

Fabian Kießling
Dr. med.

ECV 304: eine polare humane Endothelzelllinie?

Geboren am 16.08.1972 in Mannheim
Reifeprüfung am 19.05.1992 in Heidelberg
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1993/94 bis SS 2000
Physikum am 1.04.1996 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr im KKH Schwetzingen (Univ. Heidelberg)
Staatsexamen am 23.10.2000 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin, Abt. Kardiologie
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Christlieb Haller

ECV 304-Zellen wurden 1990 als spontan immortalisierte Endothelzellen aus der menschlichen Nabelschnurvene beschrieben und seitdem als endotheliales Zellkulturmodell eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung dieser Zelllinie als Zellkulturmodell für die Erforschung der endothelialen Zellpolarität getestet. Unter Zellpolarität versteht man die aufgabengerichtete Spezialisierung apikaler, lateraler und basaler Plasmamembranabschnitte sowie die Fähigkeit der Zelle, Substanzen polar zu sezernieren.

ECV 304-Zellen weisen etliche endotheliale Charakteristika auf: In der Phasenkontrastmikroskopie erscheinen ECV 304-Zellen flach mit einer endothelialen Morphologie. Sie bilden dichte konfluente Zellverbände ohne erkennbare Lücken. Die endotheltypischen Proteine Thrombomodulin, ICAM, VCAM, CD51 und Vimentin konnten in ECV 304-Zellen nachgewiesen werden. Außerdem besitzen ECV 304-Zellen ein dichtes Netz subplasmalemaler Aktinfilamente in Kolokalisation mit Cadherinen und stress-fibers. ECV 304-Zellen nehmen azetyliertes LDL über den scavenger receptor intrazellulär auf und setzen Endothelin, PAI-1 und VEGF frei.

Die Sekretion von VEGF war nur bei ECV 304-Zellen, nicht aber bei HUVECs in Postprimärkultur nachweisbar.

Zur Untersuchung der Polarität des ECV 304-Zellkulturmodells wurde die Expression der heterologen Plasmamembranproteine Influenzahämagglutinin, Uvomorulin und des menschlichen Lymphozytenoberflächenmarkers CD7 analysiert. Für jedes dieser Proteine ist die Membranlokalisierung in Epithelzellen bekannt. Immunfluoreszenzmikroskopie, konfokale Laserfluoreszenzmikroskopie und Immunelektronenmikroskopie zeigten, daß Hämagglutinin apikal, Uvomorulin lateral und CD7 auf der gesamten Plasmamembranoberfläche der ECV 304-Zellen lokalisiert ist. Diese Lokalisation entspricht der Oberflächenverteilung in epithelialen Zellsystemen. Somit besitzen ECV 304-Zellen eindeutig die Fähigkeit zur polaren Proteinexpression.

Eine Voraussetzung für den polaren Zellphänotyp ist die Ausbildung spezialisierter interzellulärer Kontakte, welche die Plasmamembran in apikale, laterale und basale Abschnitte unterteilen. Die Funktion interzellulärer Kontakte bei ECV 304-Zellen wurde durch die Permeabilitätstestung für Inulin oder Dextran sowie durch Messung des elektrischen Widerstands geprüft.

Wie in epithelialen Zellsystemen führte der Entzug extrazellulären Kalziums durch EGTA zu einer Öffnung der Zellkontakte, welche durch Normalisierung der extrazellulären Kalziumkonzentration reversibel war. Die Behandlung der Zellen mit EGTA führte außerdem zu einer verminderten Endothelin- und vermehrten VEGF-Freisetzung.

Die eingehende strukturelle Analyse der interzellulären Kontakte zeigte Unterschiede zwischen der permanenten Zelllinie ECV 304 und HUVECs in Primärkultur. ECV 304-Zellen exprimieren das epitheliale E-Cadherin, während ihnen das spezifisch endotheliale VE-Cadherin, welches in HUVECs vorliegt, fehlt. Neben dem epithelialen E-Cadherin weisen ECV 304-Zellen epithelähnliche Interzellulärkontakte auf: ECV 304-Zellen bilden Maculae adhaerentes (Desmosomen) mit den epitheltypischen Zytokeratinen 8 und 18, welche in Endothelzellen nicht regelhaft vorkommen. Allerdings sind bei ECV 304-Zellen die Maculae adhaerentes (Desmosomen) nicht wie bei Epithelzellen Bestandteil geordneter Kontaktkomplexe in direkter morphologisch-funktioneller Beziehung zu Zonulae occludentes (tight junctions). Vielmehr sind die Desmosomen unabhängig von anderen spezialisierten Zellkontakten.

Zusammenfassend zeigen die Befunde dieser Arbeit, daß die humane Zelllinie ECV 304 viele endotheliale Merkmale aufweist und polare Zellmonolayers *in vitro* bildet. Heterologe Proteine werden in epitheltypischer polarer Lokalisation exprimiert. Auch die interzellulären Kontakte der ECV 304-Zelllinie gleichen eher denen epithelialer Zellverbände, so daß Zweifel an der endothelialen Herkunft dieser Zelllinie aufkommen. Dennoch bieten sich ECV 304-Zellen wegen ihrer Polarität und den vielen Endothelzellmerkmalen für Polaritätsuntersuchungen *in vitro* an, wobei jedoch Rückschlüsse auf endotheliale Zellsysteme wegen der Identitätsproblematik nur mit Vorbehalt möglich sind, bzw. der Überprüfung in definierten epithelialen oder endothelialen Zellsystemen bedürfen.