zur Verfügung

stehen (Ho und Stearns 2021). Während der G1 oder G0 Phase, die durch Nährstoffentzug forciert werden kann, findet die Zilienausbildung statt (Walia et al. 2019). Die Hauptakteure für den Zilienabbau wirken über den NEDD9/AURKA/HDAC6-Signalweg

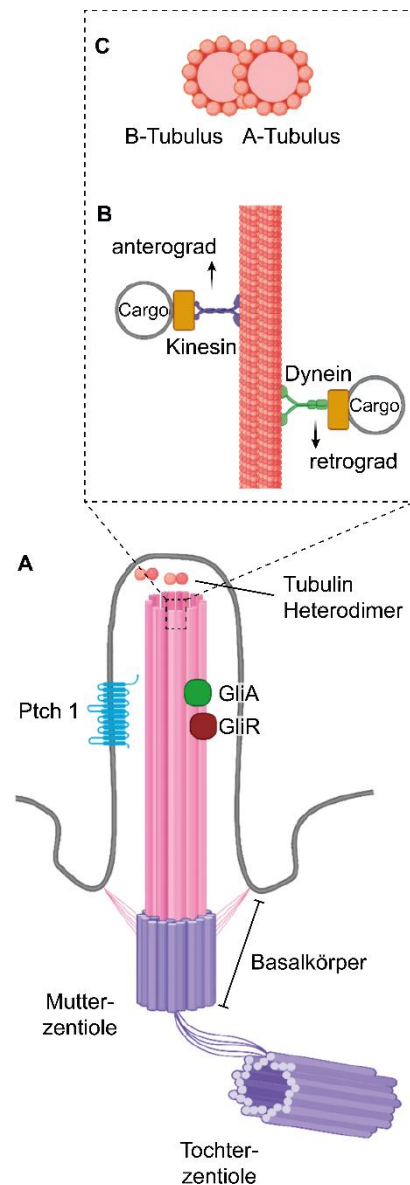


Abbildung 3: Struktur des primären Ziliums (A) Primäres Zilium mit dem Hedgehog-Rezeptor Patched-1 (PTCH1) und den nachfolgenden GLI-Transkriptionsaktivator (GliA) und GLI-Transkriptionsrepressor (GliR). **(B)** Dynein- und Kinesin-Proteine ermöglichen den intraflagellaren Transport. **(C)** Querschnitt durch ein Mikrotubuli-Douplet aus A- und B-Tubulus bestehend. Abgeändert aus (Yanardag und Pugacheva 2021).

(*engl.* Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 9/ Aurora Kinase A/ Histondeacetylase 6). Insgesamt sind viele Signalwege an der Regulation beteiligt, unter anderem der WNT-Signalweg (*engl.* Wingless and integration locus int-1). Der Abbau des Axonems erfolgt über Mikrotubuli-Depolymerasen wie Kif2A und Kif2C (*engl.* kinesin family member 2A, -2C) (Doornbos und Roepman 2021). Nach Phosphorylierung und Aktivierung durch Aurora Kinase A wirkt auch die Histondeacetylase 6 (HDAC6) durch Deacetylierung von Tubulin am Abbau des Ziliums mit (Senatore et al. 2022).

Als Einflussfaktoren auf die Länge und Funktionalität des Ziliums wurden Zytoskelettspannung (McMurray et al. 2013) und Zellform (Pitaval et al. 2010) beschrieben. Die Polyglutamylierung der Axoneme führt zu einer Stabilisierung durch Begrenzung der Resorptionsrate beim Abbau der Zilien. Die kleine Guanosintriphosphatase (GTPase) Arl13b ist an der Basis des Ziliums lokalisiert und beeinflusst die Polyglutamylierung (He et al. 2018). Antikörper gegen Arl13b werden häufig zusammen mit acetyliertem Tubulin zur Darstellung von Zilien in der Immunfluoreszenz verwendet.

1.4.1 Hedgehog Signalweg

Der Hedgehog (Hh)-Signalweg ist evolutionär konserviert und reguliert mitogene und morphogene Faktoren. Somit ist er an der Embryogenese, Gewebestrukturierung und der Gewebemöostase beteiligt (Anvarian et al. 2019; Shen et al. 2024). Die Regulierung während der Entwicklung erfolgt über einen räumlichen und zeitlichen Konzentrationsgradienten der Hh-Liganden (Kong et al. 2019), die von organisierten Epithelzellen freigesetzt werden und die umliegenden mesenchymalen Zellen stimulieren (Raleigh und Reiter 2019). Bei Erwachsenen wird das Gleichgewicht der Gewebe und ihre Regeneration durch parakrine Signalkaskaden des Hh-Signalwegs gefördert (Lee et al. 2016). Die nachgeschalteten Zielgene beeinflussen unter anderem die Hh-Rückkopplung (*GLII*, *PTCHI*), die Zellproliferation (*MYCN*, *CCND1/2*), das Zellüberleben (*BCL2*), die epithelial-mesenchymale Transition (*SNAIL*, *TWIST2*), die Angiogenese (*VEGF*, *IGF1*) und die Stammzellmodulation (*NANOG*, *SOX2*) (Katoh und Katoh 2009; Po et al. 2010; Giarretta et al. 2019).

Um kurz auf die biochemischen Mechanismen des "kanonischen" Wegs einzugehen, bei dem Smo über die Aktivierung der Gli-Familie die Transkription von Zielgenen steuert: In der Abwesenheit von Hh-Liganden verhindert der Transmembranrezeptor Patched-1 (Ptch1) die Aktivierung von Smo, wodurch der Signalweg inaktiv bleibt. Bei Bindung eines der Hh-Proteine an Ptch1, wird dieser endozytär von der Zilienmembran entfernt, wodurch die Hemmung auf Smo entfällt. Smo wird an die Membran lokalisiert und inaktiviert die inhibitorischen Proteine suppressor of fused (SUFU) und Proteinkinase A (PKA), die den Transkriptionsfaktor GLI in seiner Repressorform halten. Smo führt somit indirekt zu der Prozessierung von GLI in seine aktive Form, welche die Transkription von Zielgenen bewirkt (Kong et al. 2019; Dutta und Ray 2022).

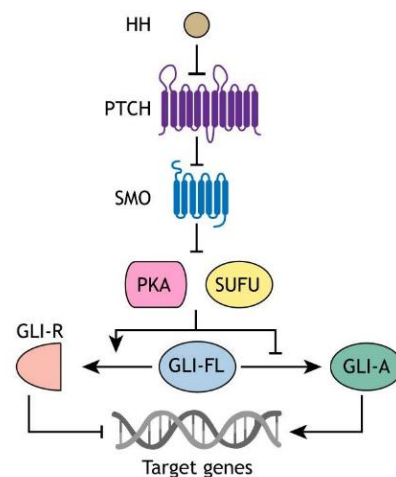


Abbildung 4: Übersicht des Hedgehog-Signalwegs

Der Transkriptionsfaktor GLI mit dualer Wirkungsweise wird von PKA und SUFU in der suppressiven Form gehalten (GLI-R). Diese Hemmung entfällt durch Ligandenbindung an Patched 1 (PTCH) und die nachgefolgte Aktivierung von Smo. Die aktive GLI-Form (GLI-A) transkribiert Zielgene. (Kong et al. 2019).

Die Hh-Proteine werden durch Lipidmodifikationen für den Transport stabilisiert, der über verschiedene Transportproteine, Lipoproteine, extrazelluläre Vesikel und Ligandenmultimere stattfindet. Für den Transport innerhalb eines Gewebes wurde das Zytonem identifiziert, eine dünne Zellausstülpung, die die Übertragung des Hh-Signals ermöglicht, ohne den Liganden freizusetzen (Kong et al. 2019). In Säugetieren gibt es drei Paraloge des Hh-Proteins: Sonic (Shh), Desert (Dhh) und Indian (Ihh), wobei der Shh der am intensivsten erforschte ist (Lee et al. 2016). Die beiden anderen Liganden Dhh und Ihh besitzen viele der gleichen nachgeschalteten Signalkomponenten. Der Dhh-Ligand wird in den Fortpflanzungsorganen von Männern und Frauen exprimiert (Finco et al. 2015). Dagegen spielt der Ihh-Ligand eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Skeletts (Hellemans et al. 2003).

Auch kleine synthetische Moleküle wie der Smoothened-Agonist (SAG) können den Hh-Signalweg aktivieren (Frank-Kamenetsky et al. 2002) und werden zu Erforschung des Signalwegs eingesetzt (Faria et al. 2019) sowie auf die Möglichkeit des therapeutischen Einsatzes untersucht (McKenzie et al. 2019; Nguyen et al. 2021).

1.4.2 Primäres Zilium der Mesenchymalen Stammzellen

In Stammzellen sind wichtige Signalwege für die zellspezifischen Eigenschaften am primären Zilium lokalisiert (Yanardag und Pugacheva 2021). Es konnte gezeigt werden, dass MSCs mit defektem primärem Zilium weniger stammzellspezifische Transkriptionsfaktoren exprimieren (Tummala et al. 2010). In der gleichen Studie wurde auch gezeigt, dass das primäre Zilium für die osteogene und adipogene Differenzierung, aber auch für die Aufrechterhaltung des Phänotyps, notwendig ist. Die chondrogene Differenzierung war durch ein nicht funktionierendes primäres Zilium weniger eingeschränkt, was auf zusätzliche Mechanismen in der chondrogenen Differenzierung hindeutet. Somit sind primäre Zilien essenziell für die grundlegenden Merkmale von MSCs mitverantwortlich.

Eine wichtige MSC-Eigenschaft ist die Chemotaxis, wobei TGF- β einen potenten chemischen Botenstoff darstellt und sein Rezeptor ist am primären Zilium lokalisiert (Labour et al. 2016). Zudem nimmt TGF- β eine Schlüsselrolle beim Wachstum und Entwicklungsverhalten von Stammzellen ein (Elsafadi et al. 2017). Für die direkte Zell-Zell-Interaktion wie auch die parakrine Signalwirkung ist die Familie der Notch-Rezeptoren unerlässlich. Diese sind am Zilium verankert und regulieren mit weiteren die MSC-Differenzierung, die jedoch abhängig von der Zelllinie ist (Takam Kamga et al. 2020). Weitere Eigenschaften werden von Notch durch ein Zusammenspiel mit anderen Signalwegen beeinflusst. Zusammen mit HIF-1 α (*engl.* hypoxia-inducible factor-1 α) wirkt Notch1 auf die Migration und Invasion von MSCs unter hypoxischen Bedingungen (Ciria et al. 2017). Für die Erhaltung und Differenzierung von MSCs ist auch die Wnt/ β -Catenin Regulation entscheidend, welche durch das primäre Zilium reguliert wird. Der Verlust der Zilien durch die Deletion von IFT88 führt zu einem Anstieg des Wnt5a/ β -Catenin-Spiegels und zu Differenzierungsdefekten (Bae et al. 2020). Die Serin-Threonin-Kinase mTOR (*engl.* mammalian target of rapamycin) reguliert grundlegend den Stoffwechsel und das Überleben und somit auch die Stammzeleigenschaften (Yanardag und Pugacheva 2021).

1.5 Trophoblastorganoide

In den letzten Jahren hat die in-vitro-Forschung an Organoiden, dreidimensionalen Gewebekulturmodelle, die vereinfachte Organversionen darstellen, stark an Bedeutung gewonnen. Turco et al. (2018) haben die Herstellung von langlebigen und genetisch stabilen Trophoblastorganoiden beschrieben und obligate Kriterien für Trophoblasten

definiert. Die Organoide wurden aus Ersttrimester-Plazentaprobe gewonnen und ähneln strukturell und funktionell stark der villösen Plazenta in-vivo. Das verwendete Matrigel, in dem die primären Zellen eingebettet sind, stellt funktionell eine Basalmembran dar, wodurch sich die Trophoblasten als äußere Schicht organisieren. Nach innen differenzieren und fusionieren sie zu einem mehrkernigen Syncytiotrophoblast, was eine zum physiologischen Aufbau inverse Anordnung darstellt. Im Verlauf bilden sich villöse Strukturen aus. Es konnte auch eine Differenzierung zu EVT's erzielt werden, die das Matrigel zersetzen und von dem Organoid in die Peripherie migrieren (Turco et al. 2018). Auch aus naiven humanen pluripotenten Stammzellen wurden funktionelle Trophoblasten Organoide hergestellt, die in der Einzelzell-Transkriptomanalyse Zytotrophoblasten- und Synzytiotrophoblast-Cluster aufweisen (Karvas et al. 2022; Cinkornpumin et al. 2020) sowie aus somatischen Zellen durch direkte Reprogrammierung (Castel et al. 2020; Liu et al. 2020).

1.6 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die funktionellen Eigenschaften von MSCs aus humanen Chorionzotten (hCV-MSCs, *engl.* human chorionic villi mesenchymal stromal cell) zu untersuchen und ihre potenzielle Beteiligung an der Pathogenese der Präeklampsie zu analysieren.

Es werden hCV-MSCs aus dem ersten Trimenon von gesunden Schwangerschaften, aus termingerecht entbundenen Plazenten sowie aus Plazenten mit Präeklampsie isoliert. Zur Charakterisierung der hCV-MSCs werden die Oberflächenmoleküle analysiert, das Zytoskelett dargestellt sowie die Zellzyklusverteilung und Proliferation untersucht. Als zu untersuchende funktionelle Eigenschaften werden die ungerichtete Motilität, die Differenzierungskapazität, das Homing-Verhalten in Richtung von Trophoblastenzelllinien und die Sekretion löslicher Wachstumsfaktoren festgelegt. Zur Beurteilung der Funktionalität werden die Morphologie des primären Ziliums und die Signaltransduktion des Hh-Signalwegs herangezogen. Darüber hinaus geht die Arbeit der Frage nach, wie hCV-MSCs auf benachbarte Zelltypen in der Plazenta wirken, insbesondere auf EVT's und Endothelzellen, und ob sie durch direkte oder parakrine Effekte Prozesse wie Motilität, Migration, Invasion, Zellzyklus, Zilienausbildung oder Angiogenese beeinflussen. Abschließend wird untersucht, ob hCV-MSCs die Entwicklung von Trophoblastorganoiden modulieren und somit aktiv an der Steuerung der Plazentabildung beteiligt sein könnten.

2 Material und Methoden

2.1 Patientinnenkollektiv

Die Experimente wurden mit den Ethikanträgen #19-201 und #19-455 der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Goethe-Universität Frankfurt am Main bewilligt. Von allen Spenderinnen wurde nach Aufklärung eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt.

Die Gewebeproben aus dem ersten Trimester (1. Trim) wurden von elektiven Schwangerschaftsabbrüchen von gesunden Schwangeren und gesunden Schwangerschaften aus der ambulanten Praxis von Herrn Dr. med. Thorsten Nowak bezogen. Die Plazenten von Schwangeren, die am Termin entbunden wurden (Termin) und von an später Präeklampsie erkrankten Patientinnen (PE) wurden von der Station für Geburtshilfe unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Frank Louwen bezogen.

Als Präeklampsie erkrankte Patientinnen wurden Schwangere definiert, die an einer späten Präeklampsie erkrankten (ab 34+0 SSW), welche mit einem arteriellen Hypertonus ($\geq 140/90$ mmHg) und einer zusätzlichen Nierenmanifestation (Proteinurie ≥ 300 mg/d) einherging.

Tabelle 1: Klinische Daten der Schwangeren

Es ist der Mittelwert oder Minimal- und Höchstwert mit Standardabweichung für verschiedene klinische Parameter angegeben.

Gruppe	n	Alter	Gestationsalter (Wochen)	BMI	Geburts- perzentile
1. Trim	4	31 \pm 2.45	6-11 \pm 1,83	29.7 \pm 5.8	n.b.
Termin	4	30,5 \pm 3,9	40-42 \pm 0,96	21,73 \pm 2,10	13-86 \pm 35,9
PE	3	32,7 \pm 3.06	37-40 \pm 1,53	25,8 \pm 5,09	3-64 \pm 29,7

Gruppe	n	Geburts- gewicht (g)	RR _{syst} (mmHg)	RR _{diast} (mmHg)	Proteinurie (mg/d)	sFLT / PIGF
1. Trim	4	n.b.	111 \pm 7.5	76 \pm 3.5	n.b.	n.b.
Termin	4	3273 \pm 539	123,5 \pm 3,4	76,5 \pm 10,3	n.b.	n.b.
PE	3	2573 \pm 595	171 \pm 6,56	108,3 \pm 6,7	4420 \pm 3465	310,33 \pm 118,9

Abkürzungen: 1. Trim: 1. Trimester, BMI: Body-Mass-Index, n.b.: nicht bestimmt, PE: Präeklampsie, PlGF: Plazenta Wachstumsfaktor, RR syst: systolischer Blutdruck nach Riva-Rocci, RR diast: diastolischer Blutdruck nach Riva-Rocci, sFlt: soluble Fms-like tyrosinkinase-1

2.2 Material

2.2.1 Laborgeräte

Centrifuge 5415R (Eppendorf, Hamburg, D)

Centrifuge Megafuge 16R (Heraeus, Hanau, D)

Centrifuge Sorvall RC-5B (Du Pont, Markham, D)

Centrifuge Universal 4 (Hettich, Tuttlingen, D)

Durchflusszytometer FACSCalibur™ (BD Biosciences, Heidelberg, D)

Elektrophoresekammer Mini-PROTEAN® (Bio-Rad, München, D)

Entwicklungsmaschine Optimax Typ TR (MS Laborgeräte, Wiesloch, D)

Fluoreszenzmikroskop AxioImager.Z1 und AxioObserver.Z1 mit AxioCam MRm und AxioCam MRc (Zeiss, Jena, D)

Gewebekulturrotator (Fisher-Scientific, Nidderau, D)

Heizeinheit DRI-BLOCK® DB-3A (Techne, Stone, UK)

HERAfreeze BASIC (Heraeus, Hanau, D)

Horizontal Mixer ST5 (CAT, Thermo Scientific, Schwerte, D)

Inkubations-Schüttelschrank Certomat® BS-1 (B. Braun, Melsungen, D)

Inkubator BBD 6220 (Heraeus, Hanau, D)

Konfokales Laserscan-Mikroskop CTR 6500 (Leica, Heidelberg, D)

Leica CTR 6500 (Leica, Heidelberg, D)

Mechanische Pipette Eppendorf Research® plus (Eppendorf, Hamburg, D)

Multilabel-Plattenlesegerät Victor™ 1420 (Wallac, Finnland)

pH-Messkette Fisherbrand Hydrus 400 (Fisher Scientific, Schwerte, D)

Polymerase-Kettenreaktion-Gerät StepOne™ real-time PCR-System (Applied Biosystems, Waltham, USA)

Protein Blotting - Transfer System Trans-Blot® (Bio-Rad, München, D)

Safe 2020 Class II Biological Safety Cabinet (Thermo Scientific, Schwerte, D)

Spektrophotometer (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)

Thermo-Cycler 2720 (Applied Biosystems, Waltham, USA)

Turbo™ (Bio-Rad, München, D)

2.2.2 Programmausstattung

Adobe Illustrator CS3 (Adobe Systems Incorporated, USA)

Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems Incorporated, USA)

Angiogenese-Analysator von Gilles Carpentier (ImageJ; 2012)

AxioVision Rel. 4.8 (Zeiss, Heidelberg, D)

CellQuest™ Pro Software (BD Biosciences, Heidelberg, D)

Chemotaxis and Migration Tool V2.0 (Ibidi GmbH, Martinsried, D)

Corel Draw X4 (Corel Corporation, USA)

Flowing Software (Turku Bioscience, Finnland)

GraphPad PRISM (Graphpad Software Inc., USA)

ImageJ (National Institutes of Health, USA)

Microsoft Office (Microsoft, USA)

StepOne Software v2.2.2 (Applied Biosystems, Waltham, USA)

2.2.3 Puffer und Lösungen

Für alle Puffer und Lösungen wurde deionisiertem Wasser verwendet. Die Reagenzien, die in der Zellkultur verwendet wurden, wurden zuvor bei Bedarf steril filtriert. Die Kalibrierung des pH-Wertes erfolgte mit 1 M Natriumhydroxidlösung (NaOH) oder 1 M Salzsäure.

α -Chymotrypsin Lösung (nach der Herstellerinformation)

1 g	Chymotrypsin
5 ml	Natriumchlorid Lösung (0,9 %)

Antikörper-Verdünnungspuffer (ABD, *engl.* antibody dilution buffer)

10 mM	TRIS (Tris(hydroxymethyl)aminomethan), pH 7.5
0,9 %	Natriumchlorid
5 mM	EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)
1 mg/ml	BSA (Bovines Serumalbumin)
10 %	FCS (Fetales Kälberserum)

Coomassie[®]-Färbung: Gelatine-Zymographie

0,5 %	Coomassie [®] Brilliant Blue R-250
5 %	Methanol
10 %	Ethansäure

Dispase II, 0,9 U/mg (nach der Herstellerinformation) zu 4 U/ml Dispase II Lösung

1 g	Dispase II
225 ml	HBSS

Entfärber: Gelatine-Zymographie

10 %	Methanol
5 %	Ethansäure

Entwicklungspuffer: Gelatine-Zymographie

50 mM	TRIS (Tris(hydroxymethyl)aminomethan), pH 7,4
10 mM	Calciumchlorid
5 μ M	Zinkchlorid

Fixierungs- und Permeabilisierungsreagenz

4 %	PFA (Paraformaldehyd)
0,1 %	Triton™ X-100
10 ml	PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung)

Gelatine (0,1 %) SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)

Reagenz	Trenngel 8 %	Sammelgel
H ₂ O	6,04 ml	4,7 ml
TRIS pH 8,8	8,94 ml	-
TRIS pH 6,8	-	834 µl
1 % Gelatinelösung	2,5 ml	-
Rotiphorese 30	6,4 ml	66 µl
10 % SDS	240 µl	1114 µl
20 % APS	80 µl	66 µl
TEMED	16 µl	6,6 µl

Hanks' balanced salt solutions (HBSS) (HANKS und WALLACE 1949)

8 g	Natriumchlorid
0,4 g	Kaliumchlorid
0,14 g	Calciumchlorid
0,09 g	Natriumdihydrogenphosphat
0,06 g	Kaliumdihydrogenphosphat
0,35 g	Natriumhydrogencarbonat
0,1 g	Magnesiumchlorid
0,1 g	Magnesiumsulfat
1 g	D-Glucose
1 l	H ₂ O

Kollagenase II Lösung 125 U/ml (nach der Herstellerinformation)

1 g	Kollagenase Typ II
1 l	HBSS

Laufpuffer-Vorrat: Gelatine-Zymographie

144 g	Glycin
30 g	TRIS (Tris(hydroxymethyl)aminomethan), pH 7,4
1 l	H ₂ O

Laufpufferansatz: Gelatine-Zymographie

10 %	Laufpuffer-Vorrat
0,2 %	SDS (Natriumdodecylsulfat)

Lysepuffer für Erythrozyten

155 mM	Ammoniumchlorid
10 mM	Kaliumhydrogencarbonat
0,1 mM	EDTA, pH 8.0

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, *engl.* phosphate buffered solution)

8 g	Natriumchlorid
0,2 g	Kaliumchlorid
1,44 g	Dinatriumhydrogenphosphat
0,24 g	Kaliumdihydrogenphosphat
0,2 %	Tween® 20
1 l	H ₂ O

Renaturierungspuffer: Gelatine-Zymographie

2,5 %	Triton™ X-100
-------	---------------

2.2.4 Zellkultur

Amphoterecin B: Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), #A9528

Cellbanker 1 (Kryomedium): AMSBIO (Abingdon, UK), #11910

DMEM Medium: Gibco™/Life Technologies (Darmstadt, D), #41965062

DMEM/F-12 Medium: Gibco™/Life Technologies (Darmstadt, D), #11320033

DMSO (Dimethylsulfoxid): AppliChem (Darmstadt, D), #A3672

DPBS: Gibco™ (Carlsbad, USA), #14190144

Fetal Bovine Serum (FBS), Premium: Gibco™/Life Technologies (Darmstadt, D), #17974731

hFGF: Promega GmbH (Walldorf, D), #G5071

Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System: Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA), #Nunc, 154526)

Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml): Gibco™/Life Technologies (Darmstadt, D), #15276355

RPMI Medium 1640: Gibco™/Life Technologies (Darmstadt, D), #21875034

Trypanblau-Lösung: Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, D), #15250061

Trypsin-EDTA (0,05 %), (0,25 %): Gibco™/Life Technologies (Darmstadt, D), # 25300054, #25200056

Vakuumfiltrationseinheit, Filtropur V50, 500 ml: Sarstedt (Nümbrecht, D), #83.3941.502

Zellkulturflasche, T-175: Sarstedt (Nümbrecht, D), #83.3912.002

Zellkulturplatte, 6 Wells: Sarstedt (Nümbrecht, D), #83.3920

Zellkulturplatte, 96 Wells: Sarstedt (Nümbrecht, D), #83.3924

Zellkulturschale, 6 cm, 10 cm, 15 cm: Sarstedt (Nümbrecht, D), #83.3901, #83.3902, #83.3903

2.2.5 Zelllinien

HTR-8/SVneo (HTR)

Die trophoblastäre Zelllinie HTR-8/SVneo weist in der Zellkultur eine unbegrenzte Lebensdauer auf. Die ursprüngliche HTR-8 Zelllinie wurde durch ausgewanderte Zellen aus Gewebestücken von humanen Ersttrimesterzotten auf Zellkulturplatten gewonnen. Die Umwandlung zu einer unbegrenzter Lebensdauer erfolgte durch Einfügen des Gens für das große T-Antigen des Simian-Virus 40. HTR-8/SVneo besitzen die invasiven Charakteristika von EVT's (Graham et al. 1993). Freundlicherweise wurde die Zelllinie HTR-8/SVneo von Herrn Prof. Charles H. Graham an der Queen's University in Kingston bereitgestellt.

HIPEC-65 (HIPEC)

Die extravillöse Trophoblastenzelllinie HIPEC-65 (*engl.* human invasive, proliferative extravillous cytotrophoblast-65) wurde mit dem Simian-Virus 40 transfiziert (Pavan et al. 2003). Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Thierry Fournier von der Universität Paris Descartes bereitgestellt.

2.2.6 Primärisolation

α -Chymotrypsin: Sigma Aldrich (St. Louis, USA), #9004-07-3

Dispase II: Roche (Mannheim, D), #4942078001

Endothelial cell growth supplement: Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), # E0760-15MG

Kollagenase II: Worthington Biochemical Corporation (Lakewood, USA), # LS0004176

NaCl 0,9%, 1000 ml: B. Braun (Melsungen, D), #3570160

Vasofix® Safety: B. Braun (Melsungen, D), #4268113S-01

2.2.7 Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenzfärbung

Tabelle 2: Primäre Antikörper für Durchflusszytometrie

Antigen	Spezies	Konjugation	Verdünnung	Bestellnr.	Firma
CD14	human	PerCP-Cy5.5	1:100	45-0149-42	eBioscience
CD31	human	APC	1:100	17-0319-42	eBioscience
CD34	human	FITC	1:100	343504	BioLegend
CD73	human	PE	1:25	550257	BD Bioscience
CD90	human	FITC	1:100	11-0909-42	eBioscience
CD105	human	PE	1:100	323206	BioLegend
CD106	human	APC	1:20	551147	BD Bioscience
CD144	human	FITC	1:20	560411	BD Bioscience
CD146	human	PE	1:100	12-1469-42	eBioscience

BD Bioscience (Franklin Lakes, USA), BioLegend (San Diego, USA), eBioscience/ Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)

Tabelle 3: Primäre Antikörper für Immunfluoreszenz

Antigen	Spezies	Verdünnung	Bestellnr.	Firma
Acetyliertes α -Tubulin	Maus	1:700	T6793	Sigma-Aldrich
Arl13B	Ratte	1:700	17711-1-AP	Proteintech
Cytokeratin 7	Maus	1:700	M7018	DAKO
Pericentrin	Ratte	1:400	AB28144	Abcam
Phosphor-FAK	Maus	1:400	3283	Cell Signaling
SMO	Maus	1:75	Sc-766685	Santa Cruz Biotechnology

Vimentin	Maus	1:400	M7020	DAKO
----------	------	-------	-------	------

Abcam (Cambridge, UK), Cell Signaling (Frankfurt a. M., D), DAKO (Jena, D), Proteintech (Rosemont, USA), Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Die sekundären Antikörper, die mit FITC, Cy3 und Cy5 konjugiert sind, wurden von Jackson ImmunoResearch (Cambridge, UK) bezogen und mit einer Konzentration von 1:700 eingesetzt.

Phalloidin-Atto 550: Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), #19083

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride): Roche (Mannheim, D), #D9542

2.2.8 RNA-Isolation und Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion

EXTRACTME TOTAL RNA KIT: 7BioScience (Neuenburg, D), #EM09.2-250

GoScript™ Reverse Transcription Mix, Random Primers: Promega (Walldorf, D), # 9PIA280

Tabelle 4: Proben für Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion

Proben für die Genexpression wurden von Applied Biosystems (Waltham, USA) bezogen		
Gensymbol	Genname	Probenkennung
<i>ADIPOQ</i>	Adiponectin	Hs00605917_m1
<i>AURKB</i>	Aurora Kinase B	Hs00945858_g1
<i>CCNB1</i>	Cyclin B1	Hs01030099_m1
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	Hs02758991_g1
<i>GLI1</i>	GLI family zinc finger 1	Hs00171790_m1
<i>KLF4</i>	Kruppel-Like Factor 4	Hs00358836_m1
<i>LEP</i>	Leptin	Hs00174877_m1
<i>MMP2</i>	Matrix-Metalloproteinase 2	Hs01548727_m1
<i>MMP9</i>	Matrix-Metalloproteinase 9	Hs00957562_m1
<i>NANOG</i>	Homeobox Transcription Factor Nanog	Hs04260366_g1
<i>PGF</i>	Placenta Growth Factor	Hs00182176_m1
<i>PTCH1</i>	Patched 1	Hs00181117_m1
<i>SMO</i>	Smoothed, Frizzled Class Receptor	Hs01090242_m1
<i>SPP1</i>	Secreted Phosphoprotein 1 (Osteopontin)	Hs00959010_m1
<i>VEGFA</i>	Vascular Endothelial Growth Factor A	Hs00900055_m1
<i>ZEB1</i>	Zinc Finger E-box-binding Homeobox 1	Hs01566408_m1

2.2.9 In-vitro-Versuche

Tabelle 5: Material für die in-vitro-Versuche

Experiment	Material
Angiogenese	Cultrex® Reduced Growth Factor Basement Membrane Extract: R&D Systems (Minneapolis, USA), #3433-005-01

Differenzierung	StemPro™ Adipogenesis Differentiation Kit: Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA), # A1007001 StemMACS OsteoDiff Media: Miltenyi Biotec (Glabach, D), #130-091-678) StemPro™ Chondrogenese-Differenzierungs-Kit: Gibco™/Life Technologies (Darmstadt, D), # A1007101 Alcianblau-Färbelösung: Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), #TMS-010-C Alizarinrot-Färbelösung: Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), #TMS-008-C
Direkte Ko-Kultur	Zellkultureinsatz für 6-Well-Platten, Porengröße 0,4 µm: Greiner bio-one GmbH (Frickenhausen, D), #657640
Hh-Signalweg	Opti MEM: Gibco (Carlsbad, USA) # 11058021 Opti-MEM™ I: Gibco™/Life Technologies (Darmstadt, D), #31985070 SAG: Biomol (Hamburg, D), #Cay11914-1
Migration	Culture-Inserts 2 Kammer: Ibidi GmbH (Gräfelfing, D) #80209
Viabilität	CellTiter-Blue® Cell Viability Assay: Promega GmbH (Walldorf, D), #G8080
Zellzyklus	RNase A: Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), #232-646-6) Propidiumiodid (PI): Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), #P1304MP
Zymographie	Gelatine: Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), #G1890

2.2.10 ELISA

β-hCG ELISA: DRG Diagnostic (Marburg, D), #EIA-1911

Human PlGF ELISA Kit: RayBiotech Life (Heidelberg, D), #P49763

VEGF-A (human) Elisa Kit: DRG Instruments (Marburg, D), # EIA-4826

2.3 Methoden, Messmethoden

Die Darstellung der statistischen Tests erfolgte mittels GraphPadprism.

Alle Mikroskopieaufnahmen wurden mit einem AxioObserver.Z1-Mikroskop (Zeiss) durchgeführt und mit einer AxioCam MRC-Kamera (Zeiss) angefertigt.

2.3.1 Zellkultur

Die Standardbedingungen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relative Luftfeuchtigkeit im BBD 6220 Inkubator gehalten. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von maximal 80-90 % erneut ausgelegt. Alle Arbeiten mit Zellkulturen erfolgten unter einer Laminar-Flow-Bench. Zum Ablösen der HTR-, HIPEC-, HUVEC-Zellen wurde 0,05 % Trypsin verwendet, während für hCV-MSCs 0,25 % Trypsin eingesetzt wurde.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer und Trypanblau-Lösung. Das Kryomedium für die längerfristige Aufbewahrung von HTR, HIPEC und HUVEC Zellen bei -80 °C setzte sich aus 50 % FCS, 40 % Medium und 10 % DMSO zusammen. Für die primären MSCs wurde Cellbanker 1 (AMSBIO) als Kryomedium verwendet.

Tabelle 6: Mediumzusammensetzung für Zelllinien

Mediumzusammensetzung	
HTR	RPMI + 15 % FCS + Amphotericin B + 1% Pen/ Strep
HIPEC	DMEM/F-12 + 15 % FCS + Amphotericin B + 1% Pen/ Strep
1. Trim-hCV-MSC	DMEM + 20 % FCS + 5 ng/ml hFGF
hCV-MSC	DMEM + 20 % FCS
HUVEC	RPMI + 15 % FCS + 1 % P/S

2.3.2 Isolation von Mesenchymalen Zellen aus humanen Plazentazotten (hCV-MSCs)

Die Plazentaprobe von termingerecht entbundenen Schwangeren (n = 4), sowie von an später Präeklampsie erkrankten Schwangeren (n = 3) wurden von der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Frankfurt gesammelt. Die Entnahme dieser Proben wurde von der Ethikkommission des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt genehmigt (Referenznummer: 19-201). Präeklampsie wurde als das Auftreten von Bluthochdruck nach der 20. Schwangerschaftswoche mit einem Blutdruck von $\geq 140/90$ mmHg und Proteinurie von ≥ 300 mg in 24 Stunden diagnostiziert (Schlembach et al. 2019). Patientinnen mit gleichzeitigem HELLP-Syndrom wurden von dieser Studie ausgeschlossen.

Die Plazentaprobe aus dem 1. Trimester von gesunden Schwangerschaften (n = 3) wurden freundlicherweise von der Praxis für Gynäkologie und Geburtshilfe unter der Leitung von Dr. Nowak bereitgestellt. Auch diese Probenentnahme wurde von der Ethikkommission des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt genehmigt (Referenznummer: 19-455). Von allen Spenderinnen wurde im Vorhinein eine informierte schriftliche Einwilligung eingeholt. Die klinischen Daten der Patientinnen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Das angewandte Protokoll basiert auf der Veröffentlichung von Steigman und Fauza (2007) und wurde modifiziert. Das Material aus dem ersten Trimester wurde in einem 50-ml-Zentrifugenröhrchen übergeben und zur Darstellung der Strukturen in einer 15-cm-Zellkulturschale mit HBSS gewaschen. Die Plazenta, abhängig von der

Schwangerschaftswoche meist sehr klein, wurde identifiziert und in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen gegeben.

Die Vorbereitung des Plazentamaterials der am Termin entbundenen Frauen erfolgte durch Lösen der Amnionmembran und Entnahme des darunterliegenden Gewebes mit einer Tiefe von 1 cm. Nach dem Zerkleinern wurde das Gewebe ebenfalls in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen überführt.

Die folgenden Schritte wurden für beide Isolationen angewandt, das Zentrifugieren erfolgte immer bei 1400 U/min über 5 Minuten.

Das vorbereitete Gewebe wurden zweimal gewaschen, indem nach der Zugabe von DPBS + 1 % Penicillin-Streptomycin das Gewebe aufgeschüttelt und anschließend zentrifugiert wurde. Danach wurden 15 ml Kollagenase II 275 U/ml und 500 µl Dispase II 90 U/ml hinzugefügt. Die Verdauung erfolgte über 75 Minuten bei 37 °C und 200 U/min im Inkubations-Schüttelschrank. Die Enzyme wurden anschließend mit 15 % FCS-haltigem Medium abgestoppt und zentrifugiert. Das Zell- und Restgewebepellet wurde in 10 ml PBS aufgenommen und durch ein 100 µm Sieb filtriert und anschließend zentrifugiert. Das in 10 ml Erythrozytenlysepuffer aufgenommene Zellpellet wurde für 10 Minuten im 37 °C warmen Wasserbad inkubiert. Nach dem Zentrifugieren wurde die Farbe des Zellpellets beurteilt. Wenn es noch kräftig rot war, wurde der letzte Schritt wiederholt. Bei hellem Zellpellet wurde einmal mit PBS resuspendiert und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 10 ml Medium aufgenommen und in eine 10-cm-Zellkulturschale überführt. Nach 24 Stunden wurde bei einem Mediumwechsel gründlich mit PBS gewaschen, um die nicht adhärenen Zellen abzuwaschen.

2.3.3 Isolation von humanen Endothelzellen der V. umbilicalis (HUVECs)

Die Nabelschnurproben von gesunden Schwangerschaften wurden von der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Frankfurt gesammelt. Die Entnahme dieser Proben wurde von der Ethikkommission des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt genehmigt (Referenznummer: 19-201). Von allen Spenderinnen wurde im Vorhinein eine informierte schriftliche Einwilligung eingeholt.

Zur Isolation der HUVECs (*engl.* human umbilical vein endothelial cells) wurde die Nabelschnur in HBSS mit 2 % Penicillin-Streptomycin transportiert und in eine 10-cm-Zellkulturschale überführt. Anschließend wurden grobe Verschmutzungen mit HBSS

abgespült. Die abgeklemmten Enden der Nabelschnur, wurden mit einem geraden Schnitt durch ein Skalpell abgetrennt. Das zu isolierende Stück war mindestens 7 cm lang. Danach wurde die Nabelschnur erneut mit HBSS gespült. Für den Anschluss an die Vene wurde ein Venenverweilkatheter verwendet, hierfür wurde die Kanüle entfernt und der Katheter um etwa 1 cm gekürzt. Der Katheter wurde vollständig in die Vene eingeführt und mit zwei Klammern an der Nabelschnur befestigt. Eine 50-ml-Spritze wurde mit HBSS befüllt und über eine Infusionsleitung mit dem Venenverweilkatheter verbunden. Das untere Ende der Nabelschnur wurde in ein Zentrifugenröhrchen gehängt und die Vene mit HBSS durchspült. Das in 5 ml NaCl (0,9 %) gelöste α -Chymotrypsin wurde in eine 5 ml Spritze aufgezogen. Die Infusionsleitung wurde vom Katheter gelöst, und die Enzymlösung wurde in die Vene gespritzt, bis etwas Flüssigkeit auf der anderen Seite austrat. Anschließend wurde das untere Ende mit einer Klemmschere abgeklemmt und der Rest der Lösung hineingegeben. Während der Inkubationszeit von 10 Minuten wurde mehrmals entlang der Vene mit der Pinzette gedrückt, um die Zellen zu lösen. Anschließend wurde die Vene mit 50 ml HBSS gespült, um die gelösten Zellen zu gewinnen. Die Zellsuspension wurde für 10 Minuten bei 1400 U/min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 4 ml RPMI-Medium + 15 % FCS + 1 % P/S aufgenommen und in eine 6-cm-Schale überführt. Nach 24 Stunden im Inkubator wurden die nicht adhärenente Zellen bei einem Mediumwechsel abgewaschen.

2.3.4 Immunfluoreszenz

Die in 4-Kammer Objektträgern kultivierten Zellen wurden für 15 Minuten mit 4 % PFA und 0,1 % TritonTM X-100 fixiert. Anschließend wurden sie 15 Minuten mit PBS gewaschen und mit ABD-Puffer für 30 Minuten bedeckt. Der primäre Antikörper wurde in ABD-Puffer verdünnt. Zur Anfärbung der Aktinfilamente wurde Phalloidin-Atto 550 (1:700) verwendet. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen zweimal für jeweils 15 Minuten mit PBS gewaschen. Währenddessen wurde der immunfluoreszenzkonjugierte sekundäre Antikörper in ABD-Puffer verdünnt (1:700). Die anschließende Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS für jeweils 15 Minuten erfolgte die Chromosomenfärbung. Hierfür wurde DAPI in einer Verdünnung von 1:30.000 in PBS hinzugegeben, die Inkubation erfolgte für 5 Minuten ebenfalls im Dunkeln. Nach einem 5-minütigem Waschen mit destilliertem Wasser und Entfernen desselben wurde Vectashield aufgetragen und ein Deckglas aufgelegt. Die

Ränder wurden mit Klebstoff luftdicht verschlossen. Die anschließende Auswertung erfolgte mit einem AxioObserver und einem Z1-Mikroskop. Die Aufnahmen wurden mit einer AxioCam MRm-Kamera über das Programm AxioVision Rel. 4.8 angefertigt. Darüber hinaus wurden die Objektträger mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie unter Verwendung von Z-Stapelbildern mit einem HCXPI APO CS 63,0 × 1,4 Ölobjectiv untersucht. Alle Bilder eines Experiments wurden mit der gleichen Laserintensität und Belichtungszeit aufgenommen. Eine Reihe von Z-Stapelbildern wurde in Abständen von 0,5 µm aufgenommen und repräsentative Aufnahmen durch die Überlagerung einzelner Bilder aus konfokalen Z-Abschnitten generiert.

2.3.5 RNA-Isolation und Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion

Die Gesamt-RNA von HTR-, HIPEC- und hCV-MSC-Zellen wurde mit dem EXTRACTME TOTAL RNA KIT (7Bioscience GmbH, Neuenburg am Rhein, Deutschland) extrahiert. Die reverse Transkription wurde unter Verwendung des GoScript™ Reverse Transcription Mix mit Random Primers (Promega GmbH, Walldorf, Deutschland) durchgeführt. Die Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion wurde mit einem StepOnePlus Real-time PCR-System durchgeführt. Wie vom Hersteller angegeben, wurde dafür jeweils 5 ng RNA pro Reaktion und TaqMan® Fast Advanced Master Mix in einem Reaktionsvolumen von 10 µl verwendet und jeweils als Triplet durchgeführt.

Die Daten wurden mit der StepOne Software v.2.3 analysiert. Unter Verwendung der vergleichenden CT-Methode wurde die Genexpression als ΔCT dargestellt, wobei GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) als endogene Kontrollreferenz genutzt wurde. Der ΔCT -Wert ist umgekehrt proportional zur Menge der Zielmoleküle in der Reaktion. Die endgültigen Ergebnisse wurden als relative Quantifizierung (RQ) dargestellt, die den Unterschied im Genexpressionsniveau zwischen den analysierten Proben angibt. Hierfür wurde auf den Expressionswert der Kontrollbedingung normalisiert und der Mittelwert sowie die minimalen und maximalen Bereiche angegeben. Da die RQ einer Gruppe als $2^{-(\Delta CT_{group} - \Delta CT_{control})}$ definiert ist, führt der RQ-Wert für die Kontrollgruppe selbst zu einem Wert von $RQ = 1$ ohne Variation.

2.3.6 Charakterisierung der hCV-MSCs

Durchflusszytometrie

Nach dem Ablösen der Zellen mit 0,25 % Trypsin wurden die Zellen für 5 Minuten bei 1400 U/min zentrifugiert. Zum Fixieren wurde 4 °C kaltes 2 % PFA in PBS verwendet,

was über 15 Minuten bei 4 °C erfolgte. Nach zweimaligem Waschen mit 1 ml PBS bei 1400 U/min für 5 Minuten wurde das Zellpellet in 100 µl PBS resuspendiert und in ein FACS-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Antikörper hinzugefügt und die Inkubation erfolgte über 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln. Zum Messen wurde die Zellsuspension mit Cell Flow auf 300 µl aufgefüllt. Anschließend wurde die Messung mit dem FACSCalibur™ durchgeführt.

Zellzyklus

Für die Analyse des Zellzyklus wurden die Zellen bei hoher Konfluenz gesammelt, zentrifugiert und das Pellet in 100 µl PBS suspendiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten in 1 ml gekühltem 70 % Ethanol auf Eis fixiert. Nach dem Waschen mit PBS und anschließendem zentrifugieren für 5 Minuten bei 1400 U/min und 4 °C wurden die Zellen mit 100 µl RNase (1 mg/ml) behandelt und anschließend mit 100 µl Propidiumjodid (100 µg/ml) gefärbt. Nach einer 30-Minütigen Inkubation bei 37 °C im Dunkeln erfolgte die Messung mit dem FACSCalibur™.

Viabilität

Das CellTiter-Blue® Assay wurde gemäß der Anleitung des Herstellers verwendet.

2.3.7 Standardisierter Überstand

Für die Gewinnung des Überstandes wurden 20 ml MSC-Medium (DMEM + 20 % FCS) in 80 – 90 % konfluent bewachsenen T-175-Zellkulturflaschen gegeben und nach 72 Stunden entnommen. Der Überstand wurde in Aliquots bei -80 °C gelagert, die jeweils nur einmalig aufgetaut wurden.

2.3.8 Funktionelle Assays der hCV-MSCs

Das primäre Zilium als zentraler Ort der Signaltransduktion wurde zur Bewertung der Funktionalität herangezogen. Zur Beurteilung der Kapazität der Signaltransduktion wurde der exklusiv am primären Zilium lokalisierte Hh-Signalweg analysiert. Der Eintritt in die G1/G0 Phase durch Nährstoffentzug wurde genutzt, um die dort stattfindende Ziliogenese zu forcieren. Zudem wurde untersucht, welchen Einfluss die in-vivo ähnelnde 3D-Anordnung auf die Ziliogenese besitzt und ob die in der Literatur beschriebene verbesserte Funktionalität sich auch in einer veränderten Zilienmorphologie widerspiegelt.

Zilienfärbung

Zur Analyse der Zilien wurden die hCV-MSCs in 4-Kammer-Objektträger mit einer hohen Konfluenz in etwa 90 % ausgelegt. Nach der Zelladhärenz, mindestens 12 Stunden, wurde das Medium für die nährstofffreie Kondition durch DMEM ohne FCS ersetzt. Für die Kontrollkondition wurde ein Mediumwechsel mit hCV-MSC-Medium durchgeführt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen fixiert und eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung für Arl13b und acetyliertes Tubulin durchgeführt. Anschließend wurde der Anteil der zilientragenden hCV-MSCs ausgewertet, wobei 15 Gesichtsfelder, zusammengefasst aus drei hCV-MSC-Isolationen je Gruppe, betrachtet wurden. Die Zilienlänge wurde von 300 Zilien, ebenfalls zusammengefasst aus drei hCV-MSC-Isolationen je Gruppe, mit ImageJ als gerade Linie gemessen.

Sphäroid Bildung

Die Bildung von hCV-MSC-Sphäroiden erfolgte mittels hängender Tropfen. Dafür wurden Tropfen, bestehend aus 2×10^3 Zellen in 25 μ l Medium, auf der inneren Seite von Zellkulturschalendeckeln gebildet. Mit einer forschenden, fließenden Bewegung wurde der Deckel gedreht und auf eine mit PBS bedeckte Zellkulturschale gelegt. Nach der Bildung von Sphäroiden, in etwa zwischen 72 und 96 Stunden, wurde bei Hälfte der Tropfen das Medium durch FCS-freies DMEM ersetzt, bei der anderen Hälfte erfolgte ein Mediumwechsel. 24 Stunden nach dem Mediumwechsel wurden die Sphäroide in Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System transferiert. Nach weiteren 24 Stunden, in denen eine leichte Adhäsion ohne Formverlust stattfand, wurden die Zellen fixiert und eine Immunfluoreszenzfärbung mit Arl13b und acetyliertem Tubulin durchgeführt. Es wurden je Gruppe 300 Zilien in den Sphäroiden vermessen, zusammengefasst aus drei hCV-MSC-Isolationen.

Aktivierung Hh-Signalweg

Zur Aktivierung des Hedgehog Signalwegs wurden die hCV-MSCs in nährstofffreiem Opti MEM für 24 Stunden kultiviert und anschließend 400 nM des synthetischen Moleküls Smoothed Agonist (SAG) hinzugegeben. Die Kultivierung erfolgte weiterhin in nährstofffreiem Medium. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen fixiert und eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung für Pericentrin, Arl13b und SMO angefertigt. Nach der Aufnahme der Objektträger mit Axio Vision Rel 4.8 wurde die Fluoreszenzintensität von SMO entlang des primären Ziliums mithilfe des ImageJ Plugins „Line-Scan Analysis“ ausgewertet. Die durchschnittlichen Intensitäten wurden entlang des Axonems

in 10 %-Intervallen über eine drei Pixel breite Linie gemessen und mithilfe des ImageJ Plugins „Plot Roi Profile“ gegen die Zilienlänge normalisiert. Zudem wurde die Genexpression der Hedgehog assoziierten Proteinen GLI, SMO und PTCH1 untersucht. Die Ergebnisse stammen aus drei unabhängigen Experimenten von unterschiedlichen hCV-MSC-Isolationen.

Motilität

Für die Messung der Motilität einzelner hCV-MSCs wurden die Zellen mit geringer Konfluenz in 6-Well-Platten ausgelegt. Mittels einer integrierten Kammer im Mikroskop wurden die Bedingungen nahe an optimalen Wachstumsbedingungen gehalten (37 °C, 5 % CO₂). Über 12 Stunden hinweg wurden in 5-Minuten-Intervallen Hellfeldaufnahmen angefertigt. Die Zeitrafferaufnahmen wurden über einen Zeitraum von 11 Stunden und 15 Minuten mit der Software ImageJ 1.49i, unter Verwendung des Plugins für manuelles Tracking und des „Chemotaxis and Migration Tool“, analysiert. Die Geschwindigkeit und akkumulierte Distanz wurden auf Basis der Rohdatenpunkte mit dem Chemotaxis and Migration Tool berechnet, und die zurückgelegten Strecken der Zellen wurden visualisiert. Pro Bedingung wurden 30 zufällig ausgewählte Zellen analysiert, und das Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander mit unterschiedlichen hCV-MSC-Isolationen je Gruppe wiederholt.

Differenzierung

Die Differenzierung wurde mit Modifikationen durchgeführt. Hierfür wurden die hCV-MSCs mit dem StemPro™ Adipogenesis Differentiation Kit bis zu 21 Tage kultiviert, um eine adipogene Differenzierung zu induzieren. Die Differenzierung erfolgte nach einem Intervallplan, die Kultivierung erfolgte 3 Tage im Differenzierungsmedium und 4 Tage im hCV-MSC-Kulturmedium zur Erhaltung. Nach 3 Zyklen wurden die Zellen fixiert, mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) gefärbt und auf für Adipozyten charakteristische Lipidtröpfchen analysiert.

Der Anteil der differenzierten Adipozyten wurde durch Auszählen der Zellen mit Lipidvakuolen in 15 Gesichtsfeldern ermittelt, zusammengefasst aus drei hCV-MSC-Isolationen je Gruppe. Zudem wurden die Gene *LEPTIN* und *ADIPOQ*, zwei wichtige Marker der Adipogenese, untersucht, wobei die relative Expression auf die Kontrollkondition der termingerechten hCV-MSCs standardisiert wurde. Die Ergebnisse stammen aus drei unabhängigen Experimenten.

Zur osteogenen Differenzierung wurden die hCV-MSCs bis zu 21 Tage mit StemMACS OsteoDiff Media inkubiert, fixiert und mit 2 % Alizarinrot S (pH 4,2) gefärbt, um die für Osteozyten charakteristischen Kalkablagerungen zu visualisieren. Mittels Hellfeldmikroskopie wurden Aufnahmen angefertigt und in 15 Gesichtsfeldern, zusammengefasst aus drei hCV-MSC-Isolationen je Gruppe, wurden die Alizarinrot-positiven, differenzierten Zellen ausgezählt und als relativer Anteil angegeben. Zusätzlich wurde mittels ImageJ der mittlere Grauwert der Aufnahmen bestimmt, der die Summe der Grauwerte aller Pixel in Relation zur Pixelanzahl darstellt. Dieser Wert diente als Indikator für den Anteil der differenzierten, angefärbten Zellen. Darüber hinaus wurden die wichtigen osteogenen Differenzierungsgene OPN, PTCH1 und KLF4 analysiert, wobei die relative Expression auf die Kontrollkondition der terminierten hCV-MSCs standardisiert wurde. Die Ergebnisse stammen aus drei unabhängigen Experimenten.

Die chondrogene Differenzierung wurde durch Inkubation von hCV-MSCs mit StemMACS ChondroDiff Media bis zu 21 Tage lang herbeigeführt. Die Zellen wurden fixiert und mit einer Alcianblau-Lösung gefärbt (Terry et al. 2000), um Ablagerungen sulfatierter Proteoglykane sichtbar zu machen, die auf funktionsfähige Chondrozyten hinweisen.

Die Quantifizierung der Alcianblau-positiven Zellen erfolgte in 15 Gesichtsfeldern, die aus drei hCV-MSC-Isolationen je Gruppe zusammengefasst wurden. Zusätzlich wurde der mittlere Grauwert der Aufnahmen bestimmt.

Attraction/ Homing

Die Fähigkeit der hCV-MSCs sich in Richtung der EVT zu bewegen, wurde durch direkte Ko-Kultur und Vermessung der Zellfortsätze nach 8 und 16 Stunden analysiert. Die EVT's ($6,5 \times 10^4$ HTR-Zellen oder $5,5 \times 10^4$ HIPEC-Zellen) und hCV-MSCs ($6,5 \times 10^4$) wurden dafür in unterschiedliche Ibidi-Kammern gefüllt. Nach Adhäsion wurde die Ibidi-Kammer entfernt, was den Zeitpunkt 0 h festlegte. Die Länge der Zellfortsätze wurde vom Zellkern aus gemessen. Zur Messung wurden die Zellen nach den angegebenen Zeiten fixiert und das Aktin-Zytoskelett (Phalloidin), die Phospho-fokale Adhäsionskinase (pFAK) sowie die DNA gefärbt.

2.3.9 Interaktion zwischen hCV-MSCs und EVT's, indirekte Ko-Kultivierung

Zur Analyse der Effekte von hCV-MSCs auf andere Zelltypen, die sich in nahegelegenen anatomischen Kompartimenten befinden, wurden indirekte (hCV-MSC-Überstand) Ko-Kultur-Experimente durchgeführt.

Bei der indirekten Ko-Kultivierung sollte der verwendete Überstand der hCV-MSCs in einem möglichst hohen Verhältnis zum HTR-Medium stehen, um eine hohe Konzentration des hCV-MSC-Sekretoms zu gewährleisten, ohne die HTR-Zellen durch Kultivierung in anderem Medium zu stark zu belasten. Um ein optimales Verhältnis zu bestimmen, wurde die Zellviabilität mittels CellTiter-Blue® Assays bei Mischungsverhältnissen von 10 %, 20 %, 30 %, 40 % und 50 % hCV-MSC-Medium zu Beginn, sowie nach 24 und 48 Stunden gemessen. Die Durchführung erfolgte gemäß den Anweisungen des Herstellers. Nach der Auswertung der Viabilität wurde ein Anteil von 50 % am Medium für weitere indirekte Ko-Kultivierung festgelegt. Neben der Kontrollbedingung, bei der die Zellen in ihrem gewohnten Medium kultiviert wurden, wurden bei den anderen Bedingungen 50 % des Mediums ersetzt: Zum einen durch hCV-MSC-Medium, zum anderen durch standardisierten Überstand (siehe 7.3.7) von hCV-MSCs aus dem ersten Trimester, von hCV-MSCs gesunder Kontrollpatientinnen, die zum Termin entbunden hatten, sowie von hCV-MSCs von an Präeklampsie erkrankten Patientinnen, die ebenfalls zum Termin entbunden hatten.

Zilienlänge

Der Einfluss von hCV-MSCs auf die Zilienlänge von HTR-Zellen wurde in einer indirekten Ko-Kultur untersucht. Die HTR-Zellen wurden mit einer hohen Konfluenz ausgelegt und nach der Adhärenz entsprechend den Bedingungen das Medium ausgetauscht. Alle Konditionen wurden mit FCS und ohne FCS durchgeführt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen fixiert und eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung für Arl13b und acetyliertes Tubulin durchgeführt. Die Zilienlänge wurde bei 300 Zilien pro Gruppe mithilfe von ImageJ als gerade Linie gemessen. Diese Daten wurden aus drei unabhängigen Experimenten mit Überstand unterschiedlicher hCV-MSCs zusammengefasst.

Motilität

Um den Einfluss von hCV-MSCs auf die Motilität von EVT zu ermitteln, wurden die Geschwindigkeit und die zurückgelegte Distanz von HTR- und HIPEC-Zellen unter dem Einfluss von hCV-MSC-Überstand gemessen. Sowohl von HTR- als auch von HIPEC-Zellen wurden 6×10^4 Zellen in 6-Well-Platten ausgelegt. Nach der Adhärenz wurde das Medium entsprechend der Bedingungen gewechselt, und über einen Zeitraum von 12 Stunden wurden in 5-Minuten-Intervallen Hellfeldmikroskopieaufnahmen angefertigt. Dabei wurden in einer im Mikroskop integrierten Kammer Standardbedingungen (37 °C,

5 % CO₂) aufrechterhalten. Die Zeitrafferaufnahmen wurden über einen Zeitraum von 11 Stunden und 15 Minuten mit der Software ImageJ 1.49i analysiert, wobei das Plugin für manuelles Tracking und das „Chemotaxis and Migration Tool“ verwendet wurden. Die Geschwindigkeit und akkumulierte Distanz wurden auf Basis der Rohdatenpunkte mit dem Chemotaxis and Migration Tool berechnet, und die zurückgelegten Strecken der Zellen wurden visualisiert. Pro Bedingung wurden 30 zufällig ausgewählte Zellen analysiert, und das Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander mit unterschiedlichen Überständen von hCV-MSC-Isolationen wiederholt.

Aktivität und Expression der Matrix-Metalloproteinasen-2 und -9 in EVT-Zelllinien

Die EVTs besitzen einen invasiven Charakter und sind zur Ausübung ihrer physiologischen Funktionen unter anderem auf ihre Motilität und die Zersetzung der EZM angewiesen. Zur Untersuchung des Einflusses von hCV-MSCs auf die Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen-2 und -9 von EVT-Zelllinien wurde ein Gelatine-Zymographie-Assay durchgeführt. Das Protokoll wurde nach Toth et al. (2012) modifiziert und dient dem Nachweis aktiver Gelatinasen (MMP-2, MMP-9). Dafür wurde ein 0,75 mm dickes, 8 %-SDS-PAGE-Gel mit 0,1 % Gelatine verwendet. Die enthaltene Gelatine wurde durch aktive Gelatinasen zersetzt. Nach der Coomassie Färbung waren an Stellen mit weniger Gelatine hellere Banden zu erkennen.

Die HTR- und HIPEC-Zellen wurden 7 Tage in Medium kultiviert, das zu 50 % aus standardisiertem Überstand von hCV-MSCs (siehe 7.3.7) bestand oder in Kontrollkonditionen. Da FCS Gelatinasen enthält wurde zur weiteren Analyse serumfreier Überstand nach 24 Stunden Kultivierung gewonnen. Der Überstand wurde zentrifugiert (4 °C, 1400 U/min, 4 min), aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Das Auftauen des Überstands erfolgte auf Eis. Es wurden 20 µl Überstand mit 10 µl Probenpuffer gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Gelkammern wurden davon mit 15 µl beladen, anschließend folgte die Elektrophorese bei 125 V für 60 bis 90 Minuten. Die Renaturierung erfolgte mit 2,5 % Triton X-100 über eine Stunde, wobei alle 20 Minuten der Renaturierungspuffer gewechselt wurde. Die Inkubation im Entwicklungspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM CaCl₂, 5 µM ZnCl₂) erfolgte über 36 Stunden bei 37 °C. Die Färbung wurde mit Coomassie für eine Stunde durchgeführt, und das anschließende Entfärben (10 % Methanol, 5 % Ethansäure) erfolgte jeweils über 10 Minuten, welches 2–3-mal wiederholt wurde. Die Quantifizierung der MMP-2- und MMP-9-Aktivität erfolgte mittels Grauwertbestimmung und Normalisierung auf die

MSC-Medium-Kontrollkondition. Die Ergebnisse stammen aus drei unabhängigen Experimenten mit Überständen unterschiedlicher hCV-MSC-Isolationen.

Die relative Expression der Enzyme von HTR- und HIPEC-Zellen wurde nach Kultivierung über 7 Tage in Medium zur Hälfte bestehend aus hCV-MSC-Überstand oder hCV-MSC-Medium bestimmt. Es erfolgte die RNA-Isolation und Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion, um den Gengehalt von *MMP9* und *MMP2* zu analysieren. Die Ergebnisse stammen aus drei unabhängigen Experimenten mit Überständen unterschiedlicher hCV-MSC-Isolationen.

2.3.10 Interaktion zwischen hCV-MSCs und EVT, direkte Ko-Kultivierung

Migration

Die Migration wurde als wound-healing-Assay in Monolage als direkte Ko-Kultur durchgeführt (Rodriguez et al. 2005). Dafür wurden Zellkultureinsätze von Ibidi mit zwei Kammern und einem definierten, zellfreien Spalt von 500 μm in 6-Well-Platten verwendet. Beide Kammern der Zellkultureinsätze wurden jeweils mit 70 μl Zellsuspension befüllt. Es wurden entweder $6,5 \times 10^4$ HTR-Zellen oder $5,5 \times 10^4$ HIPEC-Zellen in jede der Kammern ausgesät. Für die direkte Ko-Kultur wurden 2×10^5 hCV-MSCs um den Zellkultureinsatz herum ausgelegt. Die Einsätze wurden nach 8 Stunden vorsichtig entfernt und das Medium mit hCV-MSC-Medium ersetzt. Hellfeldmikroskopie-Aufnahmen wurden zu Beginn sowie nach 4 und 8 Stunden angefertigt. Die offene, zellfreie Fläche wurde mithilfe der AxioVision SE64 Re. 4.9 Software ermittelt, wobei die zellfreie Fläche zu Beginn als 100 % festgelegt wurde. Der Versuch wurde dreimal unabhängig voneinander mit unterschiedlichen hCV-MSC-Isolationen je Gruppe durchgeführt.

Ko-Kultivierung

Die Zellreihen HTR und HIPEC wurden über sieben Tage hinweg entweder mit standardisiertem Überstand (siehe 7.3.7) der hCV-MSCs kultiviert oder in direkter Ko-Kultivierung. Zur direkten Ko-Kultivierung wurden HTR oder HIPEC in 6-Well-Platten ausgelegt und 3×10^4 hCV-MSCs in einen Einsatz mit 0,4 μm Porengröße in hCV-MSC-Medium ausgelegt und in die Wells eingesetzt. Das Medium beziehungsweise das konditionierte Medium wurde alle drei Tage gewechselt. Neben der Kontrolle, die in Zellkulturmedium ohne Überstände beziehungsweise ohne Einsatz mit hCV-MSCs kultiviert wurde, diente eine zusätzliche Kontrollgruppe mit 50 % hCV-MSC-Medium

als Vergleich. Nach sieben Tagen erfolgte die RNA-Isolation und Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion, um den Gengehalt von *ZEB1*, *AURKB*, *CCNB1* zu analysieren. Der Versuch wurde dreimal unabhängig voneinander mit standardisierten Überständen (siehe 7.3.7) von unterschiedlichen hCV-MSC-Isolationen und die direkte Ko-Kultur mit hCV-MSCs unterschiedlicher Isolationen durchgeführt.

2.3.11 Tube-formation-Assay

Die Fähigkeit zur Bildung zellulärer Netzwerke wurde mittels Angiogenese-Assay zuerst an HTRs in indirekter Ko-Kultur mit hCV-MSCs untersucht. Im Weiteren wurden HUVECs mit ihrer physiologischen Angiogenesekapazität herangezogen, um Aufschluss über die angiogenen Eigenschaften der hCV-MSCs zu erlangen.

Hierfür wurden 96-Well-Platten mit wachstumsfaktorreduziertem Matrigel beschichtet. Das Matrigel wurde auf Eis aufgetaut und mit gekühlten Pipetten davon 60 µl je Well befüllt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C wurden darauf 10⁴ HUVECs oder 2 × 10⁴ HTR-Zellen in einem Medium mit 10 % FCS oder einem standardisiertem Überstand von hCV-MSCs (siehe 7.3.7) ausgelegt. Sobald die Zellen auf dem Matrigel verteilt wurden, begannen sie, netzwerkartige Strukturen zu bilden. Zwölf Stunden nach dem Auslegen der HTR-Zellen und 6 und 24 nach dem Auslegen der HUVEC-Zellen wurden die Platten unter dem Mikroskop untersucht und Hellfeldmikroskopiebilder aufgenommen. Die resultierenden Bilder wurden durch Invertieren des Hintergrunds mit Image J optimiert. Die Gesamtzahl der Verbindungen, die Länge des Hauptsegments und die Gesamtzahl der Knoten wurden mithilfe des ImageJ-Plugins gemäß den Protokollen „Angiogenese-Analysator von Gilles Carpentier“ quantifiziert. Der Versuch wurde dreimal unabhängig voneinander mit Überständen unterschiedlicher hCV-MSC-Isolationen durchgeführt.

2.3.12 ELISA

Die ELISA wurden nach dem Protokoll des Herstellers mit standardisiertem Überstand der hCV-MSCs durchgeführt.

2.3.13 Trophoblastorganoide

Um weitere Einblicke in den Prozess der Plazentation zu erlangen, wurde der Effekt von hCV-MSCs auf die Entwicklung von Trophoblastorganoiden untersucht.

Die Organoide wurden aus hTSC^{CT}-Zellen (4×10^3 Zellen) nach den Methoden von Castel et al. (2020) gebildet. hTSC^{CT}-Zellen wurden auf Platten mit niedriger Adhäsion ausgesät und für 3 Tage mit Trophoblastorganoid-Medium (TOM) behandelt: [DMEM/F12, 1x N2-Supplement, 1x B27-Supplement ohne Vitamin A, 1,25 mM N-Acetyl-L-cystein, 1 % GlutaMAX (Gibco), 0,5 % Penicillin-Streptomycin (TOM-Basismedium), ergänzt mit 500 nM A83-01, 1,5 mM CHIR99021, 80 ng/ml humanes R-spondin1, 50 ng/ml hEGF, 100 ng/ml hFGF2, 50 ng/ml hHGF, 2 mM Y-27632]. Nach drei Tagen bildete sich eine initiale dreidimensionale Struktur, woraufhin das Medium mit 30 % standardisiertem Überstand (siehe 7.3.7) von hCV-MSCs aus dem ersten Trimester, von gesunden Patientinnen, die zum Termin entbunden hatten, von an Präeklampsie erkrankten Patientinnen oder 30 % normalem hCV-MSC-Medium für 7 Tage ergänzt wurde. Die Organoide wurden fixiert und es wurde eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung für β -hCG, pHH3 und DNA angefertigt. Die Flächen sowie Durchmesser der Trophoblastorganoide wurden mittels Hellfeldmikroskopie ermittelt. Aus dem Überstand der konditionierten Organoide wurde mittels ELISA die Konzentration von β -hCG bestimmt.

2.3.14 Statistische Tests

Vor der statistischen Analyse wurde für alle Datensätze ein Ausreißertest nach Grubbs durchgeführt.

t-Test und Mann-Whitney-U-Test

Der t-Test (zweiseitig und gepaart oder homoskedastisch) wurde verwendet, um die Signifikanz der Unterschiede zwischen verschiedenen Gruppen zu bewerten. Die statistische Auswertung des Einzelzell-Tracking-Tests, der Linien-Scan Analyse, des Zellulären Netzwerk Versuchs und die Ausmessung der Zilienlänge erfolgte mittels des ungepaarten Mann-Whitney-U-Tests (zweiseitig). Ein Unterschied wurde in beiden statistischen Analysen als statistisch signifikant angesehen, wenn $p < 0,05$ beträgt.

3 Ergebnisse

3.1 Isolation und Charakterisierung von MSCs aus der humanen Plazenta

3.1.1 Isolation von MSCs aus Chorionzotten (hCV-MSCs)

Die Isolation wurde nach einer etablierten Methode modifiziert (Steigman und Fauza 2007) und bei folgenden Gewebeproben angewandt: Plazentagewebe des 1. Trimesters aus elektiven Schwangerschaftsabbrüchen von gesunden Patientinnen (1. Trim), aus Plazenten von gesunden Schwangeren, die am Termin entbunden haben (Termin) und aus Plazenten von an später Präeklampsie erkrankten Patientinnen (PE).

Die isolierten Zellen aus allen Gruppen hafteten an dem Kunststoffuntergrund der Zellkulturschalen, bildeten Kolonien aus und wuchsen als spindelförmige Zellen mit langen Zellfortsätzen. Die morphologischen Charakteristika blieben über die Zeit der Kultivierung konstant. In Abbildung 5, C ist die Zellmorphologie exemplarisch dargestellt.

3.1.2 CD-Marker und Zytoskelett

Die Oberflächenmarker wurden mittels Durchflusszytometrie nach Antikörperfärbung gemessen und sind in der Tabelle 7 dargestellt. Für die klassischen mesenchymalen Oberflächenmarker CD90, CD73 und CD105 sind die isolierten Zellen aus allen Gruppen stark positiv. CD146 war bei den unterschiedlichen Zellpopulationen bei 1/5 (Termin) bis ca. 1/3 (PE) positiv. Ein kleiner Teil der isolierten Zellen ist CD34-positiv, bei den am Termin isolierten, sowohl der gesunden, wie auch der Erkrankten beträgt der Anteil etwa 11 %, während der Anteil bei den aus dem ersten Trimester isolierten Zellen mit knapp 19,1 % fast doppelt so hoch ist. Die Analyse von CD31 wurde auf die Expression von CD31 in HUVECs bezogen. Die als CD31^{hoch} charakterisierten Zellen besitzen eine Intensität wie HUVECs, Zellen mit einer niedrigeren Intensität werden als CD31^{schwach} bezeichnet. Die CD-Marker CD106, CD144 und CD14 waren für alle drei Gruppen negativ.

Tabelle 7: Oberflächenmarker von hCV-MSCs

Die Tabelle zeigt den Anteil der Zellen, die positiv für die entsprechenden Oberflächenmarker sind. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie und ist als Mittelwert in % angegeben. 1. Trim-hCV-MSC (n = 4), Termin-hCV-MSC (n = 4) und PE-hCV-MSC (n = 3).

	CD90	CD73	CD105	CD146	CD34	CD31 hoch	CD31 schwach	CD106	CD144	CD14
1.Trim	81,3	92,6	99,6	34,2	19,1	4,4	7,5	0,8	0,5	0,5
Term	76,9	73,0	90,6	21,8	11,2	2,0	4,8	2,9	0,2	0,9
PE	83,2	88,0	97,4	35,4	11,6	3,3	8,4	4,6	6,8	1,3

Durch eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung wurden die Ergebnisse der Durchflusszytometrie der mesenchymalen Oberflächenmarker CD90 und CD73 bestätigt und verdeutlicht (Abbildung 5, D). Auch die Anfärbung des Zytoskelettbestandteils Vimentin bestätigt den mesenchymalen Charakter der Zellen (Abbildung 5, E).

3.1.3 Zellzyklus

Zur Charakterisierung der hCV-MSCs und um das Proliferationsverhalten der unterschiedlichen Gruppen zu vergleichen, wurde der Zellzyklus analysiert. Hierfür wurden die Zellen bei hoher Konfluenz gesammelt und mit RNase sowie anschließend mit Propidiumjodid behandelt, um zuerst den RNA-Gehalt intrazellulär abzubauen und nur die DNA fluoreszenzmarkiert anzufärben (Pozarowski und Darzynkiewicz 2004). Anschließend wurde mittels Durchflusszytometrie die Quantifizierung des DNA-Gehalts ermittelt und es erfolgte die anteilmäßige Zuordnung der verschiedenen Zellzyklusphasen, welche in Tabelle 8 und in Abbildung 5, A aufgeführt sind.

In der Analyse des Zellzyklus wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen festgestellt. In der G2- und Mitose-Phase unterscheiden sich die Gruppen nicht erheblich, die Termin-hCV-MSCs liegen mit 19,9 % leicht vor den 1. Trim-hCV-MSCs 18,6 % gefolgt von den PE-hCV-MSCs 16,7 %. In der Synthesephase sind 1. Trim- und PE-hCV-MSCs fast gleichauf (9,7 % und 10,0 %), die Termin-hCV-MSCs liegen mit 2,7 Prozentpunkten davor. Zellen mit einfachem DNA-Gehalt, die sich nicht in der Mitose oder der Vorbereitung befinden, haben bei PE-hCV-MSCs den größten Anteil mit 71,5 %. Bei 1. Trim-hCV-MSCs liegt der Anteil bei 70,6 % und bei Termin-hCV-MSCs bei 64,0 %.

Tabelle 8: Zellzyklusverteilung von hCV-MSCs

In der Tabelle sind die unterschiedlichen Zellzyklusphasen der hCV-MSCs als Mittelwerte in % mit SEM (*engl.* standard error of the mean) abgebildet. 1. Trim (n = 4), Termin (n = 4) und PE (n = 3).

		sub G0/G1	G0/G1	S	G2/M
1. Trim	MW	1,1	70,6	9,7	18,6
	SEM	1,0	7,5	5,1	1,3
Termin	MW	2,7	64,0	12,7	19,9
	SEM	1,3	1,9	1,7	1,2
PE	MW	1,8	71,5	10,0	16,7
	SEM	1,5	6,4	3,7	4,1

3.1.4 Viabilität

Zur Bewertung und des Vergleichs der Zellviabilität und der metabolischen Aktivität der isolierten hCV-MSC Gruppen wurde das CellTiter-Blue® Assays verwendet. Hierbei wurde die mitochondriale Aktivität direkt gemessen, in dem die mitochondriale Umwandlung von Resazurin in das fluoreszierende Resorufin quantifiziert wurde (Mueller et al. 2013). Die Ergebnisse sind in Abbildung 5, B dargestellt.

Bei der Analyse der Zellviabilität zeigt sich nach 96 h ein Unterschied zwischen den 1. Trim-hCV-MSCs und den Termin-hCV-MSCs, welcher signifikant ist. Die Termin-hCV-MSCs weisen nach 96 h eine leicht erhöhte Viabilität gegenüber den PE-hCV-MSCs auf, die jedoch nicht signifikant ist.

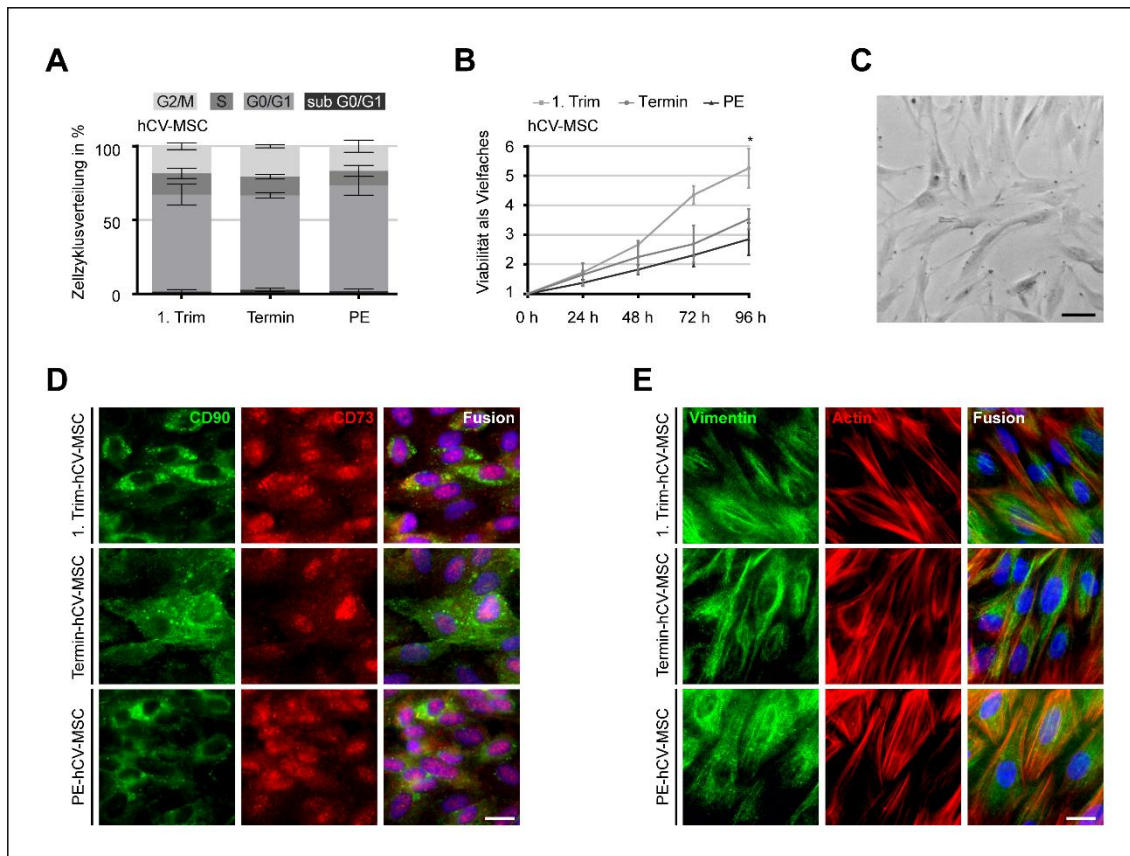


Abbildung 5: Charakterisierung und Morphologie von hCV-MSCs aus 1. Trim-, Termin- und PE-Plazenten

(A) Die Verteilung des Zellzyklus wurde von hCV-MSCs bestimmt, die in ihrem Medium bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % kultiviert wurden. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie und ist als Mittelwert \pm SEM dargestellt. 1. Trim (n = 4), Termin (n = 4) und PE (n = 3). (B) Die Viabilität der hCV-MSCs wurde mittels CellTiter-Blue® zu den Zeitpunkten 0, 24, 48, 72 und 96 h bestimmt und ist als Mittelwert \pm SD angegeben. Verwendet wurde der Student-t-Test. *p < 0,05. (C) Repräsentative Hellfeldmikroskopie-Aufnahme von Termin-hCV-MSCs. Maßstab: 30 μ m. (D) Immunfluoreszenzfärbung der MSC-Oberflächenmarker CD90 (grün), CD73 (rot) und DNA (DAPI, blau). Maßstab: 20 μ m. (E) Immunfluoreszenzfärbung der Zytoskelettkomponenten Vimentin (rot), und Aktin (grün), sowie DNA (DAPI, blau). Maßstab: 20 μ m.

3.2 Funktionelle Eigenschaften von hCV-MSCs

3.2.1 Zilien: Länge, Anteil der zilientragenden Zellen, Signalübertragung

Das primäre Zilium als zentraler Ort der Signaltransduktion (Yanardag und Pugacheva 2021) wurde zur Bewertung der Funktionalität herangezogen. Der Eintritt in die G1/G0 Phase durch Nährstoffentzug wurde genutzt, um die dort stattfindende Ziliogenese zu forcieren (Walia et al. 2019).

Die Zilienlänge wurde nach der 3. Passage bei einer hohen Konfluenz zum einen in normalem Medium, zum anderen nach 24 h Nährstoffentzug evaluiert. Hierfür erfolgte eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung für Arl13b und acetyliertes Tubulin. Neben der Anordnung in 2D-Monolage wurde untersucht, welchen Einfluss die 3D-Anordnung als Sphäroid auf die Ziliogenese besitzt und ob sich die in der Literatur beschriebene verbesserte Funktionalität (Jauković et al. 2020) auch in einer veränderten Zilienmorphologie widerspiegelt. Die Auswertung des Anteils der zilientragenden Zellen war wegen der Überlagerungen in den Sphäroiden nur in der Monolage möglich. Repräsentative Mikroskopieaufnahmen sind in Abbildung 6 D und E dargestellt.

Die 1. Trim-hCV-MSCs weisen sowohl in Monolage (Abb. 6, B) als auch in der räumlichen Struktur eines Sphäroids (Abb. 6, C) die längsten Zilien auf. Unter Nährstoffentzug werden die Zilien nahe ihrer maximalen Länge ausgebildet. Die 1. Trimester-hCV-MSCs weisen unter Nährstoffmangel 20 % längere Zilien in der einlagigen Anordnung auf (Abb. 6, B) und wachsen um 15 % in dem Sphäroid unter Nährstoffentzug (Abb. 6, C). Die PE-hCV-MSCs wiesen sowohl in einfacher Lage (Abb. 6, B), wie auch in räumlicher Struktur angeordnet (Abb. 6, C), verkürzte Zilien auf. Die Dynamik der Zilienlänge in nährstoffarmer Umgebung in der Monolage (Abb. 6, B) beträgt bei den Termin-hCV-MSCs 27 % und bei den PE-hCV-MSCs 17 % Längenzunahme.

Der Anteil der Zellen, die ein Zilium ausbildeten (Abb. 6, A) war bei den 1. Trim-hCV-MSCs in normalem Medium mit 41,6 % am höchsten. Unter Nährstoffentzug nahm der Anteil um 23,5 % weiter zu. Die Termin-hCV-MSCs bildeten mit 37,6 % anteilig weniger Zilien aus, der Unterschied ist nicht signifikant. Unter Nährstoffentzug nahm der Anteil um weitere 29,2 % zu und ist im Vergleich mit den anderen Gruppen unter Nährstoffentzug am höchsten. Signifikant weniger Zilien bildeten die PE-hCV-MSCs aus, sowohl in normalem Medium (28,7 %), wie auch unter Nährstoffentzug (53,8 %).

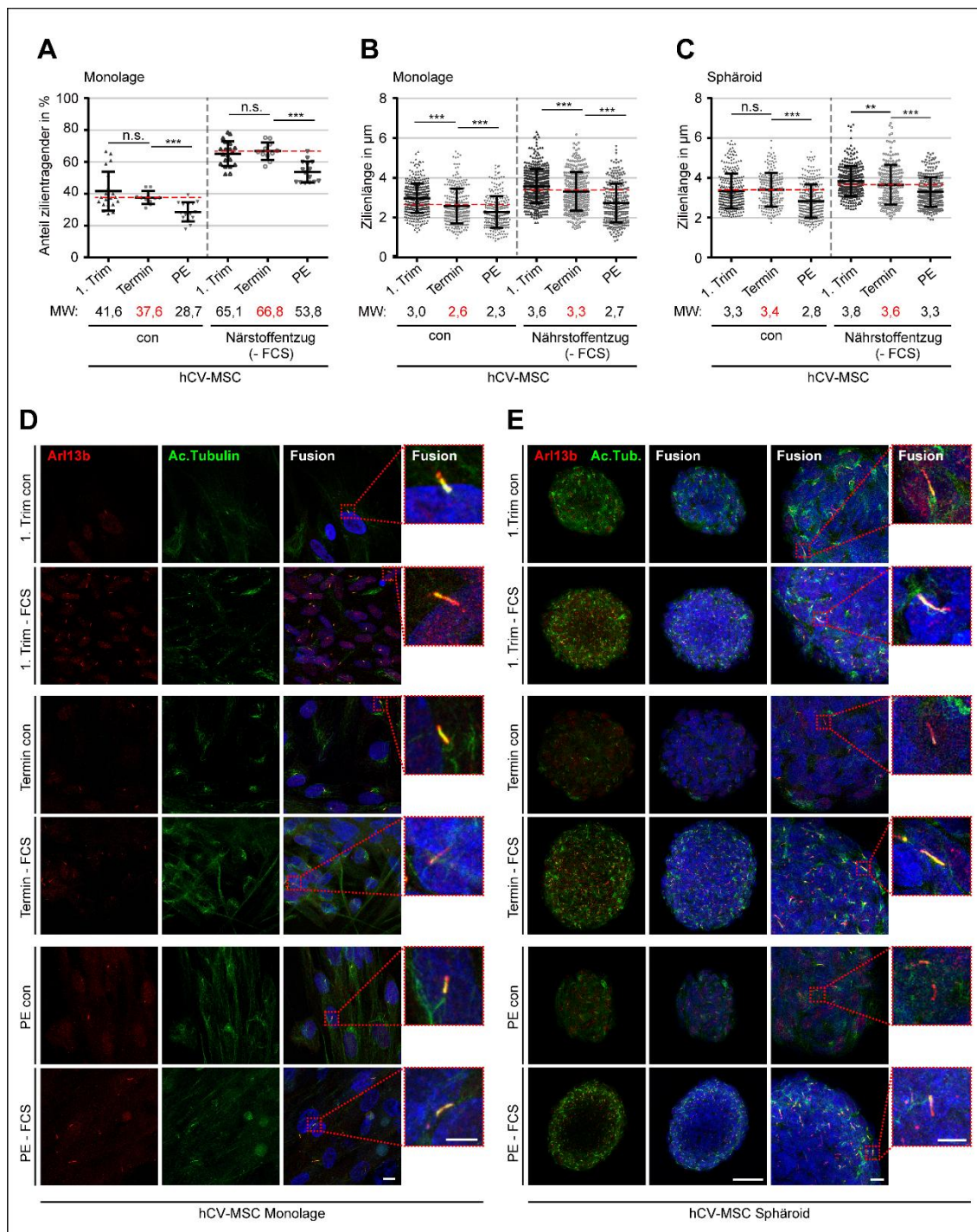


Abbildung 6: Zilienlänge und Anteil der zilientragenden hCV-MSCs in Monolage und im Sphäroid

Die Evaluation der Zilienlänge erfolgte in einschichtiger Monolage und in Sphäroiden. Die Kontrollkondition (con) entspricht der Kultivierung in hCV-MSC-Medium. Der Nährstoffentzug (- FCS, engl. fetal calf serum) zur Stimulation der Ziliogenese erfolgte über 24 h. (A) Anteil der zilientragenden hCV-MSCs in Monolage in Prozent (n = 15 Gesichtsfelder, zusammengefasst aus drei hCV-MSC-Isolationen je Gruppe). (B) Zilienlänge in Monolage in μm (n = 300 Zilien, zusammengefasst aus drei hCV-MSC-Isolationen je Gruppe). (C) Zilienlänge der hCV-MSCs in Sphäroiden (n = 300 Zilien, zusammengefasst aus drei hCV-MSC-Isolationen je Gruppe). (A-C) Darstellung der Ergebnisse als Streudiagramme mit Mittelwert \pm Standardabweichung, Verwendung des unpaarigen Mann-Whitney-U-

Tests. **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001. (D, E) Repräsentative Zilienfärbungen bei normalen Kulturbedingungen und unter Nährstoffentzug (- FCS). (D) hCV-MSCs in einschichtiger Monolage. Maßstab: 10 µm, Maßstab im vergrößerten Ausschnitt: 10 µm. (E) hCV-MSCs im Sphäroid. Maßstab: 50 µm, Maßstab im ersten vergrößerten Ausschnitt: 10 µm, Maßstab im zweiten vergrößerten Ausschnitt: 5 µm.

Zur Beurteilung der Kapazität der Signaltransduktion wurde der exklusiv am primären Zilium lokalisierte Hedgehog-Signalweg analysiert. Nach der Stimulation durch 400 nM SAG (*engl.* Smoothed Agonist) (Faria et al. 2019) wurde zum einen die Immunfluoreszenzintensität von SMO entlang des Ziliums ausgewertet, das nach Aktivierung an die Zilienmembran rekrutiert wird. Zum anderen wurde die Expression wichtiger Signalproteine des Hh-Signalwegs durch relative Genexpression ausgewertet.

Interessant zu beobachten ist, dass bei den 1. Trim-hCV-MSCs auch ohne externe Stimulation SMO am Zilium lokalisiert war (Abb. 7 B, D). Die SMO-Intensität war bei ihnen proximal mit 21 ± 7 (a.u., *engl.* arbitrary unit) doppelt so hoch wie bei den nicht stimulierten Termin- (10 ± 2 a.u.) und PE-hCV-MSCs (10 ± 3 a.u.). Distal lag die Intensität der 1. Trim-hCV-MSCs mit 16 ± 5 a.u. weit über denen der Termin- ($5 \pm 0,3$ a.u.) und PE-hCV-MSCs (5 ± 2 a.u.). Die SMO-Intensität entlang des gesamten Ziliums der 1. Trim-hCV-MSCs wurde durch die SAG-Stimulation signifikant erhöht. Diese Signalerhöhung war auch gegenüber den stimulierten Termin-hCV-MSC signifikant. Auch bei den Termin- und PE-hCV-MSC ist eine dynamische Zunahme der SMO-Intensität nach Stimulation zu erkennen (Abb. 7 C, D). Das Signal der PE-hCV-MSC nach Stimulation war proximal (33 ± 5 a.u.) und distal (21 ± 2 a.u.) signifikant ($p \leq 0,001$) im Gegensatz zu den stimulierten Termin-hCV-MSCs (proximal 53 ± 6 a.u.; distal 30 ± 2 a.u.) erniedrigt.

Die Ergebnisse der Genexpression wurden auf die nicht stimulierten Termin-hCV-MSCs normalisiert und sind in Abbildung 7 E-G dargestellt. Bereits in den nicht stimulierten 1. Trim-hCV-MSCs war eine erhöhte Expression von *GLI* ($2,0 \pm 0,3$), *SMO* ($1,8 \pm 0,2$) und *PTCH1* ($2,9 \pm 0,3$) im Gegensatz zu den Termin-hCV-MSCs: *GLI* ($1,0 \pm 0,3$), *SMO* ($1,0 \pm 0,2$) und *PTCH1* ($1,0 \pm 0,2$) sowie den PE-hCV-MSCs: *GLI* ($1,0 \pm 0,1$), *SMO* ($1,0 \pm 0,1$) und *PTCH1* ($1,1 \pm 0,2$) zu erkennen. Für *GLI* (1. Trim gegen Termin $p < 0,001$, 1. Trim gegen PE $p = 0,04$) und *PTCH1* (1. Trim gegen Termin und PE $p < 0,001$) war diese zudem signifikant. Nach der Stimulation mit SAG konnte bei allen drei Gruppen eine signifikante Erhöhung der Genexpression der untersuchten Gene im Gegensatz zur nicht stimulierten Kontrollkondition festgestellt werden. Für die 1. Trim-hCV-MSCs hat

sich die Genexpression nach Stimulation für *GLI* 4,9-fach, *SMO* 4,0-fach und *PTCH-1* 3,5-fach erhöht. Bei den Termin-hCV-MSCs hat sich die Expression von *GLI* 6,8-fach, *SMO* 2,8-fach und *PTCH-1* 5,7-fach erhöht. Bei den PE-hCV-MSCs hat sich die Genexpression am wenigsten erhöht: *GLI* 1,8-fach, *SMO* 1,6-fach und *PTCH-1* 2,3-fach. Damit wurden auf Genexpressionsebene der Trend der Fluoreszenzintensitätsunterschiede von *SMO* bestätigt.

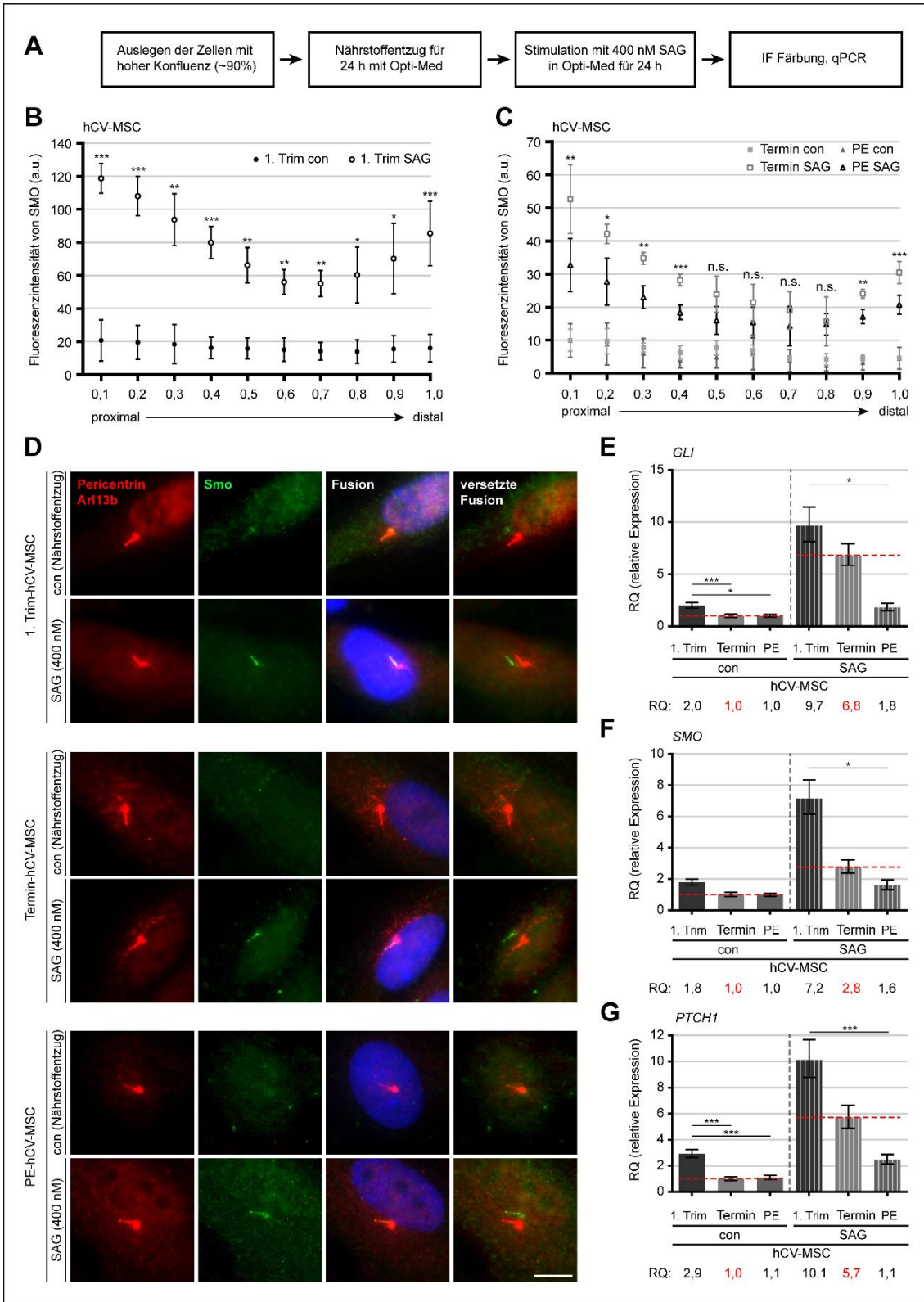


Abbildung 7: Eingeschränkter Hh-Signalweg in PE-hCV-MSCs

(A) Der Versuchsaufbau ist abgebildet. (B, C) Die Fluoreszenzintensität von SMO entlang des primären Ziliums wurde mit dem ImageJ-Plug-in „Line-Scan Analysis“ ausgewertet und die Mittelwerte \pm Standardabweichung als Punktdiagramm abgebildet. (n = 30 Zilien, zusammengefasst aus drei hCV-MSC-Isolationen je Gruppe). Der ungepaarte Mann-Whitney-U-Test wurde angewandt. (D) Repräsentative

Immunfluoreszenzaufnahmen mit Pericentrin (rot), Arl13b (rot), SMO (grün), DNA (DAPI, blau). Maßstab: 10 μm . (E-G) Abbildung der relativen Quantifizierung der Genexpression (RQ) der Hedgehog-assoziierten Proteinen *GLI* (E), *SMO* (F) und *PTCH1* (G). Darstellung der RQ-Werte mit Minimal- und Maximalwert im Balkendiagramm. Standardisiert wurde dabei auf die unbehandelten Termin-hCV-MSCs. Der Student-t-Test wurde angewendet. * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

3.2.2 Motilität

Primäre Zilien sind wichtig für die Zellmigration und -motilität (Wang et al. 2019). Um die ungerichtete Motilität einzelner hCV-MSC zu untersuchen, wurden die Zellen mit niedriger Konfluenz ausgelegt und mit Zeitrafferfunktion über 11,25 h mikroskopiert. Die Analyse der Parameter Geschwindigkeit und Distanz erfolgte mithilfe von ImageJ und dem „Chemotaxis and Migration Tool“. Repräsentative Bewegungsbahnen einzelner Zellen sind in Abbildung 8 A abgebildet.

Die hCV-MSCs aus dem ersten Trimester haben sich mit einer signifikant höheren Geschwindigkeit von 0,78 $\mu\text{m/s}$ im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen bewegt (Abb. 8 B). Auch die zurückgelegte Distanz war bei den 1. Trim-hCV-MSCs mit 524 μm deutlich erhöht (Abb. 8 B). Die Geschwindigkeit sowie die Distanz der PE-hCV-MSCs waren im Vergleich zu den Termin-hCV-MSCs signifikant erniedrigt.

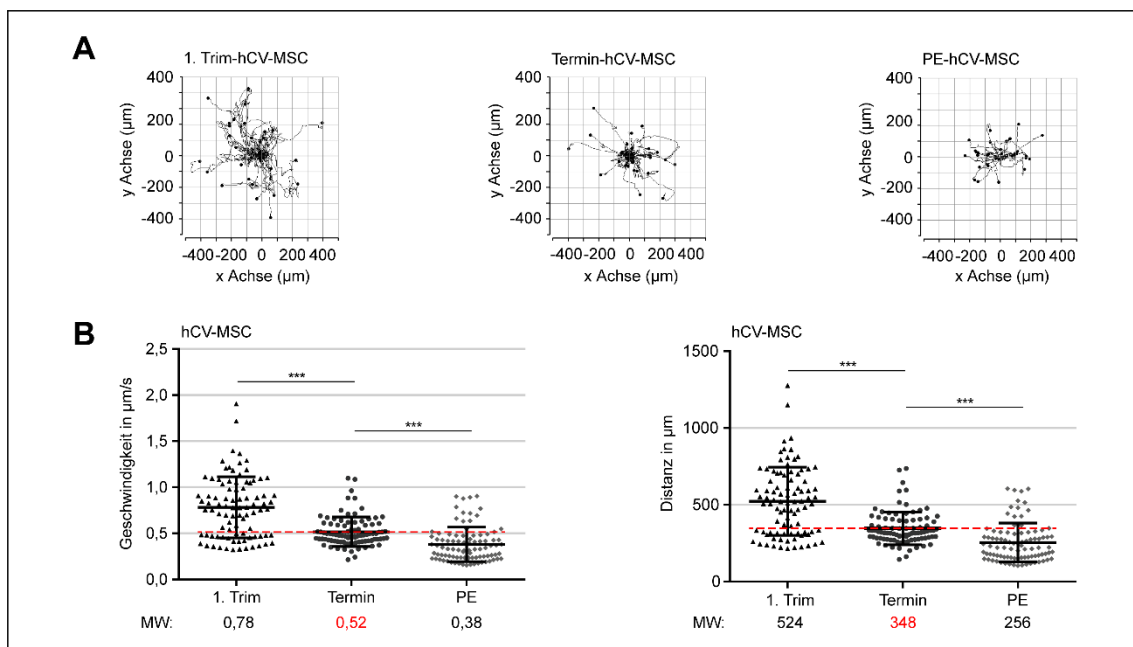


Abbildung 8: Motilität von hCV-MSCs

Auswertung der ungerichteten Motilität einzelner hCV-MSCs über 11,25 h. Dafür wurden die Zellen mit Zeitrafferfunktion mikroskopiert. (A) Repräsentative Bewegungsbahnen einzelner Zellen (n = 30 Zellen, zusammengefasst aus drei hCV-MSC-Isolationen je Gruppe). (B) Darstellung der Geschwindigkeit in $\mu\text{m/s}$ (links) und der akkumulierten Distanz in μm (rechts) als Mittelwert \pm SD. (n = 90 Zellen, zusammengefasst

aus drei hCV-MSC-Isolationen je Gruppe). Anwendung des ungepaarten Mann-Whitney-U-Test. *** $p \leq 0,001$.

3.2.3 Differenzierung

Das multipotente Differenzierungspotenzial ist nicht nur ein obligat definiertes Charakteristikum von MSCs (Dominici et al. 2006), sondern auch ein Kriterium zur Quantifizierung und zum Vergleich der Funktionalität (Yanardag und Pugacheva 2021). Um die Differenzierungskapazität der hCV-MSCs zu vergleichen wurden die hCV-MSCs über 21 Tage zur osteogenen, chondrogenen und adipogenen Differenzierung angeregt. Ab der Differenzierungsinduktion teilten sich die Zellen nicht mehr. Die Kontrollzellen, die weiter in MSC-Medium kultiviert wurden, proliferierten weiter und wurden bei einer Konfluenz von circa 80-90 % passagiert. Anschließend wurde mithilfe der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion für zelltypspezifische Differenzierungsmarker sowie mittels zelltypspezifischer Färbung ausgewertet. Repräsentative Aufnahmen sind in Abbildung 9 A, G und J gezeigt.

Bei der osteogenen Differenzierung wurde die Ansammlung von Calcium durch Alizarinrot (Natriumalizarinsulfonat) angefärbt (Abb. 9 A) und zum einen die differenzierten Zellen ausgezählt (Abb. 9 B) und zum anderen der Rotanteil der Bilder mit Image J ermittelt (Abb. 9 C). Dabei ergab sich, dass sich im Mittelwert (MW) 18,8 % der 1. Trim-hCV-MSCs differenziert haben $\pm 2,1$ als Standardfehler (SEM, *engl.* standard error of the mean), der Interquartilsbereich (IQR, *engl.* interquartile range) lag dabei zwischen 13,7 % und 21,4 %. Bei den Termin-hCV-MSCs waren es 14,3 % (MW) $\pm 1,4$ (SEM) mit einem IQR von 10,0 % bis 17,4 % und bei den PE-hCV-MSCs 10,4 % (MW) $\pm 1,2$ (SEM) mit einem IQR von 7,8 % bis 14,1 %. Bezogen auf die Termin-hCV-MSCs haben sich signifikant mehr ($p = 0,046$) 1. Trim-hCV-MSCs differenziert. Die PE-hCV-MSCs besaßen eine signifikant schlechtere ($p = 0,015$) Differenzierungskapazität bezogen auf die Termin-hCV-MSCs. Der Rotanteil der Bilder bestätigte die durch Auszählung ermittelten Werte. Der mittlere Grauwert der Aufnahmen der mit Alizarinrot-Lösung gefärbten, differenzierten 1. Trim-hCV-MSCs war mit 17,8 % mehr als doppelt so hoch wie der der Termin-hCV-MSCs mit 8,4 % und signifikant erhöht. Auf Genexpressionsebene waren die Osteogenese assoziierten Gene in den differenzierten Zellen hochreguliert (Abb. 9 D-F). Bei den hCV-MSCs des 1. Trimesters lag die relative Quantifizierung der Genexpression (RQ) der differenzierten Zellen für *PTCH1* mit 8,0 doppelt so hoch wie bei den Termin-hCV-MSCs und damit signifikant darüber. Wie auch

schon in der Analyse des Hh-Signalwegs war auch bei den nicht zur Differenzierung angeregten 1. Trim-hCV-MSCs die Expression von *PTCH1* in Bezug zu den Termin-hCV-MSCs erhöht, hier um das 6,2-fache. Die Termin- und PE-hCV-MSCs exprimierten *PTCH* in Bezug zu ihren nicht differenzierten Kontrollen um das 4-fache. Die relative Expression von *SSP1* (Osteopontin, engl. secreted phosphoprotein 1) und *KLF4* (engl. kruppel-like factor 4) zeigte sich nach der Differenzierung für alle untersuchten hCV-MSC-Gruppen bezogen auf die Termin-hCV-MSCs signifikant erhöht. Hierbei zeigten jedoch die differenzierten Termin-hCV-MSCs die höchste Expression, sowohl für *SSP1* mit 42, wie auch bei *KLF-4* mit 30,4.

Für die Quantifizierung der chondrogenen Differenzierung wurden die Zellen mit Alcianblau behandelt, wodurch sich die Aggrecane anfärbten (Abb. 9 G). Die differenzierten Zellen wurden anschließend ausgezählt (Abb. 9 H) und der mittlere Grauanteil der Bilder gemessen (Abb. 9 I). Dabei wurde festgestellt, dass sich auch hier die 1. Trim-hCV-MSCs am besten differenzierten im Vergleich zu den Termin-hCV-MSCs ($p = 0,007$). Im Mittel haben sich 24,8 % Zellen differenziert, wobei der IQR zwischen 21,1 % und 30,8 % liegt. Der Anteil der differenzierten Termin-hCV-MSCs beträgt 19,0 % mit einem IQR zwischen 15,6 % und 22,9 %. Die Differenzierungskapazität der PE-hCV-MSCs war signifikant schlechter ($p = 0,04$) mit einem Anteil von 15,5 % differenzierten Zellen und einem IQR von 11,8 % bis 17,2 %. Die Auswertung des Grauwerts der Bilder ergab einen Trend, der mit diesen Beobachtungen einhergeht, jedoch nicht signifikant war.

Nach der adipogenen Differenzierung wurden die Zellen mit Fettvakuolen ausgezählt (Abb. 9 J), wobei sich bei den drei Gruppen zwischen 7,2 % und 6,9 % der Zellen differenziert zeigten, was keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen darstellte (Abb. 9 K). Somit haben sich die hCV-MSCs von den drei untersuchten Differenzierungslinien am schlechtesten zu Adipozyten entwickelt. Die Expression der Adipogenese-assoziierten Gene *LEP* (Leptin, Abb. 9 L) und *ADIPOQ* (Adiponektin, Abb. 9 M) wurde auf die differenzierten Termin-hCV-MSCs genormt, da bei den naiven hCV-MSCs teilweise keine Expression nachweisbar war. Nach der adipogenen Differenzierung zeigte sich in der relativen Expression von *LEP* keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen. Bei der *ADIPOQ*-Expression lagen die Termin-hCV-MSCs signifikant vor den 1. Trim-hCV-MSCs.

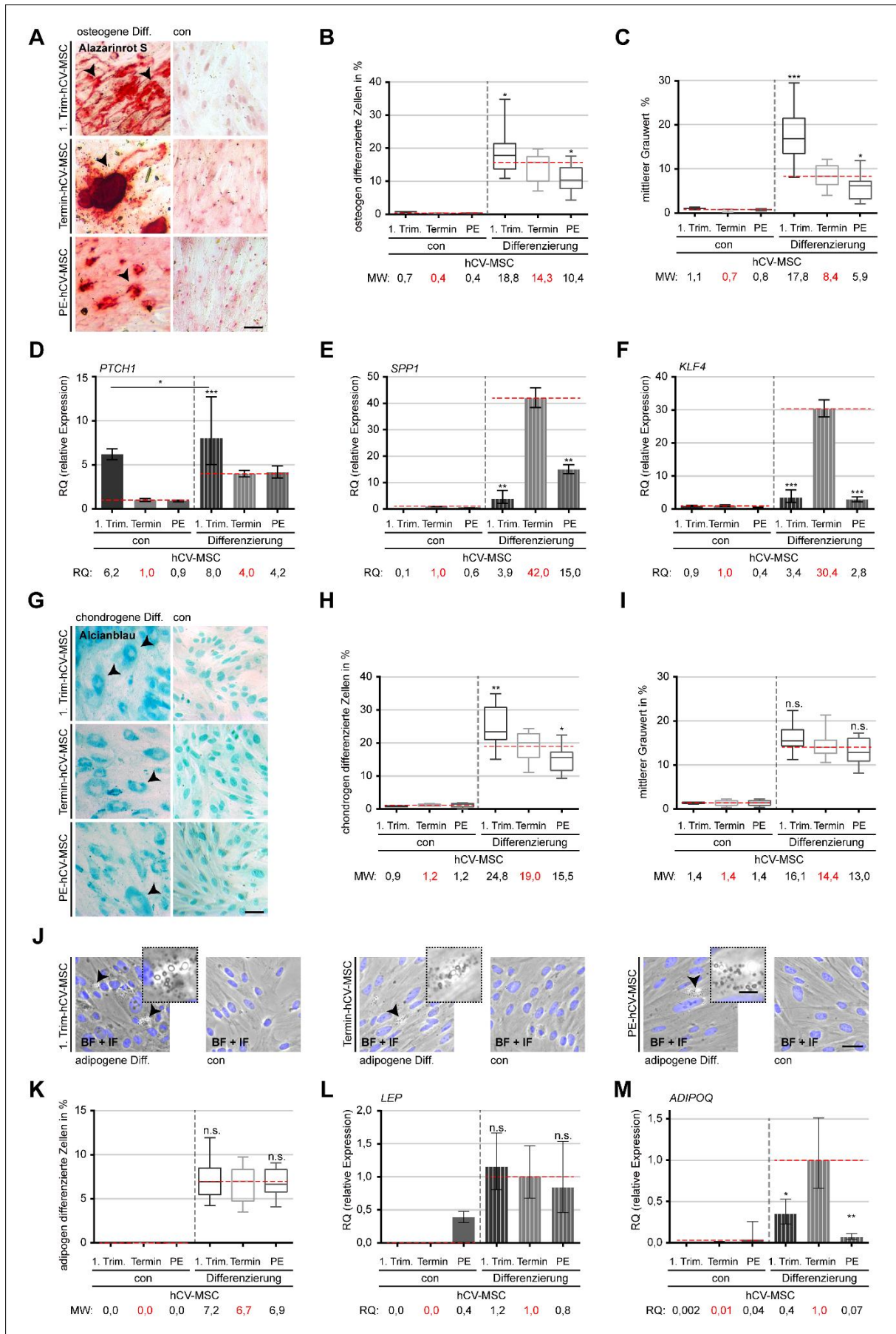


Abbildung 9: Unterschiedliche Differenzierungskapazität der hCV-MSCs

Die hCV-MSCs wurden über 21 Tage zur osteogenen (A-F), chondrogenen (G-I) und adipogenen (J-M) Differenzierung angeregt. (A) Repräsentative Hellfeldmikroskopie-Aufnahmen der osteogenen Differenzierung. Darstellung der Kalkablagerungen durch Färbung mit Alizarinrot, hervorgehoben durch Pfeilspitzen. Maßstab: 20 μm . (B-C) Quantifizierung der osteogenen Differenzierung (n = 15, zusammengefasst aus drei hCV-MSC-Isolationen je Gruppe). Darstellung als Kastengrafik mit Interquartilsbereich (Box), darin liegend der Mittelwert und außerhalb der Minimal- und Maximalwert. (B) Alizarinrot positive Zellen in Prozent. (C) Mittlerer Grauwert der Aufnahmen. Anwendung des unpaarigen Mann-Whitney-U-Tests. (D-F) Expressionsniveaus von drei mit der osteogenen Differenzierung assoziierten Genen *PTCHI* (D), *SPPI* (E) und *KLF4* (F) von hCV-MSCs in Kontrollkondition (con) und nach Differenzierung. Die Ergebnisse stammen aus drei unabhängigen Experimenten, sind auf die Termin-hCV-MSCs standardisiert und werden als RQ (relative Quantifizierung der Genexpression) mit Minimal- und Maximalwert dargestellt. Der Student-t-Test wurde angewandt. (G) Repräsentative Hellfeldmikroskopie-Aufnahmen der mit Alcianblau angefärbten chondrozytenähnlichen Zellen, die durch Pfeilspitzen hervorgehoben wurden (blau: Aggrecan). Maßstab: 50 μm . (H, I) Quantifizierung der Alcianblau-positiven Zellen und Darstellung als Kastengrafik (n = 15, zusammengefasst aus drei hCV-MSC-Isolationen je Gruppe). (H) Anteil der differenzierten chondrozytenähnlichen Zellen in Prozent. (I) Quantifizierung des mittleren Grauwerts in Prozent. Anwendung des unpaarigen Mann-Whitney-U-Test. (J) Repräsentative Hellfeldmikroskopie-Aufnahmen mit Immunfluoreszenz für DNA (DAPI, blau). Maßstab: 40 μm . Maßstab im vergrößerten Ausschnitt: 10 μm (Pfeilspitzen zeigen auf Lipidvakuolen). (K) Der Anteil der differenzierten Adipozyten wurde durch Auszählen der Zellen mit Lipidvakuolen in Prozent ausgewertet (n = 15, zusammengefasst aus drei hCV-MSC-Isolationen je Gruppe) Darstellung als Kastendiagramm. Anwendung des unpaarigen Mann-Whitney-U-Tests. (L, M) Relative Expression der beiden adipogeneseassoziierten Gene *LEP* (L), *ADIPOQ* (M) von hCV-MSCs unter Kontrollbedingungen und nach Differenzierung. Die Ergebnisse stammen aus drei unabhängigen Experimenten und werden als RQ mit Mindest- und Höchstwert dargestellt. Anwendung des Student-t-Tests. *p < 0,05; **p \leq 0,01; ***p \leq 0,001.

3.2.4 Homing-Fähigkeit

Für die Einschätzung des Homing-Verhaltens der hCV-MSCs, also der Fähigkeit zur gerichteten Migration zu Zielgewebe, wurden die Zellfortsätze der hCV-MSCs in Richtung der EVT-Ziellinien vom Zellkern aus vermessen. Zur Messung wurden das Aktinzytoskelett (Phalloidin), die phosphofokale Adhäsionskinase (pFAK) sowie die DNA (DAPI) angefärbt (Abb. 10 C). Sowohl 4 h als auch 8 h nach Entfernung der Ibidi-Kammer wiesen die hCV-MSCs des 1. Trimesters im Mittelwert \pm Standardabweichung die längsten Fortsätze in Richtung der HTR (4 h = 78 $\mu\text{m} \pm 22$; 8 h = 97 $\mu\text{m} \pm 25$; Abb. 10 A) und in Richtung der HIPEC (4 h = 77 $\mu\text{m} \pm 21$; 8 h = 93 $\mu\text{m} \pm 25$, Abb. 10 B) Zellen auf. Die Länge der 1. Trim-hCV-MSCs Zellfortsätze war damit signifikant länger als die der Termin-hCV-MSCs. Diese wiesen nach 4 h in Richtung der HTR-Zellen eine

Länge von $70 \mu\text{m} \pm 22$ auf und nach 8 h eine Länge von $83 \mu\text{m} \pm 20$. Die PE-hCV-MSCs bildeten die kürzesten Fortsätze zu beiden vermessenen Zeitpunkten in Richtung der HTR-Zellen (4 h = $71 \mu\text{m} \pm 19$; 8 h = $83 \mu\text{m} \pm 20$) und der HIPEC-Zellen (4 h = $60 \mu\text{m} \pm 15$; 8 h = $74 \mu\text{m} \pm 18$). In Richtung der HTR-Zellen bildeten die Termin- und PE-hCV-MSCs nach 4 h vergleichbar lange Zellfortsätze aus, zum zweiten Messpunkt nach 8 h waren die Fortsätze der Termin-hCV-MSCs mit $91 \mu\text{m} \pm 23$ signifikant länger ($p = 0,003$) als die der PE-hCV-MSCs ($83 \mu\text{m} \pm 20$). In Richtung der HIPEC-Zellen haben die Termin-hCV-MSC nach 4 h ($67 \mu\text{m} \pm 21$) sowie nach 8 h ($82 \mu\text{m} \pm 27$) längere Fortsätze ausgebildet (4 h: $p = 0,009$; 8 h: $p = 0,01$).

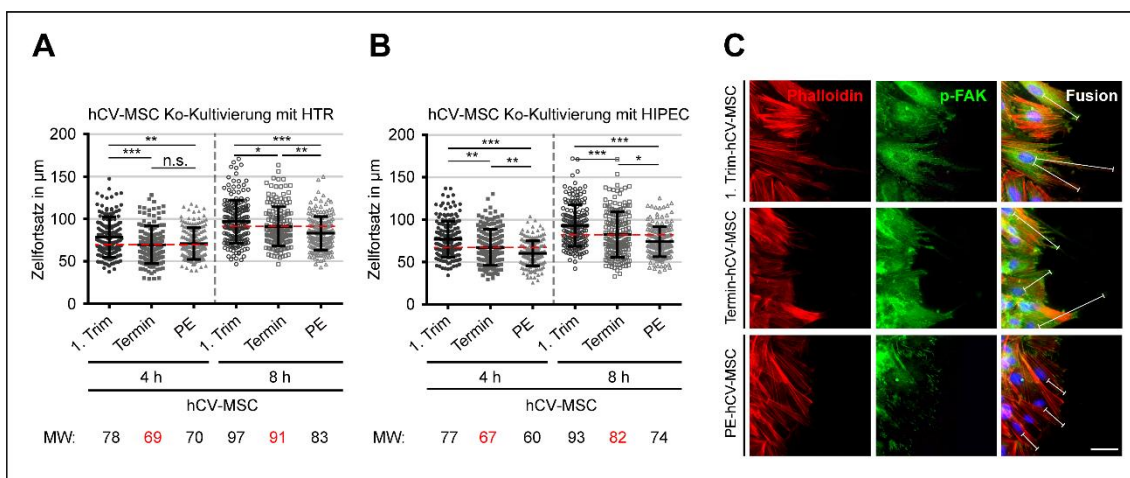


Abbildung 10: Verminderte Homing-Kapazität von PE-hCV-MSCs gegenüber EVT-Zelllinien

Nach dem Entfernen der Ibidi-Zellkultur-Inserts, in deren Kammern sich entweder hCV-MSCs neben HTR oder neben HIPEC befanden, wurden Hellfeldmikroskopie-Aufnahmen nach 4 h und 8 h angefertigt. Es wurde die Länge der zellulären Ausstülpungen in Richtung der EVT-Zellen vom Zellkern aus vermessen. (A, B) Darstellung der Länge der Zellfortsätze von hCV-MSCs als Streudiagramm mit Mittelwert \pm Standardabweichung, (A) Richtung HTR und (B) Richtung HIPEC ($n = 180$ Ausstülpungen, zusammengefasst aus drei hCV-MSC-Isolationen je Gruppe). Es wurde der unpaarige Mann-Whitney-U-Test verwendet. * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$. (C) Repräsentative Immunfluoreszenz-Aufnahmen der hCV-MSC-Migrationsfront in Richtung der HTR nach 8 h. Es wurde Phalloidin (rot), Phosphor-FAK (grün) und DNA (DAPI, blau) gefärbt. Maßstab: $50 \mu\text{m}$.

3.2.5 VEGF-A- und PlGF-Expression und Sekretion der hCV-MSCs

Zur weiteren Untersuchung der funktionellen Eigenschaften von hCV-MSCs wurde die Sekretion und Expression der Wachstumsfaktoren VEGF-A und PlGF gemessen, welche bei der Unterstützung der Gewebemöostase beteiligt sind (Di Wu et al. 2020).

Die Genexpression der Wachstumsfaktoren von hCV-MSCs unter Standardkulturbedingungen wurde bei hoher Konfluenz untersucht und auf die Termin-hCV-

MSCs standardisiert (Abb. 11 A). Aus dem Überstand wurde mittels ELISA die Konzentration der Wachstumsfaktoren bestimmt (Abb. 11 B). Dabei ergab sich eine starke Expression des Plazenta-Wachstumsfaktors (*PGF*; Abb. 11 A li) bei den 1. Trimester-hCV-MSCs, die mit einem RQ (relative Quantifizierung der Genexpression) von 2,3 mehr als doppelt so hoch war wie bei den Termin-hCV-MSCs. Dagegen liegt die relative Expression von *PGF* der PE-hCV-MSCs nur bei einem Viertel der Termin-hCV-MSCs. Eine Termin-hCV-MSCs Linie zeigte auch ein hohes relatives Expressionsprofil, was die hohe positive Abweichung erklärt. Die Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors-A (*VEGFA*; Abb. 11 A re) ist bei den Termin-hCV-MSCs am stärksten und doppelt so hoch wie die der 1. Trim-hCV-MSCs. Auch hier wird die große Abweichung durch die hohe Expression einer Termin-hCV-MSCs Linie verursacht. Die PE-hCV-MSCs exprimieren mit einem RQ von 0,12 nur etwa ein Achtel *VEGFA* der Termin-hCV-MSCs. Bei den untersuchten PE-hCV-MSCs waren die Abweichungen sowohl für *PGF*, wie auch für *VEGFA* sehr gering.

Im Überstand der hCV-MSCs konnten VEGF-A und PIGF mit einer ähnlichen Tendenz wie bei der Genexpression nachgewiesen werden. Bei PIGF (Abb. 11 B li) lag die Konzentration in den Termin- und PE-hCV-MSC-Überständen unterhalb der Nachweisgrenze. Lediglich in dem 1. Trim-hCV-MSC-Überstand konnte das Protein mit 59 pg/ml \pm 23 (MW \pm SEM) nachgewiesen werden. VEGF-A (Abb. 11 B re) konnte bei allen drei hCV-MSCs Gruppen nachgewiesen werden, wobei die Termin-Überstände mit 698 pg/ml \pm 144 am meisten VEGF-A enthielten, gefolgt von den 1. Trim-Überständen mit 578 pg/ml \pm 226. Bezogen auf die Termin-Überstände war die VEGF-A Konzentration der PE-hCV-MSC-Überstände, die im Mittel bei 151 pg/ml \pm 133 lag, signifikant erniedrigt ($p = 0,004$).

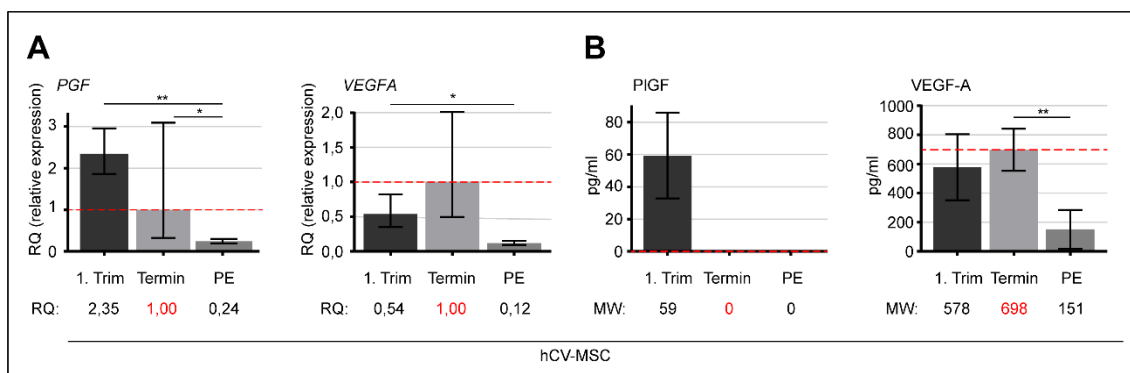


Abbildung 11: PE-hCV-MSCs exprimieren weniger Wachstumsfaktoren PIGF und VEGF-A

Für die Analyse der hCV-MSCs bezüglich der Wachstumsfaktoren PIGF und VEGF-A wurde die relative Expression ermittelt und ihre Sekretion in den Überständen untersucht. Bei einer Konfluenz von ca. 80 % wurde der standardisierte Überstand gesammelt sowie die Gesamt-RNA der hCV-MSCs extrahiert. (A) Die relative Quantifizierung der Genexpression (RQ) ist für *PGF* (links) und *VEGFA* (rechts) auf die Termin-hCV-MSCs standardisiert und als Balkendiagramm mit Minimal- und Maximalwert angegeben. Die Ergebnisse stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Der Student-t-Test wurde angewandt. (B) Der Nachweis von PIGF (links) und VEGF-A (rechts) im Überstand erfolgte mittels ELISA. Die Ergebnisse sind als Mittelwert in pg/ml \pm SEM als Balkendiagramme dargestellt und stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Es wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt. * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

3.3 Interaktion mit extravillösen Trophoblasten

Zur Analyse der Effekte von hCV-MSCs auf extravillöse Trophoblasten, die sich in nahegelegenen anatomischen Kompartimenten befinden, wurden exemplarisch immortalisierte HTR-8/SVneo (HTR)- und HIPEC-65 (HIPEC)-Zelllinien verwendet. Es wurden direkte und indirekte Ko-Kultur-Experimente durchgeführt. Für die indirekte Ko-Kultur wurde der Überstand von hCV-MSCs bei einer hohen Konfluenz von ca. 80-90 % nach 24 h verwendet (standardisierter Überstand).

Um die optimale Mediumzusammensetzung für die HTR-Zellen in indirekter Ko-Kultur zu bestimmen, wurde ihre Viabilität nach Kultivierung in unterschiedlichen MSC-Mediumkonzentrationen gemessen. Die Viabilität der HTR-Zellen wurde durch Kultivierung mit veränderter Mediumzusammensetzung beeinflusst (Abb. 12 A). Am geringsten wurde die Viabilität bei 10 % MSC-Medium verringert, nach 24 h um 0,2 % und nach 48 h um 12 %. Die Unterschiede zwischen den Zusammensetzungen mit 20-50 % MSC-Medium waren jedoch gering. Nach 24 h: 10 %, 6 %, 6 %, 11 % und nach 48 h: 17 %, 19 %, 20 %, 22 %. Daher wurde im Weiteren ein Anteil von 50 % MSC-Medium verwendet, um die HTR-Zellen einer hohen Konzentration von löslichen hCV-MSC-Faktoren auszusetzen, sie jedoch nicht zu stark in ihrer Viabilität einzuschränken. Die Exposition in der indirekten Ko-Kultur erfolgte über 24 h. Zu diesem Zeitpunkt wurde eine geringere Variabilität im CellTiter-Blue[®] Assay gemessen als bei 48 h.

3.3.1 Die Zilienausbildung von HTRs wird durch hCV-MSCs positiv beeinflusst

Zur Untersuchung der Effekte von hCV-MSCs auf EVT-Zellen wurde die Zilienausbildung von HTRs in der indirekten Ko-Kultur mit standardisiertem hCV-MSC-Überstand gemessen. Die Zilienlänge der HTR-Zellen war in der Kontrollkondition bei $4,7 \mu\text{m}$ und mit anteilig 50 % MSC-Medium bei $4,5 \mu\text{m}$ (Abb. 12 B, links). Der Unterschied von $0,2 \mu\text{m}$ war dabei nicht signifikant ($p = 0,34$). Unter Nährstoffentzug verlängerte sich die Zilienlänge im Mittel in der Kontrollkondition um 25,5 % auf $5,9 \mu\text{m}$ und in 50 % MSC-Medium um 22,2 % auf $5,5 \mu\text{m}$ (Abb. 12 B, rechts). Den größten Einfluss auf die Zilienlänge der HTR-Zellen hatten die 1. Trim-hCV-MSCs. Durch ihren Überstand wurde eine Verlängerung der Zilien um 22,2 % erzielt ($4,5 \mu\text{m}$ auf $5,5 \mu\text{m}$) und unter zusätzlichem Nährstoffentzug eine weitere Verlängerung von 12,7 % ($5,5 \mu\text{m}$ auf $6,2 \mu\text{m}$).

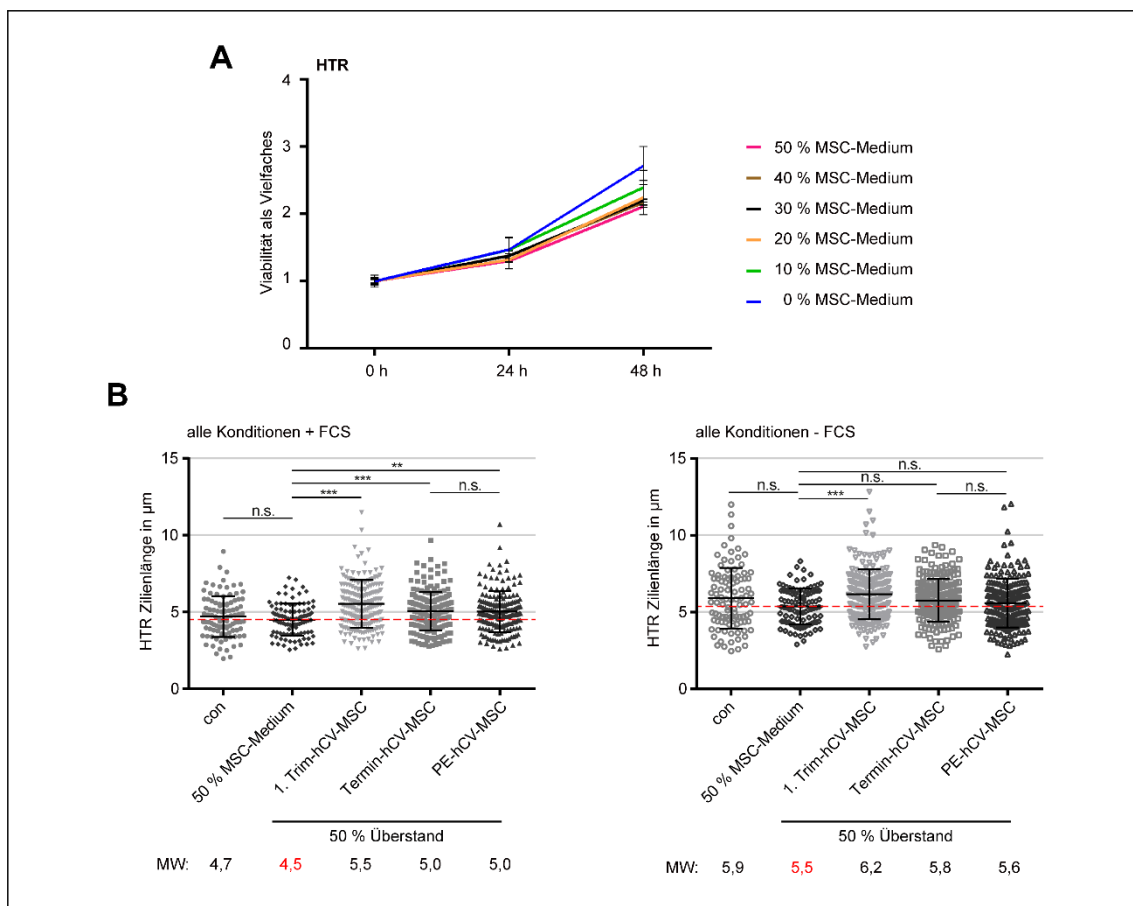


Abbildung 12: Verbesserte Zilienausbildung von HTRs unter hCV-MSC-Einfluss

(A) Die Viabilität der HTR-Zellen in veränderter Mediumzusammensetzung wurde mittels CellTiter-Blue® zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h und 48 h gemessen und ist als Mittelwert \pm SD angegeben. Das HTR-Medium wurde zu 10 %, 20 %, 30 %, 40 % und 50 % mit MSC-Medium ersetzt. (B) Zur Untersuchung des hCV-MSC-Einfluss auf die HTR wurde die Zilienlänge in der indirekten Ko-Kultur mit (+ FCS, engl. fetal calf

serum) und ohne Nährstoffe (- FCS) im Zellkulturmedium gemessen. Für die indirekte Ko-Kultur wurde standardisierter hCV-MSC-Überstand zu 50 % dem HTR-Medium zugegeben. Der Nährstoffentzug (- FCS) zur Stimulation der Ziliogenese erfolgte über 24 h. Darstellung der Zilienlänge ohne (links) und mit (rechts) Nährstoffentzug in μm ($n = 300$, zusammengefasst aus 3 unterschiedlichen Versuchen, mit standardisiertem Überstand von unterschiedlichen hCV-MSC-Isolationen) als Streudiagramm mit Mittelwert \pm Standardabweichung. Angewandt wurde der Mann-Whitney-U-Test. $**p \leq 0,01$; $***p \leq 0,001$.

3.3.2 Einfluss von hCV-MSCs auf die Funktionalität von EVT-Zelllinien

Die EVTs besitzen einen invasiven Charakter und sind zur Ausübung ihrer physiologischen Funktionen unter anderem auf ihre Motilität, Migration und die Zersetzung der extrazellulären Matrix angewiesen. Es wurden im Folgenden die Effekte der hCV-MSCs auf diese Eigenschaften untersucht.

Die Motilität der EVT-Zellen (HTR und HIPEC) wurde in indirekter Ko-Kultur mit standardisiertem hCV-MSC-Überstand gemessen. Repräsentative Bewegungsbahnen einzelner Zellen sind in Abbildung 13 A und C abgebildet. Auf die Motilität der EVTs hatte eine veränderte Mediumzusammensetzung mit 50 % MSC-Medium keinen wesentlichen Einfluss, weder auf HIPEC (Abb. 13 B) noch auf HTR (Abb. 13 D). Bei dem Überstand von 1. Trim-hCV-MSCs wurde ein signifikant positiver Effekt auf die Motilität der HIPEC- und HTR-Zellen beobachtet. Bei den HIPEC-Zellen nahm die Geschwindigkeit um 20,8 % von $0,72 \mu\text{m/s}$ auf $0,87 \mu\text{m/s}$ zu, und die akkumulierte Distanz verlängerte sich um 21,9 % von $479 \mu\text{m}$ auf $584 \mu\text{m}$ (Abb. 13 B). Bei den HTR-Zellen wurde eine Geschwindigkeitszunahme um 26,6 % von $0,64 \mu\text{m/s}$ auf $0,81 \mu\text{m/s}$ beobachtet, und die Distanz nahm um 26,7 % von $427 \mu\text{m}$ auf $541 \mu\text{m}$ zu (Abb. 13 D). Für die Termin-hCV-MSCs wurde nur auf die HIPEC-Zellen ein signifikanter Effekt beobachtet. Hier nahm die Geschwindigkeit um 8,3 % auf $0,78 \mu\text{m/s}$ zu und die Distanz um 8,8 % auf $521 \mu\text{m}$. Der Überstand der PE-hCV-MSCs hatte keine signifikante Veränderung der Parameter Geschwindigkeit und Distanz der HIPEC-Zellen zur Folge. Auf die Motilität der HTR-Zellen hatte der Überstand der PE-hCV-MSCs jedoch einen negativen Effekt. Die Geschwindigkeit verringerte sich um 14,3 % auf $0,56 \mu\text{m/s}$, und die Distanz reduzierte sich um 13,6 % auf $376 \mu\text{m}$.

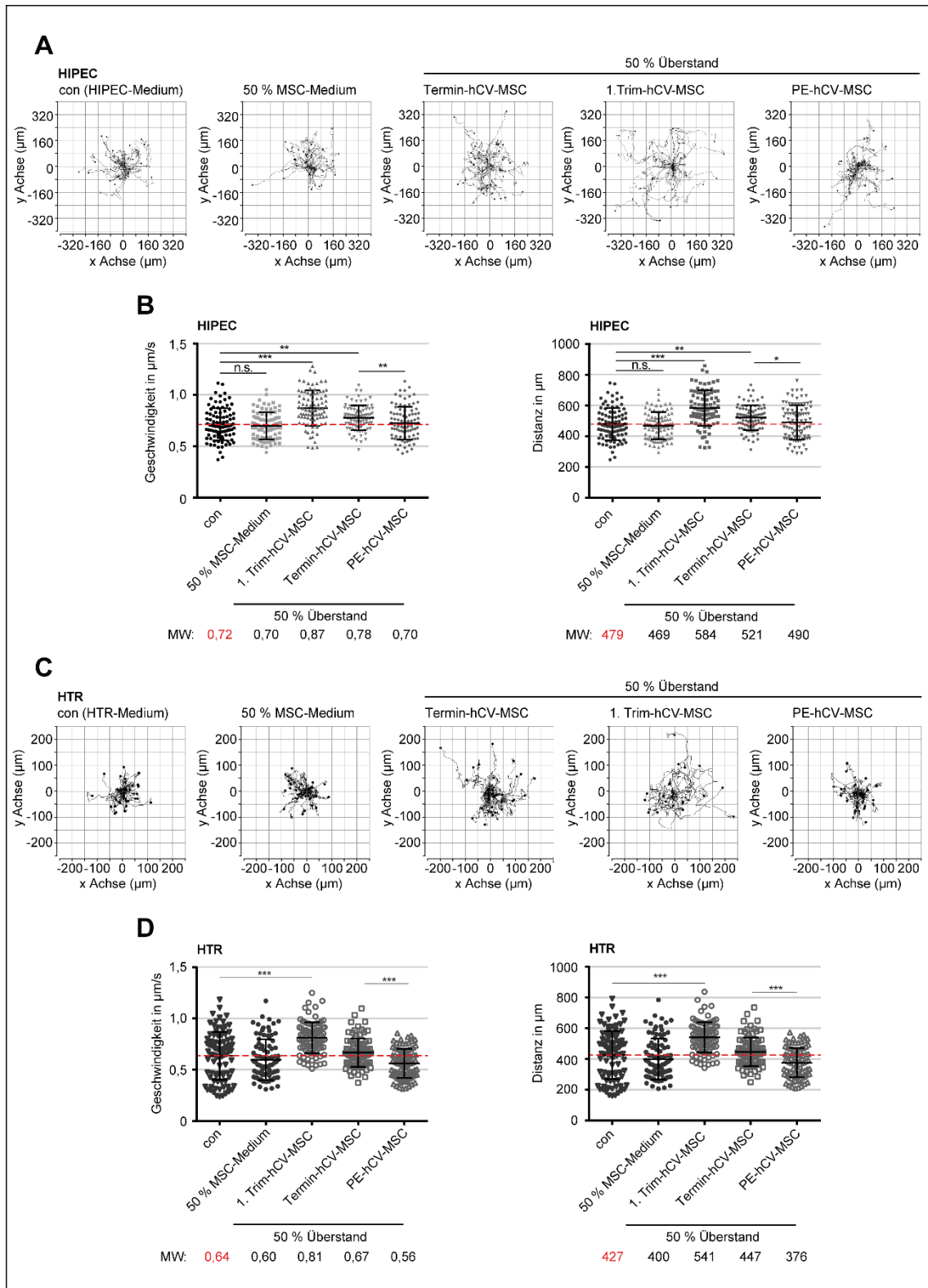


Abbildung 13: Einfluss von hCV-MSCs auf die Motilität von EVT-Zellen

Einzelne EVT-Zellen wurden nach der Behandlung mit dem angegebenen Medium (Kontrollmedium oder Medium mit 50 % Überstand von 1. Trim-, Termin- oder PE-hCV-MSCs) mithilfe der Zeitraffermikroskopie über 11,25 h verfolgt, um ihre Zellmotilität zu analysieren. Dabei wurden die beiden EVT-Zelllinien HIPEC (A, B) und HTR (C, D) verwendet. (A, C) Repräsentative Bewegungsbahnen sind

für einzelne Zellen dargestellt ($n = 30$ Zellen). **(B, D)** Darstellung der Geschwindigkeit in $\mu\text{m/s}$ (links) und akkumulierten Distanz in μm (rechts) als Mittelwert \pm SD. ($n = 90$ Zellen, zusammengefasst aus drei unabhängigen Experimenten, mit standardisiertem Überstand von unterschiedlichen hCV-MSC-Isolationen). Angewendet wurde der ungepaarte Mann-Whitney-U-Test. * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,001$; *** $p \leq 0,001$.

Zur Analyse der Effekte von hCV-MSCs auf das Migrationsverhalten von HTR- und HIPEC-Zellen wurde ein wound-healing-Assay als direktes Ko-Kultur-Experiment durchgeführt. Dafür wurden in die Ibidi-Kammern die EVT_s gesetzt und um den Zellkultureinsatz herum hCV-MSCs ausgelegt (Abb. 14 A). Nach dem Haften der Zellen wurden die Einsätze entfernt, was den Zeitpunkt 0 h definiert. Nach 4 h zeigte sich ein positiver Trend, der auf die Unterstützung der Migration hinweist. Nach 8 h war die offene Fläche der HTR- und HIPEC-Zellen, die mit hCV-MSCs aus dem ersten Trimester sowie den Termin-hCV-MSCs kultiviert wurden, signifikant kleiner als ohne Ko-Kultur. Der Unterschied der Unterstützung zwischen den beiden hCV-MSC-Gruppen war dabei gering. Bei den HTR-Zellen war die offene Migrationsfläche mit 1. Trim-hCV-MSCs nach 8 h 76,5 % ($p = 0,017$) kleiner als in der Kontrollkondition ohne hCV-MSC-Einfluss. Die Termin-hCV-MSCs verringerten die HTR-Migrationsfläche um 70,6 % ($p = 0,023$), (Abb. 14 B). Nach 8 h war die offene Migrationsfläche der HIPEC-Zellen in Ko-Kultur mit 1. Trim-hCV-MSCs um 26,4 % ($p = 0,048$) reduziert, bezogen auf die Kontrollkondition. Bei den HIPEC-Zellen in Ko-Kultur mit den Termin-hCV-MSCs war der Anteil der offenen Migrationsfläche nach 8 h um 32,1 % ($p = 0,034$) geringer als in der Kontrollkondition (Abb. 14 D). Die PE-hCV-MSCs zeigten ebenfalls eine leicht positive Tendenz auf das Migrationsverhalten der EVT-Zelllinien, jedoch war der Effekt nicht signifikant. Nach 8 h verringerten sie bei den HTR-Zellen die offene Migrationsfläche um 52,9 % ($p = 0,084$) und bei den HIPEC-Zellen um 13,2 % ($p = 0,403$), bezogen auf die Kontrollkondition.

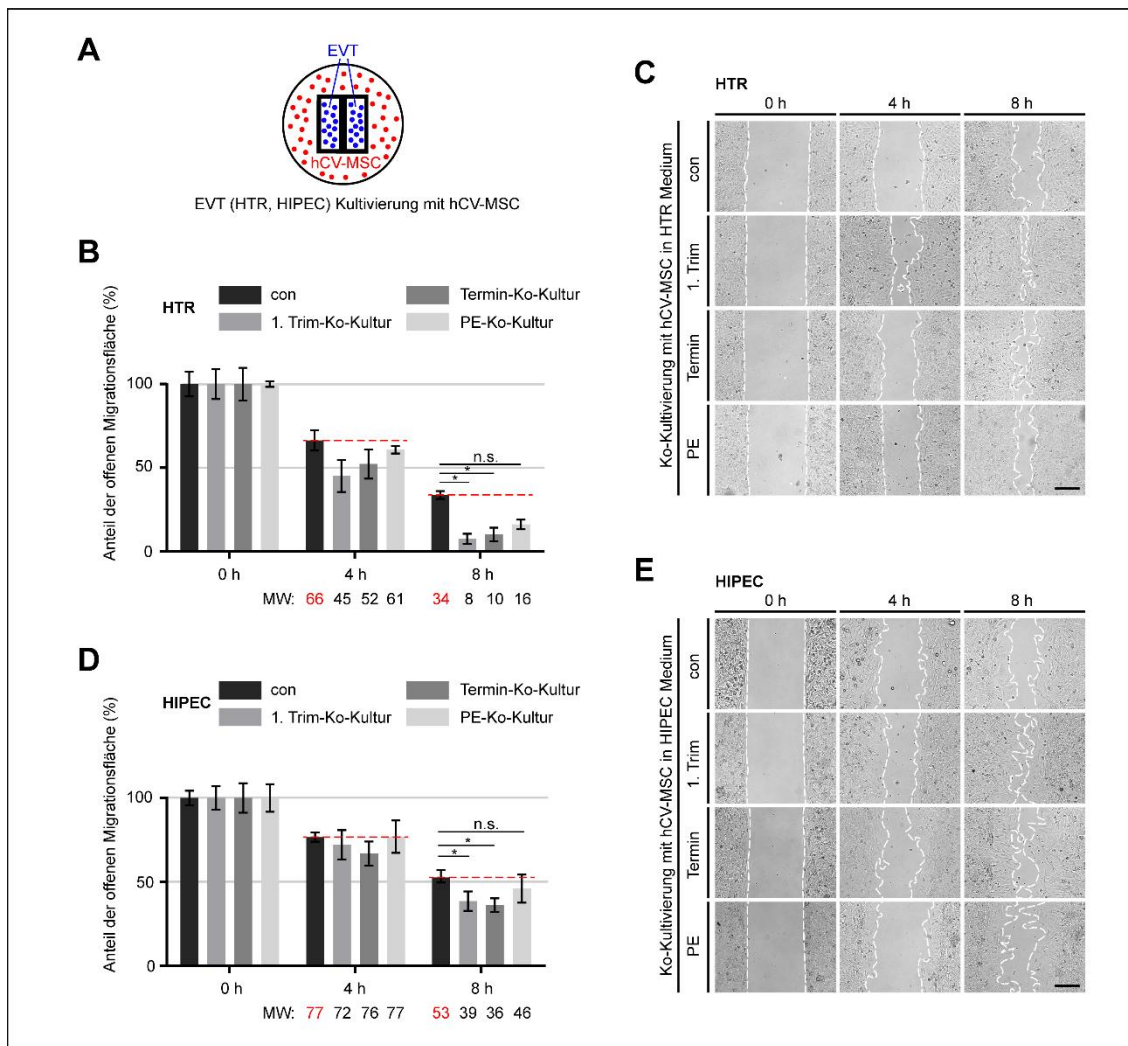


Abbildung 14: Einfluss von hCV-MSCs auf Migration von EVT-Zellen

Direktes Ko-Kultur-Experiment zur Analyse der EVT-Migration, unter Einfluss von hCV-MSCs. (A) Der Versuchsaufbau ist dargestellt: HIPEC/HTR-Zellen (blau) in Ibidi-Kammern sind umgeben von 1. Trim-, Termin- oder PE-hCV-MSCs (rot). 8 h nach dem Auslegen der Zellen wurden die Kammern entfernt und das Medium durch HTR- oder HIPEC-Medium ersetzt. Zur Dokumentation der Migration wurden Hellfeldmikroskopie-Aufnahmen nach 0 h, 4 h und 8 h aufgenommen. (B, D) Quantifizierung der offenen Fläche zwischen den beiden Migrationslinien zu verschiedenen Zeitpunkten für (B) HTR- und (D) HIPEC-Zellen. Die zellfreie Fläche zu Beginn (0 h) wurde als 100 % festgelegt. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten sind als Balkendiagramme mit Mittelwert \pm SEM angegeben. Es wurde ein ungepaarter Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. * $p < 0,05$, ** $p \leq 0,01$. (C, E) Dargestellt ist der Migrationsfortschritt. Die weiß gestrichelte Linie hebt den freien Bereich zwischen den Migrationslinien hervor. Maßstab: 200 μ m.

Um den Einfluss von hCV-MSCs auf die Funktionalität von EVT-Zelllinien weiter zu untersuchen wurde die Enzymaktivität von MMP-2 und MMP-9 durch Gelatine-Zymographie nach indirekter Ko-Kultur bestimmt sowie eine Genexpressionsanalyse durchgeführt. Dafür wurden HTR- und HIPEC-Zellen sieben Tage lang mit 50 %

standardisierten Überständen von hCV-MSCs kultiviert. Anschließend wurden die Zellen über 24 h in nährstofffreiem Medium kultiviert, um die exprimierten Enzyme zu sammeln. Dieser Überstand wurde im Weiteren mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Die im Überstand enthaltenen MMP-2 und MMP-9 haben die Galantine im Gel zersetzt und dadurch lokal lichtdurchlässiger gemacht. Die Abnahme des Grauwerts durch die MMP-Aktivität wurde verglichen und auf die Grauwert-Abnahme der Kontrollkondition mit 50 % MSC-Medium standardisiert. Im Folgenden wurde dies als Vielfaches der Aktivität angegeben.

Bei den HTRs war die MMP-2-Aktivität lediglich durch den Überstand der Termin-hCV-MSCs 1,3-fach stimuliert (Abb. 15 A). Der Überstand der 1. Trim-hCV-MSCs hatte mit 0,9-facher Aktivität fast keinen Effekt. Der Überstand der PE-hCV-MSCs zeigte einen abnehmenden Effekt auf die MMP-2-Aktivität. Bei der Analyse der MMP-9-Aktivität stimulierte der Termin-hCV-MSC-Überstand ebenfalls am stärksten, auf die doppelte Aktivität. Durch die 1. Trim-hCV-MSCs wurde die MMP-9-Aktivität der HTR gesteigert. Die PE-hCV-MSCs zeigten einen geringeren negativen Effekt auf die MMP-9- als auf die MMP-2-Aktivität, mit einer 0,8-fachen Aktivität. Die HIPEC-Zellen zeigten durch die indirekte Ko-Kultivierung mit hCV-MSCs eine ähnliche Tendenz wie die HTR-Zellen (Abb. 15 B). Hier wurde jedoch die MMP-2-Aktivität durch die hCV-MSC-Überstände stärker stimuliert. Die Termin-hCV-MSCs (2,1-fach) und die 1. Trim-hCV-MSCs (1,9-fach) zeigten einen ähnlich starken positiven Einfluss auf die MMP-2-Aktivität. Die PE-hCV-MSCs hatten nur einen geringen negativen Einfluss mit 0,7-facher Aktivität. Die MMP-9-Aktivität der HIPEC-Zellen wurde durch die 1. Trim-hCV-MSCs (1,3-fach) und die Termin-hCV-MSCs (1,7-fach) stimuliert und durch die PE-hCV-MSCs um die Hälfte gehemmt.

Nach der Kultivierung über 7 Tage in hCV-MSC-Überstand wurde die Gesamt-RNA aus den behandelten EVT-Zellen extrahiert, um den Gengehalt von *MMP9* und *MMP2* zu bestimmen. Die Quantität des MMP-Gengehalts entsprach der Tendenz, die bei der MMP-Aktivität beobachtet wurde. Bei den HIPEC stimulierten alle hCV-MSC-Gruppen die Genexpression von *MMP2* und *MMP9* signifikant (Abb. 15 C, D). Der Überstand der Termin- und 1. Trim-hCV-MSCs war dem der PE-hCV-MSCs signifikant überlegen. Die *MMP2*-Expression erreichte einen RQ-Wert von 15 (1.-Trim) und 21,8 (Term) im Vergleich zu 13,4 (PE). Für *MMP9* zeigte sich eine Expression von 9,7 (1. Trim) und 15,9 (Term) im Vergleich zu 8,2 (PE). Bei den HTRs fiel die Stimulation der Expression

geringer aus (Abb. 15 E, F). Für den 1. Trim-Überstand (RQ: $MMP2 = 1,99$; $MMP9 = 2,8$) und den Termin-Überstand (RQ: $MMP2 = 5,03$; $MMP9 = 2,97$) war die Stimulation signifikant. Der PE-hCV-MSC-Überstand stimulierte die Genexpression im Vergleich zur Kontrollkondition für $MMP2$ (RQ = 1,31) und $MMP9$ (RQ = 1,39), jedoch nicht signifikant.

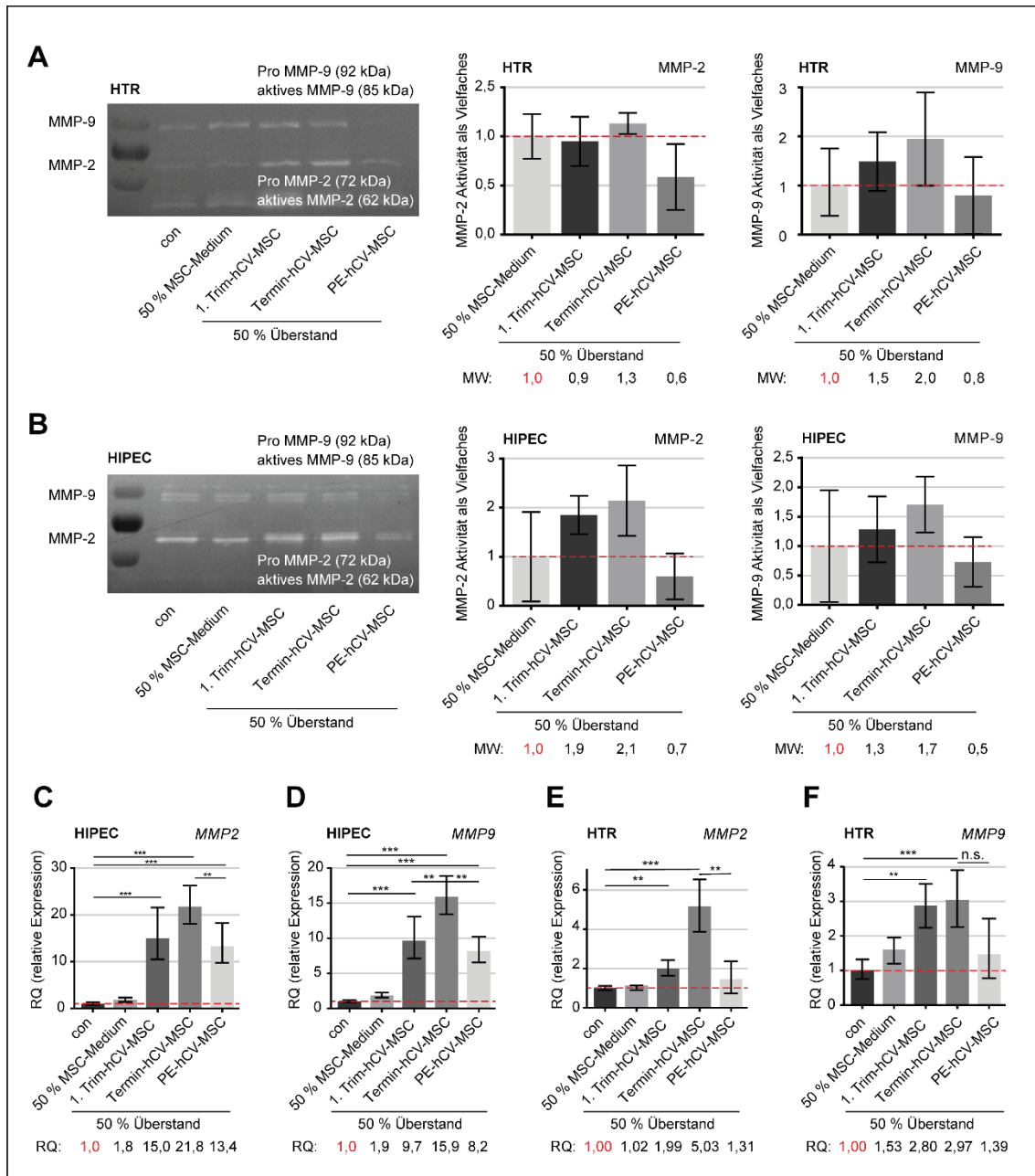


Abbildung 15: MMP-2 und MMP-9-Expression und -Aktivität in EVT-Zelllinien

Untersuchung des Einflusses von hCV-MSCs auf die Expression und Aktivität der Matrix-Metalloproteinase-2 und -9 von EVT-Zelllinien. (A) HTR- und (B) HIPEC-Zellen wurden 7 Tage lang mit dem angegebenen Medium kultiviert (Kontrollmedium oder Medium mit 50 % Überstand von 1. Trim-, Termin- oder PE-hCV-MSCs). Anschließend wurden die Zellen 24 h lang in nährstoffreiem Medium

kultiviert, der Überstand davon wurde für das Gelatine-Zymographie-Assay zur Messung der MMP-2- und MMP-9-Aktivität verwendet. Zudem wurde die gesamt-RNA aus den behandelten HTR-Zellen extrahiert, um den Gengehalt von *MMP9* und *MMP2* zu analysieren. (A, B links) Die Aufnahmen zeigen die Aktivität von MMP-2 (untere Bande) und MMP-9 (obere Bande), die das 1 %-ige Galantine SDS-Gel zersetzt haben. (A, B mittlere und rechte Grafik) Quantifizierung der MMP-2- und MMP-9-Aktivität mittels Grauwert und Normalisierung auf das MSC-Kontrollmedium (50 % MSC-Medium). Die Ergebnisse stammen aus drei unabhängigen Experimenten und sind als Balkendiagramme mit Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. (C-F) Darstellung der relativen Quantifizierung der Genexpression (RQ) von *MMP2* und *MMP9* bei den mit hCV-MSC-Überstand behandelten HTR- (E, F) und HIPEC-Zellen (C, D). Die Daten basieren auf drei unabhängigen Experimenten und werden als Balkendiagramm mit RQ und Minimal- und Maximalwert dargestellt. Es wurde der Student-t-Test verwendet. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Des Weiteren wurden HTR-Zellen in indirekter und direkter Ko-Kultur mit hCV-MSCs kultiviert und anschließend die Genexpression der zellzyklusregulierenden Proteine ZEB1, Aurora Kinase B und Cyclin B1 untersucht. Zu beobachten war, dass die HTR-Zellen in der direkten Ko-Kultivierung morphologisch gestresst erschienen. Vermehrt waren tote Zellen sichtbar, die sich abgelöst hatten. Die Zellmembranen der noch haftenden Zellen zeigten sich ausgefranst.

Die Expression des Transkriptionsfaktors *ZEB1*, eines wichtigen Regulators der epithelial-mesenchymalen Transition (Huang et al. 2022), war bei der Kultivierung von HTR-Zellen in Medium, das zur Hälfte aus MSC-Medium bestand, am stärksten beeinträchtigt, mit einer RQ von 0,57 (Abb. 16 A). Dieser Effekt wurde bei der Kultivierung in Medium, das zur Hälfte aus standardisiertem Überstand bestand, aufgehoben. Der 1. Trim-Überstand hatte hierbei den größten Effekt mit einer RQ von 1,25, was sogar noch über der Expression der Kontrollkondition in HTR-Medium lag.

Die Aurora Kinase B, die für die Bindung und Ausrichtung der Chromosomen in der (Pro-) Metaphase verantwortlich ist (Willems et al. 2018), wurde in den HTR-Zellen in konditioniertem Medium weniger exprimiert (Abb. 16 B). Im Vergleich zu der Zusammensetzung mit 50 % MSC-Medium (RQ = 0,83) war bei HTR-Zellen im 1. Trimester-Überstand (RQ = 0,81) kein wesentlicher Unterschied festzustellen. Auch der Überstand der Termin-hCV-MSCs hatte keinen weiteren fördernden Effekt auf die Expression, hier lag der RQ bei 0,79. Ein negativer Trend zeigte sich bei der direkten Ko-Kultivierung, mit einer RQ von 0,71 bei 1. Trim-hCV-MSCs und 0,41 bei Termin-hCV-MSCs war eine deutliche Beeinträchtigung der Mitose der HTR zu erkennen.

Bei Cyklin B1, die als Komplex zusammen mit CDK1 den G2/M Checkpoint kontrolliert und die Mitose induziert (Vigneron et al. 2018), zeigte die Expression im konditionierten Medium eine ähnliche Tendenz wie die Expressionsanalyse von Aurora Kinase B (Abb. 16 C). Durch die Änderung der Mediumzusammensetzung mit 50 % MSC-Medium war die Genexpression mit einer RQ von 0,75 reduziert. Die Kultivierung mit 1. Trim- und Termin-Überstand reduzierte die Expression weiter. Auch in der direkten Ko-Kultur zeigte sich bei 1. Trim- und Termin-hCV-MSC-Überständen eine Abnahme der Expression. Durch die Kultivierung in PE-Überstand war die Expression nicht eingeschränkt.

Bei Aurora B und Cyklin B 1 konnten die Ergebnisse der direkten Ko-Kultur mit PE-hCV-MSCs aufgrund von Fehlern in den Triplets nicht in die Auswertung einbezogen werden.

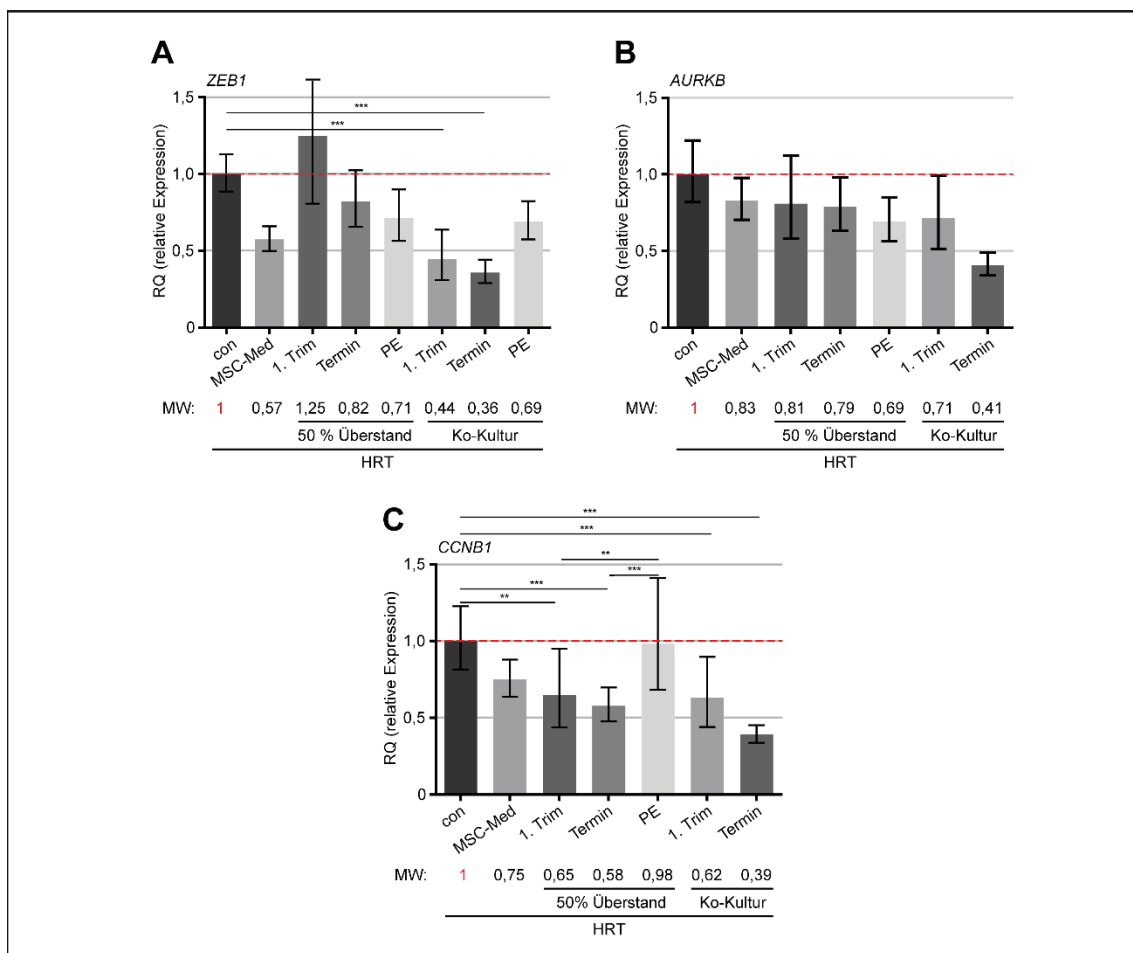


Abbildung 16: HTR-Zellzyklusgenexpression unter hCV-MSC-Einfluss

Untersuchung des Einflusses von hCV-MSCs auf die Expression der Zellzyklus regulierenden Gene *ZEB1*, *AURKB* und *CCNB1* in EVT-Zelllinien durch direkte und indirekte Ko-Kultur. (A-C) Für die indirekte Ko-

Kultur wurden HTR-Zellen sieben Tage lang mit dem angegebenen Medium kultiviert (HTR-Medium, 50 % MSC-Medium oder Medium mit 50 % Überstand von 1. Trim-, Termin- oder PE-hCV-MSCs). Für die direkte Ko-Kultur wurden auf einem Einsatz mit 0,4 µm Porengröße 3×10^4 hCV-MSCs zu den HTR-Zellen hinzugefügt. Das Medium bestand zu 50 % aus HTR- und MSC-Medium. Eine Kontrollgruppe wurde in HTR-Medium, die zweite in Medium bestehend aus 50 % MCS-Medium kultiviert. Nach sieben Tagen erfolgten die RNA-Isolation und die Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion aus den behandelten HTR-Zellen. Die relative Quantifizierung der Genexpression (RQ) für *ZEB1* (A), *AURKB* (B) und *CCNB1* (C) wurde als Balkendiagramm mit Minimal- und Maximalwert angegeben. Die Ergebnisse stammen aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils unterschiedlichen hCV-MSC-Isolationen. Der Student-t-Test wurde angewendet. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

3.3.3 1. Trim-hCV-MSCs fördern die Angiogenese von HTRs und HUVECs

MSCs sind für ihre Fähigkeit bekannt, die Angiogenese zu fördern (Meraviglia et al. 2012; Mathew et al. 2020). Um dies für die hCV-MSCs zu überprüfen, wurde ihre Unterstützung bei der Bildung zellulärer Netzwerke in dem tube-formation-Assay untersucht. Es wurden HUVEC- und HTR-Zellen auf wachstumsfaktorreduziertem Matrigel ausgelegt. Die Mediumzusammensetzung bestand zu 50 % anteilig aus standardisiertem Überstand oder Kontrollmedium. Der erste Durchlauf des Angiogenese-Versuchs mit HUVECs wurde als Zeitrafferaufnahme über 24 h festgehalten. Dabei wurde alle 20 Minuten ein Bild aufgenommen. Obwohl das aufgenommene Bildmaterial technisch nicht zur Auswertung geeignet war, konnte festgestellt werden, dass sich nach 6 h stabile Netzstrukturen gebildet hatten, die im weiteren Verlauf zu größeren Netzwerken zusammenwuchsen. Bei der Wiederholung wurden nach 6 h und 24 h Aufnahmen angefertigt. Die HTRs zeigten nach 12 h die besten Netzwerkstrukturen, die entsprechend aufgenommen und ausgewertet wurden.

Der Überstand von 1. Trim-hCV-MSCs verbesserte die Angiogenese-Fähigkeit von HTR-Zellen (Abb. 17 D). Dies wurde in der Anzahl der Verbindungsstellen (*engl.* number of junctions), der Gesamtlänge der Segmente (*engl.* total segment length), der Netzfläche (*engl.* total mesh area) und der Anzahl der Knoten (*engl.* number of nodes) deutlich. Der Überstand von Termin-hCV-MSCs hatte keinen signifikanten Effekt auf HTRs im Vergleich zu der Kontrollkondition. Die HTR-Zellen, bei denen das Medium zur Hälfte durch den Überstand von PE-hCV-MSCs ersetzt wurde, zeigten eine eingeschränkte Fähigkeit zur Ausbildung intakter Netzstrukturen.

Nachdem dieser Effekt auf die HTR-Zellen beobachtet wurde, wurden Endothelzellen aus der Nabelvene (HUVECs) getestet, um die Ergebnisse zu bestätigen. Die

Angiogenese-Fähigkeit der HUVECs wurde durch den Überstand der hCV-MSCs aus dem ersten Trimester nach 6 h verbessert (Abb. 17 B). Der positive Effekt der 1. Trim-hCV-MSCs hält auch 24 h nach dem Auslegen der HUVECs an (Abb. 17 C). Der Überstand von PE-hCV-MSCs hatte, wie bei den HTRs, einen negativen Einfluss auf die HUVECs. In den Parametern Anzahl der Knoten und Gesamtlänge der Segmente lagen die Werte der HUVECs mit dem PE-hCV-MSC-Überstand jedoch nicht mehr unter denen der Kontrollkondition.

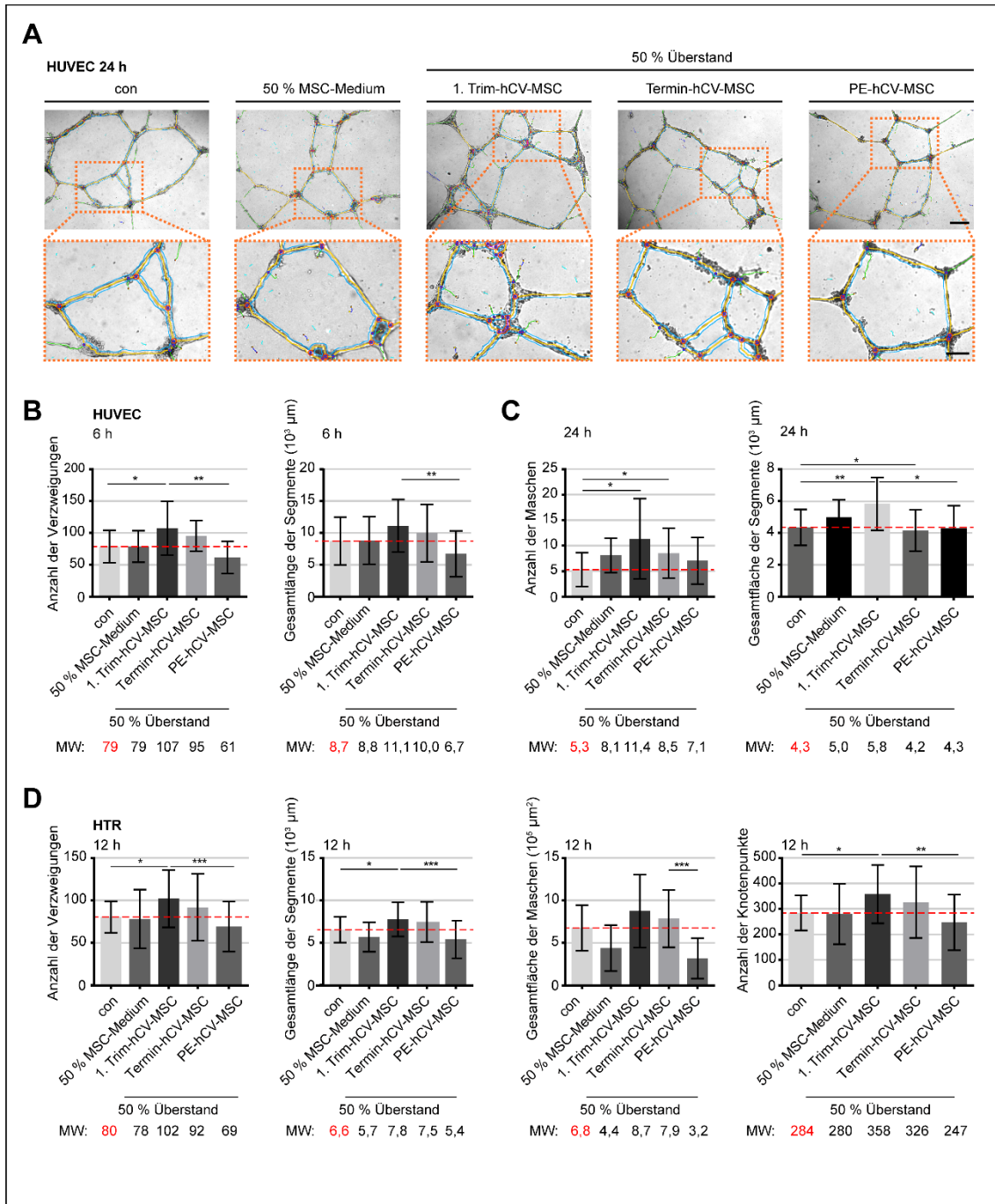


Abbildung 17: Einfluss der hCV-MSCs auf die Angiogenese von HUVEC- und HTR-Zellen

Die angiogene Wirkung von hCV-MSCs wurde durch die zelluläre Netzwerkbildung von HUVEC- und HTR-Zellen im tube-formation-Assay in einer indirekten Ko-Kultur analysiert. Die Zellen wurden auf Matrigel ausgelegt und mit verschiedenen Medien kultiviert (Kontrollmedium, Kontrollmedium mit 50 % MSC-Medium oder mit 50 % Überstand von 1. Trim-, Termin- oder PE-hCV-MSCs). Die Netzwerkbildung wurde mithilfe des ImageJ Plug-ins „Angiogenesis Analyzer“ ausgewertet. (A) Repräsentative Hellfeldmikroskopie-Aufnahmen von HUVECs nach 24 h Netzwerkbildung, mit der Maske der Auswertung (grün: Äste; cyan: Zweige; gelb: Hauptsegmente; rot umrandet von blau: Knotenpunkte umgeben von Abzweigungen; blau umrandet von rot: Hauptverbindungen). Maßstab: 200 µm, vergrößerter Ausschnitt 100 µm. (B, C) Quantifizierung der Netzwerkbildung von HUVECs nach 6 h (B) und 24 h (C). Dargestellt sind die Anzahl der Verzweigungen (B, links), Gesamtlänge der Segmente (B rechts), Anzahl der Maschen (C links) und Gesamtfläche der Segmente (B, rechts). (D) Quantifizierung der Netzwerkbildung von HTR nach 12 h. Dargestellt sind die Anzahl der Verzweigungen (D, 1. Grafik), Gesamtlänge der Segmente (D, 2. Grafik), Gesamtfläche der Maschen (D, 3. Grafik), Anzahl der Knotenpunkte (D, 4. Grafik). (B-D) Die Ergebnisse basieren auf drei unabhängigen Experimenten (n = 15 Bilder je Bedingung pro Gruppe) und sind als Balkendiagramme mit Mittelwerten ± Standardabweichung dargestellt. Angewandt wurde der Student-t-Test. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

3.4 Trophoblastorganoide

Aufgrund von zeitlicher Knappheit konnte ich an diesem Teil des Projekts nur anfänglich mitwirken. Zur Vervollständigung des Sachverhalts der Dissertation werden die Ergebnisse des Organoidversuchs trotzdem aufgeführt. Durch die freundliche Unterstützung von Frau Dr. Kreis und Frau Friemel durch die Methodenrecherche, Bereitstellung der Materialien und praktische Unterstützung konnte der Organoid-Versuch umgesetzt werden. Großen Dank kommt zudem Herrn Dr. Ritter und Frau Roth zu, die die praktische Arbeit vervollständigt haben.

Um die Effekte von hCV-MSCs auf die Trophoblastenproliferation in einem dreidimensionalen Zellverbund zu untersuchen, wurde ein Organoid-Modell herangezogen. Es wurden Trophoblastorganoide aus villösem 1. Trimester-Plazentamaterial für 72 h gebildet und anschließend das Medium zu 30 % mit standardisiertem Überstand von hCV-MSCs aus dem 1. Trimester, von termingerech entbundenen oder an Präeklampsie erkrankten Frauen ergänzt. Da davon auszugehen ist, dass die Organoide aus Trophoblastenstammzellen der Plazentazotten entstanden sind, werden diese im weiteren als hTSC^{CT} (*engl.* human villous cytotrophoblast stem cell)-Organoide bezeichnet.

Die Entwicklung wurde durch die Vermessung des Durchmessers und der Fläche mittels Hellfeldmikroskopieaufnahmen dokumentiert. Die Sekretion von β -humanem Choriongonadotropin (β -hCG), welches der fusionierte Synzytiotrophoblast produziert wird, wurde mittels ELISA-Assay quantifiziert. Die hier erstellten Modelle besitzen eine äußere Schicht aus Zytotrophoblasten, während der Synzytiotrophoblast zentral liegt. Somit liegt im Vergleich zu physiologischen Plazentazotten eine inverse Anordnung der Zellpopulationen vor.

Bei der Analyse des Wachstumsverhaltens (Abb. 18 A) zeigten die hTSC^{CT}-Organoiden, die mit 30 % Überständen von hCV-MSCs aus der Plazenta des ersten Trimesters und des Termins behandelt wurden, vergrößerte Organoidflächen von 11,0 mm² bzw. 9,3 mm² im Vergleich zu den Kontrollorganoiden, die für 7 Tage in Medium bestehend aus 30 % MSC-Medium kultiviert wurden (7,9 mm²). Im Gegensatz dazu wiesen Organoiden, die mit 30 % Überstand von PE-hCV-MSCs behandelt wurden, eine kleinere Fläche von 7,4 mm² im Gegensatz zu den Kontrollorganoiden (7,9 mm²) auf, was jedoch nicht signifikant ist ($p = 0,059$). Die Analyse des sezernierten β -hCG ergab erhöhte Werte für Organoiden, die mit Überständen von hCV-MSCs aus dem ersten Trimester oder dem Termin behandelt wurden 65 ng/ml bzw. 60 ng/ml, verglichen mit 40 ng/ml bei den Kontrollorganoiden (Abb. 18 B). Korrelierend zu der verringerten Größe der Organoiden, die mit dem Überstand von PE-hCV-MSCs behandelt wurden, war auch ihre β -hCG-Sekretion erniedrigt (26 ng/ml), ebenso wie bei den Organoiden, die mit MSC-Medium behandelt wurden (27 ng/ml).

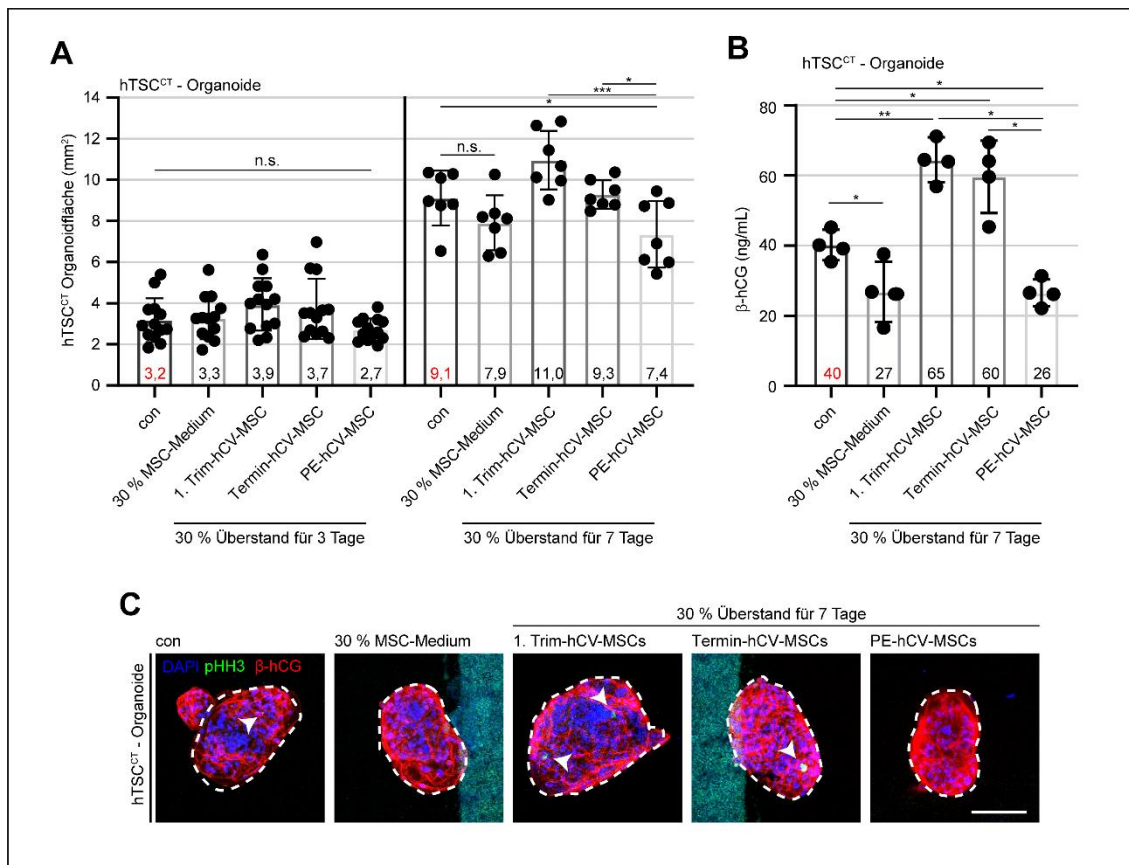


Abbildung 18: Einfluss der hCV-MSCs auf die Bildung plazentarer Organoide

Trophoblastorganoide wurden über 72 h aus hTSC^{CT}-Zellen erzeugt und anschließend bis zu 7 Tage lang mit 30 % Überstand von 1. Trim-, Termin- oder PE-hCV-MSCs. Die Organoide wurden gegen β -hCG (rot), pHH3 (grün) und DNA (DAPI, blau) gefärbt. Zudem wurden nach 3 und nach 7 Tagen Hellfeldmikroskopieaufnahmen angefertigt und Durchmesser und Fläche der Organoide ermittelt. **(A)** Die Ergebnisse der Organoidfläche werden als Streudiagramme dargestellt, die den Mittelwert \pm SEM zeigen ($n = 7-10$ Organoide, aus drei unterschiedlichen hCV-MSC-Überständen pro Gruppe). **(B)** Aus den Überständen der behandelten hTSC^{CT}-Organoide wurde die β -hCG-Konzentration mittels ELISA bestimmt und als Streudiagramm mit Mittelwert \pm SEM dargestellt ($n = 7-10$ Organoide, zusammengefasst aus drei Überständen von unterschiedlichen hCV-MSC-Isolationen pro Gruppe). **(C)** Repräsentative Bilder der gefärbten hTSC^{CT}-Organoide, die 7 Tage lang mit verschiedenen Überständen behandelt wurden, sind gezeigt (weiße gepunktete Linien zeigen die gemessenen Flächen an, Pfeilspitzen zeigen pHH3-positive Zellen). Maßstab: 200 μ m. Die Ergebnisse stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Der Student-t-Test wurde verwendet. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

4 Diskussion

4.1 hCV-MSCs bilden Zilien aus, die während der Plazentaentwicklung reguliert werden

Es wurde beobachtet, dass MSCs aus humanen Plazentazotten (hCV-MSCs) des 1. Trimesters signifikant mehr und längere primäre Zilien ausbilden als hCV-MSCs aus der reifen Plazenta. Diese Beobachtung stimmt mit früheren in-vivo-Untersuchungen der Forschungsgruppe überein, bei denen Frau Dr. Kreis und Frau Friemel Gewebeschnitte von Plazentazotten mit Zilienmarkern angefertigt haben. Dabei wurde nachgewiesen, dass mesenchymale Zellen im Zottenstroma während der Schwangerschaft primäre Zilien bilden und deren Anzahl und Länge im Verlauf der Schwangerschaft abnehmen (Romberg et al. 2022).

In meiner Arbeit konnte gezeigt werden, dass 1. Trim-hCV-MSCs nicht nur strukturell längere Zilien ausbilden, sondern auch eine verstärkte Signaltransduktion des Hh-Signalwegs aufweisen, der exklusiv am primären Zilium lokalisiert ist. Bereits ohne externe Stimulation war das Protein Smo an der Zilienmembran lokalisiert und die Expression der Gene *PTCH1*, *SMO* und *GLII* erhöht, was auf einen aktivierten Hh-Signalweg hinweist. Nach externer Stimulation konnte eine verstärkte Rekrutierung von Smo an die Zilienmembran sowie eine erhöhte Expression der nachgeschalteten Zielgene *PTCH1*, *SMO* und *GLII* nachgewiesen werden.

Der Hh-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle in der Stammzellmodulation, indem er die Expression von *NANOG* und *SOX2* reguliert (Po et al. 2010). Darüber hinaus beeinflusst dieser Signalweg die Differenzierung von MSCs (Juuri et al. 2022) und induziert die Freisetzung proangiogener Faktoren wie Ang1, Ang2 und VEGF von mesenchymalen Zellen (Jeng et al. 2020). Zudem ist der Hh-Signalweg auch an der Immunmodulation von MSCs beteiligt (Sheng et al. 2021). Aufgrund dieser vielfältigen Funktionen wird vermutet, dass der Hh-Signalweg eine wesentliche Rolle in der Funktion der hCV-MSCs während der frühen Plazentation spielt und über den Verlauf der Schwangerschaft dynamisch reguliert wird.

Über den Verlauf der Schwangerschaft nimmt die Länge des primären Ziliums in den untersuchten hCV-MSCs ab, was möglicherweise mit einer veränderten Aktivierung des Hh-Signalwegs einhergeht. Ähnliche zeitliche und räumliche Regulierungen der Signalübertragung wurden unter anderem während der Neuralrohrentwicklung und der

frühen Augenmorphogenese beschrieben (Ho und Stearns 2021). Da die Plazenta ein Organ ist, das sich durch schnelle Differenzierung sowie Alterung bzw. Kurzlebigkeit auszeichnet, ist es denkbar, dass diese Veränderungen in der Zilienstruktur und -funktion mit der spezifischen Rolle der Plazenta in den verschiedenen Phasen der Schwangerschaft zusammenhängen.

4.2 Einfluss der hCV-MSCs auf die Plazentaentwicklung

Eine der wesentlichen Eigenschaften von MSCs ist es, chemotaktischen Signalen wie Interleukinen (IL-7, IL-12, and IL-3), Stammzell-Faktor (SCF) und Chemokinen wie SDF1 (*engl.* stromal cell-derived factor-1) und IL-8 zu folgen und so an ihre physiologische Nische oder ihren Wirkort zu gelangen (Santhosh K. Ghadge et al. 2011; Bajdak-Rusinek et al. 2023). Dafür spielen sowohl die Fähigkeit zur Verarbeitung externer Reize als auch die Motilität der Zellen eine entscheidende Rolle. Die hCV-MSCs aus dem 1. Trimester weisen eine signifikant höhere ungerichtete Motilität auf, was mit ihrer stärkeren Signalverarbeitung im Hh-Signalweg in Zusammenhang gebracht werden kann. Der Einfluss des Hh-Signalwegs auf die Migration ist intensiv am Modell von *Drosophila* erforscht, wobei verschiedene Effektoren und Mechanismen beschrieben wurden. Bei der Migration im Zuge der Entwicklung des Trachealsystems wird die Expression des Hauptchemokin Branchless, einem FGF (*engl.* fibroblast growth factor)-Homolog, über den Hh-Signalweg moduliert. Wobei Stripe (Sr), ein Homolog zu Early Growth Response (EGR), den Transkriptionsfaktor darstellt (Araújo 2015). Bei der Keimzellmigration erhöht Smo die Konzentration von Tre1 an der Zellmembran, welches die polarisierte Akkumulation von F-Aktin, PI(4,5)P2 und dPIP5K induziert und dadurch die Zytoskelett Dynamik reguliert (Kim et al. 2021).

Da der Hh-Signalweg stark konserviert ist, kann auch beim Menschen eine Beteiligung an der Migration vermutet werden. Im Mausmodell wurde der Einfluss des Hh-Signalwegs auf die Migration von MSCs zu inflammatorischem Gewebe nachgewiesen (Donnelly et al. 2013). Bei humanen fibroblastenähnlichen Synovialzellen reguliert der Hh-Signalweg die Migration über den MAPK/ERK-Signalweg (Liu et al. 2018). Darüber hinaus konnte bei Mantelzell-Lymphomzellen durch die Hemmung mittels Smo-Antagonist eine Inhibition der Migration bewirkt werden (Zhang et al. 2016). Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass der Hh-Signalweg auch beim Menschen an der Migration beteiligt ist. Welche spezifischen Effektoren dabei in den hCV-MSCs der Plazenta eine Rolle spielen, muss jedoch noch weiter untersucht werden.

Ein weiterer entscheidender Aspekt für das Migrationsverhalten von MSCs ist die Bildung von Zellfortsätzen, die auf der Dynamik des Zytoskeletts basieren. Bei MSCs aus dem Knochenmark wird die Aktivierung von Fokalen-Adhäsions Kinasen und Veränderungen im Zytoskelett über PI3K/Akt-, MAPK- und JAK/STAT-Signalweg (*engl.* phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B, mitogen-activated protein kinase, Janus kinase/ signal transducer and activator of transcription proteins) reguliert (Popielarczyk et al. 2019). In dem Homing-Assay, bei dem die Ausbildung von Zellfortsätzen der hCV-MSCs in Richtung der EVTs untersucht wurde, waren die 1. Trim-hCV-MSCs signifikant überlegen.

Obwohl die Mechanismen der Chemoattraktion bei MSCs noch nicht so weit erforscht sind wie bei hämatopoetischen Stammzellen, werden ähnliche Signalwege vermutet. Bekannte chemotaktische MSC-Signale umfassen hierbei PDGF α (*engl.* platelet-derived growth factor), IGF-1 (*engl.* Insulin like growth factor 1), SDF-1 (*engl.* stromal-derived factor-1) und TGF- β (Liesveld et al. 2020). Da diese Signalwege auch über Rezeptoren am primären Zilium reguliert werden (Liesveld et al. 2020; Mill et al. 2023), könnte die überlegene Länge der primären Zilien bei 1. Trim-hCV-MSCs zur besseren Homing-Kapazität beitragen. Diese Fähigkeit ist besonders in der frühen Organogenese von Bedeutung, bei der sich die MSCs in funktionellen Nischen organisieren (Castrechini et al. 2010).

Zudem konnte der unterstützende Effekt der hCV-MSCs auf die Entwicklung der Trophoblastorganoide bestätigt werden. Hierbei überwog der positive Effekt der 1. Trim-hCV-MSC, woraus zu schließen ist, dass sich über den Verlauf der Schwangerschaft ihr Wirksektum ändert.

4.2.1 Verbesserung der EVT- und HUVEC-Eigenschaften durch hCV-MSCs

Die Untersuchung der Zell-Zell-Interaktionen zeigte, dass hCV-MSCs einen unterstützenden Einfluss auf EVT-Zellen bei wichtigen Prozessen der Plazentation haben. Zu diesen Prozessen zählen unter anderem die Migration, die Expression und Aktivität der MMP-2 und MMP-9 sowie die Angiogenese. Der positive Einfluss der hCV-MSCs auf die Angiogenese wurde durch Experimente mit HUVEC-Zellen weiter bestätigt.

Ein wesentlicher Faktor für die Funktionalität der EVTs ist ihre Invasionsfähigkeit. Die in-vitro-Experimente zeigten, dass hCV-MSCs einen signifikanten positiven Einfluss auf die Invasion von EVTs haben. Eine ausreichend tiefe Migration der EVTs in die Dezidua

ist für die physiologische Plazentation unerlässlich. Die Migration wurde hierfür in einem wound-healing-Assay untersucht, dabei zeigten die hCV-MSCs aus dem 1. Trimester den größten Effekt auf die EVT's. Auch auf die ungerichtete Motilität, die ein weiteres bestimmendes Merkmal invasiver Zellen darstellt, hatte der Überstand von hCV-MSCs einen positiven Einfluss. Diese unterstützenden Eigenschaften können mit der Sekretion von verschiedenen Zytokinen durch die MSCs erklärt werden. Auf humane Endothelzellen sowie auf malignen Brustkrebszellen wurden bereits motilitätsfördernde Effekte von MSCs nachgewiesen, die über die Sekretion verschiedener Zytokine wie IL-6, IL-8, Monozyten-Chemoattraktor-Protein 1 (MCP1) und TGF- β vermittelt werden (Yew et al. 2011; McAndrews et al. 2015; Jin et al. 2020). Einige der entsprechenden Rezeptoren wurden bereits auf EVT-Zellen nachgewiesen (Fujiwara et al. 2005; Li et al. 2021). Über welche parakrinen Wege dieser Einfluss auf primäre Trophoblasten vermittelt wird und welche Kombinationseffekte wirken, bedarf weiterer Forschung.

Dem schließt sich die Beobachtung an, dass auch die Expression der EZM zersetzenden Proteinasen MMP-2 und MMP-9 sowie ihre Aktivität durch den Überstand von hCV-MSCs verbessert wurde. Diese Proteinasen sind auch an der Migration durch Gewebe beteiligt. Interessanterweise hatten die hCV-MSCs aus der reifen Plazenta einen stärkeren Einfluss auf die Genexpression dieser Proteinasen als die hCV-MSCs des ersten Trimesters. Diese erhöhte Genexpression korrelierte mit einer gesteigerten Aktivität der Proteinasen in dem Gelatine-Zymographie-Assay. Für einige Wachstumsfaktoren der TGF- β Familie, unter anderem für das in der Plazenta produzierte GDF-8 (*engl.* growth differentiation factor 8) ist bereits die MMP-2 Hochregulierung in EVT's nachgewiesen worden (You et al. 2021; Wu et al. 2022; Chen et al. 2023).

Die Analyse der angiogenen Wirkung von hCV-MSCs erfolgte mittels tube-formation-Assay. Zuerst wurde ein positiver Effekt der 1. Trim-hCV-MSCs auf EVT-Zellen beobachtet. Da diese nicht primär an der Angiogenese beteiligt sind, sondern erst nach Phänokopie teilweise Endothelzellen in Arterien und Venen des Myometriums ersetzen (Varberg et al. 2023), wurden zur weiteren Evaluierung HUVEC-Zellen als Modell für primäre Endothelzellen verwendet. Dabei zeigten wieder nur die hCV-MSCs aus dem ersten Trimester deutliche angiogene Effekte. Dies ist in Zusammenhang zu bringen mit der Analyse der angiogenen Wachstumsfaktoren, bei der PlGF ausschließlich im Überstand von 1. Trim-hCV-MSCs mittels ELISA nachgewiesen wurde und ihre *PLGF*-Genexpression deutlich erhöht war. Die *VEGFA*-Expression war bei den hCV-MSCs aus

der reifen Plazenta am höchsten und auch im Überstand dieser Gruppe war die nachgewiesene VEGF-A-Konzentration am höchsten. Aus diesen Beobachtungen kann die Hypothese abgeleitet werden, dass die primäre Angiogenese eher PlGF abhängig verläuft, während VEGF bei der Gewebemöostase und -erhaltung die führende Rolle einnimmt. Weitere von MSCs sekretierte Wachstumsfaktoren, die die Angiogenese unterstützen, jedoch in dieser Arbeit nicht untersucht wurden, sind Angiogenin, bFGF und HGF (*engl.* hepatocyte growth factor) (Mathew et al. 2020). In welchem Maß diese auch von hCV-MSCs exprimiert werden und in welchem Umfang sie an der Plazentation beteiligt sind, bedarf weiterer Forschung.

In Übereinstimmung mit einer stärkeren Zilienausprägung und einem aktiveren Hh-Signalweg der 1. Trim-hCV-MSCs war ihre Wirkung auf EVT- und HUVEC-Zellen denen der Termin-hCV-MSCs bei der Unterstützung von Invasionsprozessen und Angiogenese überlegen. In MSCs aus der Nabelschnur wurde bereits ein Zusammenhang zwischen Hh-Signalwirkung und ihrem angiogenen Potential nachgewiesen (Zavala et al. 2017).

Bei der Vermessung der HTR-Zilien ist eine Reduktion bei der Kultivierung in anteilig 50 % MSC-Medium aufgefallen. Diese war nicht signifikant und zeigte sich bei Kultivierung mit und ohne Nährstoffentzug. Der Überstand der hCV-MSCs verbessert in allen Gruppen die Zilienlänge bezogen auf 50 % MSC-Medium signifikant. Ohne Nährstoffentzug kompensiert der Überstand aller Gruppen, den negativen Trend durch die veränderte Mediumzusammensetzung und verlängert auch die Zilien bezogen auf reines HTR-Medium. Unter Nährstoffentzug kompensiert nur der Überstand aus dem 1. Trimester den negativen Trend.

Aus den gesammelten Beobachtungen der Eigenschaften der 1. Trim-hCV-MSCs und ihrer Interaktion mit EVT- und HUVEC-Zellen lässt sich folgern, dass sie einen wesentlichen Einfluss auf die frühe Plazentaentwicklung haben. Über den Verlauf der Schwangerschaft verändern sich die Eigenschaften der hCV-MSCs. Die geringeren Zell-Zell-Effekte der Termin-hCV-MSCs deuten auf ein anderes Funktionsspektrum gegen Ende der Schwangerschaft hin.

Die verminderte Differenzierungskapazität der hCV-MSCs zum Ende der Schwangerschaft geht einher mit Ergebnissen von MSCs aus anderen Kompartimenten der Plazenta, wie z.B. aus der Nabelschnur (Iwatani et al. 2017) und der Dezidua basalis

(Khanabdali et al. 2021). Zudem unterscheidet sich, wie in dieser Arbeit gezeigt, das Transkriptionsprofil und das Sekretom von VEGF-A und PlGF über den Verlauf der Schwangerschaft. Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede der Eigenschaften könnte die molekularzelluläre Alterung der Plazenta hin zum Terim darstellen (Maiti et al. 2017). Mit fortschreitendem Gestationsalter wurde eine Zunahme von biomolekularen Markern der Alterung wie p21, p16 und cGAMP in gesunden Plazenten nachgewiesen. Der Alterungsprozess wurde in der gleichen Studie primär dem Synzytiotrophoblast zugeschrieben (Cindrova-Davies et al. 2018). Allerdings konnte auch bei MSCs der Dezidua basalis molekularbiologisch eine Seneszenz über eine miRNA aus dem Chromosom 19 MikroRNA-Cluster, das vornehmlich in der humanen Plazenta exprimiert wird, festgestellt werden (Khanabdali et al. 2021). Auch bei Schwangerschaftskomplikationen wie Präeklampsie, intrauteriner Wachstumsretardierung und Schwangerschaftshypertonus wurde eine Herunterregulierung von miRNA des C19MC nachgewiesen (Hromadnikova et al. 2015).

Dem primären Zilium, als einem Ort mit hoher Dichte an Rezeptoren und lokalisierten Signalwegen, kommt wahrscheinlich durch Modulierung und Interaktion zwischen Signalwegen eine wichtige Bedeutung bei der Beeinflussung der Zell-Zell-Kommunikation und der Zusammensetzung des Sekretoms zu. Auf welche Stimuli hin sich das Sekretom der hCV-MSCs über die Schwangerschaft hinweg ändert, bedarf weiterer Forschung.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der hCV-MSCs auf reife EVT-Zellen untersucht. Darüber hinaus ist die Untersuchung ihrer Einflussnahme auf die Differenzierung von Trophoblaststammzellen zu invasiven Trophoblasten interessant. Auch die Untersuchung des primären Ziliums könnte weitere Erkenntnisse liefern, da der Hh-Signalweg in humanen primären Trophoblastzellen an der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) beteiligt ist (Tang et al. 2015). Ein für die EMT charakterisierter Transkriptionsfaktor FOXC2 konnte in Trophoblastzellen mit dem Hh-Signalweg in Verbindung gebracht werden (Zhang und Zhang 2018). Für die Invasionsregulation durch EG-VEGF (*engl.* endocrine gland derived VEGF) in humanen Trophoblastenzelllinien wurde der am Zilium ko-lokalisierte PROKR2-Rezeptor identifiziert (Tani et al. 2021).

4.3 PE-hCV-MSCs besitzen defekte primäre Zilien und sind funktionell beeinträchtigt

Die Untersuchung des Zellzyklus zeigt eine vergleichbare Proliferationsrate und einen ähnlichen Mitose-Index zwischen Termin-hCV-MSCs und PE-hCV-MSCs. Dies lässt darauf schließen, dass die verkürzten Zilien der PE-hCV-MSCs nicht durch eine beschleunigte Zellzyklus-Progression verursacht werden.

Die eingeschränkte Zilienausbildung der PE-hCV-MSCs, die sich in dem Anteil der zilientragenden Zellen und der Länge widerspiegelt, geht mit einer verminderten Signalübertragung einher. Zum einen wird nach Stimulation weniger Smo an die Zilienmembran transportiert, zum anderen ist die Expression der Signalproteine *PTCH1*, *SMO* und *GLI* vermindert, was die funktionelle Einschränkung der PE-hCV-MSCs Zilien aufzeigt.

Die verminderte Differenzierungskapazität der PE-hCV-MSCs kann unter anderem durch die gestörte Verarbeitung am Hh-Signalweg erklärt werden, der zusammen mit weiteren zilienassoziierten Signalwegen wie Notch, Wnt/ β -Catenin und TGF- β /BMP maßgeblich an der Differenzierung von MSCs beteiligt ist (Anvarian et al. 2019; Thomas und Jaganathan 2022). Bei der frühen Festlegung der osteogenen Entwicklungslinie und der Osteogeneseregulation induziert Runx2 weitere Hedgehog- und Wnt-Signalmoleküle, die eine wesentliche Rolle bei der weiteren Reifung spielen. Die Transkription von Runx erfolgt unter anderem über Gli2. Des Weiteren wird die BMP-2 (*engl.* bone morphogenetic protein-2)-Expression von Gli2 moduliert, einem zur TGF- β -Familie gehörender Wachstumsfaktor. Die BMP-Proteine induzieren wiederum die Expression von osteogenen Transkriptionsfaktoren wie Runx2, Sox9, Osteopontin und Klf-4 (Yu et al. 2021; Thomas und Jaganathan 2022). Klf4, ein downstream Transkriptionsfaktor von BMP2, wirkt zusammen mit Runx2 als Kofaktor in der Osteoblastendifferenzierung (Yu et al. 2021). Allerdings wurde auch eine Herunterregulierung von KLF-4 nach osteogener Induktion muriner BM-MSCs beschrieben (Kim et al. 2014). Diese Beobachtung deckt sich nicht mit den hier in hCV-MSCs gemessenen Daten.

Auch bei der chondrogenen Differenzierung moduliert der Hh-Signalweg über die Expression von Sox9 mehrere Schlüsselgene wie *COL2AL* (Kollagen II), *ACAN* (Aggrecan), wodurch eine robuste Chondrogenese über BMP-Signale induziert wird (Chen et al. 2021; Yang et al. 2022b).

Die Regulation der adipogenen Differenzierung ist ebenfalls an das primäre Zilium gekoppelt. Durch molekulare Stimulation des primären Ziliums mit SAG konnte die Adipogenese von MSCs aus menschlichem Nabelschnurblut gesteigert werden. Die Abhängigkeit von der Zilienfunktionalität zeigt sich bei Beeinträchtigung der Zilienausbildung durch Knockdown von IFT-88, wodurch die PPAR γ -Expression abnimmt (Bae et al. 2020; Hilgendorf 2021).

Die Fähigkeit der Differenzierung stellt eine wesentliche Funktion von MSCs dar. Aus plazentaren MSCs gehen nicht nur die Endothelzellen der frühen Plazenta hervor, sie sind auch die Vorläuferzellen der vaskulären glatten Muskelzellen (Zhang et al. 2022). Die eingeschränkte Differenzierungskapazität der PE-hCV-MSCs trägt möglicherweise zur Entwicklung von PE bei oder erhält diese Schwangerschaftserkrankung aufrecht.

Motilität und Homing sind wesentliche Eigenschaften, die eine physiologische Funktion von MSCs sichern. Diese Fähigkeiten waren bei den PE-hCV-MSCs vermindert. Der Hh-Signalweg beeinflusst über den MAPK/ERK-Signalweg die Migration von fibroblastenähnlichen Synovialzellen (Liu et al. 2018). Über die Aktivierung von GTPasen der Rho-Familie durch SMO wird in Fibroblasten die Migration reguliert (Polizio et al. 2011). Daher ist anzunehmen, dass der geminderte Hh-Signalweg auch in den hCV-MSCs mitverantwortlich für die reduzierte Zellbewegung ist. Daraus ist abzuleiten, dass die PE-hCV-MSCs weniger kompetent sind Homing- und Reparaturprozesse zu unterstützen, wobei der eingeschränkte Hh-Signalweg ein möglicher Faktor dafür ist.

Die verminderte *VEGFA*- und *PIGF*-Expression lässt sich ebenfalls mit einem verminderten Hh-Signalweg in Verbindung bringen. In Fibroblasten, die aus MSCs hervorgehen, kann die Produktion von VEGF und anderen angiogenen Faktoren durch den Hh-Liganden induziert werden (Pola et al. 2001). Auch in mesenchymalen perivaskulären Zellen (Chen et al. 2011) und in murinen neuronalen Fibroblasten (Faniku et al. 2021) konnte eine erhöhte VEGF-A Expression durch Stimulation des Hh-Signalwegs nachgewiesen werden. Ein weiterer Erklärungsansatz könnte eine deregulierte miRNA-Expression sein. Eine negative Korrelation zwischen miRNA-16 und VEGF-A-Expression wurde in PE-assoziierten MSCs aus der Dezidua beschrieben (Wang et al. 2012). Inwieweit die Expression von miRNA in hCV-MSCs dereguliert ist

und welche zirkulierenden miRNA die Expression pro-angiogener Faktoren verringern, bedarf weiterer Forschung.

Die erhöhten Werte von proinflammatorischen Zytokinen (z.B. IL-6 und TNF- α) und miRNA, die im Gewebe und Serum von PE-Patientinnen vorhanden sind (Aggarwal et al. 2019), könnten eine mögliche Erklärung für die gestörte Zilienbildung in präeklampsischen hCV-MSCs bieten (Ritter et al. 2020). Durch die erhöhte Expression von Genen, die den Abbau von Zilien fördern, wie *KIF2A*, *PLK1* und *AURKA*, kann die negative Wirkung auf die Ziliogenese von MSCs induziert werden (Doornbos und Roepman 2021). Die Hochregulierung dieser Gene wurde bereits in Trophoblasten aus PE-Patientinnen nachgewiesen. In MSCs aus Fettgewebe konnte die Aurora Kinase A als Zielgen von IL-6 identifiziert werden (Ritter et al. 2018). Zudem schränken die PE-assoziierten mikro-RNA-141 und -200a aus der miRNA-200 Familie die Ziliogenese in EVT-Zelllinien ein (Wang et al. 2019). Inwieweit diese oder andere PE-assoziierte miRNA auch einen negativen Effekt auf die Ziliogenese von MSCs haben, gilt es herauszufinden.

Risikofaktoren für Präeklampsie umfassen unter anderem Systemerkrankungen wie Adipositas, Diabetes mellitus und Autoimmunerkrankungen wie Antiphospholipid-Syndrom und systemischer Lupus erythematodes, bei denen erhöhte Werte von proinflammatorischen Zytokinen im Serum bekannt sind (Kawai et al. 2020; Liu et al. 2021; Xourgia und Tektonidou 2022). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Zilien der hCV-MSCs schon vor Manifestation der Präeklampsie durch zirkulierende proinflammatorische Zytokine eingeschränkt sind. Ein solcher zilienverkürzender Einfluss konnte für TNF- α und IL-6, die bei adipösen Menschen in erhöhter Konzentration gemessen wurden, auf ASC in-vitro nachgewiesen werden. Zudem waren die primären Zilien von ASCs adipöser Menschen verkürzt (Ritter et al. 2018).

4.4 PE-hCV-MSCs besitzen einen negativen Einfluss auf die Ziliogenese von HTRs und führen wahrscheinlich zur Aufrechterhaltung und weiteren Progression der PE

Die Motilität der HTR-Zellen wurde durch den Überstand der PE-hCV-MSCs vermindert, was kohärent mit dem negativen Einfluss auf die HTR-Ziliogenese war. Zudem führte der Überstand von PE-hCV-MSCs bei den HTR-Zellen zu einer signifikanten Herunterregulierung der Expression und Aktivität von MMP-2 und MMP-9. Beide Eigenschaften sind an der Gewebeinvasion von EVTs beteiligt. Diese

Beobachtungen stützen die Annahme, dass das primäre Zilium für die Invasionsfähigkeit von EVT's unerlässlich ist. Der Zusammenhang zwischen eingeschränkter Ziliogenese durch Präeklampsie und Hemmung der Invasion von HTR-Zellen ist bereits beschrieben. Dabei wurden PE-assoziierte miRNAs als ursächlich für die eingeschränkte Ziliogenese identifiziert. In der untersuchten EVT-Zelllinie führte die Überexpression von miRNA-141 und miRNA-200a zu einer Herunterregulierung von *VEGF* und über den nachgeschalteten ERK-Signalweg zu einer verminderten MMP-9 Expression (Wang et al. 2019). Auch die MMP-2-Expression wurde im Plazentagewebe von präeklampsischen Patientinnen im Vergleich zu gesunden Plazenten als reduziert gemessen (Jin et al. 2017; Chen et al. 2023). Eine erhöhte miRNA-20b-Konzentration, wie sie bei Präeklampsie nachgewiesen wurde, reduziert ebenfalls die MMP-2-Expression in Trophoblasten (Jin et al. 2017). E-Cadherin, ein essenzielles Charakteristikum der EMT, wird durch den Hh-Signalweg reguliert, was einen weiteren Zusammenhang zwischen Zilium und der Invasionsfähigkeit der EVT darstellt (Huang et al. 2022). Welche Zytokine oder miRNA der PE-hCV-MSCs die Ziliogenese der EVT einschränken, gilt es noch herauszufinden.

In den funktionellen Assays zur Analyse der Zell-Zell-Interaktion mit HUVECs wurde eine reduzierte Unterstützung der Angiogenese sowie eine verminderte Genexpression von VEGF-A und PlGF sowie eine geringere Konzentration dieser Faktoren im Überstand von PE-hCV-MSCs gemessen. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass durch Unterbrechung des Shh-Signals die Vaskularisierung und Entwicklung der Plazenta gestört wird (Pan et al. 2015). Dabei ist die Übertragbarkeit von Plazentationsstudien an Tiermodellen auf den Menschen aufgrund der unterschiedlichen Plazentastruktur limitiert und kann nur als richtungsweisend für weitere Untersuchungen verstanden werden (Sakowicz et al. 2022). Die angiogenen Effekte des Hh-Signalwegs auf Endothelzellen und somit auf die Angiogenese werden vornehmlich auf indirekte Weise vermittelt. Dabei werden Fibrozyten und andere mesenchymale Zellen durch Hh-Liganden zur Produktion proangiogener Faktoren stimuliert (Giarretta et al. 2019; Huang et al. 2021). Daraus ist abzuleiten, dass die hier nachgewiesene verminderte Sekretion von VEGF-A und PlGF die Angiogenese der HUVECs limitieren.

Aufgrund der negativen Beeinflussung der PE-hCV-MSCs auf die HTR-Ziliogenese kann vermutet werden, dass sie auch andere Trophoblastenpopulationen bei ihrer Ziliogenese beeinflussen. Der dann beeinträchtigte Hh-Signalweg ist in Trophoblasten unter anderem

an der Fusion des Synzytiums über die Regulation der 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 Expression beteiligt (Zhu et al. 2016).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass PE-assoziierte Faktoren die primären Zilien der hCV-MSCs verkürzen, was unter anderem zu einem gestörten Hh-Signalweg führt. Außerdem weisen sie eine langsame Migration, eine eingeschränkte Differenzierung und unzureichende unterstützende Eigenschaften auf Zellen ihres direkten Umfelds auf. Die gesammelten Daten deuten darauf hin, dass die beschädigten primären Zilien als Sensoren, Übermittler und Modulatoren von Umgebungssignalen eingeschränkt sind, wodurch die Funktionalität der hCV-MSCs reduziert wird, was zur weiteren Progression von PE beitragen könnte. Es sind weitere Analysen der Signalkaskaden an den durch PE-Faktoren beschädigten Zilien von hCV-MSCs und EVT's erforderlich, um den umfassenden Einfluss defekter Zilien auf die Entstehung und Aufrechterhaltung der PE-Pathologie zu ermitteln, woraus potentielle Therapieansätze abgeleitet werden könnten.

Die untersuchten Eigenschaften sind besonders in der ersten Phase der Plazentaentwicklung entscheidend für eine physiologische Organogenese. Dies lässt vermuten, dass die hCV-MSCs mit an der Pathogenese der frühen PE beteiligt sind und nicht nur an der Unterhaltung und Progression der späten PE. Die VEGF-vermittelte Trophoblasteninvasion in der frühen Schwangerschaft wird auch über PROKR1 und die Struktur der primären Zilien vermittelt (Wang et al. 2017). Ob hCV-MSCs der frühen PE die primären Zilien der Trophoblasten beeinträchtigen, muss durch weitere Versuche mit primären Zellen aus Plazenten von Frauen mit früher Präeklampsie untersucht werden.

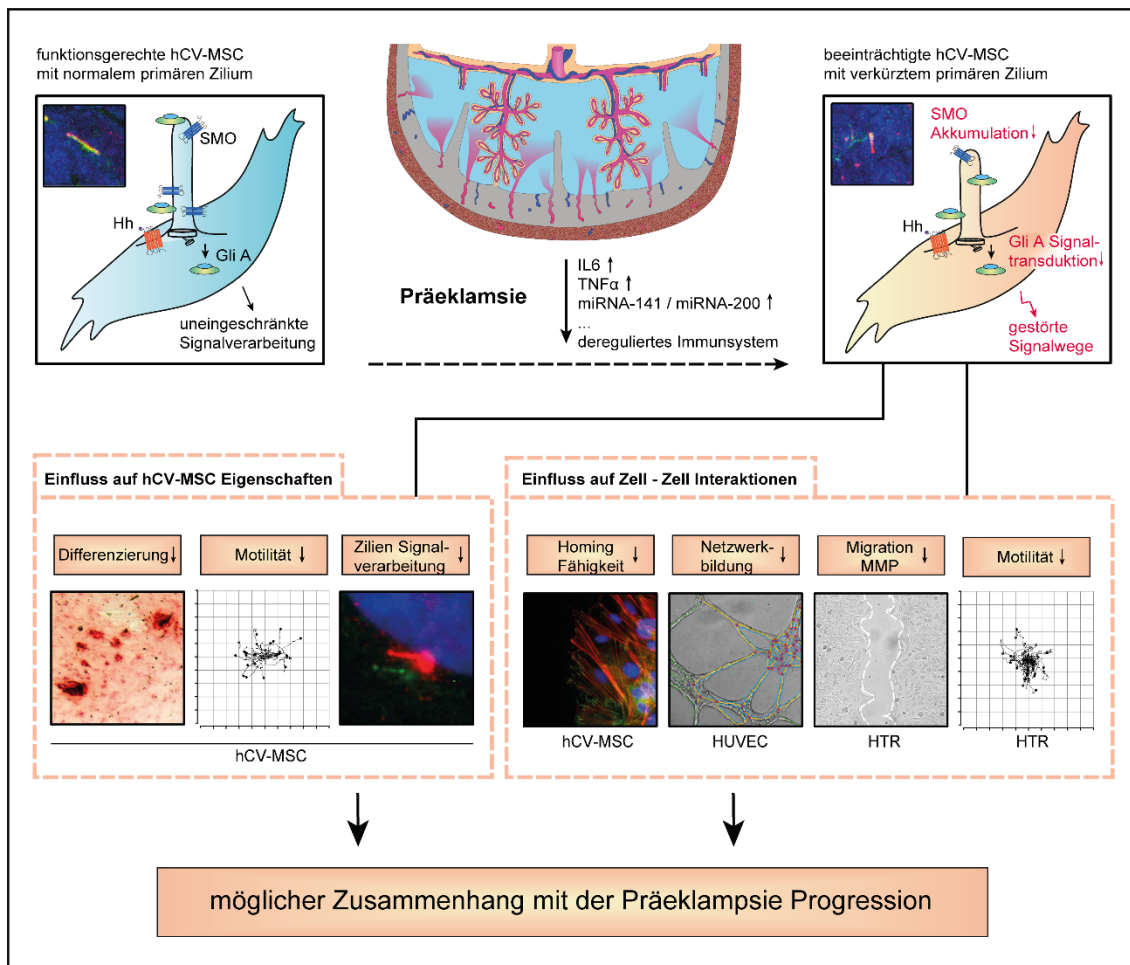


Abbildung 19: Möglicher Zusammenhang von defekten primären Zilien der hCV-MSCs mit PE-Progression

4.5 (Zellkultur-) Modelle zur Plazentaerforschung und ihre Limitationen

Die Nutzung von immortalisierten Trophoblastenzelllinien als Plazentamodell, wie auch in dieser Arbeit, ist seit Jahrzehnten etabliert und weit verbreitet. Jedoch muss bei der Verwendung von HTR-8/SVneo-Zellen beachtet werden, dass sie andere HLA-Proteine exprimieren als primären Trophoblasten. Sie besitzen HLA-A und HLA-B welche bei EVT's fehlen, jedoch keine HLA-G. Dadurch besteht eine Limitation bei der Verwendung als Modellsysteme für immunologische Interaktionen zwischen fetalem Trophoblasten und mütterlichen Leukozyten (Apps et al. 2009; Abbas et al. 2020). Zudem wurde bei der Untersuchung der HTR-8/SVneo Zelllinie auf epitheliale und mesenchymale Marker gezeigt, dass sie eine heterogene Population an Zytokeratin-7 positiven Trophoblasten und vimentinpositiven mesenchymalen Zellen enthält (Abou-Kheir et al. 2017). Andere gängig eingesetzte Trophoblastenzelllinien wie BeWo, JEG-3 and JAR weisen eigene Limitationen wie hohe Malignitätscharakteristika, abweichende Chromosomenanzahl

und ein wesentlich unterschiedliches Transkriptionsprofil auf (Abbas et al. 2020). Daher ist die Forschung an der Isolierung und langlebigen Kultivierung von primären Trophoblasten wegweisend, um differenzierter die molekularen Mechanismen der Plazentaentwicklung und ihrer Pathologien zu entschlüsseln. Die Gewinnung und Kultivierung primärer Trophoblasten in einem 2-dimensionalen Modell ist seit einigen Jahren etabliert (Okae et al. 2018) und wird für weitere Charakterisierung sowie die Untersuchung immunologischer Prozesse verwendet (Eikmans et al. 2022). Dabei konnten die Trophoblaststammzellen zur Differenzierung in EVT_s und zum STB angeregt werden.

Das etablierte Wound-Healing- oder Scratch-Assay, bei dem die flächige Schließung eines Spalts in Monolage ausgewertet wird, ist aufgrund der einfachen Handhabung und des ökonomischen Aspekts weit verbreitet. Es gibt Aufschluss über die Migrationsfähigkeit, da jedoch keine extrazelluläre Matrix zersetzt wird, besitzt es eine limitierte Aussage über die Invasionsfähigkeit (Abbas et al. 2020).

Wegen der offensichtlichen ethischen Einschränkungen klinischer Studien am Menschen, sind Experimente an Tiermodellen elementarer Bestandteil der Präeklampsieforschung. Auch diese Arbeit nimmt Bezug auf Daten, die aus Tiermodellen abgeleitet sind. Hierbei müssen die Unterschiede der Dezidualisierung/ Plazentation und die Unterschiede des strukturellen Aufbaus beachtet und in die Planung des Studiendesigns miteinbezogen werden. Dadurch besteht meist eine Beschränkung auf einzelne Aspekte der humanen Gestation. Zum Beispiel zeigen Ratten, Hamster und Meerschweinchen einen Umbau der Spiralarterien durch interstitiale und endovaskuläre Trophoblasten. Auch bei Nagetieren wird die Trophoblasteninvasion mit einer epithelial-mesenchymalen Transition vorbereitet. Der Unterschied liegt im Zeitpunkt der späteren Invasion und der niedrigen Tiefe der Invasion bei Mäusen (Ain et al. 2003). Auch der Einstrom des mütterlichen Bluts in die Lacunae findet bei Nagetieren erst während der Mitte der Gestation statt, weshalb Untersuchungen an Hypoxie der Plazenta in Tiermodellen erst während dieser Zeit sinnvoll sind. Klinisch präsentieren sich die Nagetiere ähnlich. Auch der strukturelle Aufbau der Plazenta unterscheidet sich in Nagetieren. Die materno-foetale Austauschfläche bei Mäusen und Ratten ist haemotrichordial und die Oberfläche des Chorions ist als Labyrinth angeordnet, im Gegensatz dazu besteht bei Menschen eine haemomonochordiale Struktur mit Villi (Sakowicz et al. 2022). Daher ist die Verwendung von Tiermodellen auf die Untersuchung einzelner Aspekte der

menschlichen Schwangerschaft beschränkt. Durch die ähnliche klinische Präsentation der Nagetiere mit Hypertension, Proteinurie und verminderter Flussgeschwindigkeit in der A. uterina werden die unterschiedlichen pathogenen Faktoren näher untersucht. Die Induktion der Erkrankung erfolgt durch placentare Ischämie, Dysbalance angiogener Faktoren, Dysbalance im Renin-Angiotensin System (RAS) oder Immunaktivierung durch Zytokine (Bakrania et al. 2022).

5 Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass den hCV-MSCs durch die Unterstützung der EVT's eine wichtige Rolle bei der Plazentaentwicklung zukommt. In dieser Arbeit zeigten PE-hCV-MSCs einen negativen Einfluss auf die Ziliogenese von HTR-Zellen und könnten somit zur Aufrechterhaltung und weiteren Progression der PE beitragen.

Obwohl laborchemische Screeningmarker etabliert sind, bleiben die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen unklar und bedürfen weiterer Erforschung für potenzielle Therapieansätze. Ein direkter Zusammenhang zwischen PE-Progression und defekten Zilien konnte nicht abschließend belegt werden. Darüber hinaus umfassen die Einschränkungen der Studie die geringe Probenzahl, den Einsatz der HTR-Zelllinie und das Fehlen eines Kausalnachweises.

Künftig sollten die molekularen Mechanismen, durch die PE die Zilienbildung und Funktion der hCV-MSCs beeinflusst, intensiver untersucht werden, ebenso wie deren Interaktion mit Zellpopulationen der PE-Plazenta.

5.1 Weiterentwicklung gängiger Zellkulturmodelle und Versuchsprotokolle

Konventionelle 2D-Modelle und Tiermodelle sind bisher zentrale Quellen unseres Wissens zur Organogenese, Pathogenese und Interaktion der Gewebe mit Krankheitserregern und Medikamenten sowie Zell-basierter-Therapien. Die Weiterentwicklung von Zellkulturmodellen durch langlebige Organoidmodelle bietet dafür neue Möglichkeiten. Seit 2018 wurden Trophoblastorganoide etabliert, die bessere Analysen der EVT-Differenzierung und Zell-Interaktionen ermöglichen (Turco et al. 2018; Haider et al. 2018; Sheridan et al. 2020). Auch die Interaktion des angeborenen Immunsystems an der materno-fetalen Schnittstelle (Yang et al. 2022a) sowie die Übertragung von Medikamenten und Krankheitserreger gewinnt neue Möglichkeiten der Analyse. Neuere Techniken verbinden Organoide mit "Organen auf Chips" und modellieren durch Mikroumgebungsparameter eine artifizielle Organphysiologie (Wang et al. 2024; Deng et al. 2022).

Die in den anfänglichen Modellen inverse Anordnung von Trophoblasten und Synzytium wurde zuletzt überwunden (Hori et al. 2024). Trotzdem zeigt das raffinierte Organoidmodell Limitationen: aufwändigere Kultivierung und fehlende Stroma-, Endothel- und Immunzellen. Plazenta-Villi-Organoide (PVO) enthalten diese Zelltypen

und zeigen funktionelle parakrine Eigenschaften, sind jedoch nicht langlebig (Huang et al. 2023).

5.2 MSCs für Zell basierte Therapien der Präeklampsie

Die in dieser Arbeit charakterisierten MSCs zeigten unterstützende Effekte (Motilität, Migration, Angiogenese), was therapeutisches Potenzial bietet. Während autologe MSC-Transplantation bei anderen Erkrankungen wie komplizierten Verläufen von M. Chron (Panés et al. 2016) und der Graft-versus-Host Erkrankung (Galipeau und Sensébé 2018) erprobt wurde, beschränkt sich die PE-Forschung auf Tiermodelle (Nuzzo et al. 2022; Fu et al. 2015). MSC-Exosomen besitzen im Gegensatz zu MSCs eine höhere biologische Stabilität und eine geringere Immunogenität (Shi et al. 2024) und könnten mehrere Aspekte der PE-Pathogenese regulieren, werden jedoch größtenteils vom mononukleär-phagozytären System verstoffwechselt bevor sie die Plazenta erreichen (Wan et al. 2020).

In dieser Arbeit wurde der fördernde Einfluss mesenchymaler Stammzellen auf extravillöse Trophoblasten und Endothelzellen nachgewiesen. MSCs mit reduzierter Zilienlänge zeigten eingeschränkte Signalverarbeitung und verminderte Unterstützung anderer Zellen. Inwieweit eine solche Einschränkung der Zilienfunktionalität reversibel ist und welche medikamentösen Ansätze etabliert werden können ist von großem Interesse und bedarf weiterer Forschung.

6 Zusammenfassung

Die Plazenta leistet die lebenswichtige Unterstützung für den Fötus während des intrauterinen Lebens und spielt auch für die Gesundheit der Mutter eine wegweisende Rolle. Durch die Entwicklung von Pathologien der Plazenta wird die Gesundheit von Mutter und/oder Ungeborenem gefährdet. Präeklampsie ist eine hypertensive Schwangerschaftserkrankung mit Endorganschäden, deren Entstehung von der Plazenta aus geht. Genaue Pathomechanismen sind nicht bekannt und eine kausale Therapie nicht etabliert.

Als neu entstehendes Organ mit schnellem Wachstum und Differenzierung besitzt die Plazenta eine große Population an Stammzellen, einschließlich villöser mesenchymaler Stroma-/Stammzellen. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass humane villöse MSCs mehrere Schlüsselrollen bei der Schaffung eines funktionalen Mikroumfelds spielen, das für eine erfolgreiche Schwangerschaft entscheidend ist. Wie diese Zellen reguliert werden, ist jedoch nicht gut erforscht. Diese Arbeit zeigt, dass humane Chorion Villi-MSCs (hCV-MSCs) primäre Zilien tragen und dass das primäre Zilium während der Gestation dynamisch reguliert wird. Die hier präsentierten Daten deuten darauf hin, dass das primäre Zilium für die Funktionalität wie Motilität, Homing und Differenzierung der hCV-MSCs durch ordnungsgemäße Signaltransduktion erforderlich ist. Ebenfalls wurde ein positiver Einfluss von hCV-MSCs auf die Eigenschaften von extravillösen Trophoblasten (EVTs) sowie Endothelzellen aus der V. umbilicalis beobachtet. Hierbei wurde bei den EVTs eine Änderung der Länge des primären Ziliums analysiert.

Die Zilien von hCV-MSCs aus präeklantischen Plazenten sind beeinträchtigt, diese hCV-MSCs sind in ihren eigenen Funktionen sowie in ihrer Interaktion mit trophoblastischen Zellen und Endothelzellen dysfunktional. Daher ist von einer Einschränkung ihrer Funktion in der Plazentaentwicklung und dem Organerhalt auszugehen. Somit könnten defekte Zilien mit der Pathogenese der Präeklampsie in Zusammenhang stehen und mit dem Fortschreiten der Präeklampsie verbunden sein.

Summary

The placenta provides vital support for the fetus during intrauterine life and also plays a pivotal role in maternal health. The development of placental pathologies poses risks to the health of the mother and/or the unborn child. Preeclampsia is a hypertensive pregnancy disorder associated with end-organ damage that originates from the placenta.

The exact pathomechanisms remain unknown, and no causal therapy has been established.

As a newly forming organ with rapid growth and complex differentiation, the placenta contains a large population of stem cells, including villous mesenchymal stromal/stem cells (MSCs). Recent findings show that human villous MSCs play several key roles in creating a functional microenvironment crucial for a successful pregnancy. However, how these cells are regulated are not well examined. This study demonstrates that human chorionic villous MSCs (hCV-MSCs) possess primary cilia and that the primary cilium is dynamically regulated during gestation. The data presented here suggest that the primary cilium is essential for functionalities, such as motility, homing, and differentiation of hCV-MSCs through various signal transduction pathways. A positive influence of hCV-MSCs on the properties of extravillous trophoblasts (EVTs) and endothelial cells from the umbilical vein was also observed. In this context, changes in the length of the primary cilium were analysed in EVT.

The cilia of hCV-MSCs derived from preeclamptic placentas are impaired. These hCV-MSCs are dysfunctional in their intrinsic functions and their interactions with trophoblastic cells and endothelial cells, suggesting a limitation in their role in placental development and organ maintenance. Defective cilia may therefore be associated with the pathogenesis of preeclampsia and linked to its progression.

7 Verzeichnis und Abkürzungen

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stadien der Plazentaentwicklung	3
Abbildung 2: Wege der invasiven Trophoblasten im ersten Trimester	8
Abbildung 3: Struktur des primären Ziliums	22
Abbildung 4: Übersicht des Hedgehog-Signalwegs.....	24
Abbildung 5: Charakterisierung und Morphologie von hCV-MSCs aus 1. Trimester-, Termin- und PE-Plazenten	53
Abbildung 6: Zilienlänge und Anteil der zilientragenden hCV-MSCs in Monolage und im Sphäroid.....	55
Abbildung 7: Eingeschränkter Hedgehog-Signalweg in PE-hCV-MSCs.....	58
Abbildung 8: Motilität von hCV-MSCs.....	59
Abbildung 9: Unterschiedliche Differenzierungskapazität der hCV-MSCs.....	62
Abbildung 10: Verminderte Homing-Kapazität von PE-hCV-MSCs gegenüber EVT's. 64	
Abbildung 11: PE-hCV-MSCs exprimieren weniger PlGF, VEGF-A	65
Abbildung 12: Verbesserte Zilienausbildung von HTRs unter hCV-MSC-Einfluss	67
Abbildung 13: Einfluss von hCV-MSCs auf die Motilität von EVT-Zellen	69
Abbildung 14: Einfluss von hCV-MSCs auf Migration von EVT-Zellen	71
Abbildung 15: MMP-2 und MMP-9-Expression und -Aktivität in EVT-Zelllinien.....	73
Abbildung 16: HTR-Zellzyklusgenexpression unter hCV-MSC-Einfluss	75
Abbildung 17: Einfluss der hCV-MSCs auf die Angiogenese	77
Abbildung 18: Einfluss der hCV-MSCs auf die Bildung plazentarer Organoide	80
Abbildung 19: Möglicher Zusammenhang von defekten primären Zilien der hCV-MSCs mit PE-Progression.....	92

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Daten der Schwangeren	27
Tabelle 2: Primäre Antikörper für Durchflusszytometrie	34
Tabelle 3: Primäre Antikörper für Immunfluoreszenz.....	34
Tabelle 4: Proben für Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion.....	35
Tabelle 5: Material für die in-vitro-Versuche	35
Tabelle 6: Mediumzusammensetzung für Zelllinien.....	37
Tabelle 7: Oberflächenmarker von hCV-MSCs.....	51
Tabelle 8: Zellzyklusverteilung von hCV-MSCs.....	52

7.3 Abkürzungen

A.	Arteria
ARDS	acute respiratory distress syndrome
Arl13b	ADP-ribosylation factor-like protein 13B
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMI	body mass index
C14MC	Chromosom 14 miRNA Cluster
ca.	circa
CD	cluster of differentiation
CM	Chorionmembran
con	Kontrollkondition
CTB	Zytotrophoblast
CV	Chorionzotten
D	Deutschland
Dhh	desert Hedgehog
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
EV	extrazellulär Vesikel
EVT	extravillöser Trophoblast
EZM	Extrazellulärmatrix
FCS	fetal calf serum
FGF	fibroblast growth factor
GDF-8	growth differentiation factor 8
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GTPase	Guanosintriphosphatase
hCG	humanes Choriongonadotropin
hCV-MSC	humane Chorion Villi-MSC
HDAC6	Histon-Deacetylase 6
HELLP	hemolysis, elevated liver enzyme levels, and low platelet levels
Hh	Hedgehog
HIF-1 α	hypoxia-inducible factor-1 α
HLA	humanes Leukozytenantigen
hPL	humanes Plazenta-Laktogen
hTSC ^{CT}	humane villöse Zytotrophoblaststammzellen
HUVEC	humanen Endothelzellen aus der V. umbilicalis
IFN- γ	Interferon- γ
IFT	intraflagellar Transport
IGF	Insulin-like growth factor 1
IGFBP-4	Insulin-like growth factor-binding protein 4
Ihh	indian Hedgehog
IL	Interleukin
IP-10	Interferon-induzierbares Protein-10
ISCT	Internationale Gesellschaft für Zell Therapie
IVR	Intervillarraum

Kif2A	kinesin family member 2A
LIF	leukemia inhibitory factor
MCP1	Monozyten-Chemoattraktor-Protein 1
MHC	Major-Histokompatibilitäts-Komplex
miRNA	Mikro-RNA
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MSC	Mesenchymale Stroma-/Stammzelle
mTOR	mammalian target of rapamycin
MW	Mittelwert
n	number (Anzahl)
n.s.	nicht signifikant
NEDD9	neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 9
NO	Stickstoffmonoxid
p.c.	post conceptionem
PAPP-A	pregnancy-associated plasma protein A
PDGF α	platelet-derived growth factor
PE	Präeklampsie
PE	Präeklampsie
PKA	Proteinkinase A
PIGF	placental growth factor
Ptch1	Patched-1
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems
RNA	ribonucleic acid
RQ	relative Quantifizierung der Genexpression
SAG	Smoothened-Agonist
SDF-1	stromal-derived factor-1
SEM	standard error of the mean
sEng	soluble endoglin
sFlt-1	soluble Fms-like tyrosine kinase-1
Shh	sonic Hedgehog
Smo	Smoothened
SSW	Schwangerschaftswoche
STB	Synzytiotrophoblast
SUFU	suppressor of Fused
Termin	Kontrollgruppe (termingerechte Entbindung, gesunde Patientin)
TGF- β	transforming growth factor- β
TNF- α	tumor necrosis factor- α
Trim	Trimenon
u.a.	unter anderem
uNK	uterine natürliche Killerzellen
UK	United Kingdom
USA	United States of America
VEGF	vascular endothelial growth factor
WNT	wingless and integration locus int-1
ZEB1	zinc-finger E-box-binding homeobox 1

8 Literaturverzeichnis

- Aardema, M. W.; Oosterhof, H.; Timmer, A.; van Rooy, I.; Aarnoudse, J. G. (2001): Uterine artery Doppler flow and uteroplacental vascular pathology in normal pregnancies and pregnancies complicated by pre-eclampsia and small for gestational age fetuses. In: *Placenta* 22 (5), S. 405–411. DOI: 10.1053/plac.2001.0676.
- Abalos, Edgardo; Cuesta, Cristina; Grosso, Ana L.; Chou, Doris; Say, Lale (2013): Global and regional estimates of preeclampsia and eclampsia: a systematic review. In: *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 170 (1), S. 1–7. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2013.05.005.
- Abbas, Yassen; Turco, Margherita Y.; Burton, Graham J.; Moffett, Ashley (2020): Investigation of human trophoblast invasion in vitro. In: *Human reproduction update* 26 (4), S. 501–513. DOI: 10.1093/humupd/dmaa017.
- Abdulrazzak, Hassan; Moschidou, Dafni; Jones, Gemma; Guillot, Pascale V. (2010): Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues. In: *Journal of the Royal Society Interface* 7 (Suppl 6), S689-706. DOI: 10.1098/rsif.2010.0347.focus.
- Abou-Kheir, Wassim; Barrak, Joanna; Hadadeh, Ola; Daoud, Georges (2017): HTR-8/SVneo cell line contains a mixed population of cells. In: *Placenta* 50, S. 1–7. DOI: 10.1016/j.placenta.2016.12.007.
- Aggarwal, Ruby; Jain, Arun Kumar; Mittal, Pratima; Kohli, Mangala; Jawanjal, Poonam; Rath, Gayatri (2019): Association of pro- and anti-inflammatory cytokines in preeclampsia. In: *Journal of clinical laboratory analysis* 33 (4), e22834. DOI: 10.1002/jcla.22834.
- Ain, Rupasri; Canham, Lindsey N.; Soares, Michael J. (2003): Gestation stage-dependent intrauterine trophoblast cell invasion in the rat and mouse: novel endocrine phenotype and regulation. In: *Developmental biology* 260 (1), S. 176–190. DOI: 10.1016/s0012-1606(03)00210-0.
- Amaral, Lorena M.; Cunningham, Mark W.; Cornelius, Denise C.; LaMarca, Babbette (2015): Preeclampsia: long-term consequences for vascular health. In: *Vascular health and risk management* 11, S. 403–415. DOI: 10.2147/VHRM.S64798.
- Aneman, Ingrid; Pienaar, Dillan; Suvakov, Sonja; Simic, Tatjana P.; Garovic, Vesna D.; McClements, Lana (2020): Mechanisms of Key Innate Immune Cells in Early- and Late-Onset Preeclampsia. In: *Frontiers in immunology* 11, S. 1864. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01864.
- Anvarian, Zeinab; Mykityn, Kirk; Mukhopadhyay, Saikat; Pedersen, Lotte Bang; Christensen, Søren Tvorup (2019): Cellular signalling by primary cilia in development, organ function and disease. In: *Nature reviews. Nephrology* 15 (4), S. 199–219. DOI: 10.1038/s41581-019-0116-9.
- Aplin, John D.; Myers, Jenny E.; Timms, Kate; Westwood, Melissa (2020): Tracking placental development in health and disease. In: *Nature reviews. Endocrinology* 16 (9), S. 479–494. DOI: 10.1038/s41574-020-0372-6.

Apps, Richard; Murphy, Shawn P.; Fernando, Raymond; Gardner, Lucy; Ahad, Tashmeeta; Moffett, Ashley (2009): Human leucocyte antigen (HLA) expression of primary trophoblast cells and placental cell lines, determined using single antigen beads to characterize allotype specificities of anti-HLA antibodies. In: *Immunology* 127 (1), S. 26–39. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2008.03019.x.

Araújo, Sofia J. (2015): The Hedgehog Signalling Pathway in Cell Migration and Guidance: What We Have Learned from *Drosophila melanogaster*. In: *Cancers* 7 (4), S. 2012–2022. DOI: 10.3390/cancers7040873.

Arumugasaamy, Navein; Rock, Kylie D.; Kuo, Che-Ying; Bale, Tracy L.; Fisher, John P. (2020): Microphysiological systems of the placental barrier. In: *Advanced drug delivery reviews* 161-162, S. 161–175. DOI: 10.1016/j.addr.2020.08.010.

Bae, Yun Kyung; Kim, Gee-Hye; Kwon, Ji Hye; Kim, Miyeon; Choi, Soo Jin; Oh, Wonil et al. (2020): Primary Cilia Mediate Wnt5a/ β -catenin Signaling to Regulate Adipogenic Differentiation of Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells Following Calcium Induction. In: *Tissue engineering and regenerative medicine* 17 (2), S. 193–202. DOI: 10.1007/s13770-019-00237-4.

Baergen, Rebecca N.; Burton, Graham J.; Kaplan, Cynthia G. (2022): Benirschke's Pathology of the Human Placenta. Cham: Springer International Publishing.

Bai, Tao; Peng, Chian-Yu; Aneas, Ivy; Sakabe, Noboru; Requena, Daniela F.; Billstrand, Christine et al. (2021): Establishment of human induced trophoblast stem-like cells from term villous cytotrophoblasts. In: *Stem cell research* 56, S. 102507. DOI: 10.1016/j.scr.2021.102507.

Bajdak-Rusinek, Karolina; Fus-Kujawa, Agnieszka; Buszman, Piotr; Żyła-Uklejewicz, Dorota; Jelonek, Katarzyna; Musiał-Kulik, Monika et al. (2023): SDF-1 α -Releasing Microspheres Effectively Extend Stem Cell Homing after Myocardial Infarction. In: *Biomedicines* 11 (2). DOI: 10.3390/biomedicines11020343.

Bakrania, Bhavisha A.; George, Eric M.; Granger, Joey P. (2022): Animal models of preeclampsia: investigating pathophysiology and therapeutic targets. In: *American journal of obstetrics and gynecology* 226 (2S), S973-S987. DOI: 10.1016/j.ajog.2020.10.025.

Bazzoni, Riccardo; Takam Kamga, Paul; Tanasi, Ilaria; Krampera, Mauro (2020): Extracellular Vesicle-Dependent Communication Between Mesenchymal Stromal Cells and Immune Effector Cells. In: *Frontiers in cell and developmental biology* 8, S. 596079. DOI: 10.3389/fcell.2020.596079.

Bernabé-Rubio, Miguel; Alonso, Miguel A. (2017): Routes and machinery of primary cilium biogenesis. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 74 (22), S. 4077–4095. DOI: 10.1007/s00018-017-2570-5.

Bhartiya, Deepa (2013): Are Mesenchymal Cells Indeed Pluripotent Stem Cells or Just Stromal Cells? OCT-4 and VSELs Biology Has Led to Better Understanding. In: *Stem Cells International* 2013, S. 547501. DOI: 10.1155/2013/547501.

Bhartiya, Deepa (2018): The need to revisit the definition of mesenchymal and adult stem cells based on their functional attributes. In: *Stem cell research & therapy* 9 (1), S. 78. DOI: 10.1186/s13287-018-0833-1.

Bischof, Paul; Irminger-Finger, Irmgard (2005): The human cytotrophoblastic cell, a mononuclear chameleon. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 37 (37), S. 1–16. DOI: 10.1016/j.biocel.2004.05.014.

Boregowda, Siddaraju V.; Booker, Cori N.; Phinney, Donald G. (2018): Mesenchymal Stem Cells: The Moniker Fits the Science. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 36 (1), S. 7–10. DOI: 10.1002/stem.2713.

Boss, Anna L.; Chamley, Lawrence W.; James, Joanna L. (2018): Placental formation in early pregnancy: how is the centre of the placenta made? In: *Human reproduction update* 24 (6), S. 750–760. DOI: 10.1093/humupd/dmy030.

Brosens, Ivo; Pijnenborg, Robert; Vercruyssen, Lisbeth; Romero, Roberto (2011): The "Great Obstetrical Syndromes" are associated with disorders of deep placentation. In: *American journal of obstetrics and gynecology* 204 (3), S. 193–201. DOI: 10.1016/j.ajog.2010.08.009.

Brown, Christina; McKee, Christina; Bakshi, Shreeya; Walker, Keegan; Hakman, Eryk; Halassy, Sophia et al. (2019): Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. In: *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 13 (9), S. 1738–1755. DOI: 10.1002/term.2914.

Burton, G. J.; Jauniaux, E.; Charnock-Jones, D. S. (2007): Human early placental development. Potential roles of the endometrial glands. In: *Placenta* 28, S64-69. DOI: 10.1016/j.placenta.2007.01.007.

Burton, Graham J.; Cindrova-Davies, Tereza; Yung, Hong Wa; Jauniaux, Eric (2021): HYPOXIA AND REPRODUCTIVE HEALTH: Oxygen and development of the human placenta. In: *Reproduction (Cambridge, England)* 161 (1), F53-F65. DOI: 10.1530/rep-20-0153.

Burton, Graham J.; Jauniaux, Eric (2017): The cytotrophoblastic shell and complications of pregnancy. In: *Placenta* 60, S. 134–139. DOI: 10.1016/j.placenta.2017.06.007.

Burton, Graham J.; Redman, Christopher W.; Roberts, James M.; Moffett, Ashley (2019): Pre-eclampsia: pathophysiology and clinical implications. In: *BMJ (Clinical research ed.)* 366, l2381. DOI: 10.1136/bmj.l2381.

Caplan, A. I. (1991): Mesenchymal stem cells. In: *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 9 (5), S. 641–650. DOI: 10.1002/jor.1100090504.

Caplan, Arnold I. (2017): Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! In: *Stem cells translational medicine* 6 (6), S. 1445–1451. DOI: 10.1002/sctm.17-0051.

Castel, Gaël; Meistermann, Dimitri; Bretin, Betty; Firmin, Julie; Blin, Justine; Loubersac, Sophie et al. (2020): Induction of Human Trophoblast Stem Cells from Somatic Cells and Pluripotent Stem Cells. In: *Cell reports* 33 (8), S. 108419. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.108419.

- Castrechini, N. M.; Murthi, P.; Gude, N. M.; Erwich, J. J. H. M.; Gronthos, S.; Zannettino, A. et al. (2010): Mesenchymal stem cells in human placental chorionic villi reside in a vascular Niche. In: *Placenta* 31 (3), S. 203–212. DOI: 10.1016/j.placenta.2009.12.006.
- Cordeira, Ana Sofia; James, Tim; Vatish, Manu (2022): The diagnostic value of angiogenic and antiangiogenic factors in differential diagnosis of preeclampsia. In: *American journal of obstetrics and gynecology* 226 (1), S. 156. DOI: 10.1016/j.ajog.2021.08.048.
- Cordeira, Ana Sofia; Kandzija, Neva; Pargmae, Pille; Cooke, William; James, Tim; Redman, Christopher; Vatish, Manu (2019): Circulating soluble fms-like tyrosine kinase-1 is placentally derived in normal pregnancy: First in vivo evidence. In: *Pregnancy hypertension* 16, S. 145–147. DOI: 10.1016/j.preghy.2019.03.013.
- Cetrulo, Curtis L.; Cetrulo, Kyle J. (2006): Placental and pregnancy stem cells: everyone is, or should be, interested in the placenta. In: *Stem cell reviews* 2 (2), S. 79–80. DOI: 10.1385/scr:2:2:79.
- Chang, Kai-Jung; Seow, Kok-Min; Chen, Kuo-Hu (2023): Preeclampsia: Recent Advances in Predicting, Preventing, and Managing the Maternal and Fetal Life-Threatening Condition. In: *International journal of environmental research and public health* 20 (4). DOI: 10.3390/ijerph20042994.
- Chappell, Lucy C.; Cluver, Catherine A.; Kingdom, John; Tong, Stephen (2021): Preeclampsia. In: *Lancet (London, England)* 398 (10297), S. 341–354. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)32335-7.
- Chávez, Marcelo; Ena, Sabrina; van Sande, Jacqueline; Kerchoue d'Exaerde, Alban de; Schurmans, Stéphane; Schiffmann, Serge N. (2015): Modulation of Ciliary Phosphoinositide Content Regulates Trafficking and Sonic Hedgehog Signaling Output. In: *Developmental cell* 34 (3), S. 338–350. DOI: 10.1016/j.devcel.2015.06.016.
- Chen, Jiaye; Song, Tinglin; Yang, Sizhu; Meng, Qingxue; Han, Xiaoyu; Wu, Ze et al. (2023): Snail mediates GDF-8-stimulated human extravillous trophoblast cell invasion by upregulating MMP2 expression. In: *Cell communication and signaling : CCS* 21 (1), S. 93. DOI: 10.1186/s12964-023-01107-2.
- Chen, Liyang; Liu, Gejun; Li, Wenjun; Wu, Xing (2021): Synergistic effects of Indian hedgehog and sonic hedgehog on chondrogenesis during cartilage repair. In: *Journal of molecular histology* 52 (2), S. 407–418. DOI: 10.1007/s10735-021-09964-2.
- Chen, Weiwei; Tang, Tracy; Eastham-Anderson, Jeff; Dunlap, Debra; Alicke, Bruno; Nannini, Michelle et al. (2011): Canonical hedgehog signaling augments tumor angiogenesis by induction of VEGF-A in stromal perivascular cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (23), S. 9589–9594. DOI: 10.1073/pnas.1017945108.
- Choi, Yoo Shin; Park, Yong-Beom; Ha, Chul-Won; Kim, Jin A.; Heo, Jin-Chul; Han, Woo-Jung et al. (2017): Different characteristics of mesenchymal stem cells isolated from different layers of full term placenta. In: *PloS one* 12 (2), 1-17. DOI: 10.1371/journal.pone.0172642.

- Choudhury, Jaganmoy; Pandey, Deepak; Chaturvedi, Pradeep Kumar; Gupta, Surabhi (2022): Epigenetic regulation of epithelial to mesenchymal transition: a trophoblast perspective. In: *Molecular human reproduction* 28 (5). DOI: 10.1093/molehr/gaac013.
- Cindrova-Davies, Tereza; Fogarty, Norah M. E.; Jones, Carolyn J. P.; Kingdom, John; Burton, Graham J. (2018): Evidence of oxidative stress-induced senescence in mature, post-mature and pathological human placentas. In: *Placenta* 68, S. 15–22. DOI: 10.1016/j.placenta.2018.06.307.
- Cindrova-Davies, Tereza; Sferruzzi-Perri, Amanda N. (2022): Human placental development and function. In: *Seminars in cell & developmental biology* 131, S. 66–77. DOI: 10.1016/j.semcd.2022.03.039.
- Cinkornpumin, Jessica K.; Kwon, Sin Young; Guo, Yixin; Hossain, Ishtiaque; Sirois, Jacinthe; Russett, Colleen S. et al. (2020): Naive Human Embryonic Stem Cells Can Give Rise to Cells with a Trophoblast-like Transcriptome and Methylome. In: *Stem cell reports* 15 (1), S. 198–213. DOI: 10.1016/j.stemcr.2020.06.003.
- Ciria, María; García, Nahuel A.; Ontoria-Oviedo, Imelda; González-King, Hernán; Carrero, Rubén; La Pompa, José Luis de et al. (2017): Mesenchymal Stem Cell Migration and Proliferation Are Mediated by Hypoxia-Inducible Factor-1 α Upstream of Notch and SUMO Pathways. In: *Stem cells and development* 26 (13), S. 973–985. DOI: 10.1089/scd.2016.0331.
- Clayton, Aled; Buschmann, Dominik; Byrd, J. Brian; Carter, David R. F.; Cheng, Lesley; Compton, Carolyn et al. (2018): Summary of the ISEV workshop on extracellular vesicles as disease biomarkers, held in Birmingham, UK, during December 2017. In: *Journal of extracellular vesicles* 7 (1), S. 1473707. DOI: 10.1080/20013078.2018.1473707.
- Corsello, Tiziana; Amico, Giandomenico; Corrao, Simona; Anzalone, Rita; Timoneri, Francesca; Lo Iacono, Melania et al. (2019): Wharton's Jelly Mesenchymal Stromal Cells from Human Umbilical Cord: a Close-up on Immunomodulatory Molecules Featured In Situ and In Vitro. In: *Stem cell reviews and reports* 15 (6), S. 900–918. DOI: 10.1007/s12015-019-09907-1.
- Cui, Kangli; Chen, Tingwei; Zhu, Yujuan; Shi, Yang; Guo, Yaqiong; Qin, Jianhua (2023): Engineering placenta-like organoids containing endogenous vascular cells from human-induced pluripotent stem cells. In: *Bioengineering & translational medicine* 8 (1), e10390. DOI: 10.1002/btm2.10390.
- Cunningham, Mark W.; Jayaram, Aswathi; Deer, Evangeline; Amaral, Lorena M.; Vaka, Venkata Ramana; Ibrahim, Tarek et al. (2020): Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) blockade improves natural killer cell (NK) activation, hypertension, and mitochondrial oxidative stress in a preclinical rat model of preeclampsia. In: *Hypertension in pregnancy* 39 (4), S. 399–404. DOI: 10.1080/10641955.2020.1793999.
- Daoussis, Dimitrios; Kanellou, Anastasia; Panagiotopoulos, Elias; Papachristou, Dionysios (2022): DKK-1 Is Underexpressed in Mesenchymal Stem Cells from Patients with Ankylosing Spondylitis and Further Downregulated by IL-17. In: *International journal of molecular sciences* 23 (12). DOI: 10.3390/ijms23126660.

- DaSilva-Arnold, Sonia; James, Joanna L.; Al-Khan, Abdulla; Zamudio, Stacy; Illsley, Nicholas P. (2015): Differentiation of first trimester cytotrophoblast to extravillous trophoblast involves an epithelial-mesenchymal transition. In: *Placenta* 36 (12), S. 1412–1418. DOI: 10.1016/j.placenta.2015.10.013.
- DaSilva-Arnold, Sonia C.; Zamudio, Stacy; Al-Khan, Abdulla; Alvarez-Perez, Jesus; Mannion, Ciaran; Koenig, Christopher et al. (2018): Human trophoblast epithelial-mesenchymal transition in abnormally invasive placenta. In: *Biology of reproduction* 99 (2), S. 409–421. DOI: 10.1093/biolre/iocy042.
- Deng, Pengwei; Cui, Kangli; Shi, Yang; Zhu, Yujuan; Wang, Yaqing; Shao, Xiaoguang; Qin, Jianhua (2022): Fluidic Flow Enhances the Differentiation of Placental Trophoblast-Like 3D Tissue from hiPSCs in a Perfused Macrofluidic Device. In: *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 10, S. 907104. DOI: 10.3389/fbioe.2022.907104.
- Di Wu; Liu, Yu; Liu, Xiaoxia; Liu, WeiFang; Shi, HaoRan; Zhang, Yang et al. (2020): Heme oxygenase-1 gene modified human placental mesenchymal stem cells promote placental angiogenesis and spiral artery remodeling by improving the balance of angiogenic factors in vitro. In: *Placenta* 99, S. 70–77. DOI: 10.1016/j.placenta.2020.07.007.
- Dietrich, B.; Kunihs, V.; Haider, S.; Pollheimer, J.; Knöfler, M. (2021): 3-Dimensional JEG-3 choriocarcinoma cell organoids as a model for trophoblast expansion and differentiation. In: *Placenta* 104, S. 243–246. DOI: 10.1016/j.placenta.2020.12.013.
- Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, Fc; Krause, Ds et al. (2006): Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. In: *Cytotherapy* 8 (4), S. 315–317. DOI: 10.1080/14653240600855905.
- Donnelly, Jessica M.; Chawla, Ambreesh; Houghton, Jeanmarie; Zavros, Yana (2013): Sonic hedgehog mediates the proliferation and recruitment of transformed mesenchymal stem cells to the stomach. In: *PloS one* 8 (9), e75225. DOI: 10.1371/journal.pone.0075225.
- Doornbos, Cenna; Roepman, Ronald (2021): Moonlighting of mitotic regulators in cilium disassembly. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 78 (11), S. 4955–4972. DOI: 10.1007/s00018-021-03827-5.
- Dutta, Priya; Ray, Krishanu (2022): Ciliary membrane, localised lipid modification and cilia function. In: *Journal of cellular physiology* 237 (6), S. 2613–2631. DOI: 10.1002/jcp.30787.
- Eikmans, Michael; van der Keur, Carin; Anholts, Jacqueline D. H.; Drabbels, Jos J. M.; van Beelen, Els; Sousa Lopes, Susana M. Chuva de; van der Hoorn, Marie-Louise (2022): Primary Trophoblast Cultures: Characterization of HLA Profiles and Immune Cell Interactions. In: *Frontiers in immunology* 13, S. 814019. DOI: 10.3389/fimmu.2022.814019.
- Elsafadi, Mona; Manikandan, Muthurangan; Atteya, Muhammad; Abu Dawud, Raed; Almalki, Sami; Ali Kaimkhani, Zahid et al. (2017): SERPINB2 is a novel TGFβ-

- responsive lineage fate determinant of human bone marrow stromal cells. In: *Scientific reports* 7 (1), S. 10797. DOI: 10.1038/s41598-017-10983-x.
- Faniku, C.; Kong, W.; He, L.; Zhang, M.; Lilly, G.; Pepper, J. P. (2021): Hedgehog signaling promotes endoneurial fibroblast migration and Vegf-A expression following facial nerve injury. In: *Brain research* 1751, S. 147204. DOI: 10.1016/j.brainres.2020.147204.
- Faria, Alessandra V. de S.; Akyala, Adamu Ishaku; Parikh, Kaushal; Brüggemann, Lois W.; Spek, C. Arnold; Cao, Wanlu et al. (2019): Smoothed-dependent and -independent pathways in mammalian noncanonical Hedgehog signaling. In: *The Journal of biological chemistry* 294 (25), S. 9787–9798. DOI: 10.1074/jbc.RA119.007956.
- Farivar, Behzad S.; Toursavadvkahi, Shahab; Monahan, Thomas S.; Sharma, Jashank; Ucuzian, Areck A.; Kundi, Rishi et al. (2019): Prospective study of cryopreserved placental tissue wound matrix in the management of chronic venous leg ulcers. In: *Journal of vascular surgery. Venous and lymphatic disorders* 7 (2), S. 228–233. DOI: 10.1016/j.jvsv.2018.09.016.
- Finco, Isabella; LaPensee, Christopher R.; Krill, Kenneth T.; Hammer, Gary D. (2015): Hedgehog Signaling and Steroidogenesis Annual Review of Physiology. In: *Annual review of physiology* 77, S. 105–129. DOI: 10.1146/annurev-physiol-061214-111754.
- Focşa, Ina Ofelia; Budişteanu, Magdalena; Bălgrădean, Mihaela (2021): Clinical and genetic heterogeneity of primary ciliopathies (Review). In: *International Journal of Molecular Medicine* 48 (3). DOI: 10.3892/ijmm.2021.5009.
- Frank-Kamenetsky, Maria; Zhang, Xiaoyan M.; Bottega, Steve; Guicherit, Oivin; Wichterle, Hynek; Dudek, Henryk et al. (2002): Small-molecule modulators of Hedgehog signaling: identification and characterization of Smoothed agonists and antagonists. In: *Journal of biology* 1 (2), S. 10. DOI: 10.1186/1475-4924-1-10.
- Friedenstein, A. J.; Piatetzky-Shapiro, I. I.; Petrakova, K. V. (1966): Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. In: *Journal of embryology and experimental morphology* 16 (3), S. 381–390.
- Fu, Lihua; Liu, Yongjun; Zhang, Dan; Xie, Jiang; Guan, Hongbo; Shang, Tao (2015): Beneficial effect of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on an endotoxin-induced rat model of preeclampsia. In: *Experimental and therapeutic medicine* 10 (5), S. 1851–1856. DOI: 10.3892/etm.2015.2742.
- Fuchi, Naoki; Miura, Kiyonori; Doi, Hanako; Li, Tao-Sheng; Masuzaki, Hideaki (2017): Feasibility of placenta-derived mesenchymal stem cells as a tool for studying pregnancy-related disorders. In: *Scientific reports* 7, S. 46220. DOI: 10.1038/srep46220.
- Fujiwara, Hiroshi; Sato, Yukiyasu; Nishioka, Yoshihiro; Yoshioka, Shinya; Kosaka, Kenzo; Fujii, Haruko et al. (2005): New regulatory mechanisms for human extravillous trophoblast invasion. In: *Reproductive medicine and biology* 4 (3), S. 189–195. DOI: 10.1111/j.1447-0578.2005.00104.x.

- Galipeau, Jacques; Sensébé, Luc (2018): Mesenchymal stromal cells: clinical challenges and therapeutic opportunities. In: *Cell stem cell* 22 (6), S. 824–833. DOI: 10.1016/j.stem.2018.05.004.
- Gao, Lin; Bird, Anna K.; Meednu, Nida; Dauenhauer, Kristin; Liesveld, Jane; Anolik, Jennifer; Looney, R. John (2017): Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells From Patients With Systemic Lupus Erythematosus Have a Senescence-Associated Secretory Phenotype Mediated by a Mitochondrial Antiviral Signaling Protein-Interferon- β Feedback Loop. In: *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)* 69 (8), S. 1623–1635. DOI: 10.1002/art.40142.
- Garcia-Gonzalo, Francesc R.; Reiter, Jeremy F. (2012): Scoring a backstage pass. Mechanisms of ciliogenesis and ciliary access. In: *The Journal of cell biology* 197 (6), S. 697–709. DOI: 10.1083/jcb.201111146.
- Gathiram, Premjith; Moodley, Jagidesa (2020): The Role of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Preeclampsia: a Review. In: *Current hypertension reports* 22 (11), S. 89. DOI: 10.1007/s11906-020-01098-2.
- Gauster, Martin; Moser, Gerit; Wernitznig, Stefan; Kupper, Nadja; Huppertz, Berthold (2022): Early human trophoblast development: from morphology to function. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 79 (6), S. 345. DOI: 10.1007/s00018-022-04377-0.
- Gellersen, Birgit; Brosens, Ivo A.; Brosens, Jan J. (2007): Decidualization of the human endometrium. Mechanisms, functions, and clinical perspectives. In: *Seminars in reproductive medicine* 25 (6), S. 445–453. DOI: 10.1055/s-2007-991042.
- Gerbaud, P.; Pidoux, G. (2015): Review. An overview of molecular events occurring in human trophoblast fusion. In: *Placenta* 36 Suppl 1, S35-42. DOI: 10.1016/j.placenta.2014.12.015.
- Giallongo, Cesarina; Romano, Alessandra; Parrinello, Nunziatina Laura; La Cava, Piera; Brundo, Maria Violetta; Bramanti, Vincenzo et al. (2016): Mesenchymal Stem Cells (MSC) Regulate Activation of Granulocyte-Like Myeloid Derived Suppressor Cells (G-MDSC) in Chronic Myeloid Leukemia Patients. In: *PloS one* 11 (7), e0158392. DOI: 10.1371/journal.pone.0158392.
- Giarretta, Igor; Gaetani, Eleonora; Bigossi, Margherita; Tondi, Paolo; Asahara, Takayuki; Pola, Roberto (2019): The Hedgehog Signaling Pathway in Ischemic Tissues. In: *International journal of molecular sciences* 20 (21). DOI: 10.3390/ijms20215270.
- Graham, C. H.; Hawley, T. S.; Hawley, R. G.; MacDougall, J. R.; Kerbel, R. S.; Khoo, N.; Lala, P. K. (1993): Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. In: *Experimental cell research* 206 (2), S. 204–211. DOI: 10.1006/excr.1993.1139.
- Gubenšek, Jakob; Ponikvar, Rafael; Premru Sršen, Tanja; Fabjan Vodušek, Vesna; Moertl, Manfred Georg; Lučovnik, Miha (2021): Treatment of preeclampsia at extremely preterm gestation with therapeutic plasma exchange. In: *Clinical nephrology* 96 (1), S. 101–106. DOI: 10.5414/CNP96S18.

Gumina, Diane L.; Su, Emily J. (2023): Mechanistic insights into the development of severe fetal growth restriction. In: *Clinical science (London, England : 1979)* 137 (8), S. 679–695. DOI: 10.1042/CS20220284.

Guo, Ge; Stirparo, Giuliano Giuseppe; Strawbridge, Stanley E.; Spindlow, Daniel; Yang, Jian; Clarke, James et al. (2021): Human naive epiblast cells possess unrestricted lineage potential. In: *Cell stem cell* 28 (6), 1040-1056.e6. DOI: 10.1016/j.stem.2021.02.025.

Haider, Sandra; Meinhardt, Gudrun; Saleh, Leila; Kunihs, Viktoria; Gamperl, Magdalena; Kaindl, Ulrich et al. (2018): Self-Renewing Trophoblast Organoids Recapitulate the Developmental Program of the Early Human Placenta. In: *Stem cell reports* 11 (2), S. 537–551. DOI: 10.1016/j.stemcr.2018.07.004.

Hanna, Goldman-Wohl, Hamani, Avraham, Greenfield, Natanson-Yaron, Prus, Cohen-Daniel, Arnon, Manaster, Gazit, Yutkin, Benharroch, Porgador, Keshet, Yagel, Mandelboim et al (2006): Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. In *Nature Medicine* 12 (9), S 1065–1074. DOI: 10.1038/nm1452

HANKS, J. H.; WALLACE, R. E. (1949): Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. In: *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 71 (2), S. 196–200. DOI: 10.3181/00379727-71-17131.

Harrell, Carl Randall; Jovicic, Nemanja; Djonov, Valentin; Arsenijevic, Nebojsa; Volarevic, Vladislav (2019): Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes and Other Extracellular Vesicles as New Remedies in the Therapy of Inflammatory Diseases. In: *Cells* 8 (12). DOI: 10.3390/cells8121605.

Harris, L. K. (2011): IFPA Gabor Than Award lecture. Transformation of the spiral arteries in human pregnancy: key events in the remodelling timeline. In: *Placenta* 32 Suppl 2, S154-8. DOI: 10.1016/j.placenta.2010.11.018.

Hashemian, Seyed-Mohammad Reza; Aliannejad, Rasoul; Zarrabi, Morteza; Soleimani, Masoud; Vosough, Massoud; Hosseini, Seyedeh-Esmat et al. (2021): Mesenchymal stem cells derived from perinatal tissues for treatment of critically ill COVID-19-induced ARDS patients: a case series. In: *Stem cell research & therapy* 12 (1), S. 91. DOI: 10.1186/s13287-021-02165-4.

Hass, Ralf; Kasper, Cornelia; Böhm, Stefanie; Jacobs, Roland (2011): Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. In: *Cell communication and signaling : CCS* 9, S. 12. DOI: 10.1186/1478-811X-9-12.

He, Kai; Ma, Xiaoyu; Xu, Tao; Li, Yan; Hodge, Allen; Zhang, Qing et al. (2018): Axoneme polyglutamylation regulated by Joubert syndrome protein ARL13B controls ciliary targeting of signaling molecules. In: *Nature communications* 9 (1), S. 3310. DOI: 10.1038/s41467-018-05867-1.

He, Qian; Wang, Guanghu; Dasgupta, Somsankar; Dinkins, Michael; Zhu, Gu; Bieberich, Erhard (2012): Characterization of an apical ceramide-enriched compartment

regulating ciliogenesis. In: *Molecular biology of the cell* 23 (16), S. 3156–3166. DOI: 10.1091/mbc.E12-02-0079.

Hellemans, Jan; Coucke, Paul J.; Giedion, Andres; Paepe, Anne de; Kramer, Peter; Beemer, Frits; Mortier, Geert R. (2003): Homozygous mutations in IHH cause acrocapitofemoral dysplasia, an autosomal recessive disorder with cone-shaped epiphyses in hands and hips. In: *American journal of human genetics* 72 (4), S. 1040–1046. DOI: 10.1086/374318.

Herraiz, Ignacio; Llurba, Elisa; Verlohren, Stefan; Galindo, Alberto (2018): Update on the Diagnosis and Prognosis of Preeclampsia with the Aid of the sFlt-1/ PIGF Ratio in Singleton Pregnancies. In: *Fetal diagnosis and therapy* 43 (2), S. 81–89. DOI: 10.1159/000477903.

Hilgendorf, Keren I. (2021): Primary Cilia Are Critical Regulators of White Adipose Tissue Expansion. In: *Frontiers in physiology* 12, S. 769367. DOI: 10.3389/fphys.2021.769367.

Ho, Emily K.; Stearns, Tim (2021): Hedgehog signaling and the primary cilium: implications for spatial and temporal constraints on signaling. In: *Development (Cambridge, England)* 148 (9). DOI: 10.1242/dev.195552.

Hodgins, Stephen; Tielsch, James; Rankin, Kristen; Robinson, Amber; Kearns, Annie; Caglia, Jacquelyn (2016): A New Look at Care in Pregnancy: Simple, Effective Interventions for Neglected Populations. In: *PloS one* 11 (8), e0160562. DOI: 10.1371/journal.pone.0160562.

Hori, Takeshi; Okae, Hiroaki; Shibata, Shun; Kobayashi, Norio; Kobayashi, Eri H.; Oike, Akira et al. (2024): Trophoblast stem cell-based organoid models of the human placental barrier. In: *Nature communications* 15 (1), S. 962. DOI: 10.1038/s41467-024-45279-y.

Hromadnikova, Ilona; Kotlabova, Katerina; Ondrackova, Marketa; Pirkova, Petra; Kestlerova, Andrea; Novotna, Veronika et al. (2015): Expression profile of C19MC microRNAs in placental tissue in pregnancy-related complications. In: *DNA and cell biology* 34 (6), S. 437–457. DOI: 10.1089/dna.2014.2687.

Hu, Yae; Yan, Ruhong; Zhang, Ce; Zhou, Zhichao; Liu, Meng; Wang, Can et al. (2018): High-Mobility Group Box 1 From Hypoxic Trophoblasts Promotes Endothelial Microparticle Production and Thrombophilia in Preeclampsia. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 38 (6), S. 1381–1391. DOI: 10.1161/ATVBAHA.118.310940.

Huang, Lijun; Tu, Zhaowei; Wei, Liudan; Sun, Wei; Wang, Yifan; Bi, Shilei et al. (2023): Generating Functional Multicellular Organoids from Human Placenta Villi. In: *Advanced science (Weinheim, Baden-Wuerttemberg, Germany)* 10 (26), e2301565. DOI: 10.1002/advs.202301565.

Huang, Zhao; Zhang, Zhe; Zhou, Chengwei; Liu, Lin; Huang, Canhua (2022): Epithelial-mesenchymal transition: The history, regulatory mechanism, and cancer therapeutic opportunities. In: *MedComm* 3 (2), e144. DOI: 10.1002/mco2.144.

- Huang, Zihao; Huang, Shuangbo; Song, Tongxing; Yin, Yulong; Tan, Chengquan (2021): Placental Angiogenesis in Mammals: A Review of the Regulatory Effects of Signaling Pathways and Functional Nutrients. In: *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)* 12 (6), S. 2415–2434. DOI: 10.1093/advances/nmab070.
- Huppertz, Berthold; Kingdom, John C. P. (2004): Apoptosis in the trophoblast--role of apoptosis in placental morphogenesis. In: *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 11 (6), S. 353–362. DOI: 10.1016/j.jsgi.2004.06.002.
- Hwang, Jong Ha; Lee, Mi Jung; Seok, Oye Sun; Paek, Yu Chin; Cho, Geum Joon; Seol, Hyun Joo et al. (2010): Cytokine expression in placenta-derived mesenchymal stem cells in patients with pre-eclampsia and normal pregnancies. In: *Cytokine* 49 (1), S. 95–101. DOI: 10.1016/j.cyto.2009.08.013.
- Iwatani, Sota; Shono, Akemi; Yoshida, Makiko; Yamana, Keiji; Thwin, Khin Kyae Mon; Kuroda, Jumpei et al. (2017): Involvement of WNT Signaling in the Regulation of Gestational Age-Dependent Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cell Proliferation. In: *Stem Cells International* 2017, S. 8749751. DOI: 10.1155/2017/8749751.
- Jadli, Anshul; Ghosh, Kanjaksha; Satoskar, Purnima; Damania, Kaizad; Bansal, Vandana; Shetty, Shrimati (2017): Combination of copeptin, placental growth factor and total annexin V microparticles for prediction of preeclampsia at 10-14 weeks of gestation. In: *Placenta* 58, S. 67–73. DOI: 10.1016/j.placenta.2017.08.009.
- Jauković, Aleksandra; Abadjieva, Desislava; Trivanović, Drenka; Stoyanova, Elena; Kostadinova, Milena; Pashova, Shina et al. (2020): Specificity of 3D MSC Spheroids Microenvironment: Impact on MSC Behavior and Properties. In: *Stem cell reviews and reports* 16 (5), S. 853–875. DOI: 10.1007/s12015-020-10006-9.
- Jeng, Kuo-Shyang; Chang, Chiung-Fang; Lin, Shu-Sheng (2020): Sonic Hedgehog Signaling in Organogenesis, Tumors, and Tumor Microenvironments. In: *International journal of molecular sciences* 21 (3). DOI: 10.3390/ijms21030758.
- Jiang, Ranhua; Han, Zhibo; Zhuo, Guangsheng; Qu, Xiaodan; Li, Xue; Wang, Xin et al. (2011): Transplantation of placenta-derived mesenchymal stem cells in type 2 diabetes: a pilot study. In: *Frontiers of medicine* 5 (1), S. 94–100. DOI: 10.1007/s11684-011-0116-z.
- Jin, Meiyuan; Li, Haiyang; Xu, Hongfeng; Huo, Gaoxiang; Yao, Yingyu (2017): MicroRNA-20b inhibits trophoblast cell migration and invasion by targeting MMP-2. In: *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 10 (11), S. 10901–10909.
- Jin, Shanshan; Yang, Chengzhe; Huang, Jiahui; Liu, Lianlian; Zhang, Yu; Li, Shutong et al. (2020): Conditioned medium derived from FGF-2-modified GMSCs enhances migration and angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells. In: *Stem cell research & therapy* 11 (1), S. 68. DOI: 10.1186/s13287-020-1584-3.
- Juuri, Emma; Tikka, Pauli; Domanskyi, Andrii; Corfe, Ian; Morita, Wataru; Mckinnon, Peter J. et al. (2022): Ptch2 is a Potential Regulator of Mesenchymal Stem Cells. In: *Frontiers in physiology* 13, S. 877565. DOI: 10.3389/fphys.2022.877565.

- Kanter, Jessica R.; Mani, Sneha; Gordon, Scott M.; Mainigi, Monica (2021): Uterine natural killer cell biology and role in early pregnancy establishment and outcomes. In: *F&S reviews* 2 (4), S. 265–286. DOI: 10.1016/j.xfnr.2021.06.002.
- Karrar, Shahd A.; Martingano, Daniel J.; Hong, Peter L. (2024): StatPearls. Preeclampsia. Treasure Island (FL).
- Karvas, Rowan M.; Khan, Shafqat A.; Verma, Sonam; Yin, Yan; Kulkarni, Devesha; Dong, Chen et al. (2022): Stem-cell-derived trophoblast organoids model human placental development and susceptibility to emerging pathogens. In: *Cell stem cell* 29 (5), 810-825.e8. DOI: 10.1016/j.stem.2022.04.004.
- Katoh, Y.; Katoh, M. (2009): Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. In: *Current molecular medicine* 9 (7), S. 873–886. DOI: 10.2174/156652409789105570.
- Kawai, Tatsuo; Autieri, Michael V.; Scalia, Rosario (2020): Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. In: *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 320 (3), C375-91. DOI: 10.1152/ajpcell.00379.2020.
- Khanabdali, Ramin; Zheng, Shixuan; Melton, Phillip E.; Georgiou, Harry M.; Moses, Eric; Brennecke, Shaun P.; Kalionis, Bill (2021): Late/post-term decidual basaloid-derived mesenchymal stem/stromal cells show evidence of advanced ageing and downregulation of microRNA-516b-5p. In: *Placenta* 109, S. 43–54. DOI: 10.1016/j.placenta.2021.04.008.
- Kim, Ji Hoon; Hanlon, Caitlin D.; Vohra, Sunaina; Devreotes, Peter N.; Andrew, Deborah J. (2021): Hedgehog signaling and Trel regulate actin dynamics through PI(4,5)P2 to direct migration of Drosophila embryonic germ cells. In: *Cell reports* 34 (9), S. 108799. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.108799.
- Kim, Jung Ha; Kim, Kabsun; Youn, Bang Ung; Lee, Jongwon; Kim, Inyoung; Shin, Hong-In et al. (2014): Kruppel-like factor 4 attenuates osteoblast formation, function, and cross talk with osteoclasts. In: *The Journal of cell biology* 204 (6), S. 1063–1074. DOI: 10.1083/jcb.201308102.
- Kingdom, J.; Huppertz, B.; Seaward, G.; Kaufmann, P. (2000): Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. In: *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 92 (1), S. 35–43. DOI: 10.1016/S0301-2115(00)00423-1.
- Knöfler, Martin; Haider, Sandra; Saleh, Leila; Pollheimer, Jürgen; Gamage, Teena K. J. B.; James, Joanna (2019): Human placenta and trophoblast development. Key molecular mechanisms and model systems. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 76 (18), S. 3479–3496. DOI: 10.1007/s00018-019-03104-6.
- Kong, Jennifer H.; Siebold, Christian; Rohatgi, Rajat (2019): Biochemical mechanisms of vertebrate hedgehog signaling. In: *Development (Cambridge, England)* 146 (10). DOI: 10.1242/dev.166892.
- Kotta-Loizou, Ioly; Pritsa, Agathi; Antasouras, Georgios; Vasilopoulos, Spyridon N.; Voulgaridou, Gavriela; Papadopoulou, Sousana K. et al. (2024): Fetus Exposure to Drugs and Chemicals: A Holistic Overview on the Assessment of Their Transport and

- Metabolism across the Human Placental Barrier. In: *Diseases (Basel, Switzerland)* 12 (6). DOI: 10.3390/diseases12060114.
- Kusuma, Gina D.; Georgiou, Harry M.; Perkins, Anthony V.; Abumaree, Mohamed H.; Brennecke, Shaun P.; Kalionis, Bill (2022): Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Role in Oxidative Stress Associated with Preeclampsia. In: *The Yale Journal of Biology and Medicine* 95 (1), S. 115–127.
- La Torre, Paz de; Flores, Ana I. (2020): Current Status and Future Prospects of Perinatal Stem Cells. In: *Genes* 12 (1). DOI: 10.3390/genes12010006.
- Labour, Marie-Noëlle; Riffault, Mathieu; Christensen, Søren T.; Hoey, David A. (2016): TGF β 1 – induced recruitment of human bone mesenchymal stem cells is mediated by the primary cilium in a SMAD3-dependent manner. In: *Scientific reports* 6. DOI: 10.1038/srep35542.
- Lamouille, Samy; Xu, Jian; Derynck, Rik (2014): Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 15 (3), S. 178–196. DOI: 10.1038/nrm3758.
- Leaños-Miranda, Alfredo; Inova, Campos-Galicia; Méndez-Aguilar, Francisco; Molina-Pérez, Carlos José; Ramírez-Valenzuela, Karla Leticia; Sillas-Pardo, Liliana Janet et al. (2018): Lower circulating angiotensin II levels are related to the severity of preeclampsia and its risk as disclosed by a specific bioassay. In: *Medicine* 97 (39), e12498. DOI: 10.1097/MD.00000000000012498.
- Lecarpentier, Edouard; Zsengeller, Zsuzsanna K.; Salahuddin, Saira; Covarrubias, Ambart E.; Lo, Agnes; Haddad, Bassam et al. (2020): Total Versus Free Placental Growth Factor Levels in the Pathogenesis of Preeclampsia. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 76 (3), S. 875–883. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15338.
- Lee, Raymond Teck Ho; Zhao, Zhonghua; Ingham, Philip W. (2016): Hedgehog signalling. In: *Development (Cambridge, England)* 143 (3), S. 367–372. DOI: 10.1242/dev.120154.
- Li, Yan; Yan, Junhao; Chang, Hsun-Ming; Chen, Zi-Jiang; Leung, Peter C. K. (2021): Roles of TGF- β Superfamily Proteins in Extravillous Trophoblast Invasion. In: *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 32 (3), S. 170–189. DOI: 10.1016/j.tem.2020.12.005.
- Li, Ziwei; Wang, Jie; Li, Dianting; Chen, Haiying; Meng, Tao (2022): miR-372-3p promotes preeclampsia progression by regulating twist1. In: *Experimental and therapeutic medicine* 24 (6), S. 723. DOI: 10.3892/etm.2022.11659.
- Liang, Lu; Li, Zongjin; Ma, Tao; Han, Zhibo; Du, Wenjing; Geng, Jie et al. (2017): Transplantation of Human Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells Alleviates Critical Limb Ischemia in Diabetic Nude Rats. In: *Cell transplantation* 26 (1), S. 45–61. DOI: 10.3727/096368916X692726.
- Liang, Xiaoting; Ding, Yue; Zhang, Yuelin; Tse, Hung-Fat; Lian, Qizhou (2014): Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives. In: *Cell transplantation* 23 (9), S. 1045–1059. DOI: 10.3727/096368913X667709.

- Liesveld, Jane L.; Sharma, Naman; Aljitawi, Omar S. (2020): Stem cell homing: From physiology to therapeutics. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 38 (10), S. 1241–1253. DOI: 10.1002/stem.3242.
- Liu, Fang; Feng, Xiao Xue; Zhu, Shang Ling; Huang, Hong Yu; Di Chen, Ying; Pan, Yun Feng et al. (2018): Sonic Hedgehog Signaling Pathway Mediates Proliferation and Migration of Fibroblast-Like Synoviocytes in Rheumatoid Arthritis via MAPK/ERK Signaling Pathway. In: *Frontiers in immunology* 9, S. 2847. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02847.
- Liu, Jun; Liao, Min-Qi; Cao, Da-Fang; Yang, Ying; Liu, Yan-Hua; Zeng, Fang-Fang; Chen, Xiao-Hong (2021): The Association between Interleukin-6 Gene Polymorphisms and Risk of Systemic Lupus Erythematosus: A Meta-analysis with Trial Sequential Analysis. In: *Immunological investigations* 50 (2-3), S. 259–272. DOI: 10.1080/08820139.2020.1769646.
- Liu, Xiaodong; Ouyang, John F.; Rossello, Fernando J.; Tan, Jia Ping; Davidson, Kathryn C.; Valdes, Daniela S. et al. (2020): Reprogramming roadmap reveals route to human induced trophoblast stem cells. In: *Nature* 586 (7827), S. 101–107. DOI: 10.1038/s41586-020-2734-6.
- Luo, Qing; Zhang, Bingyu; Kuang, Dongdong; Song, Guanbin (2016): Role of Stromal-Derived Factor-1 in Mesenchymal Stem Cell Paracrine-Mediated Tissue Repair. In: *Current stem cell research & therapy* 11 (7), S. 585–592. DOI: 10.2174/1574888x11666160614102629.
- Lyall, Fiona; Robson, Stephen C.; Bulmer, Judith N. (2013): Spiral artery remodeling and trophoblast invasion in preeclampsia and fetal growth restriction: relationship to clinical outcome. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 62 (6), S. 1046–1054. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01892.
- Ma, Yeling; Yu, Xin; Ye, Shenglong; Li, Wenlong; Yang, Qian; Li, Yu-Xia et al. (2024): Immune-regulatory properties of endovascular extravillous trophoblast cells in human placenta. In: *Placenta* 145, S. 107–116. DOI: 10.1016/j.placenta.2023.12.009.
- Macedo, Tereza C. C.; Montagna, Erik; Trevisan, Camila M.; Zaia, Victor; Oliveira, Renato de; Barbosa, Caio P. et al. (2020): Prevalence of preeclampsia and eclampsia in adolescent pregnancy: A systematic review and meta-analysis of 291,247 adolescents worldwide since 1969. In: *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 248, S. 177–186. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2020.03.043.
- Magatti, Marta; Stefani, Francesca Romana; Papait, Andrea; Cargnoni, Anna; Masserdotti, Alice; Silini, Antonietta Rosa; Parolini, Ornella (2019): Perinatal Mesenchymal Stromal Cells and Their Possible Contribution to Fetal-Maternal Tolerance. In: *Cells* 8 (11). DOI: 10.3390/cells8111401.
- Magee, Laura A.; Brown, Mark A.; Hall, David R.; Gupte, Sanjay; Hennessy, Annemarie; Karumanchi, S. Ananth et al. (2022): The 2021 International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy classification, diagnosis & management recommendations for international practice. In: *Pregnancy hypertension* 27, S. 148–169. DOI: 10.1016/j.preghy.2021.09.008.

- Maiti, Kaushik; Sultana, Zakia; Aitken, Robert J.; Morris, Jonathan; Park, Felicity; Andrew, Bronwyn et al. (2017): Evidence that fetal death is associated with placental aging. In: *American journal of obstetrics and gynecology* 217 (4), 441.e1-441.e14. DOI: 10.1016/j.ajog.2017.06.015.
- Mao, Jueyi; Li, Cuifang; Wu, Feifeng; She, Zhou; Luo, Senlin; Chen, Xiaoyu et al. (2022): MSC-EVs transferring mitochondria and related components: A new hope for the treatment of kidney disease. In: *Frontiers in immunology* 13, S. 978571. DOI: 10.3389/fimmu.2022.978571.
- Marín, Reinaldo; Chiarello, Delia I.; Abad, Cilia; Rojas, Deliana; Toledo, Fernando; Sobrevia, Luis (2020): Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in early-onset and late-onset preeclampsia. In: *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease* 1866 (12), S. 165961. DOI: 10.1016/j.bbadis.2020.165961.
- Martinez-Fierro, Margarita L.; Garza-Veloz, Idalia; Gutierrez-Arteaga, Cristina; Delgado-Enciso, Ivan; Barbosa-Cisneros, Olga Y.; Flores-Morales, Virginia et al. (2018): Circulating levels of specific members of chromosome 19 microRNA cluster are associated with preeclampsia development. In: *Archives of gynecology and obstetrics* 297 (2), S. 365–371. DOI: 10.1007/s00404-017-4611-6.
- Mathew, Suja Ann; Naik, Charuta; Cahill, Paul A.; Bhonde, Ramesh R. (2020): Placental mesenchymal stromal cells as an alternative tool for therapeutic angiogenesis. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 77 (2), S. 253–265. DOI: 10.1007/s00018-019-03268-1.
- McAndrews, Kathleen M.; McGrail, Daniel J.; Ravikumar, Nithin; Dawson, Michelle R. (2015): Mesenchymal Stem Cells Induce Directional Migration of Invasive Breast Cancer Cells through TGF- β . In: *Scientific reports* 5, S. 16941. DOI: 10.1038/srep16941.
- McKenzie, Jennifer A.; Maschhoff, Clayton; Liu, Xiaochen; Migotsky, Nicole; Silva, Matthew J.; Gardner, Michael J. (2019): Activation of hedgehog signaling by systemic agonist improves fracture healing in aged mice. In: *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 37 (1), S. 51–59. DOI: 10.1002/jor.24017.
- McMurray, R. J.; Wann, A. K. T.; Thompson, C. L.; Connelly, J. T.; Knight, M. M. (2013): Surface topography regulates wnt signaling through control of primary cilia structure in mesenchymal stem cells. In: *Scientific reports* 3, S. 3545. DOI: 10.1038/srep03545.
- Meakin, Cassandra; Barrett, Emily S.; Aleksunes, Lauren M. (2022): Extravillous trophoblast migration and invasion: Impact of environmental chemicals and pharmaceuticals. In: *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)* 107, S. 60–68. DOI: 10.1016/j.reprotox.2021.11.008.
- Melchiorre, Karen; Giorgione, Veronica; Thilaganathan, Basky (2022): The placenta and preeclampsia: villain or victim? In: *American journal of obstetrics and gynecology* 226 (2S), S954-S962. DOI: 10.1016/j.ajog.2020.10.024.
- Meraviglia, Viviana; Vecellio, Matteo; Grasselli, Annalisa; Baccarin, Marco; Farsetti, Antonella; Capogrossi, Maurizio C. et al. (2012): Human chorionic villus mesenchymal

stromal cells reveal strong endothelial conversion properties. In: *Differentiation; research in biological diversity* 83 (5), S. 260–270. DOI: 10.1016/j.diff.2012.02.006.

Michalczyk, Michał; Celewicz, Aleksander; Celewicz, Marta; Woźniakowska-Gondek, Paula; Rzepka, Rafał (2020): The Role of Inflammation in the Pathogenesis of Preeclampsia. In: *Mediators of inflammation* 2020, S. 3864941. DOI: 10.1155/2020/3864941.

Mill, Pleasantine; Christensen, Søren T.; Pedersen, Lotte B. (2023): Primary cilia as dynamic and diverse signalling hubs in development and disease. In: *Nature reviews. Genetics* 24 (7), S. 421–441. DOI: 10.1038/s41576-023-00587-9.

Moffett, Ashley; Chazara, Olympe; Colucci, Francesco (2017): Maternal allo-recognition of the fetus. In: *Fertility and sterility* 107 (6), S. 1269–1272. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2017.05.001.

Molla-Herman, Anahi; Ghossoub, Rania; Blisnick, Thierry; Meunier, Alice; Serres, Catherine; Silbermann, Flora et al. (2010): The ciliary pocket: an endocytic membrane domain at the base of primary and motile cilia. In: *Journal of cell science* 123 (Pt 10), S. 1785–1795. DOI: 10.1242/jcs.059519.

Morales, Enrique; Galindo, Alberto; García, Leticia; Villalaín, Cecilia; Alonso, Marina; Gutiérrez, Eduardo et al. (2020): Eculizumab in Early-Stage Pregnancy. In: *Kidney international reports* 5 (12), S. 2383–2387. DOI: 10.1016/j.ekir.2020.09.045.

Morales-Prieto, D. M.; Chaiwangyen, W.; Ospina-Prieto, S.; Schneider, U.; Herrmann, J.; Gruhn, B.; Markert, U. R. (2012): MicroRNA expression profiles of trophoblastic cells. In: *Placenta* 33 (9), S. 725–734. DOI: 10.1016/j.placenta.2012.05.009.

Moser, G.; Gauster, M.; Orendi, K.; Glasner, A.; Theuerkauf, R.; Huppertz, B. (2010): Endoglandular trophoblast, an alternative route of trophoblast invasion? Analysis with novel confrontation co-culture models. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 25 (5), S. 1127–1136. DOI: 10.1093/humrep/deq035.

Moser, Gerit; Weiss, Gregor; Sundl, Monika; Gauster, Martin; Siwetz, Monika; Lang-Olip, Ingrid; Huppertz, Berthold (2017): Extravillous trophoblasts invade more than uterine arteries. Evidence for the invasion of uterine veins. In: *Histochemistry and cell biology* 147 (3), S. 353–366. DOI: 10.1007/s00418-016-1509-5.

Mueller, Daniel; Tascher, Georg; Damm, Georg; Nüssler, Andreas K.; Heinzle, Elmar; Noor, Fozia (2013): Real-time in situ viability assessment in a 3D bioreactor with liver cells using resazurin assay. In: *Cytotechnology* 65 (2), S. 297–305. DOI: 10.1007/s10616-012-9486-6.

Najar, Mehdi; Melki, Rahma; Khalife, Ferial; Lagneaux, Laurence; Bouhtit, Fatima; Moussa Agha, Douaa et al. (2021): Therapeutic Mesenchymal Stem/Stromal Cells: Value, Challenges and Optimization. In: *Frontiers in cell and developmental biology* 9, S. 716853. DOI: 10.3389/fcell.2021.716853.

Narang, Shinjini; Agarwal, Anjoo; Das, Vinita; Pandey, Amita; Agrawal, Smriti; Ali, Wahid (2016): Prediction of pre-eclampsia at 11-14 weeks of pregnancy using mean arterial pressure, uterine artery Doppler and pregnancy-associated plasma protein-A. In:

Int J Reprod Contracept Obstet Gynecol, S. 3948–3953. DOI: 10.18203/2320-1770.ijrcog20163869.

Natenzon, Anna; McFadden, Patrick; DaSilva-Arnold, Sonia C.; Zamudio, Stacy; Illsley, Nicholas P. (2022): Diminished trophoblast differentiation in early onset preeclampsia. In: *Placenta* 120, S. 25–31. DOI: 10.1016/j.placenta.2022.02.004.

Nguyen, Vien; Chavali, Manideep; Larphaveesarp, Amara; Kodali, Srikirti; Gonzalez, Ginez; Franklin, Robin J. M. et al. (2021): Neuroprotective effects of Sonic hedgehog agonist SAG in a rat model of neonatal stroke. In: *Pediatric research* 90 (6), S. 1161–1170. DOI: 10.1038/s41390-021-01408-7.

NICE guideline [DG49]. PLGF-based testing to help diagnose suspected preterm preeclampsia. (2021). Online verfügbar unter <https://www.nice.org.uk/guidance/dg49>, zuletzt geprüft am 31.08.2023.

Ning, Wenwen; Wu, Bin; Chen, Yijie; Lian, Jiejing; Chen, Yiming (2023): Role of microRNAs regulating trophoblast cell function in the pathogenesis of pre-eclampsia (Review). In: *Experimental and therapeutic medicine* 25 (1), S. 50. DOI: 10.3892/etm.2022.11749.

Nuzzo, A. M.; Giuffrida, D.; Zenerino, C.; Piazzese, A.; Olearo, E.; Todros, T.; Rolfo, A. (2014): JunB/cyclin-D1 imbalance in placental mesenchymal stromal cells derived from preeclamptic pregnancies with fetal-placental compromise. In: *Placenta* 35 (7), S. 483–490. DOI: 10.1016/j.placenta.2014.04.001.

Nuzzo, Anna Maria; Moretti, Laura; Mele, Paolo; Todros, Tullia; Eva, Carola; Rolfo, Alessandro (2022): Effect of Placenta-Derived Mesenchymal Stromal Cells Conditioned Media on an LPS-Induced Mouse Model of Preeclampsia. In: *International journal of molecular sciences* 23 (3). DOI: 10.3390/ijms23031674.

Ogge, Giovanna; Chaiworapongsa, Tinnakorn; Romero, Roberto; Hussein, Youssef; Kusanovic, Juan Pedro; Yeo, Lami et al. (2011): Placental lesions associated with maternal underperfusion are more frequent in early-onset than in late-onset preeclampsia. In: *Journal of perinatal medicine* 39 (6), S. 641–652. DOI: 10.1515/jpm.2011.098.

O'Gorman, Neil; Wright, David; Rolnik, Daniel L.; Nicolaides, Kypros H.; Poon, Liona C. (2016): Study protocol for the randomised controlled trial: combined multimarker screening and randomised patient treatment with ASpirin for evidence-based PREEclampsia prevention (ASPRE). In: *BMJ open* 6 (6), e011801. DOI: 10.1136/bmjopen-2016-011801.

Okae, Hiroaki; Toh, Hidehiro; Sato, Tetsuya; Hiura, Hitoshi; Takahashi, Sota; Shirane, Kenjiro et al. (2018): Derivation of Human Trophoblast Stem Cells. In: *Cell stem cell* 22 (1), 50–63.e6. DOI: 10.1016/j.stem.2017.11.004.

Ortiz-Cerda, Tamara; Mosso, Constanza; Alcludía, Ana; Vázquez-Román, Victoria; González-Ortiz, Marcelo (2023): Pathophysiology of Preeclampsia and L-Arginine/L-Citrulline Supplementation as a Potential Strategy to Improve Birth Outcomes. In: *Advances in experimental medicine and biology* 1428, S. 127–148. DOI: 10.1007/978-3-031-32554-0_6.

- Pan, Y. B.; Gong, Y.; Ruan, H. F.; Pan, L. Y.; Wu, X. K.; Tang, C. et al. (2015): Sonic hedgehog through Gli2 and Gli3 is required for the proper development of placental labyrinth. In: *Cell death & disease* 6 (2), e1653. DOI: 10.1038/cddis.2015.28.
- Panés, Julián; García-Olmo, Damián; van Assche, Gert; Colombel, Jean Frederic; Reinisch, Walter; Baumgart, Daniel C. et al. (2016): Expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells (Cx601) for complex perianal fistulas in Crohn's disease: a phase 3 randomised, double-blind controlled trial. In: *Lancet (London, England)* 388 (10051), S. 1281–1290. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)31203-X.
- Parada-Niño, Laura; Castillo-León, Luisa Fernanda; Morel, Adrien (2022): Preeclampsia, Natural History, Genes, and miRNAs Associated with the Syndrome. In: *Journal of pregnancy* 2022, S. 3851225. DOI: 10.1155/2022/3851225.
- Parolini, Ornella; Alviano, Francesco; Bagnara, Gian Paolo; Bilic, Grozdana; Bühring, Hans-Jörg; Evangelista, Marco et al. (2008): Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 26 (2), S. 300–311. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0594.
- Pavan, Laëtitia; Tarrade, Anne; Hermouet, Axelle; Delouis, Claude; Titeux, Mattias; Vidaud, Michel et al. (2003): Human invasive trophoblasts transformed with simian virus 40 provide a new tool to study the role of PPARgamma in cell invasion process. In: *Carcinogenesis* 24 (8), S. 1325–1336. DOI: 10.1093/carcin/bgg074.
- Peng, Pingping; Song, Huamei; Xie, Chenghong; Zheng, Wenfei; Ma, Huigai; Xin, Dandan et al. (2021): miR-146a-5p-mediated suppression on trophoblast cell progression and epithelial-mesenchymal transition in preeclampsia. In: *Biological research* 54 (1), S. 30. DOI: 10.1186/s40659-021-00351-5.
- Petca, Aida; Miron, Bianca Corina; Pacu, Irina; Dumitraşcu, Mihai Cristian; Mehedinţu, Claudia; Şandru, Florica et al. (2022): HELLP Syndrome-Holistic Insight into Pathophysiology. In: *Medicina (Kaunas, Lithuania)* 58 (2). DOI: 10.3390/medicina58020326.
- Pijnenborg, R.; Vercruyse, L.; Hanssens, M. (2006): The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. In: *Placenta* 27 (9-10), S. 939–958. DOI: 10.1016/j.placenta.2005.12.006.
- Pitaval, Amandine; Tseng, Qingzong; Bornens, Michel; Théry, Manuel (2010): Cell shape and contractility regulate ciliogenesis in cell cycle-arrested cells. In: *The Journal of cell biology* 191 (2), S. 303–312. DOI: 10.1083/jcb.201004003.
- Po, Agnese; Ferretti, Elisabetta; Miele, Evelina; Smaele, Enrico de; Paganelli, Arianna; Canettieri, Gianluca et al. (2010): Hedgehog controls neural stem cells through p53-independent regulation of Nanog. In: *The EMBO journal* 29 (15), S. 2646–2658. DOI: 10.1038/emboj.2010.131.
- Pola, R.; Ling, L. E.; Silver, M.; Corbley, M. J.; Kearney, M.; Blake Pepinsky, R. et al. (2001): The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors. In: *Nature medicine* 7 (6), S. 706–711. DOI: 10.1038/89083.

Polizio, Ariel H.; Chinchilla, Pilar; Chen, Xiaole; Kim, Sangbumn; Manning, David R.; Riobo, Natalia A. (2011): Heterotrimeric Gi proteins link Hedgehog signaling to activation of Rho small GTPases to promote fibroblast migration. In: *The Journal of biological chemistry* 286 (22), S. 19589–19596. DOI: 10.1074/jbc.M110.197111.

Pollheimer, Jürgen; Vondra, Sigrid; Baltayeva, Jennet; Beristain, Alexander Guillermo; Knöfler, Martin (2018): Regulation of Placental Extravillous Trophoblasts by the Maternal Uterine Environment. In: *Frontiers in immunology* 9, S. 2597. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02597.

Poon, Liona C.; Magee, Laura A.; Verlohren, Stefan; Shennan, Andrew; Dadelszen, Peter von; Sheiner, Eyal et al. (2021): A literature review and best practice advice for second and third trimester risk stratification, monitoring, and management of pre-eclampsia: Compiled by the Pregnancy and Non-Communicable Diseases Committee of FIGO (the International Federation of Gynecology and Obstetrics). In: *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics* 154 Suppl 1 (Suppl 1), S. 3–31. DOI: 10.1002/ijgo.13763.

Popielarczyk, Tracee L.; Huckle, William R.; Barrett, Jennifer G. (2019): Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Home via the PI3K-Akt, MAPK, and Jak/Stat Signaling Pathways in Response to Platelet-Derived Growth Factor. In: *Stem cells and development* 28 (17), S. 1191–1202. DOI: 10.1089/scd.2019.0003.

Pozarowski, Piotr; Darzynkiewicz, Zbigniew (2004): Analysis of cell cycle by flow cytometry. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 281, S. 301–311. DOI: 10.1385/1-59259-811-0:301.

Raleigh, David R.; Reiter, Jeremy F. (2019): Misactivation of Hedgehog signaling causes inherited and sporadic cancers. In: *The Journal of clinical investigation* 129 (2), S. 465–475. DOI: 10.1172/JCI120850.

Rauth, Sanchita; Karmakar, Saswati; Batra, Surinder K.; Ponnusamy, Moorthy P. (2021): Recent advances in organoid development and applications in disease modeling. In: *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer* 1875 (2), S. 188527. DOI: 10.1016/j.bbcan.2021.188527.

Ringden, Olle; Baygan, Arjang; Remberger, Mats; Gustafsson, Britt; Winiarski, Jacek; Khoein, Bitia et al. (2018): Placenta-Derived Decidua Stromal Cells for Treatment of Severe Acute Graft-Versus-Host Disease. In: *Stem cells translational medicine* 7 (4), S. 325–331. DOI: 10.1002/sctm.17-0167.

Ritter, Andreas; Friemel, Alexandra; Kreis, Nina-Naomi; Hoock, Samira Catharina; Roth, Susanne; Kielland-Kaisen, Ulrikke et al. (2018): Primary Cilia Are Dysfunctional in Obese Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. In: *Stem cell reports* 10 (2), S. 583–599. DOI: 10.1016/j.stemcr.2017.12.022.

Ritter, Andreas; Roth, Susanne; Kreis, Nina-Naomi; Friemel, Alexandra; Hoock, Samira Catharina; Steglich Souto, Alice et al. (2020): Primary Cilia in Trophoblastic Cells: Potential Involvement in Preeclampsia. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 76 (5), S. 1491–1505. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15433.

- Roberts, James M.; Bell, Mandy J. (2013): If we know so much about preeclampsia, why haven't we cured the disease? In: *Journal of Reproductive Immunology* 99 (1-2), S. 1–9. DOI: 10.1016/j.jri.2013.05.003.
- Roberts, James M.; Rich-Edwards, Janet W.; McElrath, Thomas F.; Garmire, Lana; Myatt, Leslie (2021a): Subtypes of Preeclampsia: Recognition and Determining Clinical Usefulness. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 77 (5), S. 1430–1441. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.14781.
- Roberts, R. Michael; Ezashi, Toshihiko; Schulz, Laura C.; Sugimoto, Jun; Schust, Danny J.; Khan, Teka; Zhou, Jie (2021b): Syncytins expressed in human placental trophoblast. In: *Placenta* 113, S. 8–14. DOI: 10.1016/j.placenta.2021.01.006.
- Roberts, V. H. J.; Morgan, T. K.; Bednarek, P.; Morita, M.; Burton, G. J.; Lo, J. O.; Frias, A. E. (2017): Early first trimester uteroplacental flow and the progressive disintegration of spiral artery plugs: new insights from contrast-enhanced ultrasound and tissue histopathology. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 32 (12), S. 2382–2393. DOI: 10.1093/humrep/dex301.
- Rodriguez, Luis G.; Wu, Xiaoyang; Guan, Jun-Lin (2005): Wound-healing assay. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 294, S. 23–29. DOI: 10.1385/1-59259-860-9:023.
- Rolfo, Alessandro; Giuffrida, Domenica; Nuzzo, Anna Maria; Pierobon, Daniele; Cardaropoli, Simona; Piccoli, Ettore et al. (2013): Pro-inflammatory profile of preeclamptic placental mesenchymal stromal cells: new insights into the etiopathogenesis of preeclampsia. In: *PloS one* 8 (3), e59403. DOI: 10.1371/journal.pone.0059403.
- Rolnik, Daniel L.; Nicolaides, Kypros H.; Poon, Liona C. (2022): Prevention of preeclampsia with aspirin. In: *American journal of obstetrics and gynecology* 226 (2S), S1108-S1119. DOI: 10.1016/j.ajog.2020.08.045.
- Romberg, Sophia Indira; Kreis, Nina-Naomi; Friemel, Alexandra; Roth, Susanne; Souto, Alice Steglich; Hoock, Samira Catharina et al. (2022): Human placental mesenchymal stromal cells are ciliated and their ciliation is compromised in preeclampsia. In: *BMC Medicine* 20. DOI: 10.1186/s12916-021-02203-1.
- Sakowicz, Agata; Bralewska, Michalina; Kamola, Piotr; Pietrucha, Tadeusz (2022): Reliability of Rodent and Rabbit Models in Preeclampsia Research. In: *International journal of molecular sciences* 23 (22). DOI: 10.3390/ijms232214344.
- Sánchez-Lanzas, Jiménez-Pompa, Ganuza (2024): The evolving hematopoietic niche during development. In *Frontiers in Molecular Biosciences* 11:1488199. DOI: 10.3389/fmolb.2024.1488199.
- Santhosh K. Ghadge; Silke Mühlstedt; Cemil Özcelik; Michael Bader (2011): SDF-1 α as a therapeutic stem cell homing factor in myocardial infarction.
- Sato, Yukiyasu (2020): Endovascular trophoblast and spiral artery remodeling. In: *Molecular and cellular endocrinology* 503, S. 110699. DOI: 10.1016/j.mce.2019.110699.

- Schlembach et al. (2019): S2k-Leitlinie Hypertensive Schwangerschaftserkrankungen: Diagnostik und Therapie. In: *Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG)* (Registernummer 015 - 018).
- Senatore, Emanuela; Iannucci, Rosa; Chiuso, Francesco; Delle Donne, Rossella; Rinaldi, Laura; Feliciello, Antonio (2022): Pathophysiology of Primary Cilia: Signaling and Proteostasis Regulation. In: *Frontiers in cell and developmental biology* 10, S. 833086. DOI: 10.3389/fcell.2022.833086.
- Shen, Deyi; Xia, Yuwei; Fu, Yuhan; Cao, Qiaochang; Chen, Wenqian; Zhu, Ying et al. (2024): Hedgehog pathway and cancer: A new area (Review). In: *Oncology reports* 52 (3). DOI: 10.3892/or.2024.8775.
- Sheng, Mingwei; Lin, Yuanbang; Xu, Dongwei; Tian, Yizhu; Zhan, Yongqiang; Li, Changyong et al. (2021): CD47-Mediated Hedgehog/SMO/GLI1 Signaling Promotes Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation in Mouse Liver Inflammation. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 74 (3), S. 1560–1577. DOI: 10.1002/hep.31831.
- Sheridan, Megan A.; Fernando, Ridma C.; Gardner, Lucy; Hollinshead, Michael S.; Burton, Graham J.; Moffett, Ashley; Turco, Margherita Y. (2020): Establishment and differentiation of long-term trophoblast organoid cultures from the human placenta. In: *Nature protocols* 15 (10), S. 3441–3463. DOI: 10.1038/s41596-020-0381-x.
- Shi, HaoRan; Yang, Zejun; Cui, Jianjian; Tao, Hui; Ma, Ruilin; Zhao, Yin (2024): Mesenchymal stem cell-derived exosomes: a promising alternative in the therapy of preeclampsia. In: *Stem cell research & therapy* 15 (1), S. 30. DOI: 10.1186/s13287-024-03652-0.
- Silini, Antonietta Rosa; Di Pietro, Roberta; Lang-Olip, Ingrid; Alviano, Francesco; Banerjee, Asmita; Basile, Mariangela et al. (2020): Perinatal Derivatives: Where Do We Stand? A Roadmap of the Human Placenta and Consensus for Tissue and Cell Nomenclature. In: *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 8, S. 610544. DOI: 10.3389/fbioe.2020.610544.
- Song, Na; Scholtemeijer, Martijn; Shah, Khalid (2020): Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation: Mechanisms and Therapeutic Potential. In: *Trends in pharmacological sciences* 41 (9), S. 653–664. DOI: 10.1016/j.tips.2020.06.009.
- Soni, Sharanam; Stevens, Adam; Batra, Gauri; Heazell, Alexander E. P. (2024): Characterising delayed villous maturation: A narrative literature review. In: *Placenta* 158, S. 48–56. DOI: 10.1016/j.placenta.2024.09.020.
- Soto, Eleazar; Romero, Roberto; Kusanovic, Juan Pedro; Ogge, Giovanna; Hussein, Youssef; Yeo, Lami et al. (2012): Late-onset preeclampsia is associated with an imbalance of angiogenic and anti-angiogenic factors in patients with and without placental lesions consistent with maternal underperfusion. In: *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians* 25 (5), S. 498–507. DOI: 10.3109/14767058.2011.591461.

- Staff, Anne Cathrine (2019): The two-stage placental model of preeclampsia: An update. In: *Journal of Reproductive Immunology* 134-135, S. 1–10. DOI: 10.1016/j.jri.2019.07.004.
- Staff, Anne Cathrine; Fjeldstad, Heidi E.; Fosheim, Ingrid Knutsdotter; Moe, Kjartan; Turowski, Gitta; Johnsen, Guro Mørk et al. (2022): Failure of physiological transformation and spiral artery atherosclerosis: their roles in preeclampsia. In: *American journal of obstetrics and gynecology* 226 (2S), S895-S906. DOI: 10.1016/j.ajog.2020.09.026.
- Steigman, Shaun A.; Fauza, Dario O. (2007): Isolation of mesenchymal stem cells from amniotic fluid and placenta. In: *Current protocols in stem cell biology* Chapter 1, Unit 1E.2. DOI: 10.1002/9780470151808.sc01e02s1.
- Stepan, H.; Galindo, A.; Hund, M.; Schlembach, D.; Sillman, J.; Surbek, D.; Vatish, M. (2023): Clinical utility of sFlt-1 and PlGF in screening, prediction, diagnosis and monitoring of pre-eclampsia and fetal growth restriction. In: *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 61 (2), S. 168–180. DOI: 10.1002/uog.26032.
- Sun, Cherry; Chamley, Lawrence W.; James, Joanna L. (2024): Organoid generation from trophoblast stem cells highlights distinct roles for cytotrophoblasts and stem cells in organoid formation and expansion. In: *Placenta*. DOI: 10.1016/j.placenta.2024.12.003.
- Szarka, András; Rigó, János; Lázár, Levente; Beko, Gabriella; Molvarec, Attila (2010): Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array. In: *BMC immunology* 11, S. 59. DOI: 10.1186/1471-2172-11-59.
- Takam Kamga, Paul; Bazzoni, Riccardo; Dal Collo, Giada; Cassaro, Adriana; Tanasi, Ilaria; Russignan, Anna et al. (2020): The Role of Notch and Wnt Signaling in MSC Communication in Normal and Leukemic Bone Marrow Niche. In: *Frontiers in cell and developmental biology* 8, S. 599276. DOI: 10.3389/fcell.2020.599276.
- Takao, Daisuke; Verhey, Kristen J. (2016): Gated entry into the ciliary compartment. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 73 (1), S. 119–127. DOI: 10.1007/s00018-015-2058-0.
- Tan, Kok Hian; Tan, Soon Sim; Ng, Mor Jack; Tey, Wan Shi; Sim, Wei Kian; Allen, John Carson; Lim, Sai Kiang (2017): Extracellular vesicles yield predictive pre-eclampsia biomarkers. In: *Journal of extracellular vesicles* 6 (1), S. 1408390. DOI: 10.1080/20013078.2017.1408390.
- Tang, Chao; Mei, Liu; Pan, Liyu; Xiong, Wenyi; Zhu, Haibin; Ruan, Hongfeng et al. (2015): Hedgehog signaling through GLI1 and GLI2 is required for epithelial-mesenchymal transition in human trophoblasts. In: *Biochimica et biophysica acta* 1850 (7), S. 1438–1448. DOI: 10.1016/j.bbagen.2015.04.005.
- Tani, Kazumasa; Mitsui, Takashi; Mishima, Sakurako; Ohira, Akiko; Maki, Jota; Eto, Eriko et al. (2021): EG-VEGF Induces Invasion of a Human Trophoblast Cell Line via PROKR2. In: *Acta medica Okayama* 75 (6), S. 677–684. DOI: 10.18926/AMO/62806.

- Tannetta, Dionne; Masliukaite, Ieva; Vatish, Manu; Redman, Christopher; Sargent, Ian (2017): Update of syncytiotrophoblast derived extracellular vesicles in normal pregnancy and preeclampsia. In: *Journal of Reproductive Immunology* 119, S. 98–106. DOI: 10.1016/j.jri.2016.08.008.
- Terry, D. E.; Chopra, R. K.; Ovenden, J.; Anastassiades, T. P. (2000): Differential use of Alcian blue and toluidine blue dyes for the quantification and isolation of anionic glycoconjugates from cell cultures: application to proteoglycans and a high-molecular-weight glycoprotein synthesized by articular chondrocytes. In: *Analytical biochemistry* 285 (2), S. 211–219. DOI: 10.1006/abio.2000.4761.
- Than, Nándor Gábor; Romero, Roberto; Györffy, Dániel; Posta, Máté; Bhatti, Gaurav; Done, Bogdan et al. (2023): Molecular subclasses of preeclampsia characterized by a longitudinal maternal proteomics study: distinct biomarkers, disease pathways and options for prevention. In: *Journal of perinatal medicine* 51 (1), S. 51–68. DOI: 10.1515/jpm-2022-0433.
- Thilaganathan, Basky; Kalafat, Erkan (2019): Cardiovascular System in Preeclampsia and Beyond. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 73 (3), S. 522–531. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11191.
- Thomas, Sachin; Jaganathan, Bithiah Grace (2022): Signaling network regulating osteogenesis in mesenchymal stem cells. In: *Journal of cell communication and signaling* 16 (1), S. 47–61. DOI: 10.1007/s12079-021-00635-1.
- Toth, Marta; Sohail, Anjum; Fridman, Rafael (2012): Assessment of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by gelatin zymography. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 878, S. 121–135. DOI: 10.1007/978-1-61779-854-2_8.
- Tummala, Padmaja; Arnsdorf, Emily J.; Jacobs, Christopher R. (2010): The Role of Primary Cilia in Mesenchymal Stem Cell Differentiation. A Pivotal Switch in Guiding Lineage Commitment. In: *Cellular and molecular bioengineering* 3 (3), S. 207–212. DOI: 10.1007/s12195-010-0127-x.
- Turanov, Anton A.; Lo, Agnes; Hassler, Matthew R.; Makris, Angela; Ashar-Patel, Ami; Alterman, Julia F. et al. (2018): RNAi modulation of placental sFLT1 for the treatment of preeclampsia. In: *Nature biotechnology*. DOI: 10.1038/nbt.4297.
- Turbeville, Hannah R.; Sasser, Jennifer M. (2020): Preeclampsia beyond pregnancy: long-term consequences for mother and child. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 318 (6), F1315-F1326. DOI: 10.1152/ajprenal.00071.2020.
- Turco, Margherita Y.; Gardner, Lucy; Kay, Richard G.; Hamilton, Russell S.; Prater, Malwina; Hollinshead, Michael S. et al. (2018): Trophoblast organoids as a model for maternal-fetal interactions during human placentation. In: *Nature* 564 (7735), S. 263–267. DOI: 10.1038/s41586-018-0753-3.
- Turco, Margherita Y.; Moffett, Ashley (2019): Development of the human placenta. In: *Development (Cambridge, England)* 146 (22). DOI: 10.1242/dev.163428.
- Uriel, Montserrat; Romero Infante, Ximena Carolina; Rincón Franco, Sara; Ibáñez Pinilla, Edgar Antonio; Rojas, Nydia Alexandra (2023): Higher PAPP-A Values in Pregnant Women Complicated with Preeclampsia Than with Gestational Hypertension.

- In: *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)* 30 (8), S. 2503–2511. DOI: 10.1007/s43032-023-01176-1.
- Varberg, Kaela M.; Dominguez, Esteban M.; Koseva, Boryana; Varberg, Joseph M.; McNally, Ross P.; Moreno-Irusta, Ayelen et al. (2023): Extravillous trophoblast cell lineage development is associated with active remodeling of the chromatin landscape. In: *Nature communications* 14 (1), S. 4826. DOI: 10.1038/s41467-023-40424-5.
- Ventura Ferreira, Mónica S.; Bienert, Michaela; Müller, Katrin; Rath, Björn; Goecke, Tamme; Opländer, Christian et al. (2018): Comprehensive characterization of chorionic villi-derived mesenchymal stromal cells from human placenta. In: *Stem cell research & therapy* 9 (1), S. 28. DOI: 10.1186/s13287-017-0757-1.
- Vigneron, Suzanne; Sundermann, Lena; Labbé, Jean-Claude; Pintard, Lionel; Radulescu, Ovidiu; Castro, Anna; Lorca, Thierry (2018): Cyclin A-cdk1-Dependent Phosphorylation of Bora Is the Triggering Factor Promoting Mitotic Entry. In: *Developmental cell* 45 (5), 637-650.e7. DOI: 10.1016/j.devcel.2018.05.005.
- Wakeland, Anna K.; Soncin, Francesca; Moretto-Zita, Matteo; Chang, Ching-Wen; Horii, Mariko; Pizzo, Don et al. (2017): Hypoxia Directs Human Extravillous Trophoblast Differentiation in a Hypoxia-Inducible Factor-Dependent Manner. In: *The American journal of pathology* 187 (4), S. 767–780. DOI: 10.1016/j.ajpath.2016.11.018.
- Walia, Vijay; Cuenca, Adrian; Vetter, Melanie; Insinna, Christine; Perera, Sumeth; Lu, Quanlong et al. (2019): Akt Regulates a Rab11-Effector Switch Required for Ciliogenesis. In: *Developmental cell* 50 (2), 229-246.e7. DOI: 10.1016/j.devcel.2019.05.022.
- Wallace, Alison E.; Fraser, Rupsha; Cartwright, Judith E. (2012): Extravillous trophoblast and decidual natural killer cells. A remodelling partnership. In: *Human reproduction update* 18 (4), S. 458–471. DOI: 10.1093/humupd/dms015.
- Waller, Jamarius P.; Howell, John Aaron; Peterson, Hali; George, Eric M.; Bidwell, Gene L. (2021): Elastin-Like Polypeptide: VEGF-B Fusion Protein for Treatment of Preeclampsia. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 78 (6), S. 1888–1901. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.17713.
- Walsh, Scott W.; Strauss, Jerome F. (2022): Pregnancy-specific expression of protease-activated receptor 1: a therapeutic target for prevention and treatment of preeclampsia? In: *American journal of obstetrics and gynecology* 226 (2S), S945-S953. DOI: 10.1016/j.ajog.2021.11.1367.
- Wan, Zhuo; Zhao, Lianbi; Lu, Fan; Gao, Xiaotong; Dong, Yan; Zhao, Yingxin et al. (2020): Mononuclear phagocyte system blockade improves therapeutic exosome delivery to the myocardium. In: *Theranostics* 10 (1), S. 218–230. DOI: 10.7150/thno.38198.
- Wang, Chia-Yih; Tsai, Hui-Ling; Syu, Jhih-Siang; Chen, Ting-Yu; Su, Mei-Tsz (2017): Primary Cilium-Regulated EG-VEGF Signaling Facilitates Trophoblast Invasion. In: *Journal of cellular physiology* 232 (6), S. 1467–1477. DOI: 10.1002/jcp.25649.
- Wang, Chia-Yih; Tsai, Pei-Yin; Chen, Ting-Yu; Tsai, Hui-Ling; Kuo, Pao-Lin; Su, Mei-Tsz (2019): Elevated miR-200a and miR-141 inhibit endocrine gland-derived

- vascular endothelial growth factor expression and ciliogenesis in preeclampsia. In: *The Journal of physiology* 597 (12), S. 3069–3083. DOI: 10.1113/JP277704.
- Wang, Hui; Ning, Xiufan; Zhao, Feng; Zhao, Hui; Li, Dong (2024): Human organoids-on-chips for biomedical research and applications. In: *Theranostics* 14 (2), S. 788–818. DOI: 10.7150/thno.90492.
- Wang, Xianyun; Tang, Yida; Liu, Zhao; Yin, Yajuan; Li, Quanhai; Liu, Gang; Yan, Baoyong (2021a): The Application Potential and Advance of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes in Myocardial Infarction. In: *Stem Cells International* 2021, S. 5579904. DOI: 10.1155/2021/5579904.
- Wang, Yaping; Fan, Hongye; Zhao, Guangfeng; Liu, Dan; Du, Leilei; Wang, Zhiqun et al. (2012): miR-16 inhibits the proliferation and angiogenesis-regulating potential of mesenchymal stem cells in severe pre-eclampsia. In: *The FEBS journal* 279 (24), S. 4510–4524. DOI: 10.1111/febs.12037.
- Wang, Zheng; Zhao, Gongxiao; Zeng, Ming; Feng, Weiyi; Liu, Jinjun (2021b): Overview of extracellular vesicles in the pathogenesis of preeclampsia†. In: *Biology of reproduction* 105 (1), S. 32–39. DOI: 10.1093/biolre/ioab060.
- Weiss, Gregor; Sundl, Monika; Glasner, Andreas; Huppertz, Berthold; Moser, Gerit (2016): The trophoblast plug during early pregnancy. A deeper insight. In: *Histochemistry and cell biology* 146 (6), S. 749–756. DOI: 10.1007/s00418-016-1474-z.
- Willems, Estelle; Dedobbeleer, Matthias; Digregorio, Marina; Lombard, Arnaud; Lumapat, Paul Noel; Rogister, Bernard (2018): The functional diversity of Aurora kinases: a comprehensive review. In: *Cell division* 13, S. 7. DOI: 10.1186/s13008-018-0040-6.
- Wojczakowski, Wiktor; Kimber-Trojnar, Żaneta; Dziwisz, Filip; Słodzińska, Magdalena; Słodziński, Hubert; Leszczyńska-Gorzela, Bożena (2021): Preeclampsia and Cardiovascular Risk for Offspring. In: *Journal of Clinical Medicine* 10 (14). DOI: 10.3390/jcm10143154.
- Woo Kinshella, Mai-Lei; Sarr, Catherine; Sandhu, Akshdeep; Bone, Jeffrey N.; Vidler, Marianne; Moore, Sophie E. et al. (2022): Calcium for pre-eclampsia prevention: A systematic review and network meta-analysis to guide personalised antenatal care. In: *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* 129 (11), S. 1833–1843. DOI: 10.1111/1471-0528.17222.
- Wu, Ze; Fang, Lanlan; Yang, Sizhu; Gao, Yibo; Wang, Zhen; Meng, Qingxue et al. (2022): GDF-11 promotes human trophoblast cell invasion by increasing ID2-mediated MMP2 expression. In: *Cell communication and signaling : CCS* 20 (1), S. 89. DOI: 10.1186/s12964-022-00899-z.
- Xourgia, Eleni; Tektonidou, Maria G. (2022): An Update on Antiphospholipid Syndrome. In: *Current rheumatology reports* 23 (12), S. 84. DOI: 10.1007/s11926-021-01051-5.
- Xu, Meng; Feng, Tao; Liu, Bowen; Qiu, Fen; Xu, Youhua; Zhao, Yonghua; Zheng, Ying (2021): Engineered exosomes: desirable target-tracking characteristics for

- cerebrovascular and neurodegenerative disease therapies. In: *Theranostics* 11 (18), S. 8926–8944. DOI: 10.7150/thno.62330.
- Xunian, Zhou; Kalluri, Raghu (2020): Biology and therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived exosomes. In: *Cancer science* 111 (9), S. 3100–3110. DOI: 10.1111/cas.14563.
- Yanardag, Sila; Pugacheva, Elena N. (2021): Primary Cilium Is Involved in Stem Cell Differentiation and Renewal through the Regulation of Multiple Signaling Pathways. In: *Cells* 10 (6). DOI: 10.3390/cells10061428.
- Yang, Chuyu; Baker, Philip N.; Granger, Joey P.; Davidge, Sandra T.; Tong, Chao (2023): Long-Term Impacts of Preeclampsia on the Cardiovascular System of Mother and Offspring. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 80 (9), S. 1821–1833. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.123.21061.
- Yang, Liheng; Semmes, Eleanor C.; Ovies, Cristian; Megli, Christina; Permar, Sallie; Gilner, Jennifer B.; Coyne, Carolyn B. (2022a): Innate immune signaling in trophoblast and decidua organoids defines differential antiviral defenses at the maternal-fetal interface. In: *eLife* 11. DOI: 10.7554/eLife.79794.
- Yang, Xiaohui; Tian, Shifeng; Fan, Linlin; Niu, Rui; Yan, Man; Chen, Shuo et al. (2022b): Integrated regulation of chondrogenic differentiation in mesenchymal stem cells and differentiation of cancer cells. In: *Cancer Cell International* 22. DOI: 10.1186/s12935-022-02598-8.
- Yew, Tu-Lai; Hung, Yeh-Ting; Li, Hsin-Yang; Chen, Hsin-Wei; Chen, Ling-Lan; Tsai, Kuo-Shu et al. (2011): Enhancement of wound healing by human multipotent stromal cell conditioned medium: the paracrine factors and p38 MAPK activation. In: *Cell transplantation* 20 (5), S. 693–706. DOI: 10.3727/096368910X550198.
- You, Jiali; Wang, Wei; Chang, Hsun-Ming; Yi, Yuyin; Zhao, Hongjin; Zhu, Hua et al. (2021): The BMP2 Signaling Axis Promotes Invasive Differentiation of Human Trophoblasts. In: *Frontiers in cell and developmental biology* 9, S. 607332. DOI: 10.3389/fcell.2021.607332.
- Yu, Shuaitong; Guo, Jinqiang; Sun, Zheyi; Lin, Chujiao; Tao, Huangheng; Zhang, Qian et al. (2021): BMP2-dependent gene regulatory network analysis reveals Klf4 as a novel transcription factor of osteoblast differentiation. In: *Cell death & disease* 12 (2), S. 197. DOI: 10.1038/s41419-021-03480-7.
- Zavala, Gabriela; Prieto, Catalina P.; Villanueva, Andrea A.; Palma, Verónica (2017): Sonic hedgehog (SHH) signaling improves the angiogenic potential of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells (WJ-MSC). In: *Stem cell research & therapy* 8 (1), S. 203. DOI: 10.1186/s13287-017-0653-8.
- Zeisler, Harald; Llurba, Elisa; Chantraine, Frederic; Vatish, Manu; Staff, Anne Cathrine; Sennström, Maria et al. (2016): Predictive Value of the sFlt-1:PlGF Ratio in Women with Suspected Preeclampsia. In: *The New England journal of medicine* 374 (1), S. 13–22. DOI: 10.1056/NEJMoa1414838.
- Zeldovich, Varvara B.; Clausen, Casper H.; Bradford, Emily; Fletcher, Daniel A.; Maltepe, Emin; Robbins, Jennifer R.; Bakardjiev, Anna I. (2013): Placental syncytium

forms a biophysical barrier against pathogen invasion. In: *PLoS pathogens* 9 (12), e1003821. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003821.

Zhang, Han; Chen, Zheng; Neelapu, Sattva S.; Romaguera, Jorge; McCarty, Nami (2016): Hedgehog inhibitors selectively target cell migration and adhesion of mantle cell lymphoma in bone marrow microenvironment. In: *Oncotarget* 7 (12), S. 14350–14365. DOI: 10.18632/oncotarget.7320.

Zhang, Yang; Zhong, Yanqi; Zou, Li; Liu, Xiaoxia (2022): Significance of Placental Mesenchymal Stem Cell in Placenta Development and Implications for Preeclampsia. In: *Frontiers in Pharmacology* 13, S. 896531. DOI: 10.3389/fphar.2022.896531.

Zhang, Yuhong; Zhang, Yangjia (2018): Forkhead box C2 promotes the invasion ability of human trophoblast cells through Hedgehog (Hh) signaling pathway. In: *Cell biology international* 42 (7), S. 859–866. DOI: 10.1002/cbin.10953.

Zhu, Haibin; Zou, Chaochun; Fan, Xueying; Xiong, Wenyi; Tang, Lanfang; Wu, Ximei; Tang, Chao (2016): Up-regulation of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Expression by Hedgehog Ligand Contributes to the Conversion of Cortisol Into Cortisone. In: *Endocrinology* 157 (9), S. 3529–3539. DOI: 10.1210/en.2016-1286.

Zhuang, Bai-Mei; Cao, Dan-Dan; Li, Tian-Xi; Liu, Xiao-Feng; Lyu, Min-Min; Wang, Si-Dong et al. (2023): Single-cell characterization of self-renewing primary trophoblast organoids as modeling of EVT differentiation and interactions with decidual natural killer cells. In: *BMC genomics* 24 (1), S. 618. DOI: 10.1186/s12864-023-09690-x.

Zou, Xue; Yuan, Meng; Zhang, Tongyu; Zheng, Nan; Wu, Zhiwei (2021): EVs Containing Host Restriction Factor IFITM3 Inhibited ZIKV Infection of Fetuses in Pregnant Mice through Trans-placenta Delivery. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 29 (1), S. 176–190. DOI: 10.1016/j.ymthe.2020.09.026.

9 Publikationsverzeichnis

Romberg, Sophia Indira; Kreis, Nina-Naomi; Friemel, Alexandra; Roth, Susanne; Steglich Souto, Alice; Hooek, Samira Catharina; Fischer, Kyra; Nowak, Thorsten; Solbach, Christine; Louwen, Frank; Ritter, Andreas; Yuan, Juping (2022): Human placental mesenchymal stromal cells are ciliated and their ciliation is compromised in preeclampsia. In: *BMC Medicine* 20:35. DOI: 10.1186/s12916-021-02203-1

10 Danksagung

Allen voran danke ich Frau Prof. Dr. Juping Yuan, dass sie mir die Möglichkeit eingeräumt hat, in ihrem Team mitzuforschen. Dadurch erhielt ich einen umfassenden und nachhaltigen Einblick in die Grundlagenforschung, der mein Verständnis für die wissenschaftlichen Zusammenhänge vertieft hat und den ich nicht hätte missen wollen. Ihre kritischen Nachfragen und konstruktiven Vorschläge haben die Projektarbeit maßgeblich geprägt und vorangebracht.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. Tikkanen für die geduldige und kompetente universitätsinterne Betreuung bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit wesentlich beigetragen hat.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Andreas Ritter, der die Finanzierung für das tolle Projekt, an dem ich mitwirken durfte, sichergestellt hat. Er hat mich geduldig betreut und mir bei allen auftretenden Problemen tatkräftig zur Seite gestanden. Durch ihn wurde mir der Zugang zur Laborarbeit und zum wissenschaftlichen Arbeiten auf angenehme und verständliche Weise eröffnet.

Ich möchte mich auch bei Prof. Dr. Louwen und seinem geburtshilflichen Team für die klinische Koordination und die Bereitstellung der Gewebeproben bedanken. Ebenso danke ich Herrn Dr. Nowak und seinem Team für die Bereitstellung der Gewebeproben aus der frühen Schwangerschaft.

Ein herzliches Dankeschön geht an Susanne Roth für ihre stets hilfreiche Unterstützung und ihre wertvollen Tipps bei der Durchführung der Experimente.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Nina-Naomi Kreis und Alexandra Friemel, die mich nicht nur in die Laborarbeit eingearbeitet, sondern mir auch darüber hinaus wertvolle Unterstützung geboten haben.

Auch meiner Doktoranden Kollegin Julia und meinem Doktoranden Kollegen Ha Hyung, die zur gleichen Zeit im Labor tätig waren, möchte ich für die gute und kollegiale Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Experimente danken. Sie haben die Zeit bei der Laborarbeit humorvoll und scharfsinnig bereichert und mich auf die alltägliche Laborarbeit freuen lassen.

Meinen tiefsten Dank richte ich an meine Mutter, die mich auf meinen pendelnden Strecken, die gelegentlich von Bauarbeiten unterbrochen waren, mit häufigen

Telefonaten bei Laune gehalten hat. Ebenso danke ich meinem Vater, der mir mit seiner unerschütterlichen Ruhe und Gelassenheit in stressigen Phasen geholfen hat, ausgeglichen zu bleiben.

Ein weiterer Dank geht an meinen Studienkollegen Arslan Magomedov, der mich mit überzeugenden Argumenten für die Idee einer experimentellen Arbeit begeistern konnte. Beim gemeinsamen Schreiben in der Bibliothek hat er meine Motivation für den Schreibprozess aufrechterhalten und mich mental unterstützt.

Ein besonderer Dank gilt meinem Lebenspartner Alexandros Konstantinidis, der mich während der letzten Phase des Schreibprozesses mit großer Geduld und unermüdlicher Unterstützung begleitet hat.

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.

11 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Ort/ Datum

Unterschrift