

**Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med Dr. agr. Bernd Fischer)**



Rolle der Relaxin-artigen Peptide in der Tumorbilogie der Schilddrüse

Habilitation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med. habil.

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von: Dr. med. Sabine Hombach-Klonisch

geb. am 03. 04. 1963 in Gießen

Verteidigung am: 07. 12. 2004

Gutachter:

1. Professor Dr. Dr. Bernd Fischer
2. Professor Dr. Elke Winterhager
3. Professor Dr. Dr. Ulrich Welsch

urn:nbn:de:gbv:3-000007755

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000007755>]

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung und Fragestellung	4 - 9
1.1 Übersicht	4
1.2 Molekulare Struktur von Relaxin und INSL3	5
1.3 Rezeptoren	8
2. Stand der Forschung	
Relaxin-artige Peptide in Tumoren	10 - 14
3. Relaxin-artige Peptide in Karzinomen der humanen Schilddrüse	15 - 40
3.1 INSL3 in der normalen und neoplastischen humanen Schilddrüse und in Schilddrüsenkarzinomzelllinien	15
3.2 H2-Relaxin in der normalen und neoplastischen humanen Schilddrüse und in Schilddrüsenkarzinomzelllinien	16
3.3 Herstellung und Charakterisierung stabiler Transfektanten der humanen Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-133 mit Überexpression von humanem INSL3	19
3.4 Herstellung und Charakterisierung stabiler Transfektanten der humanen Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-133 mit Überexpression von H2-Relaxin	25
3.5 Schilddrüsenphänotyp der INSL3 knock-out-Maus	38
3.6 Zusammenfassende Darstellung zur Rolle Relaxin-artiger Peptide in Karzinomen der humanen Schilddrüse	39
4. Diskussion und Ausblick	41 - 48
5. Literaturverzeichnis	49 - 62
6. Anlagen	63 - 70
6.1 Lebenslauf	63
6.2 Erklärungen	64
6.3 Danksagung	65
6.5 Thesen	67
6.5 Thematisch relevante eigene Publikationen im Anhang	70

für

Helge, Tobias und Susanne

1. Einleitung und Fragestellung

1.1 Übersicht

Die heterodimeren Peptidhormone Relaxin und das strukturell ähnliche Insulin-like molecule 3 (INSL3), auch Relaxin-like Factor (RLF) genannt, sind die Relaxin-artigen Vertreter innerhalb der Familie der Insulin-artigen Peptidhormone, zu denen neben dem Insulin auch IGF-I, IGF-II und Plazentin (Insl4; Koman et al., 1996) zählen. Relaxine unterschiedlicher Spezies zeigen eine ausgeprägte Heterogenität in ihrer Peptidsequenz (Klonisch et al., 1997, 1999 a+b, 2000, 2001; Hombach-Klonisch et al., 2000) und besitzen ein breites physiologisches Wirkungsspektrum. Das INSL3 wurde als Marker testikulärer Leydigzellen identifiziert (Adham et al, 1993; Pusch et al., 1996; Ivell et al., 1997) und die interstitiellen Leydigzellen des Hodens sind bei allen bisher untersuchten Spezies als ein wichtiger Syntheseort für INSL3 charakterisiert worden, wobei im bovinen Hoden bis zu 5% aller exprimierten Transkripte für INSL3 kodieren (Bathgate et al., 1996). Mittlerweile gehören zur Relaxin-Familie außer Relaxin und INSL3 auch das SQ10-Molekül des Kaninchens (Fields et al., 1995), kürzlich beim Menschen und Chimpanzen beschriebene trunkierte Relaxinvarianten (Gunnarsen et al., 1996), das H3-Relaxin als dritte im humanen Gehirn exprimierte Relaxin-variante (Bathgate et al., 2002) und eine im Neuweltaffen *Callithrix jacchus* nachgewiesene INSL3 Spliceform (Zarreh-Hoshyari-Khah et al., 1999).

Im weiblichen und männlichen Reproduktionstrakt werden Relaxin und INSL3 exprimiert (Ivell, 1997; Sherwood, 1994). In einigen Spezies ist die Plazenta der Hauptsyntheseort für Relaxin und die während der Gravidität gemessenen hohen Relaxinwerte sind ein geeigneter Indikator für die plazentare Funktion bei trächtigen Stuten und Hündinnen (Stewart et al., 1992; Steinetz et al., 1987). Zunächst ausschließlich als Hormon des weiblichen Reproduktionstraktes (Plazenta, Uterus mit Zervix, Ovar) angesehen, weisen neuere Untersuchungen auf eine sehr weitreichende Bedeutung von Relaxin im kardiovaskulären/ pulmonalen System, im Gehirn und in Tumoren hin. In neoplastischen Geweben der humanen Brustdrüse, der Schilddrüse, des Gastrointestinaltraktes und des Reproduktionstraktes wurden Relaxin und INSL3 nachgewiesen (Hombach-Klonisch et al., 2000, 2003; Stemmermann et al., 1994; Bongers-Binder et al., 1991; Tashima et al., 1994; Klonisch et al., 1999a+b; Mazoujian and Bryant-Greenwood, 1990). Zellbiologische

Untersuchungen deuten auf eine Rolle der Relaxin-artigen Peptide für Prozesse der Karzinogenese, hier speziell der Zellproliferation und –differenzierung, Invasion und Neovaskularisation hin. Die Identifizierung zweier G-Protein-gekoppelter membranständiger Relaxinrezeptoren (Leucin-rich G-protein-coupled receptors) LGR7 und LGR8 stellte einen Meilenstein für die Forschung an Relaxin-artigen Peptidhormonen dar (Hsu et al. 2002). Relaxin fungiert als Ligand für beide Rezeptoren (Hsu et al. 2002; Kumagai et al., 2002; Büllsbach and Schwabe, 1995), während INSL3 ausschließlich an LGR8 bindet (Kumagai et al., 2002).

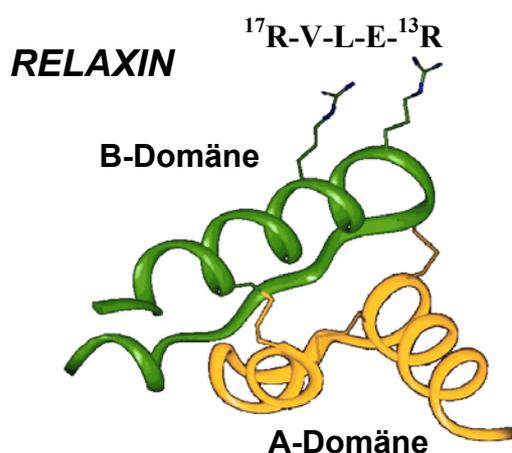
Ziel meiner Arbeiten war die Etablierung geeigneter Modellsysteme, mit denen die Rolle von Relaxin und INSL3 im Hinblick auf ihre tumorbiologische und entwicklungsbiologische Relevanz für die Schilddrüse untersucht werden kann.

1.2 Molekulare Struktur von Relaxin und INSL3

Die Synthese von Relaxin erfolgt als Präprohormon, welches aus einem Signalpeptid, einer B-Domäne, einer C- und einer A-Domäne (vom N'- zum C'-Terminus) besteht. Präprorelaxin ist aufgrund seines wesentlich längeren C-Peptids etwa doppelt so groß wie das Präproinsulin (Gast, 1983). Die enzymatische Abspaltung des Signalpeptids erfolgt, wie bei anderen Proteinen (Steiner et al., 1980), an einer Aminosäure mit kurzer Seitenkette und überführt das Präprorelaxin in das Prorelaxin. Die Bedeutung des C-Peptids liegt wahrscheinlich in der Stabilisierung der korrekten Molekülkonformation von Prorelaxin, um so die Ausbildung der Disulfidbrücken zwischen A- und B-Domäne (im H2-Relaxin: Cys^{B11}-Cys^{A11} und Cys^{B23}-Cys^{A24}) sowie der Disulfidbrücke innerhalb der A-Domäne (im H2-Relaxin: Cys^{A10}-Cys^{A15}) zu ermöglichen. Die enzymatische Abspaltung des C-Peptids erfolgt durch die Serinprotease Prohormon Convertase 1 (Marriott et al., 1992) und möglicherweise zusätzlich durch Chymotrypsin-artige Enzyme (Haley et al., 1987). Es konnte gezeigt werden, dass im Schwein sowohl das prozessierte Relaxin wie auch sezerniertes Prorelaxin mit gleicher Affinität an den Relaxinrezeptor binden und biologisch aktiv sind (Tan et al., 1998). Baculovirus-exprimiertes rekombinantes Marmoset Prorelaxin, welches zu 70% identisch ist mit dem humanen H2-Relaxin, ist ebenfalls bioaktiv (Zarreh-Hoshyari-Khah et al., 2001).

Strukturell, funktionell und immunologisch ist die Position des Relaxins innerhalb der Familie der Insulin-artigen Moleküle eine eigenständige. Trotz ähnlicher alpha-Helix- und beta-Faltblatt-Sekundärstrukturen (Eigenbrot et al., 1991; Du et al., 1982;

Rawitch et al., 1980; Schwabe und Harmon, 1978) beträgt der Anteil identischer Aminosäuren zwischen den ca. 6 kD großen Relaxin- und Insulin-Dimeren nur ca. 25% und umfasst die Cysteine, die an der Bildung der bei beiden Hormonen identischen Disulfidbrücken beteiligt sind (Eigenbrot et al., 1991). Die Oberflächen von Relaxin und Insulin präsentieren keine gemeinsamen immunologischen Epitope und Relaxin interagiert sehr viel schwächer als Insulin mit Insulin-degradierenden Enzymen (Ding et al., 1992; Pilistine et al., 1986). Relaxin bindet nicht an den Insulin- oder IGF-I-Rezeptor (Ohleth und Bagnell, 1995; Hofig et al., 1991; Hernandez et al., 1988) und dies erklärt die unterschiedlichen biologischen Aktivitäten von Relaxin und Insulin. Die Bioaktivität des Relaxins ist abhängig von der korrekten Konformation der A- und B-Domänen. Die Aminosäuren Gly^{B12}, Arg^{B13} und Arg^{B17} in dem hexameren konservierten Motiv -GRELVR- und Gly^{B24} in der Relaxin B-Domäne sowie Gly^{A14} in der A-Domäne (Numerierung der Aminosäuren entsprechend dem H2-Relaxin) sind hoch konserviert, trotz der für die Relaxine unterschiedlicher Spezies typischen hohen Heterogenität in ihren Aminosäuresequenzen (Schwabe und Büllesbach, 1990). Drei dieser Aminosäuren sind wesentlich für die Bioaktivität des Relaxins (Büllesbach et al., 1996, 1988). Die Guanidino-Seitengruppen beider Arg^{B13} und Arg^{B17} ragen wie Zacken aus der Oberfläche der B-Domäne heraus und interagieren direkt mit dem membranständigen Relaxinrezeptor. Diese Relaxin-Rezeptor-Bindung stellt eine neue Form der Hormon-Rezeptor-Interaktion dar (Büllesbach et al., 1992, 2000; Bryant-Greenwood and Schwabe, 1994).



Während Arg^{B13} und Arg^{B17} essentiell für den Rezeptorkontakt sind, ist die in der A-Domäne aller Relaxine konservierte Aminosäure Gly^{A14} wichtig für die korrekte Konformation des Gesamtmoleküls (Büllesbach und Schwabe, 1994). Wie bereits erwähnt, stellt die Anwesenheit der C-Domäne kein Hindernis für die Rezeptorbindung dar (Tan et al., 1998).

Mit Ausnahme des Menschen und der Menschenaffen (Klonisch et al., 2000), kodiert das Genom aller bislang untersuchten Spezies für ein Relaxingen, das aus zwei Exonen und einem ca. 4 kb großen Intron aufgebaut ist. In den humanen Relaxinen kodiert Exon 1 für das Signalpeptid, die B-Domäne und den Anfangsteil der C-

Domäne bis zur Aminosäure Glu⁴⁶, während Exon 2 für den Rest der C- und die gesamte A-Domäne kodiert (Crawford et al., 1989; Haley et al., 1987; Hudson et al., 1984). Der Mensch besitzt, wie die Menschenaffen, zwei nichtallele Relaxingene H1 und H2, die auf dem kurzen Arm des Chromosoms 9 lokalisiert sind (Crawford et al., 1984). Im Corpus luteum und der Placenta gelang kürzlich der Nachweis von ca. 100 bp längeren Transkripten für beide humanen Relaxine (H1 und H2) sowie für das Relaxin-2 des Chimpanse (Gunnarsen et al., 1996). Diese durch alternatives Splicing erzeugten Transkripte beinhalten ein weiteres Exon und kodieren aufgrund eines vorzeitigen Stopkodons für trunkierte Relaxinprodukte, über deren physiologische Rolle nichts bekannt ist. Kürzlich wurde ein H3-Relaxin identifiziert (Bathgate et al., 2002; Samuel et al., 2002), welches dem Relaxin-3 Peptid von Ratte und Schwein entspricht. Relaxin3 der Ratte und der Maus wird hauptsächlich im Zentralnervensystem aber auch in Testis, Thymus, Milz, Lunge und Herz exprimiert (Bathgate et al., 2002). Über seine Funktion ist bisher wenig bekannt.

Das INSL3-Gen ist ebenfalls aus zwei Exonen und einem Intron aufgebaut (Koskimies et al., 1997; Zimmermann et al., 1997; Burkhardt et al., 1994a). Das humane INSL3-Gen liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 19, 13.2-p12 (Burkhardt et al., 1994b). Die INSL3-Transkripte verschiedener Spezies (Mensch: Burkhardt et al., 1994a; Schwein: Adham et al., 1993; Maus: Pusch et al., 1996; Wiederkäuer: Bathgate et al., 1996, Roche et al., 1996, Hombach-Klonisch et al., 1999, 2000; Marmoset: Zarreh-Hoshyari-Khah et al., 1999; Galago: Klonisch et al., 2001; Pferd: Klonisch et al., 2003; Hund: Truong et al., 2003) kodieren für ein ca. 14,5 kD Polypeptid mit einem für alle Mitglieder der Relaxin-Familie einheitlichen molekularen Aufbau. Aufgrund analoger Daten zur enzymatischen Prozessierung des Relaxins sowie der Lage der Cysteine und potentiellen Endopeptidase-Spaltstellen (Renegar et al., 1996) im INSL3-Molekül erfolgt die Untergliederung des INSL3-Moleküls in ein Signalpeptid und die B-, C- und A-Domäne (vom N'- zum C'-Terminus). Auch INSL3 besitzt in der B-Domäne das stark konservierte Peptidmotiv -x-R-x-x-R-x- (R=Arginin), welches im Unterschied zu dem des Relaxins vier Aminosäuren weiter C'-terminal lokalisiert ist (Büllesbach et al., 1992, 1995, 1999). Struktur- und Funktionsstudien haben gezeigt, dass die Aminosäure Tryptophan in Position B27 der B-Domäne für die Interaktion mit dem Rezeptor essentiell ist (Büllesbach u. Schwabe, 1999).

Geeignete Antikörper zur Detektion von RLF stehen erst seit kurzem zur Verfügung (Zarreh-Hoshyari-Khah et al., 1999; Ivell et al., 1997; Hombach-Klonisch et al., 2000; Klonisch et al., 2001a+b). Unsere bisherigen Daten zeigen, dass INSL3 im deszendierten Hoden des Rehes, der Ziege, des Damwildes, des Hundes und im deszendierten und kryptorchen Hoden des Pferdes (Hombach-Klonisch et al., 2004, 2000, 1999; Klonisch et al., 2003, 2001) sowie in der humanen hyperplastischen und neoplastischen Schilddrüse (Hombach-Klonisch et al., 2003) sowie in humanen Mammakarzinomen (Hombach-Klonisch et al., 2000) als Prohormon produziert wird, während in Proteinextrakten der reifen humanen Plazenta (Hombach-Klonisch et al., 2001) und der Testes des Hundes (Klonisch et al., 2001) außer der Proform auch prozessiertes INSL3 nachweisbar ist. Neben INSL3 wurden im Marmosetaffen (Zarreh-Hoshyari-Khah et al., 1999) und beim Menschen (Safford et al., 1997) unterschiedliche Transkripte für INSL3-Splicevarianten beschrieben, über deren Funktion bisher nichts bekannt ist. In humanen Schilddrüsentumoren und humanen Schilddrüsen-Tumorzelllinien konnten wir eine um 77 Basenpaare größere INSL3 Spliceform nachweisen (Hombach-Klonisch et al., 2003), welche aufgrund einer Verschiebung des Nukleinsäure-Leserasters aber wahrscheinlich für ein nicht-funktionales Peptid kodiert.

1.3 Rezeptoren Relaxin-artiger Peptide

Die Rezeptoren für die Relaxin-artigen Peptide sind membranständige, 7-transmembranöse G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR; Hsu et al., 2002). Die „leucin-rich G-protein-coupled receptors“ LGR7 und LGR8 haben strukturelle Ähnlichkeit zum TSH-Rezeptor und zu den Rezeptoren für die Gonadotropine (LHR und FSHR). In der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 sowie der humanen myelomonozytären Zelllinie THP-1 sind LGR7 und LGR8 an Gs-Proteine gekoppelt und aktivieren die Adenylatzyklase (Bigazzi et al., 1992, Parsell et al., 1996), wodurch es nach Bindung der Liganden Relaxin und INSL3 zur Erhöhung des intrazellulären cAMP Spiegels kommt. Insulin, IGF-I und IGF-II binden nicht an diese LGRs. LGR7 und LGR8 besitzen ca. 60% identische Aminosäuresequenzen (Hsu et al., 2002). Relaxin bindet an die extrazelluläre Domäne und an den zweiten extrazellulären Loop des LGR7 und wahrscheinlich auch des LGR8 (Hsu et al. 2002; Kumagai et al., 2002; Sudo et al., 2003). Bindungsstudien haben gezeigt, dass LGR8 nicht nur als Relaxin- sondern auch als INSL3-Rezeptor fungiert und damit identisch

sein könnte zu den Relaxin/INSL3-Bindungsstellen, welche im Gehirn der Maus beschrieben wurden (Hsu et al. 2002; Kumagai et al., 2002; Büllsbach and Schwabe, 1995). INSL3 dagegen bindet nicht an LGR7, sondern ausschließlich an LGR8 (Kumagai et al., 2002), was eine differenzielle Rezeptoraktivierung durch die beiden Liganden ermöglicht. Das humane LGR8 entspricht dem GREAT der Maus, einem GPCR, für dessen knock-out Phänotyp ein bilateraler Kryptorchismus beschrieben wurde, der identisch dem der Insl3-KO Maus ist (Gorlov et al., 2002; Zimmermann et al., 1999; Nef und Parada, 1999). Kultivierte Gubernaculumzellen aus der Ratte exprimieren LGR8 und zeigen nach Inkubation mit INSL3 eine cAMP-Erhöhung (Kumagai et al., 2002). INSL3-überexprimierende transgene weibliche Mäuse sind subfertil und zeigen aufgrund INSL3-induzierter Wachstums- und Differenzierungsvorgänge im Gubernaculum testis einen Deszensus ovarii bis in Höhe des inneren Leistenrings (Bogatcheva et al., 2003). Zwei weitere GPCRs, GPCR 135 und GPCR 142, wurden kürzlich als spezifische Rezeptoren für H3-Relaxin identifiziert (Liu et al., 2003 a + b). Im Gegensatz zu LGR7 und LGR8 bewirkt die Bindung des Liganden H3-Relaxin an GPCR 135 und GPCR 142 eine Inhibition der Adenylatzyklase. GPCR 135, der auch als Somatostatin und Angiotensin-like Peptidrezeptor beschrieben ist, wird beim Menschen in Gehirn, Testis, Thymus und Nebenniere exprimiert. Obwohl H3-Relaxin auch an LGR7 binden kann (Sudo et al., 2003; Kumagai et al., 2003) ist es wahrscheinlich, dass die Wirkung dieses Peptids von der Lokalisation von GPCR 135 und GPCR 142 bestimmt wird. Transkripte für GPCR 142 wurden außer in Colon, Gehirn, Testis, Prostata, Niere und Plazenta des Menschen auch in der humanen Schilddrüse nachgewiesen.

2. Stand der Forschung

Relaxin-artige Peptide in Tumoren

Für die Entwicklung der Brustdrüse spielt Relaxin eine wichtige Rolle. Relaxin stimuliert zusammen mit Östrogen die parenchymatöse Entwicklung der Glandula mammaria und reduziert synergistisch mit Progesteron die kollagene Matrix in der Umgebung der sich entwickelnden Drüsenendstücke im Schwein (Min et al., 1996; Winn et al., 1994). In Mäusen induziert Relaxin Wachstum und Differenzierung der Brustdrüse während der Trächtigkeit (Bani und Bigazzi, 1984). Relaxin Knock-out Mäuse weisen eine Retardierung der Mamma-Entwicklung, vergrößerte Ductus lactiferi und eine fehlende Ausbildung der Brustwarzen auf (Zhao et al., 1999). Zwar kann es in Relaxin knock-out Mäusen zur Induktion einer laktierenden Mamma kommen, aufgrund der fehlenden Ausbildung der Brustwarzen können die Jungen jedoch nicht saugen und verhungern. Dies unterstreicht die essentielle Bedeutung des Relaxin für die Umbildung des Binde- und Epithelgewebes in der Mamma während der Entwicklung und während physiologischer Differenzierung. Für die humane Mamma haben beide Relaxin-Isoformen, H1- und H2-Relaxin, nicht nur eine Bedeutung für die physiologische Entwicklung sondern auch für das neoplastische Wachstum der Brustdrüse (Tashima et al., 1994; Mazoujian and Bryant-Greenwood, 1990; Bryant-Greenwood et al., 1994). Bei Frauen konnte Relaxin im Kollostrum, in der Flüssigkeit von Zysten bei Mammadysplasie und im Plasma einer Patientin mit großem Fibroadenom der Mamma nachgewiesen werden (Nardi et al., 1983). Während des Zyklus, der normalen pubertären und postmenopausalen Entwicklung sowie während der Laktation werden H1- und H2-Relaxin exprimiert. In neoplastischen Brustdrüsengeweben sind Transkripte beider Relaxin-Isoformen gegenüber den Normalgeweben deutlich vermehrt (Tashima et al., 1994). Brustkrebspatientinnen zeigen erhöhte Relaxin-Serumspiegel (Binder et al., 2001). Unsere Untersuchungen an humanem Brustdrüsengewebe haben gezeigt, dass auch INSL3 im Brustdrüsenepithel exprimiert wird. In neoplastischen Epithelzellen duktaler und lobulärer Mammakarzinome ist immunreaktives INSL3 verstärkt nachweisbar (Hombach-Klonisch et al., 2000). Diese Befunde zusammen mit dem Nachweis von LGR7- und LGR8-Transkripten in neoplastischen Geweben der humanen Mamma sowie in Brustdrüsenkarzinomzelllinien (Hombach-Klonisch, unveröffentlicht) lassen auf eine Rolle beider Relaxin-artiger Peptide bei

Mammakarzinomen schließen. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die INSL3 Expression in der humanen Brustdrüse stark posttranskriptionell modifiziert wird. Trotz im Vergleich zu normalem Brustdrüsenepithel reduzierter INSL3 mRNA Expression in Epithelien duktaler und lobulärer Mammakarzinome, zeigt der immunologische Nachweis von INSL3-Protein in diesen neoplastischen Epithelien eine vermehrte INSL3 Proteinproduktion (Hombach-Klonisch et al., 2000). Dies ist auch in Lymphknotenmetastasen primärer Mammakarzinome nachweisbar.

INSL3 und Relaxin spielen auch in Neoplasien anderer Organe eine Rolle. Neuere Daten aus laufenden Projekten belegen, dass auch die humane Prostata ein INSL3 Zielorgan ist. Physiologischerweise exprimieren vor allem die basalen Epithelien der humanen Prostata INSL3 mRNA und Protein. Die LGR8-positiven Epithelzellen sind auch die Zielzellen für INSL3 in der Prostata. Unsere Untersuchungen mit der Prostatakarzinom-Zelllinie PC-3, welche INSL3 und LGR8 exprimiert, zeigen Veränderungen im Proliferationsverhalten und der metabolischen Aktivität dieser Zellen nach Inkubation mit INSL3. Die zelluläre Signaltransduktion über LGR8 führt in PC-3 zu einer Erhöhung von c-AMP und führt zur Phosphorylierung der ERK1/2 MAP-Kinasen (Publikation in Vorbereitung).

Im Gegensatz zur Hochregulation von INSL3 in Neoplasien der Brust- und Schilddrüse konnten wir eine deutliche Reduktion der INSL3 Expression in Leydigzellen aus testikulären Leydigzelladenomen zeigen, ein Befund, welcher in diesem Kontext auf den reduzierten Differenzierungsgrad dieser Leydigzellen hinweist (Klonisch et al., 1999). Alle Befunde deuten darauf hin, dass sich die Regulation der INSL3 Expression in testikulären Leydigzellen von der im Epithel der Organe Mamma und Prostata unterscheidet.

Die Befunde zur differentiellen Expression Relaxin-artiger Peptide in der humanen Schilddrüse mit vermehrter Produktion sowohl von Relaxin (Klonisch, unveröffentlichte Daten) als auch von INSL3 (Hombach-Klonisch et al., 2003) in humanen Schilddrüsenneoplasien bildeten den Anlass, die zelluläre Wirkung der beiden Peptide in humanen Schilddrüsenzellen und deren Bedeutung für die Pathogenese von Schilddrüsentumoren zu untersuchen. Auf die neueren Ergebnisse dieser Untersuchungen zur Rolle Relaxin-artiger Peptide in der humanen Schilddrüse wird im 3. Teil dieser Arbeit eingegangen.

Für die Tumorgenese spielen Veränderungen der Proliferation und Differenzierung, der Zellinvasion und der Angiogenese eine entscheidende Rolle. Im Folgenden

werde ich bekannte Einflüsse Relaxin-artiger Peptide auf diese Faktoren in einer Übersicht darlegen.

Eine veränderte **Differenzierung** in Kombination mit unkontrollierter **Zellproliferation** spielt in der Tumorbiologie eine große Rolle, und Relaxin beeinflusst sowohl die Zelldifferenzierung als auch das Zellwachstum in Mammatumoren der Ratte (Segaloff, 1983). Die Reaktion der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 auf Inkubationen mit Relaxin ist konzentrationsabhängig. Relaxin führt bei Konzentrationen zwischen 2×10^{-10} M und 4×10^{-10} M zur signifikanten Steigerung der Zellproliferation. Demgegenüber führen höhere Relaxinkonzentrationen zur Reduktion der Proliferation und zur Differenzierung in MCF-7 (Bigazzi et al., 1992). Bani und Mitarbeiter (Bani et al., 1994; Sacchi et al., 1994) beschrieben für hohe Relaxinkonzentrationen von 10^{-9} M und 10^{-10} M in MCF-7 eine Differenzierung mit Bildung duktaler Eithelverbände bei Kokultivierung mit humanen Myoepithelzellen. In Nacktmäusen resultiert die Behandlung mit 10 µg Schweinerelaxin pro Tag über einen Zeitraum von 19 Tagen in der Differenzierung eingebrachter MCF-7 Brustkrebszellen mit der Bildung Myoepithel- und Epithel-artiger Verbände (Bani et al., 1985, 1986, 1994). Anteile dieser Zellverbände bildeten vermehrt Zellkontakte und zeigten Veränderungen von Zellorganellen und Zytoskelett. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass Relaxin die Differenzierung von Tumorzellen beeinflussen kann, und fordern uns, die zellulären Wirkmechanismen der beiden Relaxin-artigen Peptide zu untersuchen. Isolierte primäre humane endometriale Stromazellen und humane vaskuläre glatte Muskelzellen reagieren mit Proliferation auf die Inkubation mit rekombinantem humanem Relaxin (rhRlx). Relaxin (10 ng/ml) induziert nach 5 Minuten in diesen Zellen MAPK und MEK Proteine und führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB (Zhang et al., 2002). Dies zeigt einen für rhRlx einmaligen zellulären Signalweg, denn andere Moleküle der Insulin-artigen Hormone, wie Insulin oder IGF-1, führten nicht zur Aktivierung von CREB. Während der Fetalentwicklung induziert INSL3 die Proliferation der LGR8-exprimierenden Zellen des Gubernaculum testis und führt über das Wachstum des kaudalen Gubernaculumsegmentes zum Hodendeszensus. (Kumagai et al., 2002 ; Kubota et al., 2002). Informationen über einen mitogenen Effekt des INSL3 in Tumoren stehen zur Zeit nicht zur Verfügung.

Tumorzellen sind responsiv gegenüber NO-vermittelter Zytostase (Xie et al., 1998; Lie et al., 1991), was Bani und Mitarbeiter (1995) veranlasst hat, Untersuchungen zu

einer eventuell synergistischen Wirkung von Relaxins und NO durchzuführen. Tatsächlich führt Relaxin (10^{-9}M) zu einer schnellen Induktion der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen NOS (cNOS) und zu einer langsameren Induktion der induzierbaren NOS (iNOS) in MCF-7 Zellen und resultiert damit über eine NOS-vermittelte Katalyse von L-Arginin in der Erhöhung von NO. Über diesen L-Arginin-NO Weg vermag Relaxin die DNA-Synthese, die mitochondriale Atmung und die Aktivität von Cytochrom P450 Enzymen und damit das Tumorwachstum zu hemmen (Bani et al., 1995, 1998; Bogdan et al., 2001). Eine Aktivierung des cAMP/Adenylatzyklase/PKA Weges durch Relaxin wurde in verschiedenen Zellen beschrieben (Parsell et al., 1996; Fei et al., 1990; Hsu et al. 2000; Failli et al., 2002) und gilt als der LGR7 und LGR8-vermittelte zelluläre Signalweg (Hsu et al., 2000, 2002). Neben der cAMP-abhängigen Aktivierung der PKA katalytischen Aktivität beeinflusst Relaxin auch indirekt über cAMP die Stabilität des NFkB-IkB-PKAc Komplexes und über eine Erhöhung der transkriptionellen Aktivität von NFkB die Tumorgenese (Zhong et al., 1997).

Physiologische sowie pathologische Vorgänge der **Zellmigration und Zellinvasion** werden unter anderem über Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und deren Inhibitoren (tissue inhibitors of MMP, TIMPs) beeinflusst. MMPs sind involviert in zahlreiche in der Tumorbilogie bedeutende Prozesse: Degradation der extrazellulären Matrix (ECM), Änderung der ECM-Zusammensetzung und darüber des Verhaltens epithelialer Zellen sowie Modulation der biologischen Aktivität sezernierter oder membranständiger Moleküle (Vu und Werb, 2000). Durch enzymatische Spaltung von Wachstumsfaktoren wie TGF-beta, HB-EGF und IGF-BP-3 (Vu und Stamenkovic, 2000; Pierce et al., 2001; Prenzel et al., 1999; Fowlkes et al., 1994a+b) spielen MMPs eine Rolle für Tumorinvasion, Metastasierung und Angiogenese. MMP -2, -9 und -14 fördern die Migration von Tumorzellen durch die Basalmembran und die Tumormetastasierung (Sugiura et al., 1998; Hua et al., 1996; Montgomery et al., 1994; Zhuge und Xu, 2001; Deryugina et al., 2001), wobei membrangebundenes MMP-14 zur Aktivierung von MMP-2 führt (Ellerbroek und Stack, 1999). MMPs vermitteln Interaktionen zwischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und Rezeptor-Tyrosinkinase (Nath et al., 2001; Filardo et al., 2002). Der Einfluss von Relaxin auf das MMP/TIMP System ist abhängig vom untersuchten Zelltyp. In kultivierten Fibroblasten des Cervix uteri wurde nach Relaxingabe sowohl eine Erhöhung der Aktivität von MMPs als auch eine Reduktion von Pro-MMP-1 beschrieben (Palejwala

et al., 2001, 2002). In humanen Brustkrebszelllinien MCF-7 und SK-BR3 führte Relaxin zu einer vermehrten Expression von MMP-2, -9 und -14 und zur Steigerung der zellulären Migration (Binder et al., 2002). Inkubation mit Relaxin führte zur Erhöhung der Migration der Ratten-Myoblastenzelllinie L6 und der CF33.Mt Mammakarzinomzelllinie des Hundes (Silvertown et al., 2003 a+b). Binder und Kollegen beschrieben 2001 für Brustkrebspatientinnen mit Metastasen erhöhte Serumwerte für Relaxin.

Die Stimulation der **Angiogenese** ist ein essentieller Faktor für das Tumorwachstum und garantiert ausreichende Austauschfläche für Nährstoffdiffusion und Oxygenierung des Tumorgewebes (Hanahan and Folkman, 1996). Die proangiogenetischen Faktoren „Vascular Endothelial Growth Factor“ VEGF und NO sind in der Tumorpathologie hinreichend bekannt (Kandel et al., 1991; Folkman et al., 1989). Relaxin induziert VEGF und NO in Stromazellen und glandulären Epithelzellen des Endometriums, während der Wundheilung und in der myelomonozytären Leukämiezelllinie THP1 (Parsell et al., 1996; Palejwala et al., 2002; Unemori et al., 1999, 2000). Wie oben bereits erwähnt induziert Relaxin das für die NO-Synthese benötigte Enzym NOS. Erhöhte NO-Spiegel haben positiven Einfluss auf die Mikrozirkulation und Neovaskularisierung des Tumors (Wink et al., 1998; Fukumura und Jain 1998). In-vivo Untersuchungen belegen die Bedeutung von iNOS (Jadeski und Lela, 1999) und endothelialer NOS (eNOS, Jadeski et al., 2000) für die tumorassoziierte Angiogenese. Außerdem führt endogenes NO im Tumorgewebe zur Dilatation von Arteriolen, zur Verminderung der Leukozyten-Adhäsion an Endothelien und zur vermehrten Gefäßpermeabilität (Fukumura und Jain, 1998). Die Tumorzell-Überlebensrate zweier häufiger humaner Tumore, des Mamma- und des Prostata-karzinoms, korreliert positiv mit der Gefäßdichte im Tumor (Lissbrant et al., 1997). Trotz des Nachweises von Relaxin und INSL3 in Mamma- und Prostata-Tumorgeweben (Hombach-Klonisch et al., 2000; Tashima et al., 1994; Mazoujian und Bryant-Greenwood, 1990; Nardi et al., 1983; Ivell et al., 1989) gibt es noch keine schlüssigen Beweise für eine tumorfördernde Wirkung dieser Relaxin-artigen Peptide durch Induktion angiogenetischer Faktoren wie VEGF und NO.

3. Relaxin-artige Peptide in Karzinomen der humanen Schilddrüse

Vor allem papilläre, aber auch follikuläre Schilddrüsenkarzinome entwickeln sich bei jüngeren Menschen, und Frauen sind 3 x häufiger betroffen als Männer. Inwiefern Serum-Hormonspiegel zirkulierenden Relaxins oder INSL3 für die Pathogenese dieser Tumore bedeutend sind, bleibt vorerst eine spekulative Fragestellung. Unsere Befunde zur differentiellen Expression Relaxin-artiger Peptide in der humanen Schilddrüse mit einer vermehrten Produktion von INSL3 und Relaxin in Schilddrüsentumoren haben uns veranlasst, die Rolle dieser beiden Peptide in Schilddrüsenkarzinomzelllinien zu untersuchen. Der humane Thyreozyt wurde aufgrund seiner Fähigkeit zur vielfältigen Differenzierung in papilläre, follikuläre oder undifferenzierte Schilddrüsentumorformen als ein zellbiologisch interessantes und klinisch relevantes Tumormodell gewählt, um die Rolle des INSL3 und des Relaxins im Rahmen von Differenzierungsprozessen in Schilddrüsentumorzellen zu studieren.

3.1 INSL3 in der normalen und neoplastischen humanen Schilddrüse und in Schilddrüsenkarzinomzelllinien

In Thyreozyten der Basedow-Struma (n=10) und papillären (n=9), follikulären (n=12) und undifferenzierten (n=15) Schilddrüsenkarzinomen, nicht jedoch in histologisch normalem humanem Schilddrüsengewebe (n=15), konnten Insl3-Transkripte sowie immunoreaktives INSL3 Protein nachgewiesen werden (Hombach-Klonisch et al., 2003). In-situ Hybridisierungen haben gezeigt, dass die hyperaktiven und neoplastischen Thyreozyten in diesen Geweben die Quelle für produziertetes INSL3 sind. Diese differenzielle Expression von INSL3 in der humanen Schilddrüse mit einer Induktion der INSL3-Expression in hyperaktiven Thyreozyten des Morbus Basedow und der autonomen Adenome sowie in neoplastischen Thyreozyten papillärer, follikulärer und anaplastischer Schilddrüsenkarzinome wurde von uns erstmals beschrieben. Diese Befunde und der Nachweis von Transkripten für den INSL3-Rezeptor LGR8 in humanen Schilddrüsengeweben gaben den Anlass zur Untersuchung der Bedeutung des INSL3 in der humanen Schilddrüse.

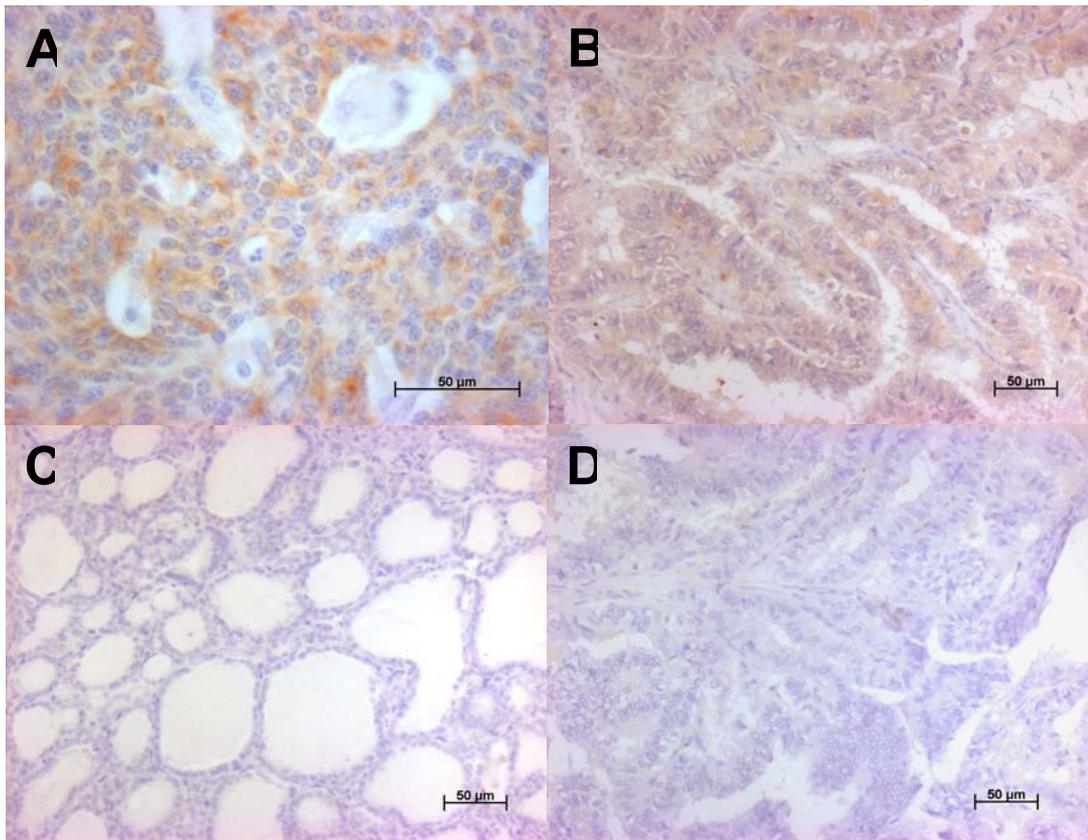
Die Expression von Insl3-Transkripten wurde in den verschiedenen humanen Schilddrüsenkarzinomzelllinien FTC-133, FTC-236, FTC-238, 8505C, 8305C, HTH74, C-643 und BCPAP mit semiquantitativer RT-PCR Analyse bestimmt (Hombach-Klonisch et al., 2003). In der undifferenzierten Schilddrüsentumorzelllinie

8505C wurde neben dem spezifischen Amplifikat für normales Insl3 eine neuartige Insl3-Splicevariante kloniert und durch Sequenzanalyse verifiziert (Hombach-Klonisch et al., 2003). Diese Insl3-Splicevariante resultiert aus einer Deletion im Exon2 mit Verschiebung des Leserasters und kodiert für ein 2,3 kD größeres INSL3 splice-Protein, dessen Funktion unbekannt ist. Für die Beschreibung der Splicevariante und die Expression von Insl3 und der Insl3-Splicevariante in verschiedenen Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien wird auf die Publikation Hombach-Klonisch et al., 2003, verwiesen.

3.2 H2-Relaxin in der normalen und neoplastischen humanen Schilddrüse und in Schilddrüsenkarzinomzelllinien

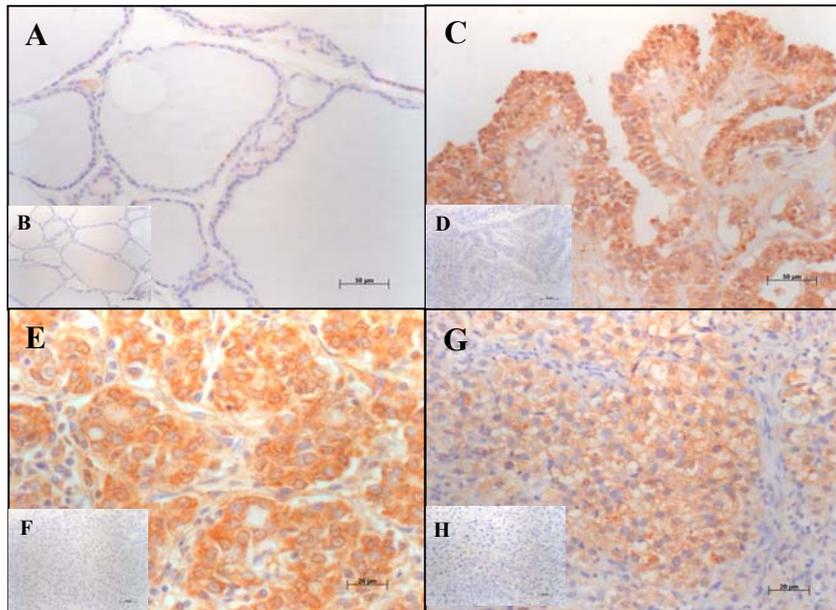
Spezifische H2-Relaxin-Transkripte wurden mit RT-PCR Analysen in den untersuchten follikulären FTC-133, FTC-236, FTC-238 und den undifferenzierten anaplastischen 8305C und 8505C Schilddrüsenkarzinomzelllinien sowie in humanen Thyreozyten des papillären, follikulären und dedifferenzierten Schilddrüsenkarzinomgewebes detektiert. Mit einem spezifischen Kaninchen-Antiserum gegen H2-Relaxin (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Laura Parry, Dept. of Zoology, U. of Melbourne, Australien) gelang auch der spezifische Nachweis von immunoreaktivem H2-Relaxin in humanen Schilddrüsenkarzinomgeweben (Abb. 1). Unterschiede bezüglich des Differenzierungsgrades der Tumore und der Relaxin-Expression waren wie beim INSL3 nicht nachweisbar. Im Unterschied zur Expression des INSL3 zeigten hyperaktive Thyreozyten autonomer Adenome und des Morbus Basedow keine Produktion von Relaxin.

Abbildung 1: Immunhistochemischer Nachweis von H2-Relaxin in Thyreozyten humaner Schilddrüsenkarzinomgewebe: (A) follikuläres Karzinom (FTC) und (B) papilläres Karzinom (PTC) zeigen wie die anaplastischen Schilddrüsenkarzinome positive Immunreaktionen für Relaxin. Schilddrüsenadenome (C) sind Relaxin-negativ. Gewebe, welche mit nicht-Immunsereum behandelt wurde, zeigen keine spezifische Immunreaktion (D).



Es gelang außerdem der Protein-Nachweis des Relaxinrezeptors LGR7 mit einem Kaninchen-Antiserum, das freundlicherweise von Prof. Aaron Hsueh, Stanford University, USA zur Verfügung gestellt wurde (Abb. 2).

Abbildung 2: Nachweis des immunreaktiven LGR7 Relaxinrezeptors in humanen papillären (C), follikulären (E) und anaplastischen (G) Schilddrüsenkarzinomgeweben. Die normale Schilddrüse produziert kein immunhistochemisch detektierbares LGR7 (A). Nicht-Immuneserum zeigt keine spezifische Immunreaktion (Inserts: B, D, F, H).



Zwischenresümee: Es gelang der Nachweis von INSL3 und einer neuartigen INSL3 Splicevariante in humanen Schilddrüsenkarzinomzelllinien und –geweben. Humanes immunoreaktives INSL3 und H2-Relaxin zeigten ein vergleichbares Verteilungsmuster in humanen Schilddrüsenkarzinomgeweben. In normalem humanem Schilddrüsengewebe konnten weder INSL3 Isoformen, H2-Relaxin noch Relaxinrezeptoren (LGR7) nachgewiesen werden. Hingegen produzieren Thyreozyten hyper- und neoplastischer Schilddrüsengewebe Relaxin-artige Liganden. Außerdem exprimieren humane Schilddrüsenkarzinomzellen LGR7 und sind somit Zielzellen im Karzinom für die auto-/ parakrine Wirkung des H2-Relaxins und des INSL3. Das dargestellte Expressionsprofil für INSL3 und H2-Relaxin in humanen Schilddrüsenkarzinomgeweben ließ vermuten, dass beide Relaxin-artigen Peptidhormone eine mögliche pathophysiologische Rolle in humanen Schilddrüsenkarzinomen haben. Um sowohl Relaxin- als auch INSL3-induzierte Effekte in der humanen Schilddrüse in einem zellbiologischen Modell untersuchen zu können, wurden sowohl Relaxin- als auch INSL3-überexprimierende Transfektanten der follikulären Schilddrüsen-Karzinomzelllinie FTC-133 hergestellt. Diese FTC-133 Schilddrüsekarzinom-Zelllinie wurde aufgrund der Expression endogener LGR7 und LGR8 Rezeptoren bei sehr schwacher endogener Expression der beiden Liganden Relaxin und INSL3 ausgewählt.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Herstellung und derzeitigen Charakterisierung der H2-Relaxin- und der INSL3-Transfektanten von FTC-133 dargestellt.

3.3 Herstellung und Charakterisierung stabiler Transfektanten der humanen Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-133 mit Überexpression von humanem INSL3

Ein humanes Insl3-Konstrukt wurde hergestellt, bei dem der unmittelbar vor dem ATG-Startcodon gelegene 5'-untranslatierte Bereich mit kloniert wurde, um Kosac-Sequenzen mit zu berücksichtigen. Dieses Konstrukt wurde in den eukaryoten Expressionsvektor pIRES-EGFP kloniert und unter Verwendung eines Lipid-vermittelten Transfektions-kits (Metafectene) in FTC-133 stabil transfektiert. Stabile Transfektanten wurden mit Geneticin selektiert und stabil überexprimierende Klone aufgrund ihrer grünen Fluoreszenz (EGFP) selektiert (Abb. 3).

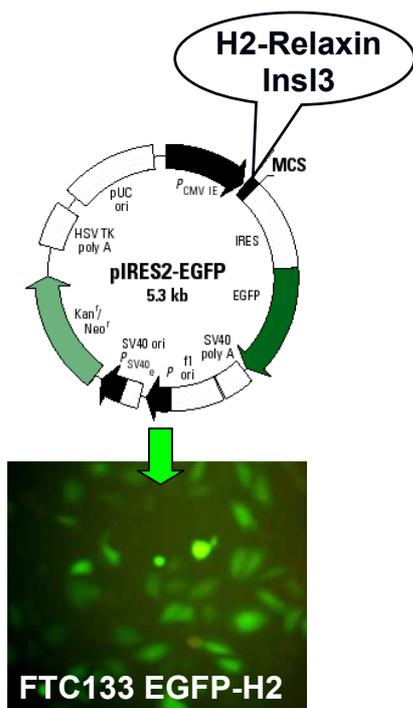
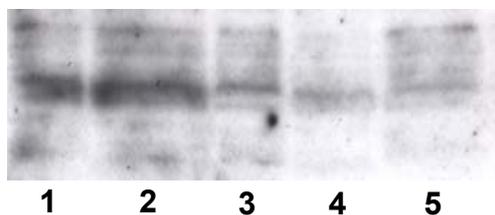


Abbildung 3: Gewinnung stabiler INSL3- und H2-Relaxin-Transfektanten der humanen Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-133. Grün-leuchtende, Geneticin-resistente FTC-133 Transfektanten wurden als Einzelzellen kloniert und auf RT-PCR- wie auf Proteinebene (ELISA, Westernblot) auf die Anwesenheit von H2-Relaxin und INSL3 (mRNA und Hormonproduktion) untersucht. Als Beispiel der grün-leuchtenden FTC-133 Transfektanten sind in dieser Abb. FTC-133-H2-Relaxin-Transfektanten gezeigt. Ein vergleichbares Ergebnis wurde für die FTC-133-INSL3-Transfektanten erreicht.

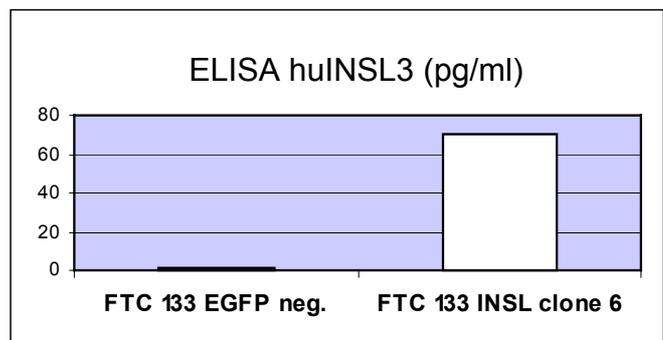
RT-PCR-Analysen ergaben eine starke Expression der Insl3 mRNA in den stabilen FTC-133 Transfektanten, die im weiteren im Westernblot sowie im INSL3-ELISA auf die Produktion der Hormone untersucht wurden. INSL3-Klon 6 wurde für den ELISA ausgewählt, weil er wiederholt eine starke Präsenz von INSL3 Protein im Western Blot zeigte (Abb. 4).

Abbildung 4: Westernblot Analyse (A) mit einem polyklonalen INSL3-Antiserum (Hombach-Klonisch et al., 2000; Klonisch et al., 2002) ergab eine Bande bei ca. 14,5 kD für Pro-INSL3 im Proteinextrakt von FTC-133-INSL3 Klon 6 bis 9 (1-4), während FTC-133 pIRES-EGFP-Leervektor-transfektanten (5) nur schwach INSL3 produzierten. Der nachfolgende INSL3-Relaxin ELISA (B; Phönix Pharmaceuticals) zeigte eine Sekretion von INSL3 in Klon 6, nicht jedoch in FTC-133, die stabil mit dem Leervektor pIRES-EGFP transfektiert wurden.

A. Westernblot



B. Humaner INSL3 ELISA



RT-PCR Untersuchungen ergaben eine Detektion für Transkripte des INSL3-Rezeptors *Lgr8* in der FTC-133-INSL3-Transfektanten Klon 6 und 7 (Abb. 5). *Lgr8*-Transkripte waren nicht nachweisbar in FTC-133-pIRES-EGFP Leervektor-Transfektanten oder FTC-133.

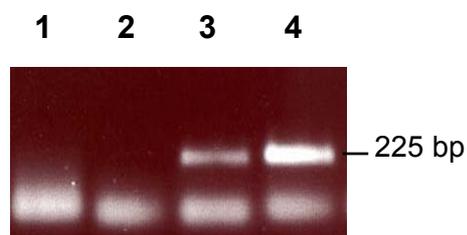
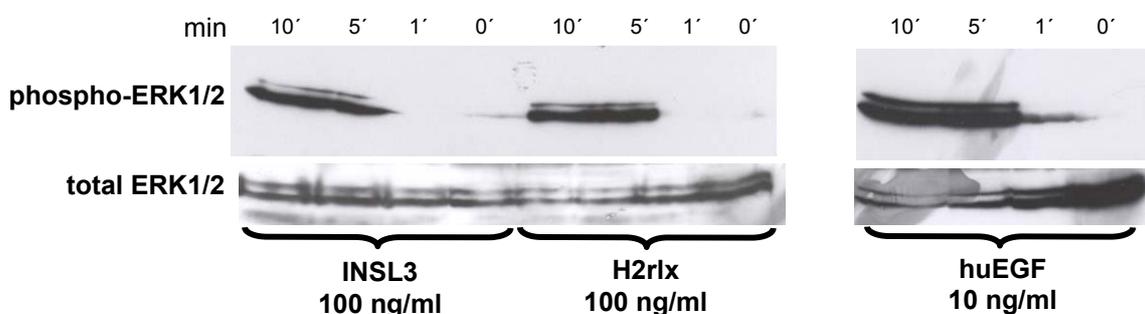


Abbildung 5: Nachweis von Transkripten für *Lgr8* INSL3-Rezeptor in FTC-133-INSL3 Transfektanten Klon 7 (3) und Klon 6 (4). FTC-133 (1) und FTC-133-pIRES-EGFP Leervektor-Transfektanten (2) zeigten keine *Lgr8*-Transkripte. Es wurde ein Primerpaar verwendet, welches ein 225 bp PCR-Produkt der zytoplasmatischen Domäne des *LGR8* Genes amplifizierte.

Der Nachweis der ERK1/2 Phosphorylierung durch H2-Relaxin und INSL3 in FTC-133 deutet auf funktionelle Rezeptoren für Relaxin (LGR7) und INSL3 (LGR8) in

diesen humanen Schilddrüsenkarzinomzellen hin. Ähnliche Befunde konnten Bartsch et al., 2002, mit THP-1 Leukämiezellen zeigen. Da es sich bei den LGRs um G-Protein vermittelte Rezeptoren handelt, deuten diese Phosphorylierungsbefunde sowie der verspätete Beginn dieser Phosphorylierung (nicht früher als ca. 5 min) auf einen indirekten LGR-vermittelten Signalweg mit möglicher Beteiligung des EGF-Rezeptors, welcher nach EGF-Gabe zu einer raschen und starken ERK1/2 Phosphorylierung führt (Abb. 6).

Abbildung 6: Nachweis der Phosphorylierung von ERK1/2 in FTC-133 nach Kurzzeitinkubation mit INSL3 und H2-Relaxin. Humanes EGF diente als Positivkontrolle für die Induktion der ERK-Phosphorylierung.

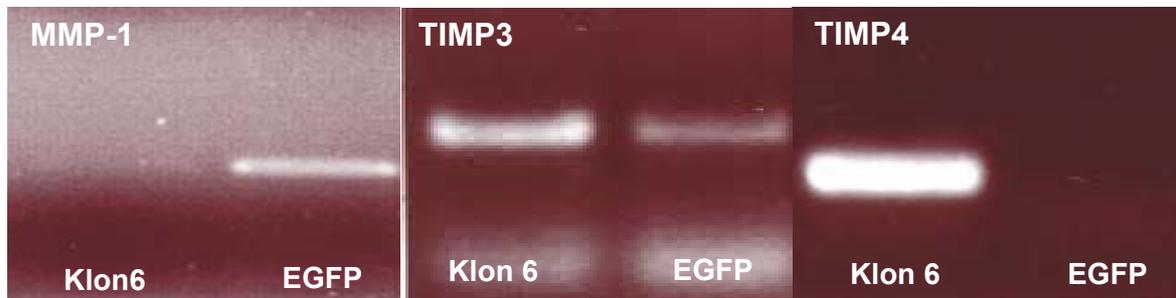


Die weitere funktionelle Charakterisierung der FTC-133 INSL3-Transfektanten wird gemeinsam mit der für die FTC-133 H2-Relaxin Transfektanten im Kapitel 3.4 erfolgen.

Erste semiquantitative RT-PCR Analysen mit der INSL3-überexprimierenden FTC-133-Transfektante ergaben, dass Klon 6 Veränderungen im MMP- und TIMP-Expressionsmuster zeigte (Abb. 7). Es konnte eine signifikante und reproduzierbare Herunterregulation für MMP-1 mRNA sowie eine Hochregulation der mRNA Expression für TIMP-3 und TIMP-4 nachgewiesen werden.

Abbildung 7: Semiquantitative RT-PCR Analysen für die humanes INSL3-überexprimierende FTC-133 Transfektante zum Nachweis transkriptioneller Veränderungen von MMP- und TIMP-Genen. Von den hier untersuchten MMP-Genen (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9) konnte eine deutliche Herunterregulation für das MMP-1 Gen (Amplikon: 445 bp) nachgewiesen werden. Von den 4

untersuchten TIMP-Genen waren in Klon 6 nur TIMP-3 (Amplikon: 565 bp) und TIMP-4 (Amplikon: 430 bp) exprimiert und beide TIMP-Gene waren deutlich hochreguliert.



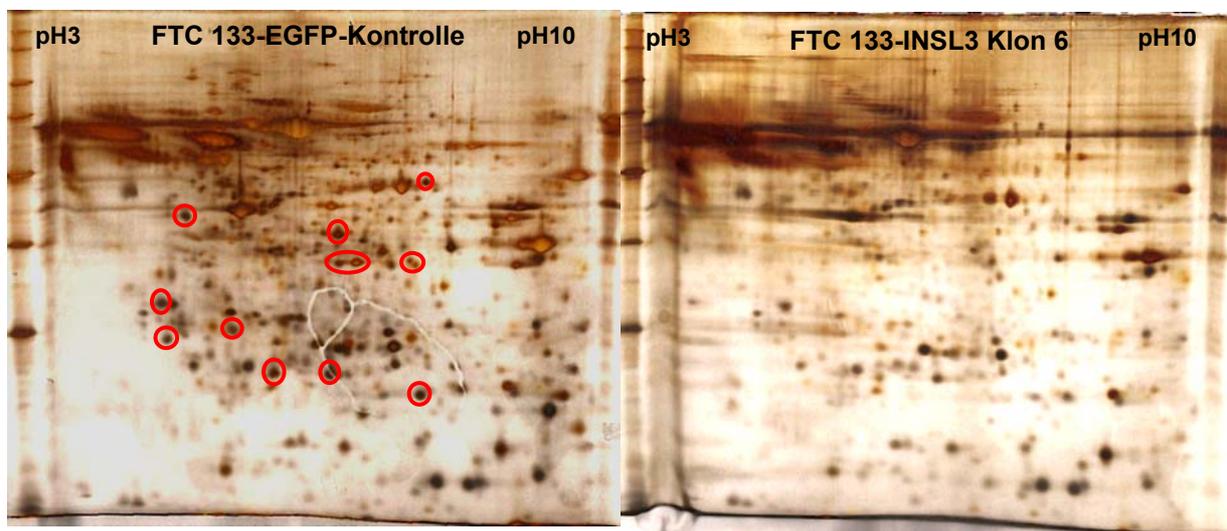
Ein Mikroarray für die INSL3 überexprimierende FTC-133 Transfektante (Klon 6) wurde vor Kurzem durchgeführt (Abb.10). Der Vergleich der Daten aus diesem Affymetrix-Array mit denen des H2-Relaxinklones 10 wird interessante neue Einblicke in die differentielle Genregulation von Relaxin und INSL3 in Schilddrüsenkarzinomzellen liefern. Erste Analysen der differenziell exprimierten Gene in INSL3 überexprimierenden FTC-133 Transfektanten decken deutliche Unterschiede im Vergleich zu denen unter Relaxin veränderten Gene auf.

Zwischenresümee: Für beide Relaxin-artigen Peptide konnte in der Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-133 eine Aktivierung des MAP-Kinase ERK1/2 Signaltransduktionsweges gezeigt werden. Die leichte zeitliche Verzögerung der ERK-1/-2 Phosphorylierung im Vergleich zu der Aktivierung durch EGF könnte auf einen indirekten Mechanismus hinweisen. FTC-133-Transfektanten mit Überexpression von humanem INSL3 (Klon 6) zeigen Veränderungen in der Expression von Genen der MMP-/TIMP-Familie, welche auf bislang unbekannte Funktionen von INSL3 in Schilddrüsenkarzinomzellen hindeuten.

Um Veränderungen im Proteinexpressionsmuster der FTC-133 INSL3-Transfektanten im Vergleich zu Leervektortransfektanten zu identifizieren, wurden zweidimensionale Gelelektrophoresen durchgeführt. Für die 2D gelelektrophoretischen Analysen wurden in der 1. Dimension 18 cm- und 24 cm-lange IEF-Strips mit einem pH-Bereich pH3-10 eingesetzt, um ein breites

Proteinspektrum mit guter Auflösung der Proteinspots erfassen zu können. Die isoelektrisch fokussierten Proteine wurden in der 2. Dimension auf 12% SDS-PAGE Gelen aufgetrennt. Erste 2D-SDS-PAGE Experimente mit dem INSL3 überexprimierenden Klon 6 haben eine generelle Herunterregulation der Proteinproduktion in dieser INSL3-überexprimierenden FTC-133-Transfektante gezeigt (Abb. 8).

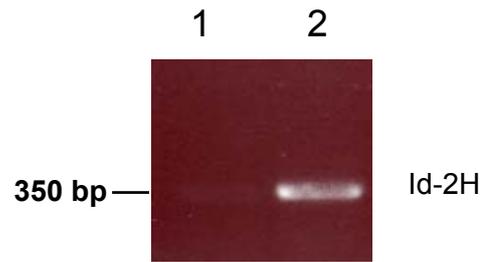
Abbildung 8: Repräsentatives Beispiel der vergleichenden 2D SDS-PAGE Analysen (250 µg Gesamtprotein/ Gel) von Klon 6 mit Überexpression von humanem INSL3 und der EGFP-Kontroll-FTC-133-Transfektante. Rote Kreise markieren Proteinspots in der EGFP-Kontrolle, welche im Klon 6 fehlen oder deutlich vermindert sind.



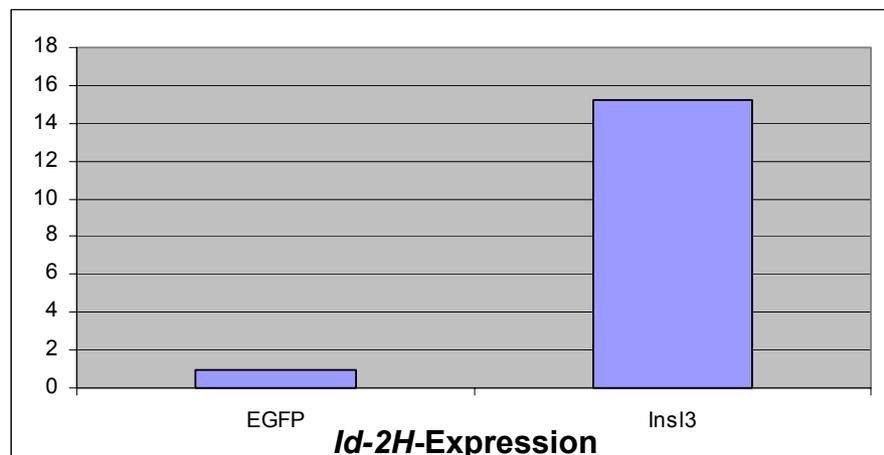
Diese INSL3-vermittelte inhibierende Wirkung auf bestimmte zelluläre Proteine könnte ihre Ursache in transkriptionellen Veränderungen spezifischer inhibitorisch wirkender Transkriptionsfaktoren haben. Ein solcher die Transkription inhibierender Transkriptionsfaktor ist Id-2H (Eiji Hara et al., 1994), für den in Klon 6 eine signifikante Hochregulation auf mRNA-Ebene festgestellt wurde (Abb. 9). Id-2H ist ein helix-loop-helix (HLH) Transkriptionsfaktor, der vor allem inhibitorisch reguliert. Weitere experimentelle Arbeiten sollen u.a. klären, ob Id-2H auch auf Proteinebene hochreguliert ist und dieser möglicherweise kausal für die veränderte Proteinproduktion in Klon 6 verantwortlich ist.

A.

Abbildung 9: Ergebnis semiquantitativer RT-PCR (A) und quantitativer PCR-Analysen (B) zeigten eine signifikante und reproduzierbare Hochregulation der mRNA für den HLH-Transkriptionsfaktor Id-2H in Klon 6 mit Überexpression von humanem INSL3 (2). Diese erhöhte Transkription war für die EGFP-Kontroll-Transfektante (1) nicht nachweisbar.



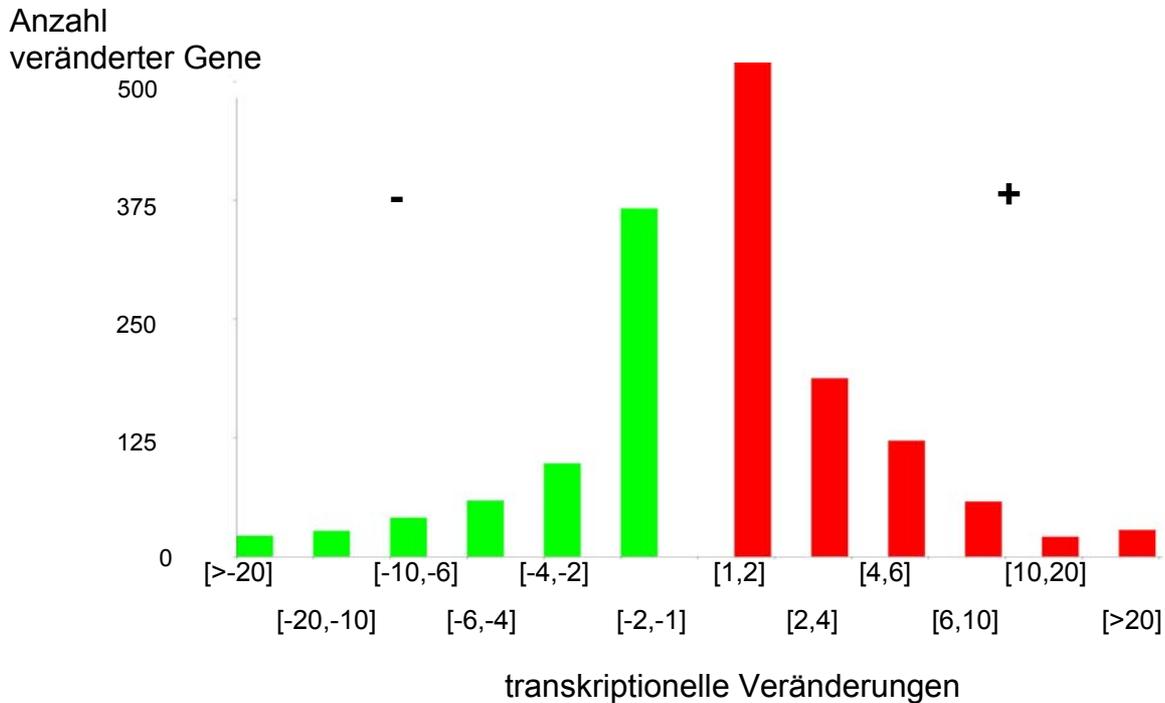
B.



Zwischenresümee: Für die INSL3-überexprimierende FTC-133 Transfektante (Klon 6) konnten differentiell exprimierte Proteinspots in der 2D-SDS-PAGE i.V.z. EGFP-Kontroll-Transfektante nachgewiesen werden. Es fällt auf, dass unter dem Einfluss von INSL3 zahlreiche Proteinspots deutlich vermindert sind oder fehlen im Vergleich zur Leervektor-Transfektante. Massenspektrometrische Analysen werden ausgewählte fehlende bzw. verminderte Proteinspots durch Isolation aus dem 2D-Gel der EGFP-Transfektante identifizieren. Ob die starke Induktion von Transkripten des inhibitorischen Transkriptionsfaktors ID-2H mit dieser veränderten Proteinexpression kausal in Zusammenhang steht, ist derzeit noch ungeklärt.

Vergleichende Microarray-Analysen der FTC-133 INSL3-Transfektante mit der Leervektortransfektante zeigen zahlreiche vermindert und verstärkt exprimierte Gene und im Vergleich zu der H2-Relaxin-Transfektante deutliche Unterschiede in den regulierten Genen (Abb. 10).

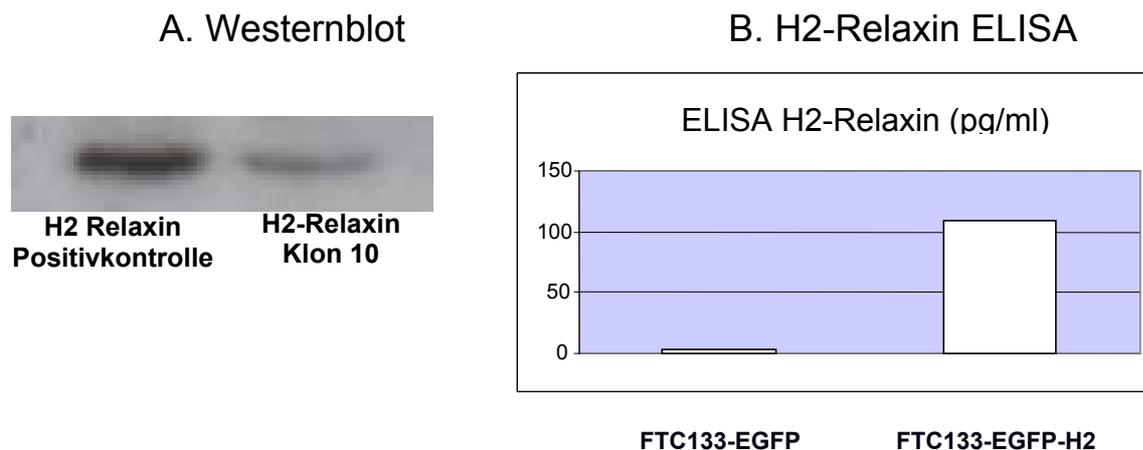
Abbildung 10: Microarray-Analysen der FTC-133-INSL3-Transfektante ergaben zahlreiche deutlich regulierte Gene



3.4 Herstellung und Charakterisierung stabiler Transfektanten der humanen Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-133 mit Überexpression von H2-Relaxin

Parallel zu den Insl3-Klonierungen, wurde ein H2-Relaxin-Konstrukt (freundlicherweise von Prof. A. Summerlee, OVC Guelph, Canada, zur Verfügung gestellt) in den eukaryoten Expressionsvektor pIRES-EGFP kloniert und stabil in FTC-133 transfiziert (Abb.3). Die Selektion stabiler Transfektanten erfolgte wie in 3.3 beschrieben. RT-PCR-Analysen ergaben eine starke Expression der H2-Relaxin mRNA in den stabilen FTC-133 Transfektanten, deren Produktion von H2-Relaxin im Westernblot sowie im H2-Relaxin-ELISA untersucht wurde. H2-Relaxin-Klon 10 wurde exemplarisch unter anderen H2-Relaxin-Klonen ausgesucht für die Darstellung des Westernblots und des ELISAs (Abb. 7).

Abbildung 11: Westernblot Analyse (A) mit dem polyklonalen R6 Relaxin-Antiserum ergab eine Bande bei ca. 7 kD für prozessiertes H2 Relaxin im Proteinextrakt von FTC-133 Klon10. H2-Relaxin diente als Positivkontrolle (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. L. Parry, U. of Melbourne, Australien). Der nachfolgende H2-Relaxin ELISA (B; Immunodiagnosics) zeigte eine Sekretion von H2-Relaxin in Klon10, nicht jedoch in FTC-133, die stabil mit dem Leervektor pIRES-EGFP transfektiert wurden.



Zwischenresümme: Es konnten stabile Transfektanten mit Überexpression von H2-Relaxin und humanem INSL3 in der humanen Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-133 hergestellt werden, für die eine Sekretion der entsprechenden Peptide nachgewiesen wurde.

In der FTC-133-H2-Relaxin Transfektante (Klon 10) konnten Transkripte für Lgr7 Relaxinrezeptor mit RT-PCR detektiert werden (Abb. 12). Dies deutete auf eine mögliche auto-/parakrine Relaxinwirkung in dieser humanen Schilddrüsenkarzinomzell-Transfektante hin.

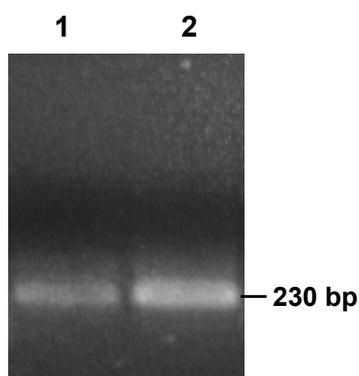
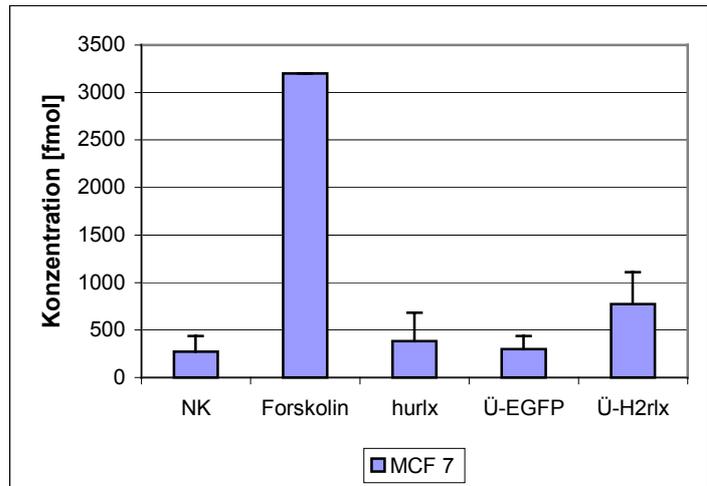


Abbildung 12: Nachweis von Transkripten für Lgr7 Relaxinrezeptor in der FTC-133-H2-Relaxin Transfektante (Klon 10). Es wurde ein Primerpaar verwendet, welches ein 230 bp PCR-Produkt der cytoplasmatischen Domäne des Lgr7 amplifiziert. Leichte Unterschiede im H2-Expressionslevel waren nachweisbar zwischen proliferativen (1) und konfluenten (2) FTC-133 H2-Relaxintransfektanten.

Abbildung 13: Die Bioaktivität des sezernierten Relaxins wurde mittels cAMP-Assays belegt. Dazu wurden MCF-7 Brustkrebszellen eingesetzt, welche als Relaxin-responsive Zelllinie beschrieben ist (Bigazzi et al., 1992; Bani et al., 1994; Binder et al., 2002). MCF-7 Zellen wurden mit dem Phosphodiesterase-Inhibitor IBMX vorbehandelt und für



30 Minuten mit dem Überstand der FTC-133 H2-Relaxin Transfektante inkubiert. Zur Stimulation der Adenylatzyklase wurde als Positivkontrolle Forskolin eingesetzt. Der Zellkulturüberstand der FTC-133 H2-Relaxin Transfektante, nicht jedoch dieser der Leervektortransfektante führte zu einer cAMP-Erhöhung in MCF-7 (Abb. 13).

Weitere funktionelle Charakterisierung der stabilen FTC-133 Transfektanten für H2-Relaxin und INSL3

Die FTC-133 Transfektanten wurden in BrdU-Proliferationsassays (Roche) und metabolischen MTT- und ATP-Assays (beide Promega) untersucht (Abb. 9-11). Für die Darstellung hier habe ich mich auf eine INSL3-Transfektante (Klon 6) und eine H2-Relaxin Transfektante (Klon 10) beschränkt. Die im Folgenden genannten Ergebnisse sind jedoch auch in mindestens einem anderen Klon für jedes der Peptide bestätigt worden. Es zeigte sich, dass FTC-133 INSL3 Klon 6 im Vergleich zu H2-Relaxin Klon 10 und der EGFP-Leervektor-Kontrolle eine leichte, aber signifikante Verminderung der Proliferation zeigte (Abb. 9). H2-Relaxin Klon 10 zeigte keine Veränderung der Proliferation zur EGFP-Leervektor-Kontrolle (Abb. 9).

Abbildung 14: Ergebnisse der BrdU-Proliferationsassays für drei unterschiedliche Zelldichten (jeweils n=4) zeigten eine verminderte Proliferation für FTC133-INSL3 Klon6.

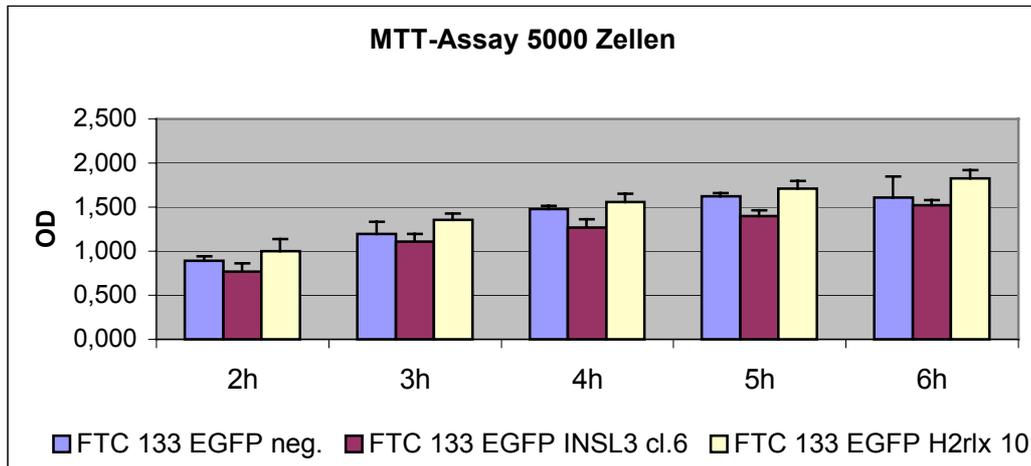


Abbildung 15: MTT-Vitalitätsassays für die drei stabilen FTC-133 Transfektanten konnten keinen signifikanten Einfluss von H2-Relaxin oder humanem INSL3 auf die Zellvitalität feststellen.

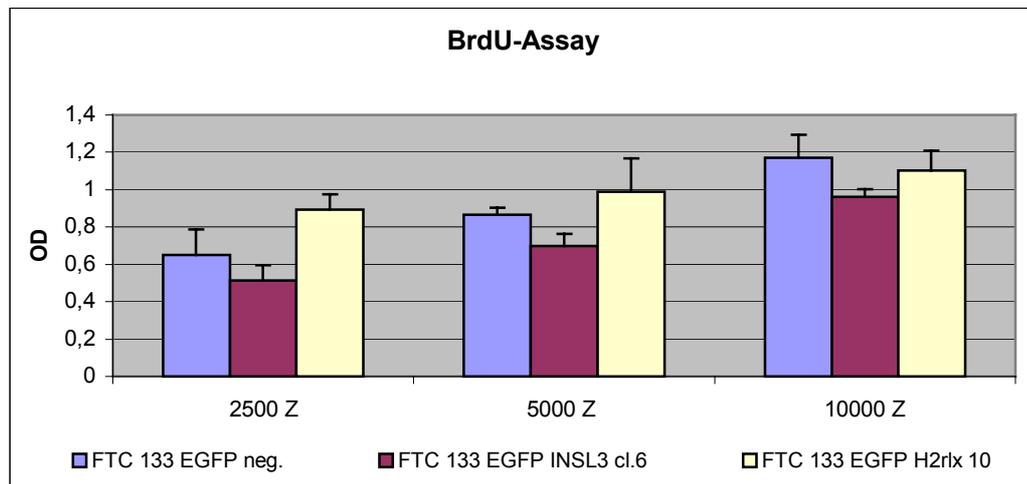
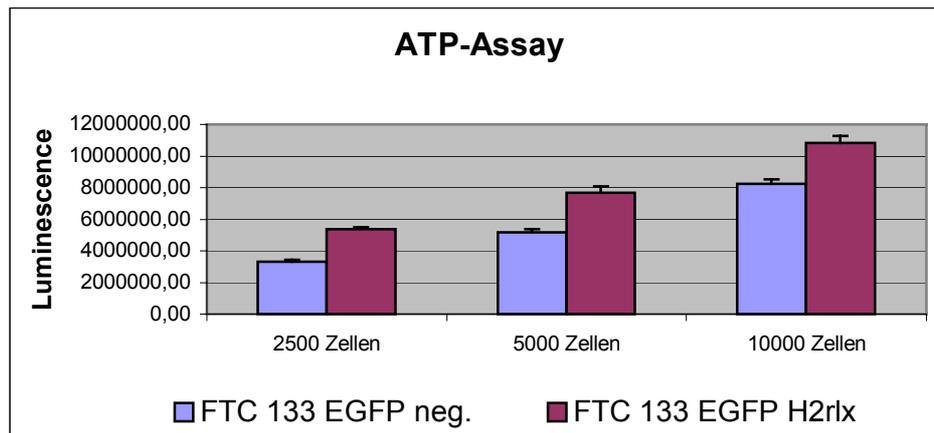


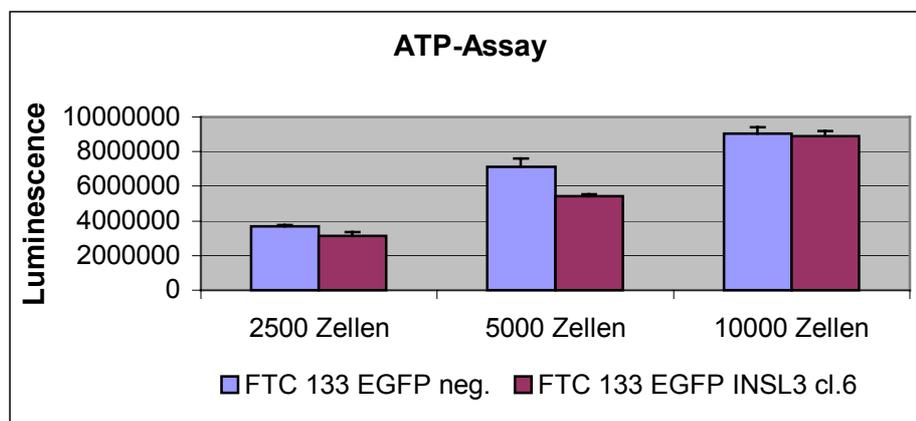
Abbildung 16: Der Einfluss von H2-Relaxin und INSL3 auf den Energiestoffwechsel der Transfektanten wurde durch Lumineszenz-Messungen des intrazellulären ATP-Gehaltes der FTC-133 Transfektanten bestimmt. Es zeigte sich, daß der H2-Relaxin überexprimierende Klon 10 (A) einen signifikant erhöhten ATP-Gehalt im Vergleich

zur EGFP-Leervektor-Kontrolle aufwies. Dies deutete auf eine Beeinflussung des mitochondrialen Stoffwechsels durch H2-Relaxin hin. Ein uneinheitliches Bild ergaben die Ergebnisse zur ATP-Messung beim INSL3-überexprimierenden Klon 6 (B), bei dem ein signifikant verminderter ATP-Gehalt nur bei einer ausgesäten Zellzahl von 5000 Zellen/ Platte wiederholt nachweisbar war (n=4).

A. H2-Relaxin überexprimierende Transfektante Klon 10



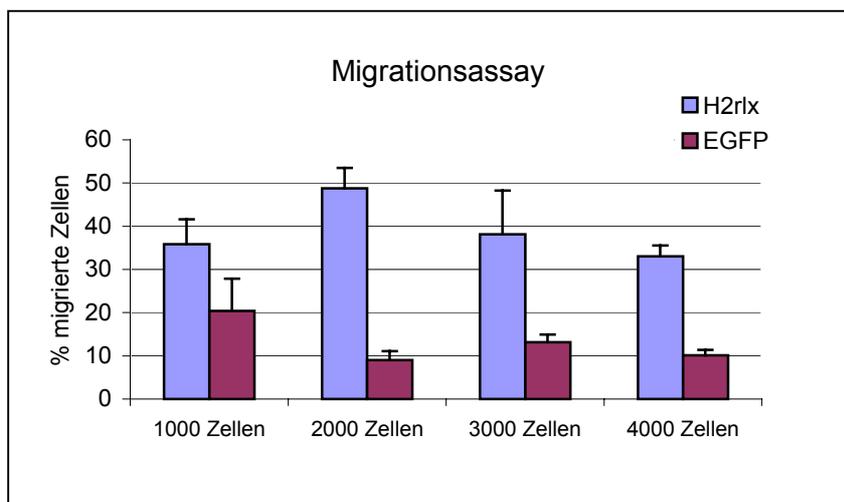
B. Humanes INSL3 überexprimierende Transfektante Klon 6



Aus den Microarray-Analysen deutet die Regulation zahlreicher nukleärer Gene, welche für mitochondriale Proteine kodieren, auf eine Beeinflussung des mitochondrialen Stoffwechsels unter Relaxin hin. Unter diesen Genen befinden sich die NAD⁺ spezifische Isocyanat-Dehydrogenase, die Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase, eine Ferredoxin-Reduktase, Kreatin Kinasen, Karrier-Proteine der inneren mitochondrialen Membran und die Monoaminoxidase B (MAOB).

Für das hier eingesetzte H2-Relaxin-Konstrukt konnte gezeigt werden, dass H2-Relaxin-überexprimierende Mammakarzinomzellen des Hundes ein erhöhtes Migrationsverhalten zeigten (Silvertown et al., 2003). Um das Migrationsverhalten des H2-überexprimierenden FTC-133 Klon 10 zu untersuchen, wurden Migrationsassays durchgeführt, bei denen der H2-Relaxin Klon10 im Vergleich zur EGFP-Leervektorkontrolle auf einem Filter mit 8 µm Poren (Costar) kultiviert wurde. Diese Filtereinsätze wurden in 24 well-Platten eingehängt und am Boden des 24wells wurden Zellen der FTC-133-EGFP-Leervektorkontrolle kultiviert. Es wurde der Prozentsatz der nach 24 h durch die Poren auf die Unterseite des Filters migrierten Zellen bestimmt. In dieser (bislang einzig getesteten) Konstellation konnte eine signifikant erhöhte Migration für den FTC-133 H2-Relaxinklon 10 detektiert werden (Abb. 17). In ersten Migrationsassays wurde die parakrine Fähigkeit von H2-Relaxin, Überstand von Klon 10, humanem INSL3 und Überstand von Klon 6 getestet, Einfluss auf die Migration von FTC-133 Zellen zu nehmen. Hierbei zeigte sich, dass das von den stabilen FTC-133-Transfektanten sezernierte H2-Relaxin und INSL3 biologisch aktiv waren und wie die rekombinanten Peptidhormone zu einer signifikant gesteigerten Migration von FTC-133 führten.

Abbildung 17: Migrationsassays (n=4) für den H2-Relaxin überexprimierenden Klon 10 im Vergleich zu FTC-133 Leervektorkontrollen, welche als Kontrolle (EGFP) diente. Bei jeder eingesetzten Zellzahl zeigte Klon 10 eine signifikant erhöhte Migration.

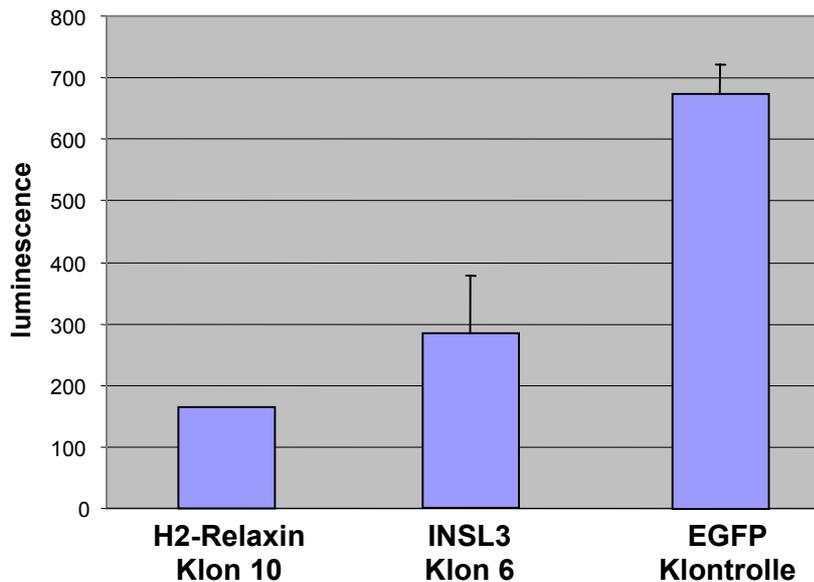


Migrationsstudien für eine H2-Relaxin-überexprimierende Transfektante der Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie FTC-238 haben ebenfalls eine Steigerung der zellulären Migration gezeigt.

Ein weiteres Ziel bei der Charakterisierung der stabilen FTC-133 Transfektanten war es, den möglichen Einfluss der Relaxin-artigen Peptidhormone auf Prozesse der Apoptose in den humanen Schilddrüsenkarzinomzellen aufzudecken. Hierzu kamen in den bislang durchgeführten Untersuchungen der Tunnel-Test sowie der Caspase-Glow Assay für den Nachweis aktivierter Caspase-3 und -7 zum Einsatz. Es ist jedoch beabsichtigt, die gewonnenen Apoptose-Daten durch eine FACS-Analyse für Annexin-V zu vertiefen. Unter normalen Kulturbedingungen, zeigten sowohl der Tunnel-Test als auch der Nachweis aktivierter Caspasen-3/7 keine Veränderungen für H2-Relaxin Klon 10, INSL3 Klon 6 oder die EGFP-Kontrolltransfektanten. Die Überexpression beider Relaxin-artigen Peptidhormone beeinflusste somit nicht das Apoptoseverhalten dieser Zelltransfektanten, auch nicht im Vergleich zu FTC-133 (nicht gezeigt). Wurden die Transfektanten jedoch für 6 h mit dem Proteinsynthese-Inhibitor und Apoptose-Induktor Cycloheximid (175 μ M) inkubiert, zeigten sowohl der H2-Relaxin Klon 10 sowie der INSL3 Klon 6 eine signifikant erhöhte Resistenz gegenüber Cycloheximid-induzierter Apoptose im Vergleich zu den EGFP-Transfektanten (Abb. 18). Dies könnte bedeuten, dass die in den humanen Schilddrüsenkarzinomzellen produzierten Relaxin-artigen Peptidhormone durch verminderte Apoptose-Neigung förderlich auf die Schilddrüsenkarzinogenese wirken könnten.

Abbildung 18:

Cycloheximid-vermittelte Induktion der Apoptose (n=3). Nach 6h Inkubation mit dem Proteinsynthese-Inhibitor Cycloheximid (175 μ M) zeigten FTC-133 EGFP Kontrollzellen eine Induktion der Apoptose mit erhöhter Aktivität von Caspase 3 und 7. Hingegen zeigten unter den gleichen Bedingungen weniger als 50% der Zellen des INSL3 Klon 6 und 20% der Zellen von H2-Relaxin Klon 10 eine Aktivierung der Caspasen. Dies deutet auf eine starke anti-apoptotische Wirkung für Relaxin und INSL3 in den FTC-133 Transfektanten hin.



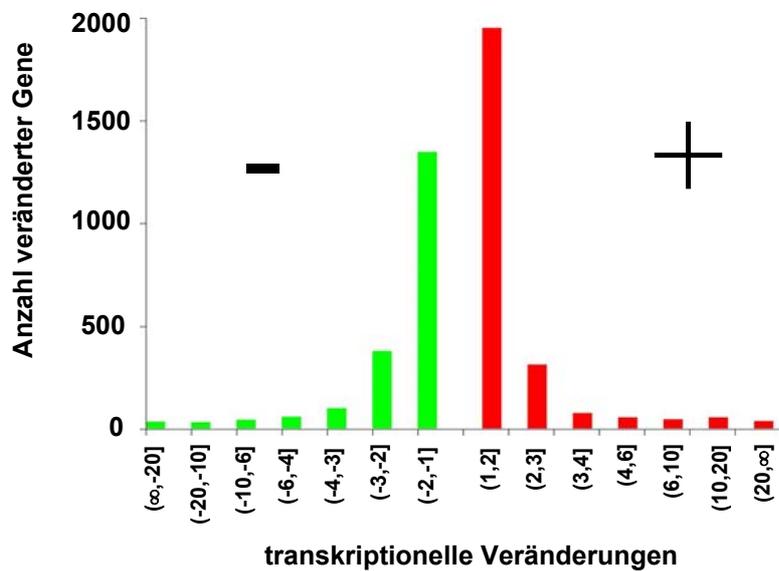
Semiquantitative RT-PCR Analysen für den H2-Relaxin Klon 10 und die EGFP-Kontrolle ergaben bislang keine Hinweise auf eine unterschiedliche transkriptionelle Regulation der folgenden Apoptose-assoziierten Gene: Bcl-2, Bcl-X(L), Bcl-W, Bag, Bad, Bim, Bis, Btf, Tegt, Survivin.

Zwischenresümee: Es konnte gezeigt werden, dass der H2-Relaxin Klon 10 und der INSL3 Klon 6 eine signifikant erhöhte Migration aufweisen. Beide Relaxin-artigen Peptide wirken anti-apoptotisch auf FTC-133 Zellen. Diese Daten lassen vermuten, dass Relaxin und möglicherweise auch INSL3 wichtige bislang unbekannte endokrine Modulatoren während der Karzinogenese der humanen Schilddrüse darstellen.

Mikroarray-Analysen von stabilen FTC-133 Transfektanten für H2-Relaxin und INSL3

Als Erste waren stabile FTC-133 Transfektanten mit Überexpression von H2-Relaxin verfügbar. Diese wurden vergleichend zu den FTC-133 EGFP-Leervektor-Transfektanten im Mikroarray (Affymetrix U-133) analysiert. Zahlreiche Gene waren in ihrer Expression signifikant verändert (Abb. 19).

Abbildung 19: Schematische Darstellung der Ergebnisse des Mikroarrays für Klon 10 mit Überexpression von H2-Relaxin i.V.z. FTC133-EGFP-Leervektor-kontrolle.



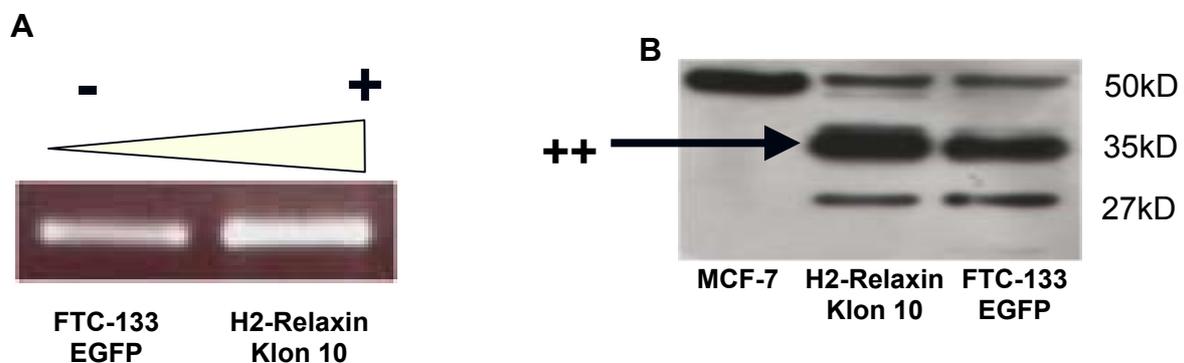
Aus der großen Anzahl von Genen mit veränderten Expressionsmustern in Klon 10 im Vergleich zu FTC-133-EGFP-Leervektortransfektanten wurden zunächst Mitglieder der Matrix-Metallo-proteinasen (MMP), deren Inhibitoren (TIMP), ADAM und Cathepsine analysiert (Tab. 1).

Tabelle 1. Auflistung der Anzahl untersuchter Gene der MMP, TIMP, ADAM und Cathepsin-Familien mit mindestens 2-fach erniedrigter oder erhöhter Expression in Klon 10.

	Gene	erniedrigte Expression	erhöhte Expression
MMP	24	0	1
TIMP	4	0	TIMP3 TIMP4
ADAM	34	5	2
Cathepsine	15	3	0

Hierbei zeigte TIMP-3 mit einer ca. 20-fach erhöhten Genexpression besonders starke Veränderungen. Die im Mikroarray nachgewiesene Erhöhung der TIMP-3 mRNA Level konnte wiederholt in cDNA Präparationen konfluent gewachsener FTC-133 H2-Relaxin-Transfektanten (Klon 10) bestätigt werden (Abb. 16A). Westernblot Analysen zeigten ebenfalls eine erhöhte Produktion von TIMP-3. Es konnten in den FTC-133 Transfektanten drei immunoreaktive TIMP-3 Isoformen detektiert werden, von denen in Klon 10 die 35 kD Isoform überexprimiert war (B). Die im Mikroarray für Klon 10 nachgewiesene erhöhte TIMP-4 mRNA Expression konnte bislang mit Westernblot-Analysen nicht bestätigt werden.

Abbildung 20: Vergleichende Darstellung der RT-PCR Daten mit erhöhter Expression von TIMP-3 mRNA in Klon 10 i.V.z. FTC-133-EGFP (A). Western Blot Analysen zellulärer Proteinextrakte zeigten eine erhöhte Menge von immunoreaktivem TIMP-3 Protein, Isoform 35 kD, in Klon 10. Die humane Brustkrebszelllinie MCF-7 diente als Positivkontrolle, exprimiert aber nur die 50 kD Form von TIMP3.



Die Analyse der Mikroarray-Daten für solche Gene, deren Produkte Einfluss nehmen können auf Prozesse der Zelladhäsion, Zellmigration und Modulation der ECM, zeigte eine große Anzahl von Genen unterschiedlicher Molekülfamilien auf, deren Expression durch H2-Relaxin in FTC-133 verändert wurde (Abb. 21).

Abbildung 21: Auflistung von Genen aus dem Mikroarray mit möglichem Einfluss auf die Zelladhäsion, Zellmigration und Modifikation der ECM, deren Expression in der H2-Relaxin-überexprimierenden FTC-133-Transfektante Klon 10 verändert waren. Hierbei zeigten sich für Collagen Col3A1 (-274-fach) die stärkste transkriptionelle Veränderung.

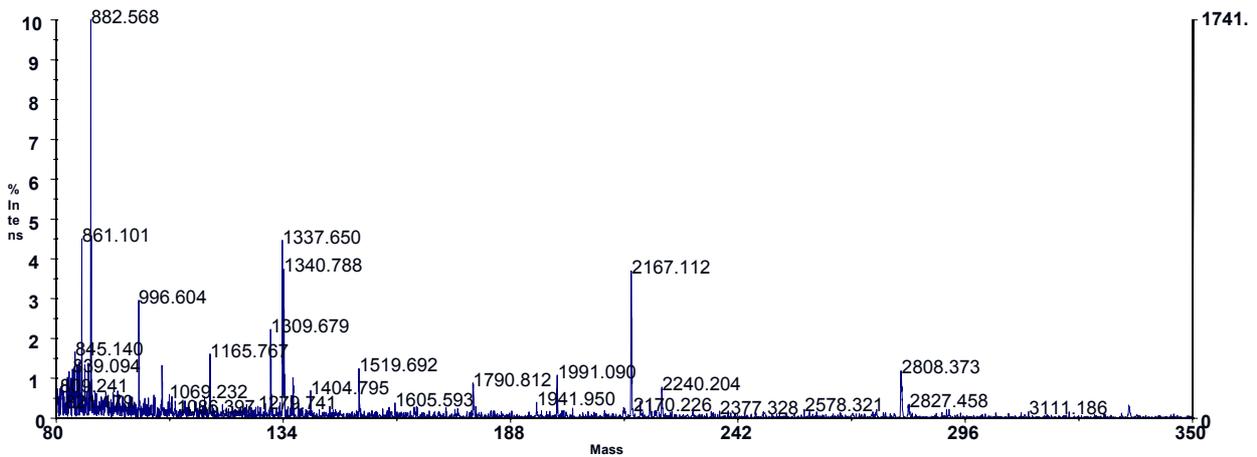
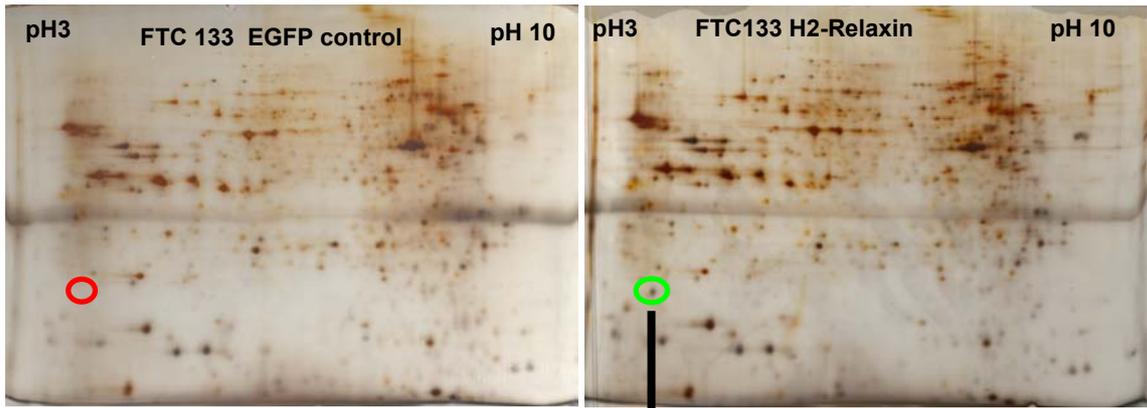
	Gene	erniedrigte Expression	erhöhte Expression
ICAM	35	3	5
Cadherine	49	7	2
Integrine	29	2	0
Connexine	10	0	1
Tactine	12	2	2
Invasions-assozierte Proteine	14	2	0
Junctional Proteine	8	0	2
Collagene	38	2	1

Zwischenresümee: Für die FTC-133-Transfektanten mit Überexpression von H2-Relaxin (Klon 10) konnten Veränderungen in der Expression von Genen der MMP-/TIMP-Familie nachgewiesen werden, welche auf z.T. unterschiedliche bislang unbekannte Funktionen von Relaxin in Schilddrüsenkarzinomzellen hindeuten. Die Überexpression der 35 kD-Isoform von TIMP-3 deutet auf komplexe und nicht nur auf die Inhibition von MMP beschränkte Prozesse hin, da TIMP-3 z.B. auch ein kompetitiver Inhibitor der Bindung von VEGF an seinen KDR-Rezeptor (Qi et al., 2003) ist und somit indirekt Einfluss auf Prozesse der Angiogenese und Apoptose (Ahonen et al., 2003) nehmen kann.

2D-SDS-PAGE Analysen der stabilen FTC-133 Transfektanten für H2-Relaxin

Zusätzlich zu den Mikroarray-Analysen zum Nachweis differentieller Genexpression wurden 2D gelelektrophoretische Analysen durchgeführt, um differentiell produzierte Proteine in den H2-Relaxin-überexprimierenden FTC-133-Transfektanten nachzuweisen. Wie für die INSL3-Transfektanten beschrieben wurden in der 1. Dimension 18 cm- und 24 cm-lange IEF-Strips mit einem pH-Bereich pH3-10 eingesetzt und die isoelektrisch fokussierten Proteine in der 2. Dimension auf 12% SDS-PAGE Gelen aufgetrennt. Initiale massenspektrometrische Untersuchungen im MALDI-ToF konnten einen differentiell exprimierten Proteinspot als das Aktin-bindende Protein Aktin-Depolymerizing Factor (ADF)/ Cofilin identifizieren. ADF/ Cofilin erhöht sowohl die Assoziations- wie auch die Dissoziationsrate der Aktinmonomere und beschleunigt den Umbau der Aktinfilamente. Dies deutet auf eine bislang nicht bekannte Funktion des H2-Relaxin auf den dynamischen Umbau des Aktinzytoskelettes hin.

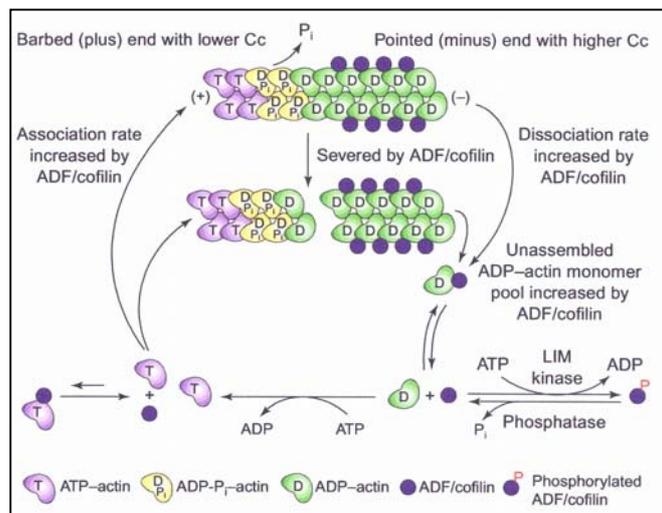
Abbildung 22: Vergleichende 2D SDS-PAGE Analysen für Klon 10 und die EGFP-Kontrolle identifizierten in massenspektrometrischen Analysen einen differentiellen Proteinspot als ADF/ Cofilin. Dies ist der erste Hinweis auf eine Rolle des H2-Relaxins bei den dynamischen Prozessen des Aktinfilament-Umbaues. Diese Daten könnten dazu beitragen, molekulare Mechanismen aufzudecken, welche das verstärkte Migrationsverhalten der H2-Relaxin-Transfektante erklären könnten.



Voyager Spec #1 MC=>TR=>AdvBC(32,0.5,0.1)=>AdvBC(32,0.5,0.1)=>NF0.7=>NF0.3=>TR[BP = 882.5, 1741]

Die MALDI-ToF-Analyse des in dem H2-Relaxin Klon 10 hochregulierten Proteinspot ergab humanes ADF/ Cofilin mit einer Wahrscheinlichkeit von 98%. Die Wirkungsweise des ADF/ Cofilin ist im folgenden schematisch dargestellt (Abb. 19).

Abbildung 23:
Zellulärer Wirkmechanismus des ADF/ Cofilin



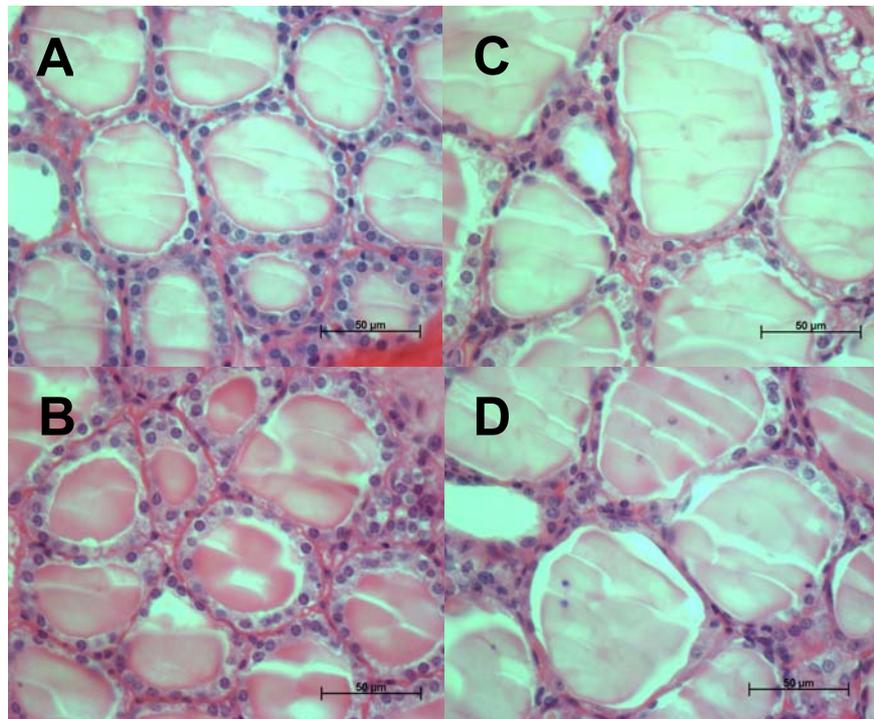
3.5 Schilddrüsenphänotyp der H2-Relaxin und INSL3 Doppel-knock-out-Maus

Um die Rolle der beiden Peptidhormone Relaxin und INSL3 für die Entwicklung und Differenzierung der Schilddrüse untersuchen zu können, haben wir die Schilddrüsen von Relaxin- und INSL3 KO-Mäuse histologisch untersucht. In Zusammenarbeit mit Professor Wolfgang Engel, Institut für Humangenetik der Universität Göttingen, und mit Dr. Laura Parry, Department of Zoology, University of Melbourne, Australien, wurden außerdem H2-Relaxin/INSL3 Doppel-knock-out Mäuse generiert. In der F1-Generation der Relaxin/INSL3 Doppel-KO-Mäuse zeigen erste histologische Untersuchungen deutliche Veränderungen in der Morphologie der Schilddrüsenepithelien. Schilddrüsen der Doppel-KO-Mäuse zeigen eine geschlechtsunabhängige Abflachung und Rarefizierung der Thyreozyten. Der Epithelverband wirkt unregelmäßig in der Epithelhöhe mit tendenziell flacherem Epithel und unregelmäßiger Anordnung der Zellkerne. Diese morphologischen Veränderungen könnten auf eine mangelnde Differenzierung der Thyreozyten hinweisen. Da diese morphologischen Epithelveränderungen auch bei homozygoten INSL3-KO-Mäusen, nicht jedoch bei homozygoten Relaxin-KO-Mäusen, nachweisbar sind, muss man einen spezifischen Einfluss des INSL3 auf die Thyreozyten vermuten (Abb. 24).

Abbildung 24:

Histologische Untersuchung von 3 μ m Schnitten muriner Schilddrüsenewebe; HE-Färbung.

- (A) Normale Maus,
- (B) homozygote Relaxin-KO-Maus,
- (C) homozygote Relaxin/INSL3 Doppel-KO-Maus,
- (D) Homozygote INSL3-KO-Maus.



Diese Daten zu morphologischen Veränderungen der Schilddrüse bei INSL3-KO-Mäusen sind hier erstmals beschrieben und deuten auf eine Rolle des INSL3 für die zelluläre Differenzierung der Thyreozyten hin.

3.6 Zusammenfassende Darstellung der bisherigen Ergebnisse

Die experimentellen Daten belegen eine neue funktionelle Rolle Relaxin-artiger Peptidhormone in humanen Schilddrüsenkarzinomen:

- Humanes INSL3 und Relaxin, mRNA und Protein, werden differenziell in humanen Schilddrüsengeweben exprimiert. INSL3 wird in Schilddrüsenkarzinomgeweben von hyper- und neoplastischen Thyreozyten exprimiert, Relaxin wird ausschließlich in neoplastischen Epithelien der humanen Schilddrüse exprimiert. Thyreozyten der normalen humanen Schilddrüse zeigen weder eine Expression für INSL3 noch für Relaxin.
- Der humane Relaxinrezeptor LGR7 wird ausschließlich in Schilddrüsenkarzinomgeweben exprimiert. Somit ist die neoplastische humane Schilddrüse ein Zielorgan für Relaxin. In Schilddrüsenkarzinomzellen wirkt Relaxin in einem auto-/parakrinen Regelkreis, der selbstverstärkende Effekte in neoplastischen humanen Thyreozyten erzeugen könnte. Es existiert noch kein gut charakterisiertes LGR8-Antiserum, so dass derzeit Aussagen zum LGR8-Rezeptorstatus in der humanen Schilddrüse fehlen. Transkripte für LGR8 sind in normalen und neoplastischen Schilddrüsengeweben nachweisbar.
- Stabile Transfektanten der humanen Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-133 wurden hergestellt, die H2-Relaxin (Klon 10) und INSL3 (Klon 6) überexprimieren und sekretieren. Diese sekretierten Relaxin-artigen Hormone sind bioaktiv.
- C-AMP-Assays belegen die Expression funktionaler Rezeptoren für INSL3 und Relaxin in FTC-133.
- Überexpression von Relaxin führt nicht zu Veränderungen in der Proliferation oder der Zellvitalität (MTT-Assay). Für den H2-Relaxin Klon 10 wurde eine erhöhte ATP-Produktion festgestellt. INSL3 dagegen setzt die zelluläre Proliferation leicht herab.
- Klon 10 (H2-Relaxin) und Klon 6 (humanes INSL3) zeigten unbehandelt keine Veränderung in der Zellvitalität. Jedoch waren diese Klone im Vergleich zur

EGFP-Leervektor-Kontrolle nach Induktion der Apoptose deutlich Apoptose-resistenter. Relaxin und INSL3 wirken somit in diesen FTC-133 Klonen anti-apoptotisch.

- H2-Relaxin und INSL3 sind migrationsfördernde Hormone für FTC-133. Diese Wirkung zeigt sich auch parakrin über den Kulturüberstand der Relaxin- oder INSL3 sezernierenden Klone auf FTC-133 Zellen.
- Überexpression von H2-Relaxin induziert zahlreiche Veränderungen im Genexpressionsmuster im Vergleich zur EGFP-Kontrolle. Zu den Genen, die in ihrer Expression im Klon 10 verändert waren, zählten u.a. Gene, deren Produkte die Zelladhäsion, Zellmigration und Zusammensetzung der ECM betreffen. Besonders hervorzuheben ist die starke Induktion von TIMP3 auf RNA- und Proteinebene.
- Veränderungen im Proteinmuster konnten in 2D-Gelanalysen für die Klone 10 (H2-Relaxin) und 6 (humanes INSL3) detektiert werden. Mit MALDI-ToF konnte im Klon 10 ein differentiell exprimierter Proteinspot als das Aktin-bindende ADF/Cofilin identifiziert werden. Klon 6 zeigte eine signifikante Herunterregulation in der Proteinsynthese.
- Der inhibitorische Transkriptionsfaktor Id-2H aus der Familie der Helix-loop-Helix (HLH) Proteine wird in der FTC-133-INSL3-Transfektante transkriptionell signifikant induziert.
- Erste Untersuchungen der Schilddrüsengewebe von Relaxin/INSL3 Doppel-KO-Mäusen zeigen morphologische Veränderungen des Epithels, welche auf eine mangelnde Differenzierung der Thyreozyten in Relaxin/INSL3 defizienten Mäusen hinweisen könnten. Dieser Phänotyp tritt auch bei homozygoten INSL3-KO-Mäusen auf und ist daher als ein INSL3-Phänotyp zu betrachten.

4. Diskussion und Ausblick

Für die Untersuchungen zur Rolle der Peptidhormone Relaxin und INSL3 in Tumoren der humanen Schilddrüse wurden neuartige Zellkulturmodelle generiert und charakterisiert. Hierbei kamen Relaxin- und INSL3-überexprimierende stabile Transfektanten der humanen Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie FTC-133 sowie entsprechende EGFP-Leervektorkontrollen zum Einsatz. Mit diesen humanen Zellmodellen wurde es möglich, auto- und parakrine Wirkungen jeweils eines der beiden Peptidhormone auf Schilddrüsenkarzinomzellen zu untersuchen. Die mit diesen zellulären Modellen bisher durchgeführten Untersuchungen zeigten Gemeinsamkeiten, aber auch deutliche Unterschiede in der biologischen Wirkung der beiden Peptide Relaxin und INSL3 in der follikulären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie FTC-133. Vor dem Hintergrund, dass INSL3 ausschließlich an den G-Protein-gekoppelten membranständigen Rezeptor LGR8, nicht jedoch an den Relaxinrezeptor LGR7 bindet, können die spezifischen zellulären Effekte der INSL3-überexprimierenden FTC-133-Transfektanten auf LGR8-vermittelte Signalwege zurückgeführt werden.

Die Relaxin-überexprimierenden FTC-133-Transfektanten zeigten deutliche Veränderungen der Aktivität solcher Gene auf, die für die Modulation der extrazellulären Matrix (ECM) bedeutend sind. Veränderungen der ECM können eine vermehrte Migration/ Invasivität von Tumorzellen bedingen. Unter den in ihrer Expression veränderten Genen sind außer Cadherinen, Connexinen, Taktinen, ICAMs (Intracellular Adhesion Molecules), ADAMs (A Disintegrin And Metalloproteinase) vor allem die Relaxin-induzierte Herabregulation von Kollagen Col3A1 und die Induktion von TIMP3 auf Transkript- und Proteinebene hervorzuheben. Die erhebliche transkriptionelle Herabregulation des Kollagen Col3A1 durch Relaxin in FTC-133 weist auf die anti-fibrotische Wirkung des Relaxins hin. Eine potentiell klinisch bedeutsame Fibrose-protective Modulation der ECM durch lokale Relaxinwirkung wurde in verschiedenen Organsystemen beschrieben. Relaxin-knockout Mäuse zeigen Altersveränderungen in der Lunge, Prostata und im Herzen, welche mit vermehrter Kollagenproduktion einhergehen (Zhao et al., 2003; Samuel et al., 2003). Der Einfluss des Relaxins auf ECM-modulierende Moleküle ist komplex und ist abhängig vom untersuchten Zellsystem und der Spezies. Systemisch appliziertes Relaxin führt in präpubertären Schweinen zu einer

Aktivitätssteigerung der vor allem Kollagen Typ IV abbauenden Gelatinasen MMP-2 und MMP-9. In isolierten uterinen und zervikalen Fibroblasten jedoch ist diese Gelatinase-Aktivität aufgrund einer ebenfalls Relaxin-induzierten Induktion der Gelatinase-Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 vermindert (Lenhart et al., 2002). Die Relaxin-vermittelte Induktion von Proformen der Kollagenasen MMP-1 und MMP-3 in humanen primären Fibroblasten der Zervix uteri (Palewala et al., 2001), die vermehrte Sekretion von 92 kD- und 63 kD-Kollagenasen in kultivierten Granulosazellen der Ratte (Hwang et al., 1996) und die vermehrte Produktion der MMP-1-Kollagenase in Nierenfibroblasten der Ratte (Masterson et al., 2004) resultieren in einer Reduktion des Kollagengehaltes in diesen Organen. In neoplastischen Zellen, wie den humanen Brustkrebszelllinien MCF-7 und SK-BR3, fördert Relaxin die Invasivität dieser Brustkrebszellen in einem Matrigel-Invasionsassay durch Induktion der Genaktivität für MMP-2, -9, -13 und -14 und Steigerung der Sekretion von MMP-2, -7 und -9 Proteinen (Binder et al., 2002). Auch in der CF33.Mt Brustkrebszelllinie des Hundes induziert Relaxin einen invasiven Phänotyp (Silvertown et al., 2003). Primäre Maus-Fibroblasten der Niere reagieren auf Relaxin mit einem vermehrten Ubiquitin-abhängigen Abbau von Fibronectin, einem großen extrazellulären Adhäsionsmolekül, dessen Akkumulation mit der Pathogenese von fibrosierenden Erkrankungen verbunden ist. Eine Relaxin-vermittelte Induktion von MMP-1 wurde auch in humanen Lungenfibroblasten beschrieben, ein Effekt, welcher zusammen mit der Inhibition TGF-beta-induzierter Kollagen I und III Überexpression und Vermehrung von Fibronectin zur Verhinderung Bleomycin-induzierter Lungenfibrose beiträgt (Unemori et al., 1996) und für die progrediente Lungenfibrose in Relaxin knockout Mäusen verantwortlich sein könnte. Im Gegensatz zu den Befunden mit humanen Brustkrebszellen lässt sich in Relaxin-überexprimierenden Transfektanten der humanen Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-133 keine signifikante Induktion von MMPs nachweisen. Dies könnte auf einen konzentrationsabhängigen Effekt hinweisen, da die Mengen sezernierten Relaxins nach Messungen im Relaxin-ELISA 30-50 pM betragen und damit unter den in oben genannten Studien eingesetzten Relaxinmengen liegen. Daten von Qin et al., 1997 belegen, dass Konzentrationen des H2-Relaxins von 250 pg/ml (= 25 pM) keine MMP-3 Sekretion in humanen Amnion-Explantaten induzieren. Relaxinmengen von 25 ng/ml (= 2,5 nM) führen jedoch im gleichen Organsystem zur vermehrten Sekretion von MMP-3, nicht aber zur Erhöhung von TIMP1 (Qin et al., 1997). Eine

dosisabhängige Wirkung für Relaxin wurde auch bei humanen Brustkrebszellen MCF-7 beschrieben (Bigazzi et al., 1992). In den H2-Relaxin FTC-133-Transfektanten wird die Expression der 35 kD Isoform des TIMP3 auf RNA- und Proteinebene induziert. TIMP1-4 binden und inhibieren MMPs. TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-4 werden in löslicher Form sekretiert, während TIMP-3 mit der ECM assoziiert ist (Pavloff et al., 1992; Leco et al., 1994; Fariss et al., 1997; Yu et al., 2000) und proapoptotisch wirkt (Baker et al., 1999). Neben seiner Rolle als Inhibitor der MMPs spielt TIMP3 auch als Inhibitor von zellulärer Migration und Angiogenese eine Rolle. TIMP3 inhibiert spezifisch und konzentrationsabhängig die VEGF-induzierte Migration KDR-positiver Endothelzellen und blockiert die Bindung von VEGF an den VEGF-Rezeptor KDR (Qi et al., 2003). Ob dieser Mechanismus auch in der Schilddrüse bedeutend ist bedarf weiterer Untersuchungen. Die Microarray-Analysen dieser Relaxin-Transfektante haben gezeigt, dass Relaxin in FTC-133 nicht zu einer Induktion von VEGF führt, wie es für Stromazellen und glanduläre Epithelzellen des humanen Endometriums und für die humane myelo-monozytäre Leukämiezelllinie THP1 beschrieben wurde (Unemori et al., 1999, 2000; Palejwala et al., 2002). In Ratten bewirkte die peritoneale Injektion von Relaxin keine vermehrte mesenteriale Angiogenese (Norrby et al., 1996). Hohe zirkulierende Relaxin-Serumwerte allein führen demnach per se nicht zur Gefäßneubildung. Dies ist ein weiterer Beleg für die spezies-, zelltyp- und zelldifferenzierungs-abhängige Wirkung des Relaxins.

In humanen Melanomzellen resultiert die Expression von TIMP3 in einer Sensibilisierung gegenüber TNF-alpha -, anti-FAS-Antikörper und TRAIL-induzierter Apoptose (Ahonen et al., 2003). Dies erfolgt über eine Stabilisierung der drei „death“ Rezeptoren TNF-R1, FAS und TRAIL-R1 (TNF-related apoptosis inducing ligand receptor-1) und die Aktivierung ihrer apoptotischen Signalkaskade über Caspase-8. Trotz vermehrten TIMP-3 Proteins in FTC-133-H2-Relaxin-Transfektanten konnte keine Zunahme der Apoptose nachgewiesen werden. H2-Relaxin-Transfektanten reagierten im Vergleich zu Leervektor Transfektanten gegenüber dem Apoptose-auslösenden Agens Cycloheximid mit einer signifikant reduzierten Sensibilität, was auf eine anti-apoptotische Wirkung von Relaxin in dieser humanen Schilddrüsenkarzinomzelllinie hinweist. Eine anti-apoptotische Wirkung von Relaxin wurde bereits in der Cervix uteri und der Vagina trächtiger Ratten beschrieben (Zhao et al., 2001) und trägt möglicherweise zur Zellvermehrung und dem Wachstum dieser Organe während der zweiten Hälfte der Trächtigkeit bei. Männliche homozygote

Relaxin knockout Mäuse weisen eine vermehrte Expression von pro-apoptotischen Caspase-9 und BAX in Prostata und Testis auf. Diese Zunahme der Apoptosemarker in Relaxin knockout Mäusen im Vergleich zu normalen Mäusen fällt vor allem bei älteren Tieren ins Gewicht (>6 Monate). Die anti-apoptotische Relaxinwirkung in H2-Relaxin FTC-133-Transfektanten könnte auf eine potentielle Rolle des Relaxins während der Karzinogenese in der humanen Schilddrüse hinweisen. Schilddrüsenkarzinome unterschiedlicher Differenzierung zeigen eine starke Produktion eines potentiell funktionstüchtigen Relaxin-LGR7 Ligand-Rezeptor Systems.

H2-Relaxin-Transfektanten wiesen im Vergleich zu FTC-133-Leervektortransfektanten eine signifikant erhöhte zelluläre Migration auf. Diese erhöhte Zellmotilität bezieht sich nicht nur auf die H2-Relaxin überexprimierenden FTC-133 Transfektanten selber, sondern ist auch nach parakriner Wirkung des sezernierten H2-Relaxins auf FTC-133 Mutterzellen oder Leervektor-Transfektanten nachzuweisen. Dieser parakrine Effekt unterstreicht die biologische Aktivität des sezernierten H2-Relaxins und zeigt, dass Relaxin die Motilität und Beweglichkeit dieser Schilddrüsenkarzinomzellen fördert. Eine enzymatische ECM-modulierende Aktivität ist für diese Migration nicht notwendig, da die im Assay verwendeten Filter nicht beschichtet waren. Die massenspektrometrische Analyse eines der unter Relaxin induzierten und mit 2D-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinspots identifizierte das Protein Actin-Depolymerizing Factor (ADF)/ Cofilin. Die vermehrte Produktion des ADF/ Cofilin in den H2-Relaxin-überexprimierenden FTC-133 Transfektanten könnte eine molekulare Erklärung für die Motilitätssteigerung unter Relaxin darstellen. ADF/ Cofilin gehört zu einer Reihe zellulärer Proteine, welche am Aktinfilament-Umbau beteiligt sind (dos Remedios et al., 2003). Die Aktivität von ADF/ Cofilin wird über eine reversible Phosphorylierung durch LIM-Kinasen und „slingshot“-Phosphatasen reguliert (Gungabissoon et al., 2003). Das Aktin-Zytoskelett ist wesentlich an der Zellform, der Motilität, der Polarität und der Phagozytose beteiligt (Suetsugu et al., 2003) und ADF/Cofilin vermittelt den schnellen Aktin-Umbau (Gungabissoon et al., 2003; Bamburg et al., 2003). Die H2-Relaxin-induzierte erhöhte zelluläre Motilität könnte somit über eine vermehrte Verfügbarkeit des Aktin-bindenden Proteins ADF/ Cofilin bedingt sein und auch reguliert werden.

Metabolische Assays mit den H2-Relaxin Transfektanten und der Leervektor-Transfektante von FTC-133 haben gezeigt, dass sezerniertes Relaxin nicht zytotoxisch wirkt. Das Zytotoxizitätsassay beruht auf dem NADPH-abhängigen Umbau von farblosen Tatrazolumsalzen in intensiv gefärbte Formazanderivate und ist an die Aktivität intakter Mitochondrien gebunden. BrdU-DNA-Einbaustudien haben gezeigt, dass das von FTC-133 H2-Relaxin Transfektanten sezernierte Relaxin nicht proliferationsfördernd wirkt. Die im Relaxin-ELISA quantifizierten Mengen sezernierten Relaxins liegen mit 30-50 pM Relaxin noch unterhalb der Konzentrationen von 1 nM extern zugeführtem Relaxin, welche in humanen MCF-7 Brustkrebszellen proliferationsfördernd wirken (Bigazzi et al., 1992; Bani et al., 1994). Hierbei muss beachtet werden, dass die auf die Zellen tatsächlich einwirkenden Konzentrationen von Relaxin für *in-vitro* Studien aufgrund der hohen Absorption des Relaxins an das Plastik der Kulturgefäße nur schwierig zu bestimmen sind. Bei einer Absorption des Relaxins an Plastik/ Glass von mehr als 50% (Qin et al., 1997) ist zu erwarten, dass mit zunehmender Inkubationsdauer immer weniger Relaxin im Medium vorhanden ist. Deutlich höhere lokale Konzentrationen von bioaktivem H2-Relaxin sind bei den stabilen Relaxin-Transfektanten zu vermuten, welche die im Überstand gemessenen Relaxinkonzentrationen erheblich übersteigen sollten und hierdurch auto- und parakrine Effekte in diesem Zellsystem auslösen können. Die biologische Wirksamkeit des sezernierten Relaxins wurde im cAMP-Assay deutlich, bei dem sezerniertes H2-Relaxin im etablierten Zellmodell der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 eine Erhöhung des intrazellulären Botenstoffes cAMP induzierte (Bigazzi et al., 1991, 1992). Eine Relaxin-induzierte cAMP-Erhöhung war auch für die humane myelomonozytäre Vorläuferzelllinie THP-1 und für humane endometriale Stromazellen beschrieben worden (Bartsch et al., 2001). Der Zellkultur-Überstand der FTC-133 H2-Relaxin Transfektante löste innerhalb von 20 Minuten einen signifikanten Anstieg der intrazellulären cAMP Menge in MCF-7 Zellen aus, während der Überstand von FTC-133 Leervektortransfektanten keinen cAMP-Anstieg induzierte. Die Mengen sezernierten Relaxins sind demnach ausreichend, um durch Bindung an den G- α_s -gekoppelten Relaxin-Rezeptor LGR7 eine biologische Wirkung in FTC-133 zu entfalten.

Der Nachweis signifikant erhöhter zellulärer ATP-Spiegel in den H2-Relaxin Transfektanten gegenüber den Leervektor-Transfektanten lassen auf eine vermehrte ATP-Produktion und Zunahme der mitochondrialen Aktivität in den H2-Relaxin FTC-

133-Transfektanten schließen. Microarray-Analysen der H2-überexprimierenden FTC-133-Transfektanten zeigen eine Zunahme der Genaktivität zahlreicher nukleärer Gene, welche für mitochondriale Proteine kodieren sowie eine vermehrte Aktivität von Genen für die Kodierung lysosomaler ATPasen und für Mitglieder des ATP-binding-cassette Komplexes. Weitere Untersuchungen zu dieser Fragestellung sind geplant.

In der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 stimuliert Relaxin den L-Arginin-NO Weg und wirkt über eine erhöhte Aktivität der iNOS und daraus resultierende Zunahme von NO anti-proliferativ in Konzentrationen von 10^{-8} M bis 10^{-6} M. Die Relaxin induzierte NO-Induktion führt im Nacktmaus-Modell über eine Hemmung der DNA-Synthese, der mitochondrialen Atmung und der Aktivität von Cytochrom P450 Enzymen zur Reduktion des Tumorwachstums von humanen MCF-7 Brustkrebszellen (Bani et al., 1995, 1998, 1999; Bogdan, 2001). Es wird erneut deutlich, dass die zellulären Effekte des Relaxins konzentrations- und zellspezifisch sind, denn Relaxin scheint die mitochondriale Atmung in FTC-133 Schilddrüsenkarzinomzellen im Gegensatz zu MCF-7 Zellen positiv zu beeinflussen. Relaxin- und INSL3-überexprimierende FTC-133 Transfektanten zeigten neben gleichartigen Veränderungen auch Unterschiede. Bei den INSL3-überexprimierenden FTC-133-Transfektanten war die zelluläre Proliferation leicht vermindert. Es lag kein zytotoxischer Einfluss durch INSL3 vor. Initiale Experimente zeigen, dass wie beim H2-Relaxin das INSL3 eine Zunahme der zellulären Migration von FTC-133 bewirkt. Wie die Relaxin-Transfektanten zeigen die INSL3-Transfektanten von FTC-133 im Caspase-Assay eine anti-apoptotische Wirkung. Über die Wirkung von INSL3 in Tumoren ist bisher nichts bekannt. Die Induktion von INSL3 in Karzinomen der humanen Mamma (Hombach-Klonisch et al., 2000) und Schilddrüse (Hombach-Klonisch et al., 2003) weisen auf eine auto- und parakrine Funktion des INSL3 in diesen Tumoren hin. Die migrationsfördernde und anti-apoptotische Wirkung des INSL3 in FTC-133-Transfektanten beschreibt erstmals zelluläre Effekte dieses Peptidhormones, die für die Karzinogenese bedeutend sind. Relaxin und INSL3 scheinen diese Effekte zumindest teilweise über andere Wege zu erzeugen. Microarray-Analysen der INSL3-überexprimierenden FTC-133 Transfektante zeigten ein deutlich anderes Expressionsprofil als die H2-Relaxin-FTC-133-Transfektanten. Die Anzahl von regulierten ECM-modulierenden Genen ist unter dem Einfluss von INSL3 geringer, aber beinhaltet, wie bei den H2-Transfektanten, eine

transkriptionelle Hochregulation von TIMP3. Demgegenüber deutet die Induktion der Genaktivität für die membranständige Matrix-Metalloproteinase MMP-14 und für Kollagene (alpha-Untereinheiten von Typ-I Prokollagen, Typ-XI- und Typ-VI-Kollagen) und des Kollagen Typ-I Rezeptors (CD36 Antigen) auf eine zum Relaxin unterschiedliche zelluläre Wirkung des INSL3 hin. Mit der Induktion von Kollagenen-Untereinheiten wird eine zum Relaxin geradezu konträre Wirkung des INSL3 auf die extrazelluläre Matrix deutlich. Die 2D-gelelektrophoretische Auftrennung zellulärer Proteine ergab wiederholt eine deutliche Reduktion zahlreicher Proteinspots gegenüber der FTC-133 H2-Relaxin- und Leervektor-Transfektanten. Gleichzeitig findet sich in den INSL3 Transfektanten eine signifikante Zunahme der Genaktivität für den inhibitorischen Transkriptionsfaktor Id-2H. Id-2H gehört in die Gruppe der Helix-loop-helix (HLH) Proteine, hat jedoch keine basic-Domäne und kann keine DNA-Bindung vermitteln. Durch Heterodimerisierung mit anderen basic Helix-loop-helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren, kann Id-2H jedoch die Bindung von bHLH an die DNA unterbinden und bewirkt hierdurch eine negative transkriptionelle Regulation. Ob dieser Mechanismus zumindest teilweise an der Reduktion einiger zellulärer Proteine beteiligt ist, wird derzeit intensiv untersucht. Die weitere Auswertung unterschiedlich regulierter Gene aus den Microarray-Analysen wird zudem wichtige Hinweise auf die von beiden Peptiden induzierten LGR7 und LGR8 Signalwege liefern. Massenspektrometrische Analysen der in den INSL3-Transfektanten vermindert exprimierten Proteinspots werden wertvolle Hinweise auf eine funktionelle Bedeutung des INSL3 für die Tumorgenese der humanen Schilddrüse ermöglichen. Um die physiologische Rolle des INSL3 in der Entwicklung und Funktion der Schilddrüse erfassen zu können, wurden in Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen IM Adham/ W Engel, Göttingen, und L Parry, Melbourne, Australien, die Schilddrüsengewebe von INSL3-KO-, Relaxin-KO und neuartigen INSL3-/ Relaxin-Doppel-KO-Mäusen untersucht. Die histologische Beurteilung ergab einen bislang nicht beschriebenen Schilddrüsen-Phänotyp in INSL3-KO-Mäusen und den INSL3-/ Relaxin-Doppel-KO-Mäusen, bei dem die follikulären Thyreozyten deutliche Unterschiede der Epithelhöhe innerhalb eines Follikels aufwiesen. Das interstitielle Bindegewebe erschien vermehrt. Dieser Phänotyp ist histologisch eindeutig als ein INSL3-Phänotyp zu identifizieren, da homozygote Relaxin-KO-Mäuse wie normale Mäuse mit gleichem genetischen Hintergrund keine Veränderungen der Schilddrüse aufweisen. Die unregelmäßige Epithelhöhe der Thyreozyten innerhalb der Follikel in

homozygoten INSL3-KO-Mäusen deutet auf eine veränderte Differenzierung oder mangelnde funktionelle Synchronisation der Thyreozyten hin. Erste immunhistochemische Untersuchungen bestätigen, dass die Produktion und Speicherung des kolloidalen Thyreoglobulins in den Schilddrüsen der INSL3-KO-Mäuse unverändert ist. Weitere Untersuchungen sollen klären, ob INSL3-KO-Mäuse Veränderungen ihrer Serumhormonspiegel für T3, T4 und TSH-Spiegel zeigen und wie der TSH-Rezeptor-Status in diesen transgenen Mäusen ist.

Die Untersuchung des INSL3-Schilddrüsenphänotyps sowie die weiteren Arbeiten mit den Relaxin- und INSL3-überexprimierenden FTC-133 Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien werden in Zukunft wertvolle Hinweise zur Rolle dieser Relaxin-artigen Peptide für die Funktion der Schilddrüse und für die Bedeutung bei Schilddrüsenkarzinomen liefern.

5. Literaturverzeichnis

- [1] Adham IM, Burkhardt E, Benahmed M, Engel W. Cloning of a cDNA for a novel insulin-like peptide of the testicular Leydig cells. *J Biol Chem* 1993;268(35):26668-72.
- [2] Ahonen M, Poukkula M, Baker AH, Kashiwagi M, Nagase H, Eriksson JE, Kahari VM. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 induces apoptosis in melanoma cells by stabilization of death receptors. *Oncogene* 2003;22(14):2121-34.
- [3] Baker AH, George SJ, Zaltsman AB, Murphy G, Newby AC. Inhibition of invasion and induction of apoptotic cell death of cancer cell lines by overexpression of TIMP-3. *Br J Cancer* 1999;79(9-10):1347-55.
- [4] Bamberg JR. Introduction to cytoskeletal dynamics and pathfinding of neuronal growth cones. *J Histochem Cytochem* 2003;51(4):407-9.
- [5] Bani G, Bigazzi M. Morphological changes induced in mouse mammary gland by porcine and human relaxin. *Acta Anat (Basel)* 1984;119(3):149-54.
- [6] Bani G, Bigazzi M, Bani D. Effects of relaxin on the mouse mammary gland. I. The myoepithelial cells. *J Endocrinol Invest* 1985;8(3):207-15.
- [7] Bani G, Bigazzi M, Bani D. The effects of relaxin on the mouse mammary gland. II. The epithelium. *J Endocrinol Invest* 1986;9(2):145-52.
- [8] Bani D, Riva A, Bigazzi M, Bani Sacchi T. Differentiation of breast cancer cells in vitro is promoted by the concurrent influence of myoepithelial cells and relaxin. *Br J Cancer* 1994;70(5):900-4.
- [9] Bani D, Masini E, Bello MG, Bigazzi M, Sacchi TB. Relaxin activates the L-arginine-nitric oxide pathway in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1995;55(22):5272-5.
- [10] Bani D, Failli P, Bello MG, Thiemermann C, Bani Sacchi T, Bigazzi M, Masini E. Relaxin activates the L-arginine-nitric oxide pathway in vascular smooth muscle cells in culture. *Hypertension* 1998;31(6):1240-7.
- [11] Bani D, Flagiello D, Poupon MF, Nistri S, Poirson-Bichat F, Bigazzi M, Bani Sacchi T. Relaxin promotes differentiation of human breast cancer cells MCF-7 transplanted into nude mice. *Virchows Arch* 1999;435(5):509-19.

- [12] Bartsch O, Bartlick B, Ivell R. Relaxin signalling links tyrosine phosphorylation to phosphodiesterase and adenylyl cyclase activity. *Mol Hum Reprod* 2001;7(9):799-809.
- [13] Bathgate R, Balvers M, Hunt N, Ivell R. Relaxin-like factor gene is highly expressed in the bovine ovary of the cycle and pregnancy: sequence and messenger ribonucleic acid analysis. *Biol Reprod* 1996;55(6):1452-7.
- [14] Bathgate RA, Samuel CS, Burazin TC, Layfield S, Claasz AA, Reytomas IG, Dawson NF, Zhao C, Bond C, Summers RJ, Parry LJ, Wade JD, Tregear GW. Human relaxin gene 3 (H3) and the equivalent mouse relaxin (M3) gene. Novel members of the relaxin peptide family. *J Biol Chem* 2002;277(2):1148-57.
- [15] Bathgate RA, Siebel AL, Tovote P, Claasz A, Macris M, Tregear GW, Parry LJ. Purification and characterization of relaxin from the tammar wallaby (*Macropus eugenii*): bioactivity and expression in the corpus luteum. *Biol Reprod* 2002;67(1):293-300.
- [16] Bigazzi M, Brandi ML, Bani G, Sacchi TB. Relaxin influences the growth of MCF-7 breast cancer cells. Mitogenic and antimitogenic action depends on peptide concentration. *Cancer* 1992;70(3):639-43.
- [17] Binder C, Binder, L., Gurlit, L., Einspanier, A. High serum concentrations of relaxin correlate with dissemination of breast cancer. In: Tregear GW, Ivell, R., Bathgate, R.A., Wade, J.D. *Relaxin 2000*: Kluwer Academic Publishers, 2001.
- [18] Binder C, Hagemann T, Husen B, Schulz M, Einspanier A. Relaxin enhances in-vitro invasiveness of breast cancer cell lines by up-regulation of matrix metalloproteases. *Mol Hum Reprod* 2002;8(9):789-96.
- [19] Bogatcheva NV, Truong A, Feng S, Engel W, Adham IM, Agoulnik AI. GREAT/LGR8 is the only receptor for insulin-like 3 peptide. *Mol Endocrinol* 2003;17(12):2639-46.
- [20] Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2001;2(10):907-16.
- [21] Bongers-Binder S, Burgardt A, Seeger H, Voelter W, Lippert TH. Distribution of immunoreactive relaxin in the genital tract and in the mammary gland of non-pregnant women. *Clin Exp Obstet Gynecol* 1991;18(3):161-4.
- [22] Bryant-Greenwood GD, Schwabe C. Human relaxins: chemistry and biology. *Endocr Rev* 1994;15(1):5-26.

- [23] Bullesbach EE, Schwabe C. On the receptor binding site of relaxins. *Int J Pept Protein Res* 1988;32(5):361-7.
- [24] Bullesbach EE, Yang S, Schwabe C. The receptor-binding site of human relaxin II. A dual prong-binding mechanism. *J Biol Chem* 1992;267(32):22957-60.
- [25] Bullesbach EE, Schwabe C. Functional importance of the A chain loop in relaxin and insulin. *J Biol Chem* 1994;269(18):13124-8.
- [26] Bullesbach EE, Schwabe C. A novel Leydig cell cDNA-derived protein is a relaxin-like factor. *J Biol Chem* 1995;270(27):16011-5.
- [27] Bullesbach EE, Schwabe C. The chemical synthesis of rat relaxin and the unexpectedly high potency of the synthetic hormone in the mouse. *Eur J Biochem* 1996;241(2):533-7.
- [28] Bullesbach EE, Schwabe C. Tryptophan B27 in the relaxin-like factor (RLF) is crucial for RLF receptor-binding. *Biochemistry* 1999;38(10):3073-8.
- [29] Bullesbach EE, Schwabe C. The relaxin receptor-binding site geometry suggests a novel gripping mode of interaction. *J Biol Chem* 2000;275(45):35276-80.
- [30] Burkhardt E, Adham IM, Hobohm U, Murphy D, Sander C, Engel W. A human cDNA coding for the Leydig insulin-like peptide (Ley I-L). *Hum Genet* 1994;94(1):91-4.
- [31] Burkhardt E, Adham IM, Brosig B, Gastmann A, Mattei MG, Engel W. Structural organization of the porcine and human genes coding for a Leydig cell-specific insulin-like peptide (LEY I-L) and chromosomal localization of the human gene (INSL3). *Genomics* 1994;20(1):13-9.
- [32] Crawford RJ, Hudson P, Shine J, Niall HD, Eddy RL, Shows TB. Two human relaxin genes are on chromosome 9. *Embo J* 1984;3(10):2341-5.
- [33] Crawford RJ, Hammond VE, Roche PJ, Johnston PD, Tregear GW. Structure of rhesus monkey relaxin predicted by analysis of the single-copy rhesus monkey relaxin gene. *J Mol Endocrinol* 1989;3(3):169-74.
- [34] Deryugina EI, Ratnikov B, Monosov E, Postnova TI, DiScipio R, Smith JW, Strongin AY. MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin alphavbeta3 promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. *Exp Cell Res* 2001;263(2):209-23.

- [35] Ding L, Becker AB, Suzuki A, Roth RA. Comparison of the enzymatic and biochemical properties of human insulin-degrading enzyme and *Escherichia coli* protease III. *J Biol Chem* 1992;267(4):2414-20.
- [36] dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, Nosworthy NJ. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev* 2003;83(2):433-73.
- [37] Du YC, Minasian E, Tregear GW, Leach SJ. Circular dichroism studies of relaxin and insulin peptide chains. *Int J Pept Protein Res* 1982;20(1):47-55.
- [38] Eigenbrot C, Randal M, Quan C, Burnier J, O'Connell L, Rinderknecht E, Kossiakoff AA. X-ray structure of human relaxin at 1.5 Å. Comparison to insulin and implications for receptor binding determinants. *J Mol Biol* 1991;221(1):15-21.
- [39] Ellerbroek SM, Stack MS. Membrane associated matrix metalloproteinases in metastasis. *Bioessays* 1999;21(11):940-9.
- [40] Failli P, Nistri S, Quattrone S, Mazzetti L, Bigazzi M, Sacchi TB, Bani D. Relaxin up-regulates inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide generation in rat coronary endothelial cells. *Faseb J* 2002;16(2):252-4.
- [41] Fariss RN, Apte SS, Olsen BR, Iwata K, Milam AH. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 is a component of Bruch's membrane of the eye. *Am J Pathol* 1997;150(1):323-8.
- [42] Fei DT, Gross MC, Lofgren JL, Mora-Worms M, Chen AB. Cyclic AMP response to recombinant human relaxin by cultured human endometrial cells-- a specific and high throughput in vitro bioassay. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;170(1):214-22.
- [43] Fields P, Kondo S, Tashima L, Bryant-Greenwood G, Greenwood F. Expression of SQ10 (a preprorelaxin-like gene) in the pregnant rabbit placenta and uterus. *Biol Reprod* 1995;53(5):1139-45.
- [44] Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton AR, Jr., Bland KI. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol Endocrinol* 2002;16(1):70-84.
- [45] Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 1989;339(6219):58-61.

- [46] Fowlkes JL, Enghild JJ, Suzuki K, Nagase H. Matrix metalloproteinases degrade insulin-like growth factor-binding protein-3 in dermal fibroblast cultures. *J Biol Chem* 1994;269(41):25742-6.
- [47] Fowlkes JL, Suzuki K, Nagase H, Thrailkill KM. Proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-3 during rat pregnancy: a role for matrix metalloproteinases. *Endocrinology* 1994;135(6):2810-3.
- [48] Fukumura D, Jain RK. Role of nitric oxide in angiogenesis and microcirculation in tumors. *Cancer Metastasis Rev* 1998;17(1):77-89.
- [49] Gast MJ. Characterization of preprorelaxin by tryptic digestion and inhibition of its conversion to prorelaxin by amino acid analogs. *J Biol Chem* 1983;258(14):9001-4.
- [50] Gorlov IP, Kamat A, Bogatcheva NV, Jones E, Lamb DJ, Truong A, Bishop CE, McElreavey K, Agoulnik AI. Mutations of the GREAT gene cause cryptorchidism. *Hum Mol Genet* 2002;11(19):2309-18.
- [51] Gungabissoon RA, Bamberg JR. Regulation of growth cone actin dynamics by ADF/cofilin. *J Histochem Cytochem* 2003;51(4):411-20.
- [52] Gunnarsen JM, Fu P, Roche PJ, Tregear GW. Expression of human relaxin genes: characterization of a novel alternatively-spliced human relaxin mRNA species. *Mol Cell Endocrinol* 1996;118(1-2):85-94.
- [53] Haley J, Crawford R, Hudson P, Scanlon D, Tregear G, Shine J, Niall H. Porcine relaxin. Gene structure and expression. *J Biol Chem* 1987;262(25):11940-6.
- [54] Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86(3):353-64.
- [55] Hernandez ER, Resnick CE, Svoboda ME, Van Wyk JJ, Payne DW, Adashi EY. Somatomedin-C/insulin-like growth factor I as an enhancer of androgen biosynthesis by cultured rat ovarian cells. *Endocrinology* 1988;122(4):1603-12.
- [56] Hofig A, Michel FJ, Simmen FA, Simmen RC. Constitutive expression of uterine receptors for insulin-like growth factor-I during the peri-implantation period in the pig. *Biol Reprod* 1991;45(4):533-9.
- [57] Hombach-Klonisch S, Tetens F, Kauffold J, Steger K, Fischer B, Klonisch T. Molecular cloning and localization of caprine relaxin-like factor (RLF) mRNA within the goat testis. *Mol Reprod Dev* 1999;53(2):135-41.

- [58] Hombach-Klonisch S, Abd-Elnaeim M, Skidmore JA, Leiser R, Fischer B, Klonisch T. Ruminant relaxin in the pregnant one-humped camel (*Camelus dromedarius*). *Biol Reprod* 2000;62(4):839-46.
- [59] Hombach-Klonisch S, Kauffold J, Rautenberg T, Steger K, Tetens F, Fischer B, Klonisch T. Relaxin-like factor (RLF) mRNA expression in the fallow deer. *Mol Cell Endocrinol* 2000;159(1-2):147-58.
- [60] Hombach-Klonisch S, Buchmann J, Sarun S, Fischer B, Klonisch T. Relaxin-like factor (RLF) is differentially expressed in the normal and neoplastic human mammary gland. *Cancer* 2000;89(11):2161-8.
- [61] Hombach-Klonisch S, Seeger S, Tscheudschilsuren G, Buchmann J, Huppertz B, Seliger G, Fischer B, Klonisch T. Cellular localization of human relaxin-like factor in the cyclic endometrium and placenta. *Mol Hum Reprod* 2001;7(4):349-56.
- [62] Hombach-Klonisch S, Hoang-Vu C, Kehlen A, Hinze R, Holzhausen HJ, Weber E, Fischer B, Dralle H, Klonisch T. INSL-3 is expressed in human hyperplastic and neoplastic thyrocytes. *Int J Oncol* 2003;22(5):993-1001.
- [63] Hombach-Klonisch S, Schön, J., Kehlen, A., Blottner, S., Klonisch, T. Seasonal expression of INSL3 and Lgr8/INSL3 receptor transcripts indicate variable differentiation of Leydig cells in the roe deer testis. *Biology of Reproduction* 2004;in press.
- [64] Hsu SY, Kudo M, Chen T, Nakabayashi K, Bhalla A, van der Spek PJ, van Duin M, Hsueh AJ. The three subfamilies of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptors (LGR): identification of LGR6 and LGR7 and the signaling mechanism for LGR7. *Mol Endocrinol* 2000;14(8):1257-71.
- [65] Hsu SY, Nakabayashi K, Nishi S, Kumagai J, Kudo M, Sherwood OD, Hsueh AJ. Activation of orphan receptors by the hormone relaxin. *Science* 2002;295(5555):671-4.
- [66] Hua J, Muschel RJ. Inhibition of matrix metalloproteinase 9 expression by a ribozyme blocks metastasis in a rat sarcoma model system. *Cancer Res* 1996;56(22):5279-84.
- [67] Hwang JJ, Lin SW, Teng CH, Ke FC, Lee MT. Relaxin modulates the ovulatory process and increases secretion of different gelatinases from granulosa and theca-interstitial cells in rats. *Biol Reprod* 1996;55(6):1276-83.

- [68] Ivell R, Hunt N, Khan-Dawood F, Dawood MY. Expression of the human relaxin gene in the corpus luteum of the menstrual cycle and in the prostate. *Mol Cell Endocrinol* 1989;66(2):251-5.
- [69] Ivell R. Biology of the relaxin-like factor (RLF). *Rev Reprod* 1997;2(3):133-8.
- [70] Ivell R, Balvers M, Domagalski R, Ungefroren H, Hunt N, Schulze W. Relaxin-like factor: a highly specific and constitutive new marker for Leydig cells in the human testis. *Mol Hum Reprod* 1997;3(6):459-66.
- [71] Jadeski LC, Lala PK. Nitric oxide synthase inhibition by N(G)-nitro-L-arginine methyl ester inhibits tumor-induced angiogenesis in mammary tumors. *Am J Pathol* 1999;155(4):1381-90.
- [72] Jadeski LC, Hum KO, Chakraborty C, Lala PK. Nitric oxide promotes murine mammary tumour growth and metastasis by stimulating tumour cell migration, invasiveness and angiogenesis. *Int J Cancer* 2000;86(1):30-9.
- [73] Kandel J, Bossy-Wetzell E, Radvanyi F, Klagsbrun M, Folkman J, Hanahan D. Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma. *Cell* 1991;66(6):1095-104.
- [74] Klonisch T, Mathias S, Cambridge G, Hombach-Klonisch S, Ryan PL, Allen WR. Placental localization of relaxin in the pregnant mare. *Placenta* 1997;18(2-3):121-8.
- [75] Klonisch T, Hombach-Klonisch S, Froehlich C, Kauffold J, Steger K, Huppertz B, Fischer B. Nucleic acid sequence of feline preprorelaxin and its localization within the feline placenta. *Biol Reprod* 1999;60(2):305-11.
- [76] Klonisch T, Hombach-Klonisch S, Froehlich C, Kauffold J, Steger K, Steinetz BG, Fischer B. Canine preprorelaxin: nucleic acid sequence and localization within the canine placenta. *Biol Reprod* 1999;60(3):551-7.
- [77] Klonisch T, Ivell R, Balvers M, Kliesch S, Fischer B, Bergmann M, Steger K. Expression of relaxin-like factor is down-regulated in human testicular Leydig cell neoplasia. *Mol Hum Reprod* 1999;5(2):104-8.
- [78] Klonisch T, Hombach-Klonisch S, Buchmann J, Fischer B, Bergmann M, Steger K. Relaxin-like factor expression in a human ovarian Sertoli-Leydig cell tumor. *Fertil Steril* 1999;72(3):546-8.
- [79] Klonisch T, Froehlich C, Tetens F, Fischer B, Hombach-Klonisch S. Molecular remodeling of members of the relaxin family during primate evolution. *Mol Biol Evol* 2001;18(3):393-403.

- [80] Klonisch T, Kauffold J, Steger K, Bergmann M, Leiser R, Fischer B, Hombach-Klonisch S. Canine relaxin-like factor: unique molecular structure and differential expression within reproductive tissues of the dog. *Biol Reprod* 2001;64(2):442-50.
- [81] Klonisch T, Steger K, Kehlen A, Allen WR, Froehlich C, Kauffold J, Bergmann M, Hombach-Klonisch S. INSL3 ligand-receptor system in the equine testis. *Biol Reprod* 2003;68(6):1975-81.
- [82] Koman A, Cazaubon S, Couraud PO, Ullrich A, Strosberg AD. Molecular characterization and in vitro biological activity of placentin, a new member of the insulin gene family. *J Biol Chem* 1996;271(34):20238-41.
- [83] Koskimies P, Spiess AN, Lahti P, Huhtaniemi I, Ivell R. The mouse relaxin-like factor gene and its promoter are located within the 3' region of the JAK3 genomic sequence. *FEBS Lett* 1997;419(2-3):186-90.
- [84] Kubota Y, Temelcos C, Bathgate RA, Smith KJ, Scott D, Zhao C, Hutson JM. The role of insulin 3, testosterone, Mullerian inhibiting substance and relaxin in rat gubernacular growth. *Mol Hum Reprod* 2002;8(10):900-5.
- [85] Kumagai J, Hsu SY, Matsumi H, Roh JS, Fu P, Wade JD, Bathgate RA, Hsueh AJ. INSL3/Leydig insulin-like peptide activates the LGR8 receptor important in testis descent. *J Biol Chem* 2002;277(35):31283-6.
- [86] Leco KJ, Khokha R, Pavloff N, Hawkes SP, Edwards DR. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues. *J Biol Chem* 1994;269(12):9352-60.
- [87] Lenhart JA, Ryan PL, Ohleth KM, Palmer SS, Bagnell CA. Relaxin increases secretion of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 and -2 during uterine and cervical growth and remodeling in the pig. *Endocrinology* 2002;143(1):91-8.
- [88] Li LM, Kilbourn RG, Adams J, Fidler IJ. Role of nitric oxide in lysis of tumor cells by cytokine-activated endothelial cells. *Cancer Res* 1991;51(10):2531-5.
- [89] Lissbrant IF, Stattin P, Damber JE, Bergh A. Vascular density is a predictor of cancer-specific survival in prostatic carcinoma. *Prostate* 1997;33(1):38-45.
- [90] Liu C, Eriste E, Sutton S, Chen J, Roland B, Kuei C, Farmer N, Jornvall H, Sillard R, Lovenberg TW. Identification of relaxin-3/INSL7 as an endogenous

- ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPCR135. *J Biol Chem* 2003;278(50):50754-64.
- [91] Liu C, Chen J, Sutton S, Roland B, Kuei C, Farmer N, Sillard R, Lovenberg TW. Identification of relaxin-3/INSL7 as a ligand for GPCR142. *J Biol Chem* 2003;278(50):50765-70.
- [92] Marriott D, Gillece-Castro B, Gorman CM. Prohormone convertase-1 will process prorelaxin, a member of the insulin family of hormones. *Mol Endocrinol* 1992;6(9):1441-50.
- [93] Masterson R, Hewitson TD, Kelynack K, Martic M, Parry L, Bathgate R, Darby I, Becker G. Relaxin down-regulates renal fibroblast function and promotes matrix remodelling in vitro. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19(3):544-52.
- [94] Mazoujian G, Bryant-Greenwood GD. Relaxin in breast tissue. *Lancet* 1990;335(8684):298-9.
- [95] Min G, Sherwood OD. Identification of specific relaxin-binding cells in the cervix, mammary glands, nipples, small intestine, and skin of pregnant pigs. *Biol Reprod* 1996;55(6):1243-52.
- [96] Montgomery AM, Mueller BM, Reisfeld RA, Taylor SM, DeClerck YA. Effect of tissue inhibitor of the matrix metalloproteinases-2 expression on the growth and spontaneous metastasis of a human melanoma cell line. *Cancer Res* 1994;54(20):5467-73.
- [97] Nardi E, Bigazzi M, Agrimonti F, Dogliotti L, Massi G.B., Ferrari A.M., Ciardetti P., DeLuca V., Angeli A. Relaxin and fibrotic disease of the mammary gland. In: Bigazzi M, Greenwood F.C., Gasparri F. *Biology of relaxin and its role in the human*. Amsterdam: Excerpta Medica, 1983.
- [98] Nath D, Williamson NJ, Jarvis R, Murphy G. Shedding of c-Met is regulated by crosstalk between a G-protein coupled receptor and the EGF receptor and is mediated by a TIMP-3 sensitive metalloproteinase. *J Cell Sci* 2001;114(Pt 6):1213-20.
- [99] Nef S, Parada LF. Cryptorchidism in mice mutant for *Insl3*. *Nat Genet* 1999;22(3):295-9.
- [100] Norrby K, Bani D, Bigazzi M, Banni Sacchi T. Relaxin, a potent microcirculatory effector, is not angiogenic. *Int J Microcirc Clin Exp* 1996;16(5):227-31.

- [101] Novak J, Danielson LA, Kerchner LJ, Sherwood OD, Ramirez RJ, Moalli PA, Conrad KP. Relaxin is essential for renal vasodilation during pregnancy in conscious rats. *J Clin Invest* 2001;107(11):1469-75.
- [102] Ohleth KM, Bagnell CA. Relaxin-induced deoxyribonucleic acid synthesis in porcine granulosa cells is mediated by insulin-like growth factor-I. *Biol Reprod* 1995;53(6):1286-92.
- [103] Palejwala S, Stein DE, Weiss G, Monia BP, Tortoriello D, Goldsmith LT. Relaxin positively regulates matrix metalloproteinase expression in human lower uterine segment fibroblasts using a tyrosine kinase signaling pathway. *Endocrinology* 2001;142(8):3405-13.
- [104] Palejwala S, Tseng L, Wojtczuk A, Weiss G, Goldsmith LT. Relaxin gene and protein expression and its regulation of procollagenase and vascular endothelial growth factor in human endometrial cells. *Biol Reprod* 2002;66(6):1743-8.
- [105] Parsell DA, Mak JY, Amento EP, Unemori EN. Relaxin binds to and elicits a response from cells of the human monocytic cell line, THP-1. *J Biol Chem* 1996;271(44):27936-41.
- [106] Pavloff N, Staskus PW, Kishnani NS, Hawkes SP. A new inhibitor of metalloproteinases from chicken: ChIMP-3. A third member of the TIMP family. *J Biol Chem* 1992;267(24):17321-6.
- [107] Pierce KL, Tohgo A, Ahn S, Field ME, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Epidermal growth factor (EGF) receptor-dependent ERK activation by G protein-coupled receptors: a co-culture system for identifying intermediates upstream and downstream of heparin-binding EGF shedding. *J Biol Chem* 2001;276(25):23155-60.
- [108] Pilistine SJ, Varandani PT. Degradation of porcine relaxin by glutathione-insulin transhydrogenase and a neutral peptidase. *Mol Cell Endocrinol* 1986;46(1):43-52.
- [109] Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C, Ullrich A. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* 1999;402(6764):884-8.
- [110] Pusch W, Balvers M, Ivell R. Molecular cloning and expression of the relaxin-like factor from the mouse testis. *Endocrinology* 1996;137(7):3009-13.

- [111] Qi JH, Ebrahim Q, Moore N, Murphy G, Claesson-Welsh L, Bond M, Baker A, Anand-Apte B. A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. *Nat Med* 2003;9(4):407-15.
- [112] Qin X, Chua PK, Ohira RH, Bryant-Greenwood GD. An autocrine/paracrine role of human decidual relaxin. II. Stromelysin-1 (MMP-3) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1). *Biol Reprod* 1997;56(4):812-20.
- [113] Qin X, Garibay-Tupas J, Chua PK, Cachola L, Bryant-Greenwood GD. An autocrine/paracrine role of human decidual relaxin. I. Interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) and tissue plasminogen activator. *Biol Reprod* 1997;56(4):800-11.
- [114] Rawitch AB, Moore WV, Frieden EH. Relaxin-insulin homology: predictions of secondary structure and lack of competitive binding. *Int J Biochem* 1980;11(5):357-62.
- [115] Renegar RH, Kwok, S.C.M., McMurty, J.P. Prohormone convertases in the porcine ovary and hamster placenta. *Biology of Reproduction* 1996;51:241.
- [116] Roche PJ, Butkus A, Wintour EM, Tregear G. Structure and expression of Leydig insulin-like peptide mRNA in the sheep. *Mol Cell Endocrinol* 1996;121(2):171-7.
- [117] Sacchi TB, Bani D, Brandi ML, Falchetti A, Bigazzi M. Relaxin influences growth, differentiation and cell-cell adhesion of human breast-cancer cells in culture. *Int J Cancer* 1994;57(1):129-34.
- [118] Safford MG, Levenstein M, Tsifrina E, Amin S, Hawkins AL, Griffin CA, Civin CI, Small D. JAK3: expression and mapping to chromosome 19p12-13.1. *Exp Hematol* 1997;25(5):374-86.
- [119] Samuel CS, Zhao C, Bathgate RA, Bond CP, Burton MD, Parry LJ, Summers RJ, Tang ML, Amento EP, Tregear GW. Relaxin deficiency in mice is associated with an age-related progression of pulmonary fibrosis. *Faseb J* 2003;17(1):121-3.
- [120] Schwabe C, Harmon SJ. A comparative circular dichroism study of relaxin and insulin. *Biochem Biophys Res Commun* 1978;84(2):374-80.
- [121] Schwabe C, Bullesbach EE. Relaxin. *Comp Biochem Physiol B* 1990;96(1):15-21.

- [122] Segaloff A. The role of the ovary in the synergism between radiation and estrogen in the production of mammary cancer in the rat. *Excerpta Medica*, 1983.
- [123] Sherwood OD. Relaxin. In: Knobil E, Neill, J. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1994. p. 861-1009.
- [124] Silvertown JD, Geddes BJ, Summerlee AJ. Adenovirus-mediated expression of human prorelaxin promotes the invasive potential of canine mammary cancer cells. *Endocrinology* 2003;144(8):3683-91.
- [125] Silvertown JD, Summerlee AJ, Klonisch T. Relaxin-like peptides in cancer. *Int J Cancer* 2003;107(4):513-9.
- [126] Steiner DF, Quinn PS, Chan SJ, Marsh J, Tager HS. Processing mechanisms in the biosynthesis of proteins. *Ann N Y Acad Sci* 1980;343:1-16.
- [127] Steinetz BG, Goldsmith LT, Lust G. Plasma relaxin levels in pregnant and lactating dogs. *Biol Reprod* 1987;37(3):719-25.
- [128] Stemmermann GN, Mesiona W, Greenwood FC, Bryant-Greenwood GD. Immunocytochemical identification of a relaxin-like protein in gastrointestinal epithelium and carcinoma: a preliminary report. *J Endocrinol* 1994;140(2):321-5.
- [129] Stewart DR, Addiego LA, Pascoe DR, Haluska GJ, Pashen R. Breed differences in circulating equine relaxin. *Biol Reprod* 1992;46(4):648-52.
- [130] Sudo S, Kumagai J, Nishi S, Layfield S, Ferraro T, Bathgate RA, Hsueh AJ. H3 relaxin is a specific ligand for LGR7 and activates the receptor by interacting with both the ectodomain and the exoloop 2. *J Biol Chem* 2003;278(10):7855-62.
- [131] Suetsugu S, Takenawa T. Regulation of cortical actin networks in cell migration. *Int Rev Cytol* 2003;229:245-86.
- [132] Sugiura Y, Shimada H, Seeger RC, Laug WE, DeClerck YA. Matrix metalloproteinases-2 and -9 are expressed in human neuroblastoma: contribution of stromal cells to their production and correlation with metastasis. *Cancer Res* 1998;58(10):2209-16.
- [133] Tan YY, Wade JD, Tregear GW, Summers RJ. Comparison of relaxin receptors in rat isolated atria and uterus by use of synthetic and native relaxin analogues. *Br J Pharmacol* 1998;123(4):762-70.

- [134] Tashima LS, Mazoujian G, Bryant-Greenwood GD. Human relaxins in normal, benign and neoplastic breast tissue. *J Mol Endocrinol* 1994;12(3):351-64.
- [135] Truong A, Bogatcheva NV, Schelling C, Dolf G, Agoulnik AI. Isolation and expression analysis of the canine insulin-like factor 3 gene. *Biol Reprod* 2003;69(5):1658-64.
- [136] Unemori EN, Pickford LB, Salles AL, Piercy CE, Grove BH, Erikson ME, Amento EP. Relaxin induces an extracellular matrix-degrading phenotype in human lung fibroblasts in vitro and inhibits lung fibrosis in a murine model in vivo. *J Clin Invest* 1996;98(12):2739-45.
- [137] Unemori EN, Erikson ME, Rocco SE, Sutherland KM, Parsell DA, Mak J, Grove BH. Relaxin stimulates expression of vascular endothelial growth factor in normal human endometrial cells in vitro and is associated with menometrorrhagia in women. *Hum Reprod* 1999;14(3):800-6.
- [138] Unemori EN, Lewis M, Constant J, Arnold G, Grove BH, Normand J, Deshpande U, Salles A, Pickford LB, Erikson ME, Hunt TK, Huang X. Relaxin induces vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis selectively at wound sites. *Wound Repair Regen* 2000;8(5):361-70.
- [139] Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* 2000;14(17):2123-33.
- [140] Wink DA, Vodovotz Y, Laval J, Laval F, Dewhirst MW, Mitchell JB. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis* 1998;19(5):711-21.
- [141] Winn RJ, Baker MD, Merle CA, Sherwood OD. Individual and combined effects of relaxin, estrogen, and progesterone in ovariectomized gilts. II. Effects on mammary development. *Endocrinology* 1994;135(3):1250-5.
- [142] Xie K, Fidler IJ. Therapy of cancer metastasis by activation of the inducible nitric oxide synthase. *Cancer Metastasis Rev* 1998;17(1):55-75.
- [143] Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 2000;14(2):163-76.
- [144] Yu WH, Yu S, Meng Q, Brew K, Woessner JF, Jr. TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix. *J Biol Chem* 2000;275(40):31226-32.

- [145] Zarreh-Hoshyari-Khah MR, Einspanier A, Ivell R. Differential splicing and expression of the relaxin-like factor gene in reproductive tissues of the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Biol Reprod* 1999;60(2):445-53.
- [146] Zarreh-Hoshyari-Khah R, Bartsch O, Einspanier A, Pohnke Y, Ivell R. Bioactivity of recombinant prorelaxin from the marmoset monkey. *Regul Pept* 2001;97(2-3):139-46.
- [147] Zhang Q, Liu SH, Erikson M, Lewis M, Unemori E. Relaxin activates the MAP kinase pathway in human endometrial stromal cells. *J Cell Biochem* 2002;85(3):536-44.
- [148] Zhao L, Roche PJ, Gunnarsen JM, Hammond VE, Tregear GW, Wintour EM, Beck F. Mice without a functional relaxin gene are unable to deliver milk to their pups. *Endocrinology* 1999;140(1):445-53.
- [149] Zhao S, Fields PA, Sherwood OD. Evidence that relaxin inhibits apoptosis in the cervix and the vagina during the second half of pregnancy in the rat. *Endocrinology* 2001;142(6):2221-9.
- [150] Zhong H, SuYang H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Ghosh S. The transcriptional activity of NF-kappaB is regulated by the IkappaB-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell* 1997;89(3):413-24.
- [151] Zhuge Y, Xu J. Rac1 mediates type I collagen-dependent MMP-2 activation. role in cell invasion across collagen barrier. *J Biol Chem* 2001;276(19):16248-56.
- [152] Zimmermann S, Schottler P, Engel W, Adham IM. Mouse Leydig insulin-like (Ley I-L) gene: structure and expression during testis and ovary development. *Mol Reprod Dev* 1997;47(1):30-8.
- [153] Zimmermann S, Steding G, Emmen JM, Brinkmann AO, Nayernia K, Holstein AF, Engel W, Adham IM. Targeted disruption of the *Insl3* gene causes bilateral cryptorchidism. *Mol Endocrinol* 1999;13(5):681-91.

6. Anlagen

6.1 Lebenslauf

1963	geboren am 03. April in Gießen, Hessen
1969-1973	Grundschule in Bad Nauheim
1973-1982	St. Lioba-Gymnasium in Bad Nauheim
1982-1989	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
1985-1989	Experimenteller Teil der Promotionsarbeit
1988-1989	Praktisches Jahr am Kreiskrankenhaus Bad Hersfeld
1989	III. Statsexamen mit der Note „sehr gut“
1989-1990	Ärztin-im-Praktikum in der Abteilung für Innere Medizin am Kreiskrankenhaus Bad Hersfeld, Lehrkrankenhaus der Universität Gießen
1991	Approbation als Ärztin
1994	Promotion zum Dr. med
1991-1996	Berufliche Pause aus familiären Gründen (Geburt und Erziehung der Kinder Susanne und Tobias in Guelph und London)
1997-1998	Gastwissenschaftlerin am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
1998-2000	Wiedereinstiegsstipendium des Landes Sachsen Anhalt am Institut für Anatomie und Zellbiologie
2000-jetzt	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

6.2 Erklärungen

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Ein Habilitationsverfahren wurde bislang an einer anderen Fakultät oder Universität weder eröffnet noch beantragt. Frühere Habilitationsverfahren an der Martin-Luther-Universität sind meinerseits nicht unternommen worden.

Halle, den 17.05.2004

Dr. med. Sabine Hombach-Klonisch

6.3. Danksagungen

Herrn **Professor Dr. Dr. Bernd Fischer**, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für die uneingeschränkte Unterstützung während der experimentellen Arbeiten und Fertigstellung meiner Habilitationsschrift.

Herrn **PD Dr. Cuong Hoang-Vu**, Abteilung Endokrinologische und Chirurgische Onkologie, Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für seine ausgezeichnete Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten, für die erstklassische fachliche Beratung und für die vielen anregenden Fachgespräche.

Den Doktorandinnen **Frau Joanna Bialek** und **Frau Barbara Fiebig** für ihren unermüdlichen experimentellen Einsatz und für die angenehme und konstruktive Zusammenarbeit.

Frau Christine Fröhlich, Frau Elisabeth Schlüter, Frau Kathrin Hammje und **Frau Anja Winkler** für ihre exzellente Zusammenarbeit.

Frau Dr. Astrid Kehlen für viele fruchtbare Gespräche und für die quantitativen PCR-Auswertungen.

Herrn **Professor Dr. Hans-Jürgen Holzhausen**, Institut für Pathologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für die wertvolle Unterstützung bei der pathologischen Begutachtung der Schilddrüsengewebe und der Tumorklassifikation.

Herrn **Professor Alastair J. Summerlee**, Department of Biomedical Sciences, Ontario Veterinary College, University of Guelph, Ontario, Canada, für die Bereitstellung des H2-Relaxin-Konstruktes.

Herrn **Professor Aaron Hsueh**, Division of Reproductive Biology, Department of Gynecology and Obstetrics, Stanford University School of Medicine, Stanford, California, für die Bereitstellung des LGR7-Antiserums.

Herrn **PD Dr. Ibrahim M. Adham** und Herrn **Professor Dr. Wolfgang Engel**, Institut für Humangenetik, Universität Göttingen, für die Bereitstellung der INSL3-KO-Mäuse und die Generierung und Bereitstellung der Relaxin/INSL3-doppel-KO-Mäuse.

Frau **Dr. Laura Parry**, Institute of Zoology, University of Melbourne, Australien, für die Bereitstellung der Relaxin-KO-Mäuse.

Herrn **Professor Dr. Bernhard Steinetz**, New York University Medical Center, Tuxedo, NY, für die Bereitstellung des polyklonalen Anti-Relaxin-Antiserums.

Meinem Ehemann, Herrn **PD Dr. Thomas Klonisch**, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für die wertvollen fachlichen Hinweise und seine Unterstützung beim Zustandekommen dieser Arbeit.

6.4 Thesen

- (1) Ziel dieser Arbeit war es, zelluläre Modellsysteme zu etablieren, mit denen die Rolle der beiden Relaxin-artigen Peptidhormone Relaxin und INSL3 in humanen Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien untersucht werden kann.
- (2) Relaxin und das strukturell verwandte INSL3 gehören zur Gruppe der Relaxin-artigen Peptide innerhalb der Familie der Insulin-artigen Wachstumsfaktoren.
- (3) Humanes INSL3, mRNA und Protein, wird differentiell in humanem Schilddrüsengewebe von hyper- und neoplastischen Thyreozyten exprimiert. Thyreozyten der normalen humanen Schilddrüse zeigen weder eine Expression für INSL3 noch für Relaxin.
- (4) Humanes H2-Relaxin wird ausschließlich in neoplastischen Epithelien von Schilddrüsentumoren exprimiert.
- (5) Im Gegensatz zu Insulin und IGF-I und IGF-II binden die Relaxin-artigen Peptide nicht an membranständige Thyrosinkinasen sondern an die 7-transmembranösen G-Protein-vermittelten Rezeptoren LGR7 und LGR8. Ihre Bindung resultiert in einer Aktivierung der Adenylatzyklase mit resultierender cAMP-Erhöhung.
- (6) Der humane Relaxinrezeptor LGR7 wird in normalen und neoplastischen Schilddrüsengeweben exprimiert und ist im Karzinomgewebe deutlich verstärkt. Somit ist die normale und neoplastische humane Schilddrüse ein Zielorgan für Relaxin. In Schilddrüsenkarzinomzellen wirkt Relaxin in einem auto-/parakrinen Regelkreis, der selbstverstärkende Effekte in neoplastischen humanen Thyreozyten erzeugen könnte. Es existiert noch kein gut charakterisiertes LGR8-Antiserum, so dass derzeit Aussagen zum LGR8-Rezeptorstatus in der humanen Schilddrüse fehlen.

- (7) Stabile Transfektanten der humanen Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-133 wurden hergestellt, die H2-Relaxin oder humanes INSL3 überexprimieren und sekretieren. Diese sekretierten Relaxin-artigen Hormone sind bioaktiv.
- (8) Überexpression von Relaxin und INSL3 führen nicht zu Veränderungen in der Proliferation oder Zellvitalität (MTT-Assay). Für die H2-Relaxin Transfektante wurde eine erhöhte ATP-Produktion festgestellt.
- (9) H2-Relaxin und INSL3 überexprimierende FTC-133 Transfektanten zeigen unbehandelt keine Veränderung in der Zellvitalität. Nach Induktion der Apoptose jedoch sind diese Klone im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle deutlich Apoptose-resistenter. Relaxin und INSL3 wirken somit in diesen FTC-133 Klonen anti-apoptotisch.
- (10) H2-Relaxin und INSL3 sind migrationsfördernde Hormone für FTC-133.
- (11) Überexpression von H2-Relaxin induziert zahlreiche Veränderungen im Genexpressionsmuster im Vergleich zur EGFP-Kontrolle. Zu den Genen, die in ihrer Expression im Klon 10 verändert waren, zählten u.a. Gene, deren Produkte die Zelladhäsion, Zellmigration und Zusammensetzung der ECM betreffen.
- (12) 2D-Gelanalysen zeigten Veränderungen im Proteinmuster für die H2-Relaxin-überexprimierenden FTC-133 Klone. Mit MALDI-ToF massenspektrometrischen Analysen konnte im Klon 10 ein differenziell exprimierter Proteinspot als das Aktin-bindende ADF/Cofilin identifiziert werden.
- (13) Der INSL3-überexprimierende FTC-133 Klon 6 zeigte eine signifikante Herunterregulation einiger zellulärer Proteine. Transkriptionell wurde in diesen INSL3-überexprimierenden Transfektanten der inhibitorisch wirkende Transkriptionsfaktor Id-2H hochreguliert.

- (14) Diese Daten weisen auf eine neue funktionelle Rolle Relaxin-artiger Peptidhormone in humanen Schilddrüsenkarzinomen hin.
- (15) Erste Untersuchungen der Schilddrüsengewebe von INSL3-KO-Mäusen, Relaxin-KO-Mäusen und Relaxin/INSL3 Doppel-KO-Mäusen zeigen morphologische Veränderungen des Epithels in homozygoten INSL3-KO-Mäusen auf, unabhängig vom Relaxin-Genotyp. Diese Unregelmäßigkeit der Epithelhöhe innerhalb der selben Follikel könnte auf eine mangelnde Differenzierung oder Synchronisation der Thyreozyten in INSL3 defizienten Mäusen hinweisen.

6.5 Thematisch relevante eigene Publikationen im Anhang

Hombach-Klonisch S, Hoang-Vu C, Kehlen A, Hinze R, Holzhausen HJ, Weber E, Fischer B, Dralle H, Klonisch T. INSL-3 is expressed in human hyperplastic and neoplastic thyrocytes. *Int J Oncol* 2003;22: 993-1001.

Hombach-Klonisch S, Buchmann J, Sarun S, Fischer B, Klonisch T. Relaxin-like factor (RLF) is differentially expressed in the normal and neoplastic human mammary gland. *Cancer* 2000;89: 2161-8.

Klonisch T, Hombach-Klonisch S, Buchmann J, Fischer B, Bergmann M, Steger K. Relaxin-like factor expression in a human ovarian Sertoli-Leydig cell tumor. *Fertil Steril* 1999;72: 546-8.

Klonisch T, Fowler PA, Hombach-Klonisch S. Molecular and genetic regulation of testis descent and external genitalia development. Review. *Developmental Biology* 2004; 270: 1-18.

Klonisch T, Froehlich C, Tetens F, Fischer B, Hombach-Klonisch S. Molecular remodeling of members of the relaxin family during primate evolution. *Mol Biol Evol* 2001;18: 393-403.