

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Allgemein-, Vizeral- und Gefäßchirurgie  
der Medizinischen Fakultät an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Direktor: Prof. Dr. med. H. Dralle

**Einfluss von Relaxin-2 auf das Motilitäts-, Migrations- und Invasionsverhalten  
der humanen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizinischen Wissenschaft (Dr. rer. medic.)  
für das Fachgebiet Medizinische Physiologie und Pathophysiologie

vorgelegt der  
Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Yvonne Radestock  
geboren am 13.04.1978 in Leipzig

Betreuer: Prof. Dr. C. Hoang-Vu  
Gutachter: 1. Prof. Dr. C. Hoang-Vu  
2. PD Dr. A. Kehlen  
3. Prof. Dr. J. Kauffold, Leipzig

Eröffnungsdatum: 14.01.2014  
Verteidigungsdatum: 09.10.2014

Für meine Lieben

## Referat

In einer Vielzahl von Untersuchungen an humanen Brustkrebsgeweben konnte eine erhöhte Expression von Relaxin nachgewiesen werden. In verschiedenen Karzinomzelllinien der Brust, der Prostata oder der Schilddrüse wurde gezeigt, dass dieses Peptidhormon einen fördernden Einfluss auf die Migration dieser Zellen besitzt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden stabile Relaxin-2 überexprimierende Transfektanten der hoch invasiven Östrogen Rezeptor alpha negativen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 etabliert. Diese zeigten eine deutlich erhöhte Expression und Sekretion von bioaktivem Relaxin-2 (RLN2). Anschließend wurden die stabilen MDA/RLN2 Transfektanten auf Relaxin-2 bedingte biologische Veränderungen zellulärer Prozesse, wie Proliferation und Migration, untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine Überexpression von Relaxin-2 keine zytotoxische sowie keine proliferationsfördernde Wirkung in den MDA-MB-231 Brustkrebszellen hatte. Die vorliegende Arbeit identifizierte eine zeitabhängige Regulation der zellulären Motilität durch Relaxin in MDA-MB-231 Zellen mit Steigerung der Motilität nach 24 Stunden und einer Inhibition nach Langzeitexposition gegenüber Relaxin. Das Calcium-bindende Protein S100A4 (Metastasin) wurde als ein neues Zielmolekül des RLN2/RXFP1 Signalweges in humanen Brustkrebszellen identifiziert. Die Relaxin-induzierte transkriptionelle Reduktion von S100A4 führte zu einer deutlichen Verminderung der Zellmotilität. Relaxin beeinflusste die zelluläre Verteilung von Aktin- und Tubulinfilamenten in humanen Brustkrebszellen und führte zu einer verstärkten Ausbildung von Stressfasern. Im Nacktmausmodell wurde deutlich, dass die stabilen MDA/RLN2 Transfektanten ein reduziertes Tumorwachstum aufwiesen und ebenfalls reduzierte S100A4 Protein Level in-vivo besaßen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass eine konstante Exposition zu Relaxin zu einer Inhibition des Wachstums von Östrogen-unabhängigen Xenograft-Tumoren führt. Eine Identifizierung RXFP1-vermittelter zellulärer Signalwege wird in Zukunft wichtige S100A4 Regulationsmechanismen aufzeigen, welche klinisch von Bedeutung sind. Relaxin und der Relaxinrezeptor RXFP1 sind potentiell nicht nur als diagnostische und prognostische Marker sondern auch als Zielmoleküle für therapeutische Interventionen in Zukunft zu eruieren.

Radestock, Yvonne: Einfluss von Relaxin auf das Motilitäts-, Migrations- und Invasionsverhalten der humanen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231.  
Halle (Salle), Univ., Med. Fak., Diss., 75 Seiten, 2013

---

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Brust.....	1
1.1.1	Erkrankungen der Brust.....	1
1.1.2	Ursachen und Risikofaktoren für Brustkrebserkrankungen.....	2
1.2	Relaxin.....	3
1.2.1	Aufbau, Biosynthese und Rezeptor.....	3
1.2.2	Relaxin Signalwege.....	4
1.2.3	Biologische und Therapeutische Effekte von Relaxin in der Brustdrüse und Tumoren.....	5
1.3	Ziel der Arbeit.....	8
2	Material und Methoden.....	9
2.1	Material.....	9
2.1.1	Geräte, Materialien und Chemikalien.....	9
2.1.2	Puffer.....	9
2.1.3	Kits.....	11
2.2	Methoden.....	11
2.2.1	Herkunft der Zelllinien.....	11
2.2.2	Rekultivierung von Zellen.....	11
2.2.3	Kultivierung von Zellen.....	11
2.2.4	Kryokonservierung von Zellen.....	12
2.2.5	Stabile Transfektion der Zellen.....	12
2.2.6	Transiente Transfektion der Zellen mit spezifischer siRNA.....	13
2.2.7	Inkubation der Zellen.....	14
2.2.8	Homogenisieren von Gewebe.....	14
2.2.9	RNA Isolation aus Zelllinien.....	15
2.2.10	cDNA Synthese (Reverse Transkription).....	15
2.2.11	Semiquantitative RT-PCR.....	15
2.2.12	Protein Extraktion aus Zelllinien und Tumorgewebe.....	17
2.2.13	Fraktionierung von Proteinen.....	17
2.2.14	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) und Western Blot Analyse.....	18
2.2.15	Immunfluoreszenz zytoskelettaler Bestandteile.....	20
2.2.16	Immunhistochemie.....	21

---

2.2.17	Relaxin Elisa.....	21
2.2.18	cAMP Assay .....	21
2.2.19	BrdU Assay.....	22
2.2.20	MTT Assay .....	23
2.2.21	ATP Assay.....	23
2.2.22	Motilitäts-Assay .....	23
2.2.23	Migrations-Assay.....	24
2.2.24	Softagar-Assay .....	24
2.2.25	Tumorwachstumsstudien in Nacktmäusen.....	25
2.2.26	Statistische Analysen .....	26
3	Ergebnisse.....	27
3.1	Herstellung stabiler RLN2 Transfektanten der humanen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 .....	27
3.2	Charakterisierung der stabilen RLN2 Transfektanten der humanen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 .....	28
3.2.1	Nachweis der Überexpression von RLN2 auf RNA Ebene.....	28
3.2.2	Nachweis der Überexpression von RLN2 auf Protein Ebene.....	28
3.2.3	Nachweis von sekretiertem RLN2 in den Transfektanten .....	29
3.2.4	Bioaktivitätsnachweis des sekretierten RLN2 der Transfektanten. ....	29
3.2.5	Einfluss von Relaxin 2 auf den Energiehaushalt und Proliferation humaner Brustkrebszelllinien. ....	30
3.2.6	Einfluss von Relaxin 2 auf die Motilität humaner Brustkrebszelllinien.....	33
3.2.7	Einfluss von Relaxin 2 auf die Migration humaner Brustkrebszelllinien .....	35
3.2.8	RXFP1 vermittelter Einfluss von Relaxin 2 auf die Motilität der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 .....	37
3.2.9	Softagar-Assay .....	38
3.2.10	Einfluss von Relaxin 2 auf das Zytoskelett von humanen Brustkrebszelllinien .	39
3.3	S100A4 eine neues Zielmolekül von Relaxin 2 .....	44
3.3.1	Expressionsnachweis von S100A4 auf RNA Ebene .....	45
3.3.2	Expressionsnachweise von S100A4 auf Protein Ebene.....	45
3.3.3	Einfluss von S100A4 auf die Motilität der humanen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 .....	47
3.3.4	RLN2 bedingtes Tumorwachstum in Nacktmäusen .....	48
3.3.5	RLN2 indizierte morphologische Veränderungen der Maustumore.....	50
3.3.6	Expressionsanalysen von RLN2 und S100A4 der Maustumoren.....	51
4	Diskussion .....	52

---

4.1	Einfluss von RLN2 auf die Motilität und Invasivität von humanen Brustkrebszelllinien.....	53
4.2	Bedeutung von RLN2 für die Proliferation und das Tumorwachstum humaner Brustkrebszelllinien .....	59
4.2.1	Proliferation .....	59
4.2.2	Tumorwachstum .....	61
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	64
6	Literaturverzeichnis .....	66
	Verwendete Geräte .....	76
	Materialien .....	76
	Chemikalien .....	77
	Thesen .....	80

---

## Abkürzungen

%	Prozent
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
<sup>32</sup> P	Phosphor-32
Abb.	Abbildung
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
APTEX	3-Aminopropyltriethoxysilane
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	Mutation des AT-Gens
ATP	Adenosintriphosphat
BRCA1/2	Breast Cancer 1/2
BrdU	Bromdesoxyuridin
BRIP1	BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	kodierende Desoxyribonukleinsäure
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CHEK2	CHK2 checkpoint homolog
CK-2	Casein Kinase 2
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COX2	Cyclooxygenase-2
CREB	cAMP response element-binding protein
cyt	cytoplasmatisch
DCIS	Duktales Karzinom in situ
DEPC	Diethylene Pyrocarbonate
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
DMSO	Dimethylsulfoxide
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF-Hand	spezifisches Aminosäurenmotiv in Proteinen
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EGTA	Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
ErbB2	human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)

---

Erk	Extracellular-signal Regulated Kinasen
Erk1/2	Extracellular-signal Regulated Kinasen 1/2
ER $\alpha$	Estrogen Receptor alpha
ER $\beta$	Estrogen Receptor beta
EZ4U	Easy for you
EZM	extrazelluläre Matrix
FCS	fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FSH	follikelstimulierende Hormon
g	Gramm
G	Gauge
GAM	Goat anti mouse
GAR	Goat anti rabbit
GPCR	G-protein coupled receptor
GR	Glucocorticoid Rezeptor
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
HBSS	Hank`s Balanced Salt Solution
HCL	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperaziny)-ethansulfonsäure
Her2	human epidermal growth factor receptor 2
Hoxa-10	homeobox A10
hRLN2	humanes Relaxin 2
HRP	Horseradish Peroxidase
IBMX	3-Isobutyl-1-methyl-Xanthin
IGF	Insulin-like growth factor
in situ	lateinisch für „an Ort und Stelle“
INSL	Insulin-like
INSL 6	Insulin-like 6 peptide
INSL3/RLF	Leydig cell insuli-like peptide
INSL4 & 5	Early placenta insulin-like peptide
IRS	immunreaktiver Score
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo-Dalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LCIS	Lobuläres Karzinom in situ
LGR	Leucin-rich receptor
LRP	Anti-gen related transmembran phosphatase

---

---

M	mol/l Molarität
mA	Milliampere
MAP	mitogen-activated protein
MCS	Multiple Cloning Site
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchloride
MHC	Myosin heavy chain
min	Minute
ml	Milliliter
MLCK	myosin light chain kinase
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Molekulargewicht
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NFκB	nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
NMRI	Nacktmausstamm
NO	Stickstoffmonoxid
non-sp.	Non-spezifisch
NOS	NO-Synthase
NP-40	Nonidet® P-40
nuc	nukleär
PALB2	partner and localizer of BRCA2
PBS	Phosphat Buffered Saline
PC1	Proprotein-Convertase 1
PCR	Polymerase Chain Reaktion
PDE	3",5"-Zyklonukleotid-Phosphodiesterasen
PgR	Progesteron Rezeptor
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIPES	Piperazine-N,N'-bis [2-ethanesulfonic acid]
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase-C
PKCζ	Proteinkinase C Isoform
pmol	Pikomolar
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PVDF	Polyvinylidenfluorid

---

---

RAGE	Rezeptor für advanced glycation endproducts
rhRLN2	rekombinantes humanes Relaxin 2
RLN	Relaxin
RNA	Ribonukleinsäure
RNAsen	Ribonukleinsäuren-abbauende Enzyme
rpm	revolutions per minute, „Umdrehungen pro Minute“
RT	Raumtemperatur
RXFP	Relaxin Familiy Peptide Receptor
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
siRNA	Small interfering RNA
STK11	Serin-Threonin-Kinase 11
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
T <sub>M</sub>	Schmelztemperatur
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Triton-X100	4-octylphenol polyethoxylate
TSH	Thyreotropin
Tween	Polyoxyethylene Sorbitan Monolaureate
U	Units
UICC	Union internationale contre le cancer
ÜS	Überstand
UTR	Untranslated Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
V1	Vasopressin 1 Rezeptor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

# 1 Einleitung

## 1.1 Brust

### 1.1.1 Erkrankungen der Brust

Der Brustkrebs (*Mammakarzinom*) ist weltweit eine der häufigsten Erkrankungen der Frau. Jedes Jahr treten nach Angaben der IARC (*International Agency for Research on Cancer*) in der ganzen Welt circa 1.000.000 neue Erkrankungen (*Inzidenzfälle*) auf. Davon sterben ungefähr 375.000 Frauen pro Jahr. Dies bedeutet, dass es sich bei den weltweit rund 4.5 Millionen diagnostizierten Krebserkrankungen bei einem Fünftel der Frauen um die Diagnose Brustkrebs handelt.

Nach neusten Schätzungen des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, treten derzeit jährlich über 57.000 Neuerkrankungen an Brustkrebs bei Frauen auf. Dies bedeutet, dass das Mammakarzinom in Bezug auf alle Krebsneuerkrankungen mit einem Anteil von 27,8 % die häufigste Krebserkrankung bei Frauen in Deutschland ist. Charakteristisch für die Inzidenzrate an Brustkrebs ist die Rate der Altersverteilung der erkrankten Frauen. Das mittlere Erkrankungsalter in Deutschland liegt bei 63 Jahren. Die Altersverteilung muss bei internationalen Vergleichen berücksichtigt werden. So liegt in Deutschland die altersstandardisierte Inzidenz (nach Europastandard) bei 104,2 Fällen pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Die Sterberate (*Mortalität*) in Deutschland, bedingt durch eine Brustkrebserkrankung, liegt nach dem Europastandard altersstandardisiert bei 26,8 Fällen pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Neuste Untersuchungen zeigen, dass bis 2005 ein rückläufiger Trend der altersstandardisierten Inzidenzrate in allen Altersgruppen zu finden ist. Diese Zahlen machen deutlich, dass das Mammakarzinom bei Frauen die häufigste Todesursache in Deutschland bzw. weltweit ist [1-6].

Untersuchungen zeigen, dass der Inzidenzverlauf der Brustkrebserkrankungen im Laufe der Jahre stetig angestiegen ist. Seit 1995 konnte bei der Brustkrebs-bedingten Mortalitätsrate ein leicht rückläufiger Trend festgestellt werden. Besonders interessant ist, dass sich sogar innerhalb von Deutschland geografische Unterschiede für Inzidenz und Mortalität aufzeigen lassen. So liegt die Inzidenzrate in den alten Bundesländern (100-140/100.000) höher als in den neuen Bundesländern (80-88/100.000). Die gleiche Tendenz zeigt sich auch in der Mortalitätsrate. So sind in Ostdeutschland circa 20% weniger Frauen betroffen als in Westdeutschland [1]. In seltenen Fällen können auch

Männer von einer Brustkrebserkrankung betroffen sein. Weltweit beträgt die altersstandardisierte Inzidenzrate bei Männern ein Fall pro 100.000 [7].

### 1.1.2 Ursachen und Risikofaktoren für Brustkrebserkrankungen

Für die Erkrankung an Brustkrebs bei Frauen gibt es viele verschiedene Ursachen. Einige wichtige sollen anschließend kurz dargestellt werden.

Nur ein geringer Prozentsatz der Brustkrebserkrankungen ist genetisch bedingt. Man kann sagen, dass bei einer von 500 Frauen eine Erkrankung der Brust durch genetische Veränderungen diagnostiziert wird. Bei solchen Fällen handelt es sich meist um eine Mutation oder Deletion der Gene BRCA1 (**BR**east **CA**ncer **1**) und BRCA2 (**BR**east **CA**ncer **2**). Kommt es zu genetischen Veränderungen von BRCA1 oder BRCA2, besteht die Möglichkeit einer Tumorbildung und das Risiko einer Brustkrebserkrankung erhöht sich um das 10- bis 20-fache. Mit ansteigendem Alter nimmt das Risiko im Vergleich zu Patienten ohne Variationen in einem der beiden Gene zwischen 30 bis 60 Prozent zu. Ebenfalls zu einem erhöhten Risiko einer Brustkrebserkrankung führen genetische Veränderungen von p53, PTEN (*Cowden-Syndrom*), STK11 (*Peutz-Jeghers-Syndrom*), ATM (*Louis-Bar-Syndrom*), CHEK2 (*CHK2 checkpoint homolog*), BRIP1 (*BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1*), PALB2 (*Partner and localizer of BRCA2*) und E-Cadherin [8-11].

Während der Pubertät und während der Schwangerschaft kommt es zu Östrogenbedingten Veränderungen der Brust. Dieses und andere weibliche Geschlechtshormone, wie zum Beispiel Gestagen, spielen jedoch auch eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Brustkrebs. So führen oft erhöhte Östrogenspiegel im Blut zu Erkrankungen der Brust. Es fördert das Wachstum von Brustkrebszellen über einen spezifischen Östrogenrezeptor. Es konnten zwei Subtypen des Rezeptors (a) der Östrogenrezeptor alpha (ER- $\alpha$ ) und (b) der Östrogenrezeptor beta (ER- $\beta$ ) identifiziert werden. Eine Vielzahl von aggressiven Mammakarzinomen exprimieren den Östrogenrezeptor alpha. Hingegen wird eine Östrogenrezeptor beta Expression mit einer geringeren Aggressivität des Brusttumors assoziiert und im Vergleich zu Östrogenrezeptor beta negativen Tumoren erhöht sich die Überlebensrate der betroffenen Patienten [12-13]. Desweiteren zählen (a) eine frühe erste Regelblutung (*Menarche*), (b) die Geburt eines Kindes in einem höheren Alter (*späte Primipara*), (c) Kinderlosigkeit (*Nullipara*) oder (d) spät einsetzende Wechseljahre (*Menopause*) zu weiteren Risikofaktoren. In welchem Maße eine langjährige Einnahme der Antibabypille die Brustkrebserkrankung fördert, ist weiterhin fraglich [3]. Von einer

Brustkrebserkrankung betroffen sind vor allem ältere Frauen, welche mit gezielten Hormonersatzpräparaten in den Wechseljahren behandelt werden [10-11, 14-15].

## 1.2 Relaxin

### 1.2.1 Aufbau, Biosynthese und Rezeptor

Erste Hinweise auf das Hormon Relaxin gab es 1926. 1930 konnte zum ersten Mal eine Substanz aus dem Gelbkörper (*Corpus luteum*) eines Mutterschweins isoliert werden, welche eine deutliche Entspannung des „*pubic ligaments*“ erzielte. Diese Substanz wurde als neues Hormon identifiziert und mit dem Namen „Relaxin“ versehen [16-18]. Bis 1992 konnte Relaxin in verschiedenen Tiergattungen nachgewiesen werden [19].

Das heterodimere Peptidhormon Relaxin gehört zur Familie der Relaxin-artigen Peptide, welche zu der Insulin-artigen Superfamilie gehört, zu denen Insulin, IGF-1 [20], IGF-2 [21], RLN1 [22], RLN2 [23], RLN3 [24], INSL3/RLF [25], INSL4 und INSL5 [26-27] INSL6 [28] zählen.

Zu Beginn der Untersuchungen waren zwei Formen des humanen Relaxin, das Relaxin 1 und das Relaxin 2 bekannt. Relaxin hat ein Molekulargewicht von ungefähr 6 kDa. Es besteht aus einer B- und A-Kette mit annähernd gleicher Größe, welche durch zwei intermolekulare Disulfidbrücken (hRLN2: Cys<sup>B11</sup> - Cys<sup>A11</sup> und Cys<sup>B23</sup> - Cys<sup>A24</sup>) kovalent verbunden sind. Innerhalb der A-Kette befindet sich noch eine intramolekulare Disulfid-Bindung (hRLN2: Cys<sup>A10</sup> - Cys<sup>A15</sup>) [29]. Im Vergleich zu anderen Spezies besteht eine Homologie der Relaxin Aminosäuresequenzen zwischen 30-60%. Die ähnliche Lokalisation der Disulfidbrücken und die Lage von Cysteinpaaren lassen darauf schließen, dass alle Relaxine eine ähnliche Tertiärstruktur besitzen [30-31]. Das humane Relaxin 1 und Relaxin 2 sind lokalisiert auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 (9p24) [32]. Hingegen ist das erst später entdeckte Relaxin 3 auf dem Chromosom 19p13.3 lokalisiert [24].

Obwohl das Relaxin-artige Peptidhormon Relaxin zu der Insulin-artigen Superfamilie gehört, bindet es nicht an den Insulin- oder IGF-1-Rezeptor. Zwei orphanen Leucinreiche G-Protein gekoppelte Rezeptoren (*leucin-rich G-protein coupled receptors, GPCRs*), bezeichnet als RXFP1 (LGR7) und RXFP2 (LGR8), wurden 2002 als Rezeptoren für Relaxin identifiziert, wobei über 60% der Aminosäuren identisch sind [33]. Ähnlich zu anderen GPCRs wie dem TSH Rezeptor oder FSH Rezeptor, bestehen der RXFP1 und RXFP2 Rezeptor aus einer 7 transmembranösen Domäne, einem intrazellulären C-Terminus und einem relativ großem extrazellulärem N-Terminus [34].

Studien haben gezeigt, dass RXFP1 der spezifische Rezeptor für RLN1, RLN2 und RLN3 ist [33, 35]. RXFP2 bindet vorzugweise INSL3, wobei auch RLN1 und RLN2 mit niedrigerer Affinität an RXFP2 binden können [33, 36]. INSL3 hingegen bindet ausschließlich an RXFP2 und nicht an RXFP1. Untersuchungen mit einer Anzahl von RXFP1/RXFP2 Schimären haben zwei Bindungsstellen an den beiden Rezeptoren identifiziert. Eine primäre, „high-Affinity“ Bindungsstelle, welche auf der Ektodomäne lokalisiert ist und innerhalb der Leucin-reichen Repeats liegt sowie eine sekundäre, „low-Affinity“ Bindungsstelle, die innerhalb der transmembranösen Region zu finden ist [37]. In-vivo Untersuchungen mit verschiedenen Knockout Mäusen haben gezeigt, dass weder INSL3 noch RXFP2 an der Aktivierung des RLN Signalweges beteiligt sind und somit sich INSL3/ RXFP2 und RLN1/ RXFP1 Aktionen in-vivo nicht überschneiden [38]. Außer RXFP1 und RXFP2 existieren noch zwei weitere orphan G-Protein gekoppelte Rezeptoren, GPCR135 (RXFP3) und GPCR142 (RXFP4). Diese werden ausschließlich durch RLN3 und INSL5 aktiviert [39-41]. Humanes RLN1 und RLN 2 aus dem Schwein sind in der Lage, den humanen Glucocorticoid Rezeptor (GR), ein sogenannter nukleärer Rezeptor, zu binden und zu aktivieren. Dabei kommt es zu einer Interaktion von endogenem und exogenem Relaxin mit zytoplasmatischen und nukleären Glucocorticoid Rezeptoren, wobei Relaxin mit verschiedenen GR Agonisten um die Rezeptorbindung konkurriert [42-43].

### **1.2.2 Relaxin Signalwege**

Ende der 70iger Jahre wurden erste Hinweise darauf gefunden, dass Relaxin zu einer Veränderung von cAMP in der Symphyse von Mäusen führt [44]. Der Zusammenhang zwischen der Freisetzung von Relaxin und einem verbundenem Anstieg von cAMP konnte in verschiedenen Studien an Geweben und Zellen von Ratten [45-48] sowie an verschiedenen humanen Zellen inklusive humanen Brustkrebszellen [49-51] deutlich gemacht werden. Ein zeitlich versetzter biphasischer cAMP Anstieg bedingt durch Relaxin, konnte in einigen Zellen wie humanen Makrophagen (THP-1), humanen Brustkrebszellen (MCF7), in humanen myometrialen Zellen (PHM1-31) und Mesangialzellen (MMC) der Maus nachgewiesen werden [52-54]. Bindet Relaxin an seinen spezifischen Rezeptor, kommt es zu einer Aktivierung der heterotrimeren G-Protein Untereinheit  $G\alpha_s$ , welche die Adenylatzyklase aktiviert und somit zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP Spiegels führt [55]. Dieses geschieht innerhalb der ersten 2 Minuten nach Bindung von Relaxin an RXFP1 und RXFP2. Durch die Phosphorylierung von RXFP1 kommt es zu einer Aktivierung der heterotrimeren G-Protein Untereinheit  $G\alpha_i$ . Diese setzt G-Protein Untereinheiten  $G\beta$  oder  $G\gamma$  frei und

aktiviert die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K). Dies führt zu einer Aktivierung der atypischen Protein-Kinase-C Isoform PKC $\zeta$ , welche erneut die Adenylatzyklase stimuliert und es nach ungefähr 15 min nach der Bindung von Relaxin an RXFP1 zu einem zweiten Anstieg des intrazellulären cAMP Spiegels kommt. Wird hingegen durch die Bindung von Relaxin an RXFP1 und RXFP2 die heterotrimere G-Protein Untereinheit G $\alpha_o$  aktiviert, führt dies zu einer Inhibition der Adenylatzyklase und somit zu Erniedrigung des intrazellulären cAMP Levels [53, 56-61]. Andere Studien an G-Protein gekoppelten Rezeptoren zeigten, dass durch die Bildung in spezifischen hochselektiven Signalosomen hoch sensitive Signalwege erreicht werden können [62]. So konnten zum Beispiel mit Hilfe von cAMP Biosensoren in kardialen Fibroblasten der Ratte aktive GPCR Signalsomen, welche an RXFP1 binden, identifiziert werden. Erstaunlich an diesen Ergebnissen war, dass durch diese Bindung eine Konzentration von frei zirkulierendem Relaxin im sub-picomolarem Bereich ausreichte, um den cAMP Level zu erhöhen [63]. Bis dahin war ein Anstieg des cAMP Levels durch Relaxin bei einer Konzentration im micromolarem Bereich nachweisbar [51, 64] In verschiedenen Zelllinien vom Rind oder Mensch sowie humanen Brustkrebszelllinien gab es Hinweise, dass Relaxin die Expression der immunoreaktiven induzierbaren NO-Synthase (NOS) stimuliert, was zu einem signifikanten Anstieg des intrazellulären cGMP Spiegels führt [65-68]. Durch die erhöhte Produktion von Stickstoffmonoxid kann es auch zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B kommen. Es wird vermutet, dass eine erhöhte transkriptionelle Aktivierung von NF $\kappa$ B das Tumorwachstum fördert und Relaxin folglich die Tumorgenese positiv beeinflusst [69].

### **1.2.3 Biologische und Therapeutische Effekte von Relaxin in der Brustdrüse und Tumoren**

Viele Jahre der Untersuchungen haben gezeigt, dass Relaxin Einfluss auf das weibliche Reproduktionssystem wie z.Bsp. die Schambeinfuge (*Symphysis pubica*), die Gebärmutter (*Uterus*), oder die Brustdrüse (*Glandula mammaria*) besitzt, welcher je nach Spezies variieren kann [70]. Im nächsten Abschnitt soll der Effekte von Relaxin auf Prozesse in der weiblichen Brustdrüse näher betrachtet werden.

Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass Relaxin einen wichtigen Aspekt in der Brustdrüse spielt. In einer Anzahl von Spezies, unter anderem des Menschen, konnten spezifische Relaxin-Bindungsstellen in der Brustdrüse nachgewiesen werden [71-72]. In Untersuchungen von Schweinen und Ratten zeigte sich, dass Relaxin eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und des Wachstums des Brustparenchyms (epithelialen und myoepithelialen Zellen) sowie des Stromas der Brust (Fibroblasten, Adipozyten,

Kollagen) besitzt [73-74]. Bei der Differenzierung der Brustdrüse durch Relaxin kommt es zu einer Erniedrigung der Dichte und Organisation der Kollagenfasern sowie zu einer Reduzierung der Länge der Elastinfasern. Desweiteren werden die Durchschnitte der Ateriolen erhöht [75-76]. Diese Relaxin-induzierten Effekte an der Brustdrüse sind abhängig von Östrogen und werden von einer noch verstärkten Reduktion der Organisation von Kollagenfaserbündeln im Stroma begleitet [77]. Arbeiten verschiedener Arbeitsgruppen mit Relaxin oder RXFP1 (LGR7) negativen Knockout Mäusen oder Ratten deuten darauf hin, dass Relaxin einen überlebenswichtigen Einfluss auf die Ausbildung der Zitzen in der zweiten Hälfte der Schwangerschaft hat. Relaxin defiziente Tiere wiesen im Vergleich zu der Kontrollgruppe sehr schlecht ausgebildete Zitzen auf. Dadurch war eine ausreichende Säugung der Jungtiere nicht möglich und die Jungtiere mussten verhungern [75, 78-80]. In histologischen Untersuchungen der Zitzen konnten wie in Cervix und Vagina Relaxin-bedingte Reduktionen der Kollagenfasern nachgewiesen werden. Diese Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass Relaxin bei der Entwicklung der Zitzen eine beträchtliche Rolle spielt [78]. Auch Relaxin-abhängige morphologische Veränderungen wurden gefunden [78]. Desweiteren ließen sich spezifische Relaxin-Bindungsstellen in den Zitzen der Maus, der Ratte oder Schweinen sowie in den Brustwarzen des Menschen nachweisen [72, 81-82]. Einige Hinweise deuten darauf hin, dass Relaxin auch bei der Laktation eine Rolle spielt. Dabei wird der Milchausstoß durch die Inhibition von Oxytocin im Gehirn mittels Relaxin unterdrückt [79, 83]. In dem bisherigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass Relaxin in der weiblichen Brustdrüse unterschiedliche Einflüsse besitzt. So konnte Relaxin nicht nur in gesundem Gewebe sondern auch in verschiedenen Karzinomen wie der Brust [84-85], des Gastrointestinaltraktes [86], des Kolon [87], der Prostata [88] oder der Schilddrüse [89] detektiert werden. Anzeichen deuten darauf hin, dass Relaxin eine bedeutende Rolle beim Brustkrebs spielt. So konnte humanes RLN1 und RLN2 in normalem aber auch in neoplastischem Gewebe der Brustdrüse detektiert werden [90]. Humanes RLN2 wurde deutlich erhöht in allen untersuchten neoplastischen Brustgeweben und nur sehr vereinzelt in nicht-neoplastischen Veränderungen oder normalem Brustgewebe nachgewiesen [90]. Es zeigte sich, dass der Gehalt von zirkulierendem Relaxin im Serum bei Patientinnen mit Metastasen signifikant höher als bei Patientinnen ohne Metastasen ist und sich mit der Überlebensrate vergleichen lässt [91-92]. Untersuchungen an den humanen Brustkrebszelllinien T47D und MCF-7 weisen darauf hin, dass Östrogen einen positiven Einfluss auf Relaxin-Effekte haben könnte. So zeigte sich, dass eine Inkubation mit Östrogen die RLN2 Genaktivität dieser Brustkrebszellen stimuliert [93]. Aber nicht nur im Gewebe der Brust ist Relaxin vorhanden. So befinden sich Spuren

von Relaxin in der ersten Muttermilch, dem Kolostrum, in der Zystenflüssigkeit von Patientinnen mit Dysplasien der Brustdrüse oder im Plasma bei Frauen, die an großen Fibroadenomen leiden [69]. Wie bereits näher erläutert, agiert Relaxin über verschiedene Signalwege. So konnte in verschiedenen normalen Zelllinien aber auch in humanen Tumorzelllinien (MCF-7, THP-1) ein Relaxin-abhängiger Anstieg von cAMP nachgewiesen werden. In frühen Studien zeigte sich in den humanen MCF-7 Karzinomzelllinien ein von der Relaxin-Konzentration abhängiges Wachstumsmuster [51]. Bei niedrigen Konzentrationen konnte eine Förderung des Zellwachstums, der Differenzierung und Invasion beobachtet werden. Hingegen zeigten sich bei höheren Relaxin Konzentrationen eine Erniedrigung des Wachstums [51, 64]. Die Beeinflussung von Relaxin auf das Wachstums und die Differenzierung dieser Karzinomzelllinie lässt sich auf die Aktivierung des NO-Signalweges zurückführen [51, 65, 94]. Die erhöhte NO Expression führt folglich zu einem erniedrigten Tumorwachstum, da die eigene DNA Synthese inhibiert wird und oxydative Schäden entstehen können [65]. Auf der anderen Seite ist Relaxin in der Lage, die Tumorgenese durch die NO geförderte Inhibition der Apoptose zu fördern [95]. Auch über eine NO bedingte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB mittels Relaxin und eine damit verbundene Erhöhung des Tumorwachstums wird diskutiert [69]. Einen anderen Aspekt für die zelluläre Migration und Invasivität spielen Signalwege bei denen Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und deren Inhibitoren (TIMP) eine Rolle spielen. Viele Untersuchungen haben gezeigt, dass MMPs eine entscheidende Rolle bei der Angiogenese, Invasion und Metastasierung von Tumoren spielen [96-99]. In verschiedenen Untersuchungen konnte deutlich nachgewiesen werden, dass Relaxin zellspezifisch die Expression von einzelnen MMPs beeinflussen kann. So konnte in einer aktuellen Studie aus unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Relaxin in humanen Schilddrüsenkarzinomzellen verschiedene MMPs signifikant hochreguliert und somit die collagenolytische Aktivität und Invasivität in-vivo erhöht [100]. Ein weiterer wichtiger Schritt innerhalb der Tumorgenese ist die Fähigkeit der Zellen, zu invasieren. In Untersuchungen an verschiedenen Brustkrebszelllinien vom Hund (CF33) und Mensch (MDA-MB-435) wurde die Migration in-vitro mittels Relaxin signifikant erhöht [101]. Diese konnte in den endometrialen Karzinomzelllinien HEC-1B und KLE mittels Inhibition von MMPs oder durch eine Inkubation von siRNA gegen RXFP1 aufgehoben werden [92]. Bei in-vivo Experimenten an Nacktmäusen führte eine Injektion von Transfektanten der Prostatakarcinomzelllinie PC3, welche Relaxin überexprimieren, zu einem erhöhten Tumorwachstum im Vergleich zu den Kontrollen. Diese Tumoren zeigten einen fortgeschrittenen angiogenen Phänotyp sowie eine erhöhte VEGF Genexpression, was erneut auf einen proangiogenetischen Effekt von Relaxin hinweist [102]. Auch in

humanen Schilddrüsenkarzinomzelllinien konnte die Invasivität durch eine Elastin-Matrix mittels RLN2 deutlich erhöht werden. Untersuchungen diesbezüglich wiesen eine Korrelation mit einer vermehrten Produktion und Sekretion von elastinolytischem Cathepsin-L auf [103]. Wie wichtig es ist, nicht nur die Wirkung von Relaxin allein, sondern auch genauer die Rolle des RLN/RXFP1 Signalweges zu betrachten, haben uns neuere Daten gezeigt. So konnte in Mammatumoren von Hunden eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von RLN/ RXFP1 sowie eine Korrelation zwischen RXFP1 und einer MMP2 Expression gezeigt werden [104]. In humanen Prostatakarzinomzellen bewirkt RLN2 eine Erhöhung der Proliferation, Invasion und Adhäsion. Eine Ausschaltung des RLN/RXFP1 Signalweges mittels siRNA bewirkte eine Hemmung der Invasivität sowie des Zellwachstums und erhöhte parallel die Zellapoptose. Außerdem zeigten sich nach der Ausschaltung von RXFP1 Veränderungen der Expression verschiedener Gene, welche für das extrazelluläre Remodelling verantwortlich sind. In-vivo führte der Knockout von RXFP1 zu einer drastischen Reduktion des Tumorwachstums und einer reduzierten Metastasierungsrate [105-106]. Letztendlich lässt sich sagen, dass Relaxin ein vornehmlich in seinen unterschiedlichen Wirkungsweisen positiver Modulator der Tumorentwicklung und Progression darstellt.

### **1.3 Ziel der Arbeit**

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, den Einfluss von Relaxin auf Prozesse des Tumorwachstums und der Zellmigration in humanen Östrogen-Rezeptor-alpha negativen Brustkrebszelllinien zu untersuchen. Dabei sollten stabile Transfektanten der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231, welche das humane Relaxin 2 (RLN2) überexprimieren, etabliert werden und diese anschließend mit den MDA-MB-231 Mutterzellen sowie den Leerplasmidtransfektanten verglichen werden. Nach einer gründlichen Charakterisierung der Transfektanten sollte nun das Wachstumsverhalten dieser Zelllinien intensiver betrachtet werden, um genauere Eindrücke auf mögliche Einflüsse von Relaxin 2 auf die bereits in der Literatur angedeuteten tumorbiologischen Prozesse zu erhalten. Desweiteren sollten neue Zielmoleküle von Relaxin 2 identifiziert, und diese genauer untersucht werden.

Nach den in-vitro Untersuchungen sollte das Tumorwachstum der stabilen Relaxin 2 überexprimierenden Transfektanten der MDA-MB-231 Brustkrebszelllinie im Vergleich zur Vektorkontrolle in-vivo im Nacktmausmodell untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte, Materialien und Chemikalien

Die Listen für die einzelnen Geräte, Materialien und Chemikalien, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, sind im Anhang zu finden.

#### 2.1.2 Puffer

Standard-Puffer	Komponenten
<b>RNA</b>	
Vermessungspuffer	10 ml DEPC Wasser 100 µl Tris HCl pH 7,5
DNA Stopper	10 ml Aqua dest. 100 µl Tris HCl pH 7,5 40 µl 0,5 M EDTA pH 7,5 mit gleicher Menge Glycerin mischen 1 Spatelspitze Bromphenolblau
<b>Protein-Isolation</b>	
Laemmli-Puffer	125 mM Tris-HCl pH 6,8 4% SDS 20% Glycerol 10% Mercaptoethanol, 2% Bromphenolblau
hypotonischer Puffer A	10 mM HEPES pH 7,9 10 mM KCl 1,5 mM MgCl <sub>2</sub>
Extraktionspuffer C	20 mM HEPES pH 7,9 0,45 M NaCl 1 mM EDTA
<b>Western Blot</b>	
PBS (1x Dulbecco's-Pulver)	0,2 g/l KCl 0,2 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8,0 g/l NaCl 1,15 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

---

<b>Western Blot</b>	
TBS Puffer	10 mM Tris 0,5 M NaCl, pH 7,5
Laufpuffer	50 mM Tris-HCl 384 mM Glycin 0,1% SDS
Blot-Puffer	20% Methanol 50 mM Tris 380 mM Glycin

<b>Immunfluoreszenz</b>	
Permeabilisierungspuffer	2 mM EGTA 5 mM PIPES 1% Triton-X100

<b>Softagar-Assay</b>	
Underlayer (15 ml)	2,5 ml 3% Agar 1,5 ml FCS (10%) 22,5 µl Geneticin (75 µg/ml) 150 µl (1:1000) Amphotericin (0,25 µg/ml) 450 µl (1:1000) Gentamycin (10 µg/ml) 10,4 ml Medium
Overlayer (7,5 ml)	0,8 ml 3% Agar 750 µl FCS 11,25 µl Geneticin 75 µl (1:1000) Amphotericin 225 µl (1:1000) Gentamycin 5,6 ml Medium

<b>Nacktmäuse</b>	
gesättigte Pikrinsäurelösung	3 g Pikrinsäure in 1 Liter heißes Wasser
Bouin-Lösung	15 ml gesättigte Pikrinsäure 5 ml Formaldehyde 1 ml Essigsäure

---

### 2.1.3 Kits

Kit	Herkunft
ATP-Assay	Promega GmbH, Madison, USA
BrdU ELISA	Roche Diagnostik GmbH, Mannheim
cAMP ELISA	Amersham, Freiburg
EZ4U	Biomedica, Wien, Österreich
Relaxin ELISA	ImmunoDiagnostic, Bensheim

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Herkunft der Zelllinien

Die humanen Brustkrebszelllinien MDA-MB-231, MCF-7 und T-47D wurden von der „American Type Culture collection“ (ATCC) bezogen.

### 2.2.2 Rekultivierung von Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden vorsichtig in 30 ml 37°C warmes Kulturmedium überführt und 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend mit frischem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Alle Zellen wurden in einem 5% (w/v) CO<sub>2</sub>-begasteten Brutschrank, bei 90% relativer Luftfeuchtigkeit und 37°C Umgebungstemperatur kultiviert.

### 2.2.3 Kultivierung von Zellen

In dieser Arbeit wurden Zelllinien, welche aus zwei verschiedenen humanen Brustkrebsgeweben isoliert wurden, verwendet.

Zur besseren Übersicht sind in der nachfolgenden Tabelle (**Tab. 1**) von den verschiedenen humanen Brustkrebskarzinomzelllinien Herkunft, Kulturmedium und Charakteristika einzeln aufgelistet.

Tab. 1: Charakteristik der in dieser Studie verwendeten humanen Brustkrebszelllinien.

Name und Herkunft	Kulturmedium	Charakteristik	Wachstum und Morphologie
MDA-MB-231	DMEM/F12 10% FCS 6 ng/ml Insulin 3,75 µg/ml Hydrocortison	Adenokarzinom der Brust	adhärent epithelial
T-47D ATCC	DMEM/F12 10% FCS 6 ng/ml Insulin 3,75 µg/ml Hydrocortison	Duktalkarzinom der Brust	adhärent epithelial
MCF-7 ATCC	Earl's MEM 10% FCS 2 mM L-Glutamin 1 nM Natriumpyrovate 0,8 µg/ml Insulin	Adenokarzinom der Brust	adhärent epithelial

Stabile Relaxin 2 (RLN2) überexprimierende MDA-MB-231/pIRES-EGFP-RLN2 Transfektanten (MDA/RLN2) und die dazugehörigen MDA-MB-231/pIRES-EGFP Kontrollvektor Transfektanten (MDA/EGFP) wurden in DMEM/F12 mit 10% FCS und 800 µg/ml Geneticin kultiviert.

Je nach Wachstumsverhalten wurden die Zellen aller 2-4 Tage passagiert oder das alte gegen frisches Medium ausgetauscht. Dabei wurden die Zellen mit einer HBSS - Lösung gespült und mit Trypsin/EDTA vom Flaschenboden gelöst. Die abgenommenen Zellen wurden 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert, in ein frisches Kulturgefäß überführt und mit frischem Medium versehen.

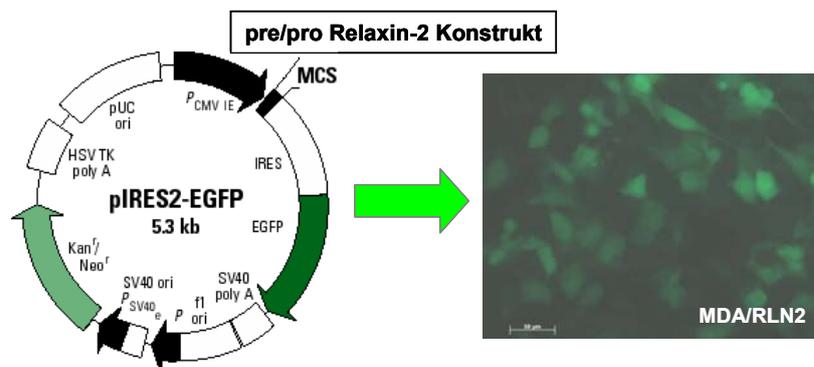
#### 2.2.4 Kryokonservierung von Zellen

Zur Langzeitlagerung im flüssigen Stickstoff, wurden die Zelllinien mit HBSS gespült und vorsichtig mit Trypsin/EDTA vom Flaschenboden gelöst. Die gelösten Zellen wurden bei 1200 rpm 10 min pelletiert. Insgesamt  $1 \times 10^6$  Zellen/ml wurden in FCS mit 10% DMSO resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Über Nacht wurden die Zellen langsam bei  $-20^{\circ}\text{C}$  und anschließend 24 h bei  $-80^{\circ}\text{C}$  langsam eingefroren und anschließen im flüssigen Stickstoff gelagert.

#### 2.2.5 Stabile Transfektion der Zellen

Um eine stabile Überexpression des humanen Relaxin 2 zu erreichen, wurde die humane Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 mit einem eukaryotischen Expressionsvektor

pIRES-EGFP (Clontech, Heidelberg, Germany), in welches das vollständige pre/pro Relaxin 2 Konstrukt kloniert wurde, transfiziert. Diese Plasmide wurde uns freundlicher Weise von Prof. Dr. Alstair Summerlee und Josh Silvertown zur Verfügung gestellt. Die mit dem pIRES/EGFP Vektor allein transfizierten MDA-MB-231 Zellen dienten später als Negativkontrollen. Für die Transfektion wurde das Transfektionsreagenz Metafectene<sup>TM</sup> mit den Angaben des Herstellers verwendet. Dabei wurden  $4 \times 10^5$  Zellen pro Well einer 6-Well Platte ausgesät und mit 0,5 µg oder 1 µg Plasmid-DNA-Metafectene-Komplex in serumfreien Medium 24 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 24 h mit frischem Kulturmedium kultiviert. 48 Stunden nach Transfektion wurde die Selektion mit 800 µg/ml Geneticin gestartet. Diese Konzentration wurde zuvor mittels „Killing Curve“ an den Mutterzellen ermittelt. Das Selektionsmedium wurde nun alle 2 Tage gewechselt, bis unter dem Fluoreszenzmikroskop deutlich grün leuchtende Klone erkennbar waren (**Abb. 1**).



**Abb. 1:** Struktur des verwendeten pIRES-EGFP Plamids der Firma Clontech, Heidelberg

Positive Klone wurden unter dem Mikroskop markiert, mit Trypsin/EDTA leicht gelöst, in ein 24-Well überführt und mit Selektionsmedium weiter bei 37°C kultiviert. Nachdem eine Konfluenz von ca. 80% erreicht war, wurden die Zellen in einem 6-Well kultiviert und standen nun für RNA und Proteinanalysen zu Verfügung.

### 2.2.6 Transiente Transfektion der Zellen mit spezifischer siRNA

Eine transiente Ausschaltung von RXFP1 und S100A4 in den Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 wurde mittels einer Transfektion unter Verwendung spezifischer siRNA gegen RXFP1 und S100A4 erreicht. Als Kontrolle wurde eine humane Negativ Control siRNA benutzt (**Tab. 2**).

**Tab. 2: Darstellung der verschiedenen siRNA's, welche zur transienten Ausschaltung spezifischer Gene benutzt wurden.**

siRNA	Sequenzen	Herkunft
RXFP1	sense-r [GCA GUU ACC UGC UUU GGA A]dTdT	Qiagen, Germany
	antisense-r [UUC CAA AGC AGG UAA CUG C] dAdG	
S100A4	sense- 5` - (GGG UGA CAA GUU CAA GCU Ctt) – 3`	Ambion, UK
	antisense 5` - (GAG CUU GAA CUU GUC ACC Ctc) -3`	
Neg. Control	sense- UUC UCC GAA CGU GUC ACG Udttd	Qiagen, Germany
	antisense- ACG UGA CAC GUU CGG AGA Adtdt	

Dabei wurden  $1 \times 10^5$  Brustkrebszelllinien in 6-Well Platten eingesät. Zur Komplexbildung mit 5  $\mu$ l/Well Lipofectamine™ 2000 wurden 150 nM der RXFP1 und Negativ Control siRNA oder 200 nM S100A4 und Negative Control siRNA in serumfreies Opti-MEM Medium gegeben und die Zellen mit dem Transfektions-Mix bei 37°C inkubiert. Nach 24 h wurde das Medium durch frisches Kultivierungsmedium mit 10% FCS ersetzt.

### 2.2.7 Inkubation der Zellen

Für Inkubationen mit humanem rekombinantem Relaxin 2 (rhRLN2) wurden  $1 \times 10^5$  Zellen in kleine Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>) mit normalem Medium eingesetzt. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt und die Zellen für 24 h mit Medium, welches 1% FCS enthielt, kultiviert. Die Zellen mit 100 ng/ml oder 500 ng/ml humanen rekombinantem Relaxin 2 (rhRLN2) wurden für 24, 48 und 72 h in Medium mit 1% FCS inkubiert. Bei längeren Inkubationen wurde das Medium mit rhRLN2 jeden Tag gewechselt. Bei der Inkubation von Zellen auf Objektträgern wurden  $1 \times 10^4$  Zellen über Nacht in einem 200  $\mu$ l großen Tropfen auf silanisierte Objektträger gesetzt. Das Medium wurde vorsichtig abgenommen und die Zellen mit Medium, welches rekombinantes Relaxin 2 enthielt, inkubiert. Bei längeren Inkubationen wurde das Medium täglich gewechselt.

### 2.2.8 Homogenisieren von Gewebe

Während der Homogenisierung wurden die aus den Nacktmäusen gewonnen Tumorgewebe und alle benötigten Utensilien in flüssigem Stickstoff gekühlt. Die Gewebestücke wurden mit Hilfe einer gekühlten teflonbeschichteten Stahlkugel in einem Teflongefäß bei einer Geschwindigkeit von 2500 rpm für 45 sec horizontal in einem Mikro Dismembrator pulverisiert und bei -80°C zwischengelagert.

### **2.2.9 RNA Isolation aus Zelllinien**

Total RNA aus den zu untersuchenden Zelllinien und Tumorgeweben wurde mittels eines Trizol Reagenz gewonnen. Es wurde von 80% konfluent bewachsenen kleinen Zellkulturflaschen das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. In jede Flasche wurde 1 ml Trizol Reagenz gegeben und die Zellen lysiert. Die Zell/Trizol-Suspension wurden in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt, mit 200 µl Chloroform versetzt, gevortext, 5 min bei RT inkubiert und zentrifugiert (12000 rpm, 15 min, 4°C). Der klare Überstand wurde vorsichtig abgenommen, in ein frisches 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und das gleiche Volumen an gekühltem Isopropanol hinzugefügt. Dieser Mix wurde vorsichtig gemischt, 10 min bei RT inkubiert und danach zentrifugiert (12000 rpm, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und das RNA-Pellet 2 mal mit je 1 ml 75 % Ethanol gewaschen, zentrifugiert (12000 rpm, 5 min, 4°C) und ca. 20 min luftgetrocknet. Das getrocknete RNA-Pellet wurde mit 20 µl RNase freiem Wasser versehen, 10 min bei 60°C gelöst und bei -80°C gelagert. Zur Bestimmung der Konzentration der isolierten total-RNA wurde eine 1:100 Verdünnung aus RNA und Vermessungspuffer (2.1.2) spektrophotometrisch bei 260/280 nm vermessen. Bei der RNA Isolation aus Tumorgeweben wurde 1 Spatel homogenisiertes Tumorgewebepulver in ein 2 ml Tube gegeben und mit 1 ml Trizol Reagenz versehen. Um größere Gewebestückchen zu zerkleinern, wurde die Suspension mit 17G Kanülen geschert und anschließend die RNA wie oben beschrieben isoliert.

### **2.2.10 cDNA Synthese (Reverse Transkription)**

Während der reversen Transkription wird die in 2.2.9 isolierte RNA in kodierende DNA (cDNA) umgeschrieben. Dabei wurden 1 µg RNA mit DEPC Wasser in einem Gesamtvolumen von 10 µl versehen und 3 min bei 70°C inkubiert. 15 µl des folgenden Master-Mixes werden (5µl 5x Puffer, 2,5 µl 0,01M DTT, 1µl 12,5mM dNTP Mix, 3µl 100 ng/µl Random Primer, 2,7µl DEPC Wasser, 0,5µl 40 U/µl RNasin und 0,5µl 200 U/µl Superscript™ II RNase H-reverse Transkriptase) zu jeder Probe hinzugefügt. Die Proben wurden nun für 45 min bei 42°C und 3 min bei 90°C im Thermozykler inkubiert und bei -20°C langfristig gelagert.

### **2.2.11 Semiquantitative RT-PCR**

Mittels einer Polymerase Kettenreaktion (PCR) lassen sich spezifische cDNA-Fragmente mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotidprimern, welche mit dem

Programm Gene Runner 3.05 konstruiert wurden, amplifizieren und vervielfältigen. Für die Amplifikation von RLN2, RXFP1, S100A4 und RAGE Rezeptor wurden spezifische Oligonukleotidprimer (Metabion, Martiensried, Germany) (**Tab. 3**) verwendet. Um spätere Auswertungen zu ermöglichen, wurde 18s ein so genanntes „housekeeping gen“ amplifiziert. Dies ermöglicht später eine Bestimmung gleicher cDNA Ausgangskonzentrationen. Die unter 2.2.10 hergestellten cDNA Proben wurden in dem folgenden Ansatz eingesetzt:

16,8 µl	dH <sub>2</sub> O
2,5 µl	10xPCR Puffer
3 µl	dNTP-Mix (100µM)
0,25 µl	sense Primer (10 pmol/ml)
0,25 µl	antisense Primer (10 pmol/ml)
0,2 µl	AmpliTaq Polymerase (2 U/µl)
2 µl	cDNA Probe

**Tab. 3: Oligonucleotid Primer, welche für die semiquantitative RT-PCR in den humanen Brustkrebszelllinien und Schilddrüsenkarzinomzelllinien verwendet wurden.**

Primer	Größe	Primer-Sequenz (5`-3`)	T <sub>M</sub>	Zyklen
S100A4	289bp	sense – gaa ggc cct gga tgt gat ggt g	65°C	35
		antisense - cat ttc ttc ctg ggc tgc tta tc		
RLN2	485bp	sense - tct gtt tac tac tga acc aat tt	55°C	35
		antisense - cat ggc aac att tat tag cca a		
RXFP1	243bp	sense - ccc aat tct cta tac tct gac cac aag	65°C	35
		antisense - tca tga ata gga att gag tct cgt tga tt		
RAGE	591bp	sense – cta atg aga agg gag tat ctg	58°C	35
		antisense – cac aag atg acc cca atg a		
18s	344bp	sense - gtt ggt gga gcg att tgt ctg g	62°C	10
		antisense - agg gca ggg act taa tca acg c		

T<sub>M</sub> = Schmelztemperatur in °C

Die Bedingungen für die Amplifikation der einzelnen Gene wurde für jedes einzelne optimiert und fand unter Verwendung der spezifischen Primer (**Tab.3**) in einem Thermozykler wie folgt statt:

94°C	1 min oder 10 min	Denaturierung der AmpliTaq der AmpliTaqGold Polymerase	} x Zyklen ( <b>Tab.3</b> )
95°C	45 sec	Denaturierung der doppelsträngigen DNA	
T <sub>M</sub>	45 sec	Annealing mit den Primern	
72°C	1 min	Elongation	
72°C	5 min		

Die PCR-Produkte (20 µl je Probe), welche 5 µl DNA Stopper (2.1.2) enthielten, wurden anschließend auf einem Ethidiumbromid-haltigem 2% Agarosegel aufgetragen und bei 50 mA für 2 h aufgetrennt. Die Visualisierung der Amplifikate fand unter UV-Licht mit Hilfe einer Kodak Scan Kamera statt. Die folgenden Auswertungen konnte mit einer Kodak Software (Kodak Digital Sciene 1D v.3.0.2, Eastman Kodak, New Heaven, USA) durchgeführt werden.

### **2.2.12 Protein Extraktion aus Zelllinien und Tumorgewebe**

Für die Extraktion von totalem Protein wurden die zu untersuchenden Zelllinien aus kleinen Zellkulturflaschen bei einer Konfluenz von 80% isoliert. Dabei wurde zuerst das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Proteine mit 2x reduzierendem Laemmli-Puffer (2.1.2), welcher einen Protease Inhibitor Cocktail enthielt, isoliert, 5 min bei 95°C inkubiert und bei -20°C gelagert.

### **2.2.13 Fraktionierung von Proteinen**

Für die Fraktionierung der zu untersuchenden Zelllinien wurden diese bei 80% Konfluenz mit Trypsin/EDTA gelöst und anschließend mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit je 200 µl hypotonischem Puffer A (2.1.2), welcher einen Protease Inhibitor Mix enthielt, 15 min bei 4°C inkubiert. Nach der hypotonischen Lyse wurden zu jeder Probe 25 µl Puffer A, welcher Protease Inhibitor und zusätzlich 2,5% NP-40 enthielt, hinzugefügt und wieder 15 min bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben bei 3500 rpm 4 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet, welches nun die Kernfraktion enthielt, wurde bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung zwischengelagert. Der Überstand, welcher die zytoplasmatische Fraktion enthielt, wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und einige Male einer Frier-Tau-Lyse unterzogen. Anschließend wurde die zytoplasmatische Fraktion zentrifugiert (14000 rpm, 30min, 4°C), der klare Überstand in ein frisches Tube überführt und bei -20°C gelagert. Die zwischengelagerte Kernfraktion wurde 1 bis 2 mal mit PBS gewaschen, zentrifugiert (3500 rpm, 4 min, 4°C) und mit 150 µl Extraktionspuffer C (2.1.2) und Protease-Inhibitor 15 min bei 4°C inkubiert. Die Proben wurden bei 14000 rpm 10 min und 4°C zentrifugiert, der Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

### 2.2.14 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) und Western Blot Analyse

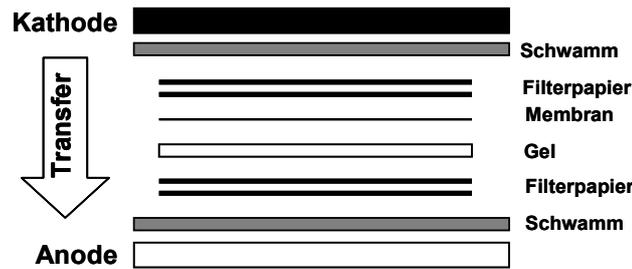
Bei einer Western Blot Analyse werden Proteine auf einer SDS-Page nach ihrer Größe aufgetrennt, auf eine spezifische Membran geblottet und mittels spezifischen Antikörpern detektiert. Die für diese Methode benutzten Polyacrylamidgele bestanden jeweils aus einem Sammel- und Trenngel. Je nach Größe der zu detektierenden Proteine wurden verschiedene Prozentigkeiten der Sammelgele verwendet (10-15%). Folgende Zusammensetzungen wurden verwendet:

10 ml Sammelgel (12 %)	3,3 ml	H <sub>2</sub> O
	4,0 ml	30 % Acrylamide (29:1)
	2,5 ml	1,5 M Tris-HCl pH 8,8
	100 µl	10 % SDS
	100 µl	10 % APS
	4 µl	TEMED
1 ml Trenngel	680 µl	H <sub>2</sub> O
	170 µl	30 % Acrylamide (29:1)
	130 µl	1,5 M Tris-HCl pH 6,8
	10 µl	10 % SDS
	10 µl	10 % APS
	1 µl	TEMED

Nach vollständiger Polymerisation wurden die Gele in eine mit 1x Laufpuffer (2.1.4) gefüllte Gel-Elektrophorese-Kammer eingespannt.

Da bei den mit Laemmli-Puffer isolierten Proteinen keine Konzentration bestimmt werden konnte, wurden die Proben vor dem Auftragen 5 min bei 95°C gekocht und anschließend 20 - 40 µl auf das Gel aufgetragen. Um zeigen zu können, dass eine vergleichbare Proteinmenge aufgetragen wurde, sind anschließend von allen Membranen noch Detektionen von beta-Aktin, einem „housekeeping“ Gen, durchgeführt wurden. Die Proteine wurden bei 80 V circa. 1,5 bis 2 Stunden aufgetrennt.

Die auf der SDS-Page aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrozellulose- oder eine Polyvinylidenfluorid- (PVDF) Membran transferiert. Bei diesem Verfahren handelt es sich um ein Nass-Blot Verfahren. Dabei werden Filterpapier (Whatman Blotting Papier), Nitrozellulose Membranen und Gele kurz in Blot-Puffer (2.1.2) getaucht. Die PVDF-Membranen müssen vor ihrer Verwendung kurz in Methanol rehydriert werden. Für den Transfer wurden die einzelnen Bestandteile sandwichartig aufgebaut (**Abb. 2**), die Blotkammer mit Blot-Puffer aufgefüllt und die Proteine 130 min bei 1 A und 4°C auf die Membranen transferiert.



**Abb. 2:** Schichtaufbau während des Nass-Blot-Verfahrens.

Nach dem Blotten wurden die Membranen mit einer Ponceau-Lösung 5 min inkubiert und anschließend mit Leitungswasser gespült. Mit dieser Färbung ließ sich die Transfereffizienz kontrollieren. Die angefärbten Proteine waren nun als rote Banden erkennbar. Für spätere Molekulargewichtsbestimmungen wurde der Broad Range Marker (Broad Range Protein Molecular Weight Marker), gekennzeichnet.

Zur Detektion verschiedener Gene wurden spezifische Antikörper verwendet. Zuvor wurden die unspezifischen Bindungsstellen mittels eines Blockpuffers, welcher je nach verwendetem Antikörper optimiert wurde (**Tab. 4**), abgesättigt. Dabei wurden die Membranen 1 h bei RT in dem jeweiligen Blockpuffer inkubiert. Anschließend wurden die Antikörper im Blockpuffer verdünnt (**Verdünnungen siehe Tab. 4**) auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4°C auf einem Roller inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Membranen je 3 mal für 10 min mit PBS + 0,1% Tween (PBS-T) oder TBS + 0,1% Tween (TBS-T) (2.1.2) gewaschen. Anschließend wurden die Membranen mit einem sekundären Antikörper, welcher mit PBS-T oder TBS-T 1:20000 verdünnt wurde, für 1 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Membranen 1 min mit einer ECL™-Lösung inkubiert und die spezifischen immunoreaktiven Proteinbanden auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm-MP), mittels Entwickler und Fixierer sichtbar gemacht.

**Tab. 4:** Antikörper, welche für Proteinchemische Analysen in humanen Brustkrebszelllinien verwendet wurden.

Primär-AK	Verdünnung	Blockpuffer	Sekundär-AK	MW
S100A4	1:500	PBS-T + 3% BSA	GAR	10kDa
R6 <sup>1</sup>	1:2500	PBS-T + 5% Milch + 3% BSA	GAR	18kDa
β-Aktin	1:20000	PBS-T + 3% Milch	GAM	42kDa

<sup>1</sup> Der R6-Antikörper wurde freundlicherweise von Professor B. Steinetz (Nelson Institute of Environmental Medicine, New York University Medical Centre, Tuxedo, NY, USA) bereitgestellt.

### 2.2.15 Immunfluoreszenz zytoskelettaler Bestandteile

Für die Darstellung der Lokalisation zytoskelettaler Bestandteile wurden  $1 \times 10^4$  Zellen auf mit APTEX silanisierte Objektträger über das Wochenende bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\% \text{CO}_2$  wachsen gelassen. Die Zellen wurden vorsichtig mit PBS kurz gewaschen und 20 min in  $3,7\%$  Formaldehyde bei Raumtemperatur fixiert. Nach 15-minütigem Waschen mit PBS wurden die Zellen 1 min in Permeabilisierungspuffer (2.1.4) permeabilisiert und anschließend 3 mal gewaschen. Die Objektträger wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen alpha Tubulin, acetyliertem Tubulin und gamma Tubulin (**Tab. 5**), welche mit Blockpuffer (**Tab. 5**) verdünnt wurden, über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger 3 mal je 10 min mit PBS gewaschen und mit einem Rhodamine gelabelten sekundären Antikörper, welcher mit PBS 1:100 verdünnt wurde, 1 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellkerne mit einem Hoechstfarbstoff, welcher 1:100 in PBS verdünnt wurde, 2 min angefärbt. Nach dreimaligem Waschen wurden die Objektträger bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend mit einem Flurescent Mounting Medium eingedeckt. Die Fluoreszenzen konnten mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops dargestellt werden. Für die Fluoreszenz von Phalloidin (F-Aktin) wurden die Zellen wie oben beschrieben 2 Tage auf silanisierten Objektträgern wachsen gelassen, mit  $3,7\%$  Formaldehyde fixiert und 15 min mit PBS gewaschen. Die Permeabilisierung fand anschließend für 10 min mit PBS +  $0,1\%$  Triton X 100 statt. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Objektträger mit Blockpuffer A (**Tab. 5**) 1 h bei  $4^\circ\text{C}$  blockiert und anschließend mit einem Rhodamine Phalloidin Antikörper, welcher mit dem Blockpuffer B (**Tab. 5**) verdünnt wurde, für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellkerne mit Hoechst wie oben beschrieben angefärbt, anschließend gewaschen, getrocknet und mit einem Flurescent Mounting Medium eingedeckt.

**Tab. 5** Antikörper, welche für Immunfluoreszenzen in humanen Brustkrebszelllinien verwendet wurden.

Primär-AK	Verdünnung	Blockpuffer	Sekundär-Ak
alpha Tubulin	1:100	PBS + $0,1\%$ BSA	GAM
acetyliertes Tubulin	1:100	PBS + $0,1\%$ BSA	GAM
gamma Tubulin	1:100	PBS + $0,1\%$ BSA	GAM
Phalloidin	nach Firmenprotokoll	Blockpuffer A: PBS + $3\%$ Milch Blockpuffer B: PBS + $0,1\%$ BSA	

### **2.2.16 Immunhistochemie**

Für histologische Untersuchungen wurden von den in Formaldehyd fixierten und in Paraffin eingebetteten Tumorgewebe HE (Hämatoxylin-Eosin) Färbungen hergestellt. Dabei wurden die Gewebe 3 mal 10 min in Xylol, 2 mal 3 min in 95%-igem Ethanol, 2 mal 3 min in 70%-igem Ethanol entparaffiniert, kurz in destilliertem Wasser gespült und anschließend in PBS überführt. Für die HE-Färbung wurden die entparaffinierten Tumorgewebe kurz in 10% Formalin überführt und anschließend mit Aqua bidest gespült. Anschließend wurden alle DNA- bzw. Ribosomalhaltigen Bestandteile der Gewebe 1min mit Hämalaun angefärbt. Um die typische blauviolette Färbung der Zellkerne zu erreichen, wurden die Gewebe 2 min in Leitungswasser gestellt. Die Zytoplasma-Färbung fand in einer 1%-igen Eosin Lösung für circa 15 sec statt. Für die folgende Entwässerung der Gewebe wurden die Gewebe kurz in Leitungswasser und danach für kurze Zeit in absoluten Alkohol überführt. Zur anschließenden Klärung der Gewebe diente Xylol. Nun konnten die Gewebe mit Entellan eingedeckelt und haltbar gemacht werden.

### **2.2.17 Relaxin Elisa**

Mit dem Relaxin Elisa lassen sich Relaxinkonzentrationen in Flüssigkeiten bestimmen. Dabei wurden  $1 \times 10^5$  Zellen der Relaxin 2 überexprimierenden MDA-MB-231 Transfektanten (MDA/RLN2) und deren Leerplasmidkontrollen (MDA/EGFP) pro 6-Well eingesät und über Nacht mit wenig Medium bei 37°C kultiviert. Der Zellkulturüberstand wurde anschließend abgenommen und zur Entfernung von Zellresten vorsichtig zentrifugiert (10 min bei 1200 rpm). Die Konzentration des sekretierten Relaxin 2 von den Transfektanten wurde nach Firmenprotokoll des verwendeten Relaxin-ELISA ermittelt. Die Konzentration wurde mittels Farbreaktion bei 450 nm in einem ELISA Reader bestimmt.

### **2.2.18 cAMP Assay**

Mit diesem Assay ist es möglich, intrazelluläre cAMP Konzentration, welche durch die Adenylcyclase gebildet wird, in den Brustkrebszelllinien zu bestimmen. Es wurden  $1 \times 10^4$  MDA-MB-231 oder MCF-7 Zellen pro 96-Well eingesetzt und über Nacht bei 37°C kultiviert. Vor den eigentlichen Inkubationen wurden die Zellen mit 1 mM IBMX, was die Aktivität der cAMP-Phosphodiesterase (PDE) hemmt, für 2 h bei 37°C vorinkubiert. Dadurch wird gewährleistet, dass nur das durch Relaxin 2 induzierte cAMP im ELISA gemessen wurde. Die MDA-MB-231 Zellen wurden nun mit 100 ng/ml

rhRLN2, 100 µl/Well mit den Überständen der RLN2 überexprimierenden MDA/RLN2 Transfektanten sowie von den Kontrollen (MDA/EGFP) 30 min bei 37°C in Anwesenheit von 1 mM IBMX inkubiert. Die Überstände wurden von den Transfektanten gewonnen, indem  $1 \times 10^5$  pro 6-Well über Nacht bei 37°C kultiviert wurden. Restliche Zellbestände wurden nach der Abnahme von der Zellkultur mittels Zentrifugation (1200 rpm, 10 min) entfernt. Eine Inkubation der MDA-MB-231 Zellen mit 10 µM Forskolin, ein Stimulator der Adenylylcyclase, diente als Positivkontrolle für die Induktion von zellulärem cAMP. Die Zellen wurden nach Firmenprotokoll gewaschen, mit einem cAMP Extraktionspuffer lysiert und die cAMP Konzentration mittels eines kolorimetrischen cAMP Biotrak Enzym-Immunoassay bestimmt. Die Reaktion wurde mit 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt und die Farbreaktion bei 450 nm mit einem ELISA Reader gemessen.

### **2.2.19 BrdU Assay**

Zur Bestimmung der zellulären Proliferation wurde ein kolorimetrischer Zell-Proliferations-ELISA (BrdU-Assay) verwendet. Es wurden  $5 \times 10^3$  Zellen der MDA/RLN2 und MDA/EGFP Transfektanten pro 96-Well in 100 µl Medium eingesetzt und 24 h bei 37°C kultiviert. Am nächsten Tag wurden 10 µl BrdU Markierungslösung in jedes Well außer zur Negativkontrolle gegeben und 7 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt, die Zellen luftgetrocknet und 30 min mit 200 µl/Well ELISA-Blockpuffer bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µl/Well BrdU-Antiserum für 30 min bei RT inkubiert. Nachdem die Wells gewaschen waren, wurden sie mit je 100 µl/Well Substratlösung für 10 min bei RT inkubiert. Schließlich wurde mit 25 µl/Well 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> die Farbreaktion gestoppt und die Absorbanz konnte nach 5 min bei 450 nm / 620 nm in einem ELISA-Reader gemessen werden. Um den Einfluss des sekretierten Relaxins der MDA-Transfektanten auf die Proliferation der MDA-MB-231 messen zu können, wurden kleine Flaschen der MDA/RLN2 und MDA/EGFP Transfektanten bis zu einer Konfluenz von 80% wachsen gelassen. Anschließend wurden 2 ml frisches Medium für 24 h auf die Transfektanten gegeben. Die Zellreste wurden mittels Zentrifugation (1200 rpm, 10 min) entfernt und anschließend auf die am Vortag in 96-Well eingesetzten MDA-MB-231 ( $5 \times 10^3$ ) für 24 h gegeben. Zur Bestimmung der zellulären Proliferation wurde nun wie oben beschrieben der BrdU-Assay durchgeführt.

### **2.2.20 MTT Assay**

Zur Bestimmung Zellzytotoxizität wurde der kolorimetrische Zell-Proliferation Assay Kit EZ4U, ein NADH abhängiger Zellvitalitätstest, verwendet. Die Transfektanten (MDA/RLN2 und MDA/EGFP) wurden mit einer Zellzahl von  $1 \times 10^4$  Zellen/ 96-Well in 200  $\mu$ l Kulturmedium für 24 h bei 37°C kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit 20  $\mu$ l einer chromophorhaltigen Substrat Lösung inkubiert. Nach 6 h wurde die Absorbanz des NADH abhängig gebildeten blau-violetten Formazansalzes bei einer Wellenlänge von 450 nm / 620 nm mit Hilfe eines ELISA-Readers gemessen.

### **2.2.21 ATP Assay**

Um festzustellen, ob die Überexpression von Relaxin 2 einen Einfluss auf die Energieproduktion der Zellen besitzt, wurde eine luminometrischer ATP Assay (CellTiter-Glo-Assay) benutzt. Es wurden von den MDA Transfektanten und den Kontrollen  $2,5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^3$  und  $1 \times 10^4$  Zellen pro 96-Well über Nacht bei 37°C kultiviert. Nur mit Medium gefüllte Wells dienten bei diesem Assay als Negativkontrolle. Anschließend wurden die Zellen mit 100  $\mu$ l Substrat für 2 min inkubiert, 10 min geschüttelt und die Lumineszenz mit einem Sirius Luminometer gemessen.

### **2.2.22 Motilitäts-Assay**

Die Experimente für die zelluläre Motilität wurden in 24-Well Platten durchgeführt.  $1 \times 10^4$  Zellen der überexprimierenden Transfektanten MDA/RLN2 und MDA/EGFP wurden in spezielle Thin Certs™-TC Polykarbonat Filter, welche 8  $\mu$ m große Poren besaßen, in 200  $\mu$ l Medium mit 1% FCS eingesetzt. Die untere Kammer wurde mit 500  $\mu$ l Medium mit 1% FCS gefüllt, der mit den zu testenden Zellen gefüllte Filter hineingesetzt und anschließend bei 37°C kultiviert. Nach 24 h wurden die Zellen auf dem Filter kurz mit PBS gewaschen, 5 min in einem 1:1 PBS/Methanol Gemisch inkubiert und 10 min in Methanol fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen mit 0,1% Toluidinblau in 2,5% Natriumcarbonat 30 min bei Raumtemperatur angefärbt. Die nicht migrierten Zellen wurden vorsichtig mit Wattestäbchen entfernt und die Filter anschließend über Nacht an der Luft getrocknet. Die trockenen Membranen wurden aus den Filtern herausgetrennt, auf Objektträger gebracht und unter dem Lichtmikroskop ausgewertet. Dabei wurden fünf separate Blickfelder fotografiert und die Zellzahl bestimmt. Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt und die durchschnittliche Zellzahl der migrierten Zellen pro Filter mit Standardfehlern in Diagrammen dargestellt.

Um parakrine Kurzzeiteffekte von Relaxin auf die MDA-MB-231 Mutterzellen darstellen zu können, wurden  $1 \times 10^4$  dieser Zellen auf den Filter gegeben und diese zusätzlich mit 100 ng/ml oder 500 ng/ml rekombinantes RLN2 (rhRLN2) versehen. Außerdem wurden die gleichen Konzentrationen von rhRLN2 in das Medium der unteren Kammer gegeben und die Zellen 24 h bei 37°C inkubiert. Um parakrine Effekte des sekretierten RLN2 der MDA-Transfektanten auf die Motilität der MDA-MB-231 Zellen zeigen zu können, wurden in die untere Kammer ein Tag zuvor die Transfektanten mit einer Zellzahl von  $5 \times 10^4$  pro 24-Well eingesät. Die Filter mit den MDA-MB-231 Zellen wurden nach 24 h darauf gesetzt und abermals 24 h bei 37°C inkubiert. Die Filter beider Versuche wurden anschließend wie oben bereits beschrieben fixiert, gefärbt und die Zellzahl der migrierten Zellen bestimmt.

Zur Bestimmung der Zellmotilität der MDA-MB-231 Zellen nach einer Langzeitinkubation mit RLN2 wurden die Zellen 7 Tage in einer Flasche mit 500 ng rhRLN2 vorinkubiert, wobei jeden Tag frisches Medium mit rhRLN2 zu den Zellen gegeben wurde. Anschließend wurde wie oben beschrieben ein Motilität-Assay mit den langzeitinkubierten MDA-MB-231 unter RLN2 durchgeführt.

Motilitäts-Assay mit siRNA behandelten MDA-MB-231 fanden 24 h nach Transfektion mit siRNA in Medium mit 1% FCS statt und wurden 48 h nach Transfektion fixiert, gefärbt und ausgewertet.

### **2.2.23 Migrations-Assay**

Zur Darstellung des invasiven Verhaltens der RLN2 überexprimierenden Transfektanten wurden modifizierte Polykarbonat Filter mit 8 µm großen Poren verwendet. Diese wurden mit verschiedenen Bestandteilen der extrazellulären Matrix (EZM) beschichtet. Es wurden in den Versuchen 1 bis 2 µg/cm<sup>2</sup> Laminin der humanen Plazenta, 1 mg/ml Gelatine, 0,8 mg/ml Kollagen A der humanen Plazenta und 50 µg/ml Elastin der humanen Lunge verwendet. Die MDA/RLN2 und MDA/EGFP Transfektanten wurden mit einer Zellzahl von  $1 \times 10^4$  Zellen je beschichteten Filter in 200 µl Medium mit 1% FCS eingesetzt und 24 h bei 37°C kultiviert. Die Fixierung, Färbung und Auswertung wurden anschließend wie unter 2.2.22 beschrieben durchgeführt.

### **2.2.24 Softagar-Assay**

Mit Hilfe eines Softagar-Assays lässt sich die Fähigkeit zur Koloniebildung von Tumorzellen untersuchen. Dieser Zwei-Schichten Softagar-Assay wurde in 6-Well

Platten durchgeführt. Zu dem bereits hergestellten und bei 37°C vorgewärmten Master-Mix für die untere Schicht (Underlayer, 2.1.2) wurden 2,5 ml einer sterilen 3% Agar-Agar-Lösung, welche zuvor verflüssigt und bei 70°C warm gehalten wurde, dazugegeben und gemischt. Anschließend wurden vorsichtig und möglichst luftblasenfrei 1,5 ml der Lösung in je ein 6-Well pipettiert und unter der Zellkulturbank 10 min abgekühlt.  $2 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$  und  $1 \times 10^5$  Zellen wurden in je 1 ml warme Overlay-Lösung (2.1.2), welche zuvor mit der warmen Agar-Agar Lösung versetzt wurde, überführt, vorsichtig auf den abgekühlten Underlayer gegossen und ebenfalls 10 min unter der Zellkulturbank abgekühlt. Nachdem der Overlay ausgekühlt und fest war, wurde langsam 1 ml Kulturmedium auf den Softagar gegeben und der Assay bei 37°C kultiviert. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Kolonien wurden die Assays mehrere Wochen ohne viel Bewegung kultiviert. Dabei wurde jede Woche das Kulturmedium vorsichtig gewechselt. Nach 4 bis 6 Wochen wurden die gebildeten Kolonien mit 500 µl einer Iodotetrazoliumchloridlösung (5 mg/ml) über Nacht bei 37°C gefärbt. Nun konnten unter dem Lichtmikroskop Kolonien aufgenommen, sowie die Anzahl und die Größen dieser bestimmt werden.

### **2.2.25 Tumorwachstumsstudien in Nacktmäusen**

Die Nacktmausversuche wurden von dem Tierethikkomitee der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg genehmigt. Für das Tumorwachstumsstudium wurden 3 Wochen alte männliche Nacktmäuse des Stammes NMRI verwendet.  $2 \times 10^7$  Zellen/ml der MDA/EGFP und zwei MDA/RLN2 Transfektanten (Klon 19 und 23) wurden in Medium ohne FCS subkutan in die abdominale Region an beiden Seiten jeder Maus injiziert. Pro Transfektante wurden fünf Mäuse injiziert. Dabei wurde für die Analyse pro verwendeten Transfektante eine maximale Tumoranzahl von 10 erreicht. Das Tumorwachstum wurde zweimal pro Woche gemessen. Die Mäuse wurden getötet, wenn die Tumorgröße 10% der Körpergröße überschritten hat. Die Primärtumoren sowie andere Organe wurden entnommen und die Mäuse nach Metastasen untersucht. Tumorgewebe und andere Organe wie Lunge, Leber oder Gehirn wurden geteilt und für spätere Untersuchungen kryokonserviert oder über Nacht in einem Pikrinsäure-Formol-Eisessig-Gemisch nach *Bouin* (2.1.2) fixiert. Die in Pikrinsäure fixierten Gewebestücken wurden anschließend in 70% Ethanol, welcher 2-3-mal gewechselt wurde, gelagert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die Einbettung der Gewebe fand mit freundlicher Unterstützung von Frau Schlüter am Institut für Anatomie der Martin-Luther-Universität statt.

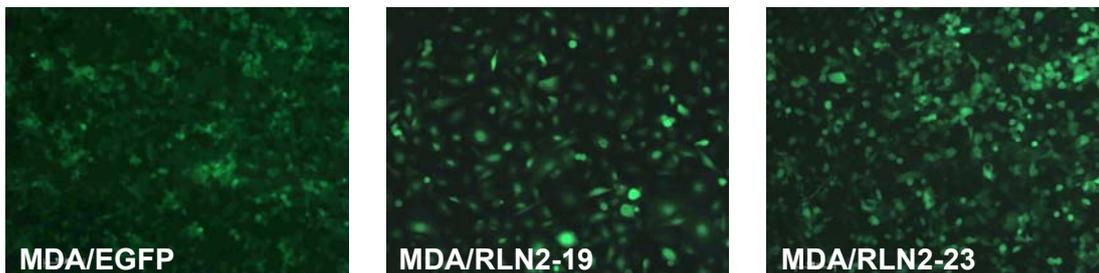
### **2.2.26 Statistische Analysen**

Alle Experimente wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt und in Säulendiagrammen mit Standardabweichung dargestellt. Zur Überprüfung der Signifikanz wurden der nichtparametrische Mann Whitney Test sowie eine One-Way ANOVA Analyse verwendet. Das Signifikanzniveau wurde bei einem p-Wert von 0,05 mit \* und bei einem p-Wert von 0,005 mit \*\* markiert. Die Ergebnisse der Tumorwachstumsstudien wurden auf eine Mann Whitney typische Darstellung in einem Box-Whisker-Plot dargestellt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Herstellung stabiler RLN2 Transfektanten der humanen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231

Für die Untersuchung auf den Einfluss von RLN2 auf zelluläre biologische Prozesse in humanem Brustkrebsgewebe wurden als Modellsystem stabile überexprimierende Transfektanten der Östrogenrezeptor alpha negativen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 etabliert. Diese Zelllinie besitzt nur eine sehr geringe Eigenproduktion von humanem RLN2 und eignete sich deshalb sehr gut für dieses Modellsystem. Für die Herstellung dieser RLN2 überexprimierenden Transfektanten wurde der eukaryotische Expressionsvektor pIRES-EGFP, welcher das vollständige pre/pro Relaxin 2 Konstrukt enthielt, verwendet. Die Selektion positiver RLN2 überexprimierender Transfektanten fand durch die fluoreszierende Eigenschaft des EGFP Proteins unter dem Fluoreszenzmikroskop statt (**Abb. 3**).



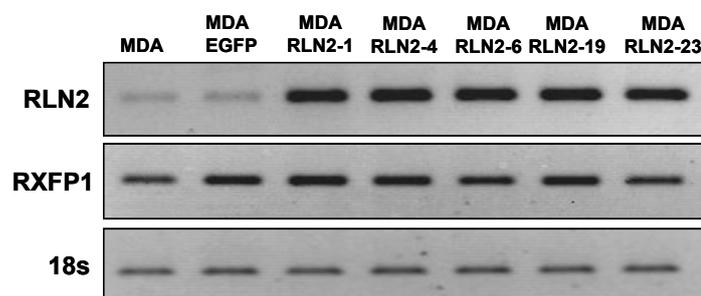
**Abb. 3:** Grün fluoreszierende RLN2 überexprimierende Transfektanten (MDA/RLN2-19 und MDA/RLN2-23 sowie der Vektorkontrolle MDA/EGFP der humanen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231.

Insgesamt konnten 15 MDA/RLN2 und 6 MDA/EGFP Transfektanten identifiziert werden. Für die folgenden Untersuchungen wurden die MDA-MB-231 Mutterzellen, die Vektorkontrollen (MDA/EGFP) mit jeweils 5 RLN2 überexprimierenden Transfektanten (MDA/RLN2-1, 4, 6, 19 und 23) verglichen.

## 3.2 Charakterisierung der stabilen RLN2 Transfektanten der humanen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231

### 3.2.1 Nachweis der Überexpression von RLN2 auf RNA Ebene

Zur Überprüfung der RLN2 Überexpression der stabilen MDA/RLN2 Transfektanten im Vergleich zu der Vektorkontrolle und den Mutterzellen auf mRNA Ebene wurde eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt. Hierfür wurden spezifische Oligonukleotidprimer (**Tab. 3**) verwendet. Mit dieser Methode konnte eine deutliche Überexpression von RLN2 in den 5 ausgewählten MDA/RLN2 im Vergleich zu den MDA/EGFP und MDA-MB-231 Zelllinien gezeigt werden (**Abb. 4**). Des Weiteren wurde der Expressionsstatus des spezifischen Relaxin Rezeptors RXFP1 in den Transfektanten untersucht. Hier zeigten sich keine Veränderungen im Expressionsmuster nach einer Überexpression von RLN2 (**Abb. 4**). Jedoch lässt eine Expression von RXFP1 auf ein potientes funktionales Relaxin-RXFP1 Ligand-Rezeptor-System schließen. Als interner Standard wurde jeweils 18s für die späteren Berechnungen mitgeführt (**Abb. 4**).



**Abb. 4:** Semiquantitative RT-PCR Analysen zeigten eine deutliche Überexpression von RLN2 in den MDA/RLN2 Transfektanten im Vergleich zu den MDA/EGFP und MDA-MB-231 Zelllinien. In der RXFP1 Expression konnten keine Veränderungen festgestellt werden. 18s diente als interner Standard.

### 3.2.2 Nachweis der Überexpression von RLN2 auf Protein Ebene

Auf Protein Ebene konnte mittels Western Blot Analyse ebenfalls eine Überexpression des 18kDa großen pro-Relaxin-Proteins in den MDA/RLN2 Transfektanten im Vergleich zu der Vektorkontrolle MDA/EGFP und den Mutterzellen dargestellt werden (**Abb. 5**). Als interner Standard wurde  $\beta$ -Aktin mitgeführt.

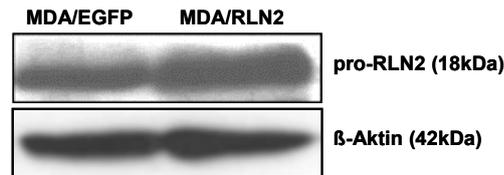


Abb. 5: Western Blot Analysen zeigten eine Überexpression der 18kDa großen pro-RLN2 Form in den MDA/RLN2 Transfektanten im Vergleich zu der Vektorkontrolle MDA/EGFP. Als interner Standard diente β-Aktin.

### 3.2.3 Nachweis von sekretiertem RLN2 in den Transfektanten

Zum Nachweis einer Expression von Relaxin 2 sowie zu Überprüfung, ob das exprimierte RLN2 von den MDA/RLN2 Transfektanten in den Kulturüberstand sekretiert wird, wurde ein kommerziell erhältlicher Relaxin-Elisa verwendet. Mit diesem Elisa lassen sich geringe Mengen von RLN2 in Serum, Plasma, Urin und Zellkulturüberständen bestimmen. In dem Assay wurden die Zellkulturüberstände der RLN2 exprimierenden Transfektanten und den Kontrollen MDA/EGFP untersucht. Dabei zeigte sich, dass die MDA/RLN2 Transfektanten signifikant mehr humanes RLN2 sekretieren als die Vektorkontrolle MDA/EGFP. Die RLN2 Konzentration der MDA/RLN2 Transfektanten war 50-fach höher als in den MDA/EGFP Transfektanten (Abb. 6).

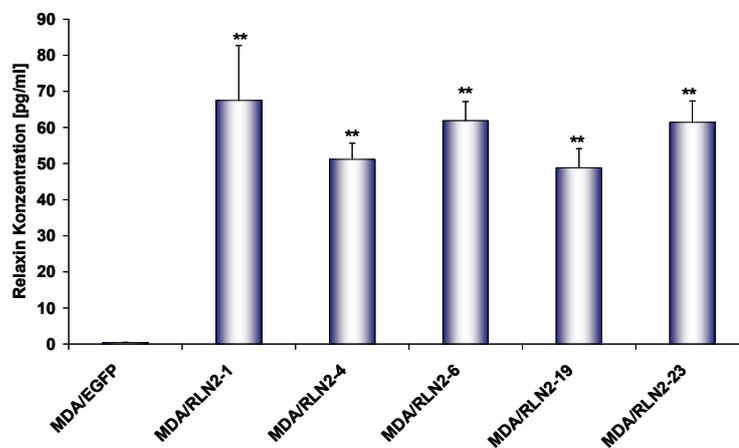
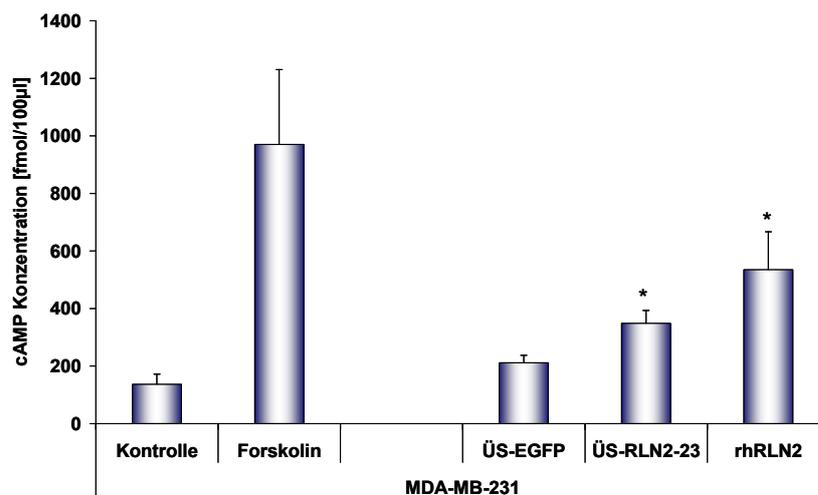


Abb. 6: Ermittelte Konzentration des sezernierten RLN2 der MDA/RLN2 Transfektanten im Vergleich zur Vektorkontrolle MDA/EGFP. Die RLN2 überexprimierenden MDA Transfektanten sezernieren signifikant mehr RLN2 als MDA/EGFP, \*\*p ≤ 0,005.

### 3.2.4 Bioaktivitätsnachweis des sekretierten RLN2 der Transfektanten.

Mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen cAMP Assays konnte die Bioaktivität des sekretierten RLN2 der MDA Transfektanten nachgewiesen werden. Dabei wurde getestet, ob sich die cAMP Konzentration der MDA-MB-231 Zellen durch Inkubationen

mit 100 ng/ml rekombinantem humanem RLN2 oder den Zellkulturüberständen der MDA/RLN2 Transfektanten erhöhen lassen. Vor den Inkubationen wurden die MDA-MB-231 Zellen 2 h mit IBMX vorinkubiert. Somit wird die Aktivität der cAMP Phosphoesterase gehemmt und gewährleistet, dass das intrazelluläres cAMP, welches durch die Stimulanzen induziert wird, nicht abgebaut wird. Als Positivkontrolle diente Forskolin, ein direkter Stimulator der Adenylzyklase. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte MDA-MB-231 verwendet. Eine deutliche Induktion von zellulärem cAMP ließ sich nach der Inkubation mit sekretiertem RLN2 im Zellkulturüberstand der MDA/RLN2 Transfektanten und mit humanem rekombinantem RLN2 bei den MDA-MB-231 Zellen erkennen (**Abb. 7**). Da bei den Inkubationen mit den Zellkulturüberständen der Vektorkontrolle in beiden Brustkrebszelllinien keine Erhöhungen des zellulären cAMP nachweisbar waren, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass das sezernierte RLN2 der MDA Transfektanten bioaktiv ist. Außerdem lässt sich daraus schließen, dass in den MDA-MB-231 Brustkrebszelllinien ein funktionelles RXFP1 Rezeptor System zu finden ist.

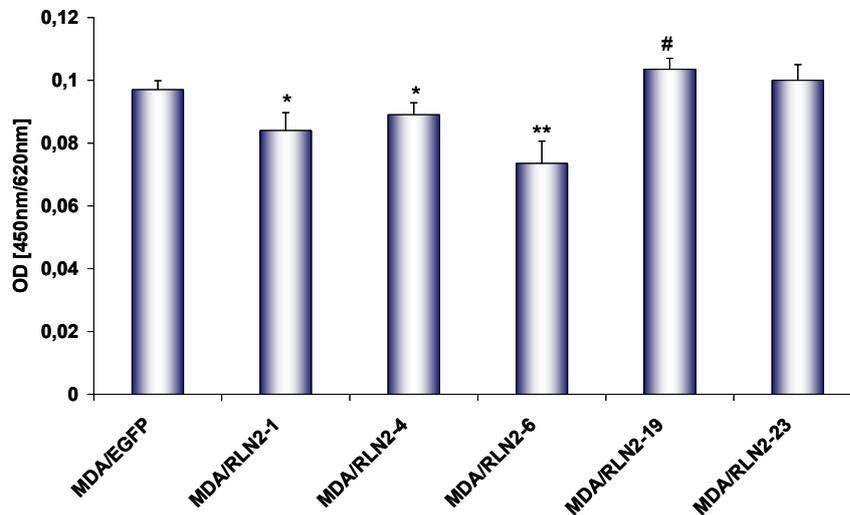


**Abb. 7:** cAMP Assay zur Bestimmung der cAMP Konzentrationen in den MDA-MB-231 Brustkrebszelllinie nach Inkubation mit Zellkulturüberständen (ÜS) der MDA/RLN2 und MDA/EGFP Transfektanten sowie mit 100 ng/ml rekombinantem Relaxin (rhRLN2), \* $p \leq 0,05$ .

### 3.2.5 Einfluss von Relaxin 2 auf den Energiehaushalt und Proliferation humaner Brustkrebszelllinien.

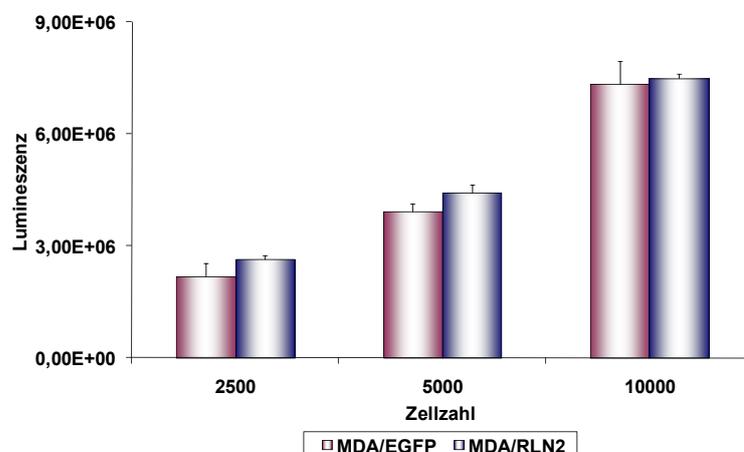
Der Einfluss von Relaxin 2 auf die Proliferation und Lebensfähigkeit der RLN2 exprimierenden Transfektanten der MDA-MB-231 Brustkrebszelllinie wurde mit einem MTT Assay bestimmt. Die mitochondriale Aktivität der MDA/RLN2 Transfektanten im Vergleich zur Vektorkontrolle MDA/EGFP wurde durch die NADH abhängige Bildung

des Formazansalzes ermittelt. Dabei konnte festgestellt werden, dass RLN2 keinen proliferationsfördernden Effekt auf MDA-MB-231 Zellen hat. In 3 von 5 MDA/RLN2 Transfektanten wurde eine Erniedrigung der mitochondrialen Aktivität durch die Expression von RLN2 induziert (**Abb. 8**).



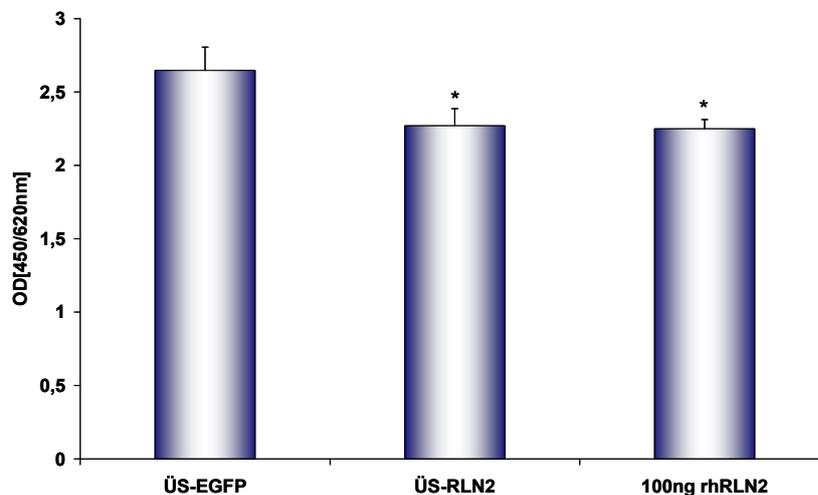
**Abb. 8:** MTT Assay zur Bestimmung der mitochondrialen Aktivität der MDA/RLN2 Transfektanten im Vergleich zu der Vektorkontrolle MDA/EGFP, \*(erniedrigt), # (erhöht)  $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,005$ .

Ein luminometrischer ATP Assay wurde verwendet, um den Einfluss des exprimierten RLN2 auf die metabolische Aktivität der MDA/RLN2 Transfektanten im Vergleich zu der Vektorkontrolle MDA/EGFP zu bestimmen. Es konnten keine deutlichen Unterschiede zwischen den MDA/RLN2 und MDA/EGFP festgestellt werden (**Abb. 9**). Es zeigte sich, dass eine Expression von RLN2 keinen Einfluss auf die ATP Bildung und somit auf die metabolische Aktivität der Zellen besitzt.



**Abb. 9:** ATP Assay zur Bestimmung der metabolischen Aktivität der RLN2 überexprimierenden MDA/RLN2 Transfektanten im Vergleich zur Vektorkontrolle MDA/EGFP.

Zur Untersuchung auf den Einfluss von RLN2 auf die Proliferation der MDA-MB-231 humanen Brustkrebszelllinie wurde ein kolorimetrischer Zell-Proliferations-ELISA (BrdU-Assay) verwendet. In diesem Assay wird während der DNA Synthese proliferierender Zellen das Desoxythymidin-Analogon 5'-Brom-2'-desoxyuridin eingebaut. Die gemessene Absorbanz ist nach Abzug des Leerwertes proportional zur Zahl der proliferierenden Zellen in dem jeweiligen 96-Well. Die Ergebnisse des BrdU Assays zeigten, dass sich bei der MDA-MB-231 Zelllinie nach der Inkubation mit 100 ng/ml rhRLN2 die Proliferation signifikant verringert (**Abb. 10**). Dieselben Resultate konnten nach der Inkubation mit den Zellkulturüberständen der MDA/RLN2 Transfektanten im Vergleich mit den MDA/EGFP Überständen gezeigt werden (**Abb. 10**).



**Abb. 10:** BrdU Assay der MDA-MB-231 Brustkrebszelllinie nach Inkubationen mit 100 ng/ml rhRLN2 und mit Überständen der RLN2 überexprimierenden MDA/RLN2 Transfektante und der Vektorkontrolle MDA/EGFP, \* $p \leq 0,05$ .

In einem durchgeführten BrdU Assay mit den RLN2 überexprimierenden MDA/RLN2 Transfektanten konnte in einer Transfektante (MDA/RLN2-4) eine Erniedrigung und in einer anderen Transfektante (MDA/RLN2-23) hingegen eine Erhöhung der zellulären Proliferation festgestellt werden (**Abb. 11**). Bei den drei restlichen Transfektanten, die untersucht wurden, waren im Vergleich zu der Vektorkontrolle keine signifikanten Unterschiede erkennbar (**Abb. 11**).

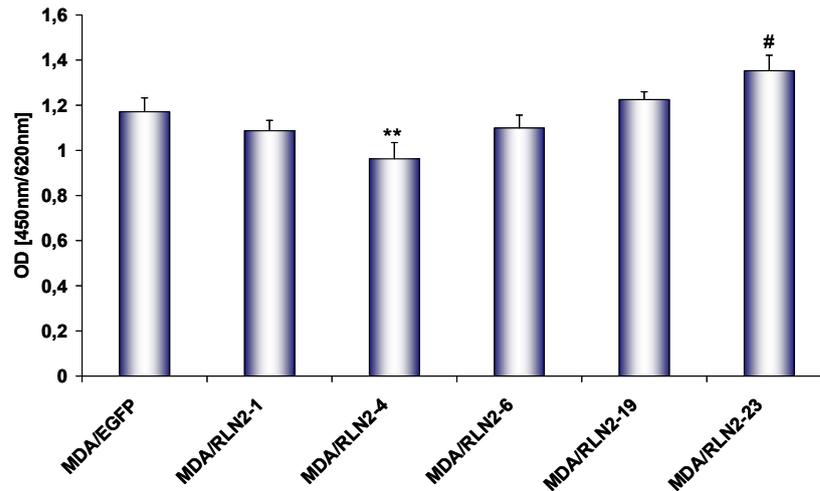
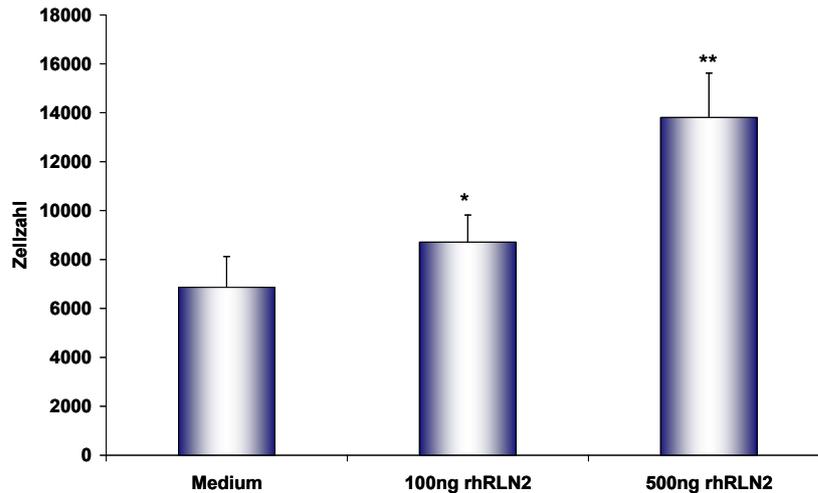


Abb. 11: BrdU-Assay zur Bestimmung der zellulären Proliferation unter dem Einfluss der Überexpression von RLN2 in den MDA/RLN2 Transfektanten im Vergleich zu Vektorkontrolle, \*\* (erniedrigt) =  $p \leq 0,005$ , # (erhöht) =  $p \leq 0,05$ .

### 3.2.6 Einfluss von Relaxin 2 auf die Motilität humaner Brustkrebszelllinien

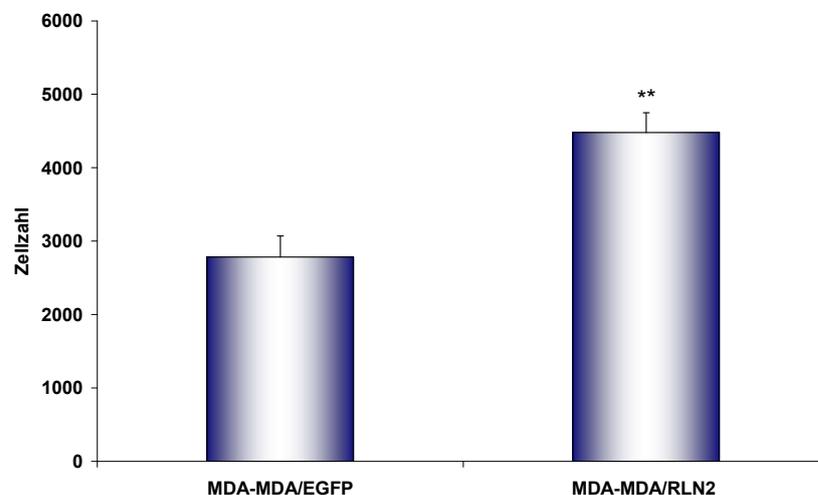
Mit den nachfolgenden Motilitäts-, Migrations- und Softagar-Assays soll der Einfluss von Relaxin 2 auf das Wachstumsverhalten und die Motilität der humanen Brustkrebszelllinie untersucht werden. Mit diesen Untersuchungen lassen sich Schlüsse auf die mögliche Einflussnahme von Relaxin 2 auf das Metastasierungsverhalten der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 schließen.

Für den Motilitäts-Assay wurden Polykarbonat-Filter mit 8  $\mu\text{m}$  großen Poren benutzt. Nach 24-stündiger Kultivierung der MDA-MB-231 unter verschiedenen Bedingungen wurden die durch den Filter migrierten Zellen fixiert, angefärbt und mikroskopisch ausgewertet. Zu Beginn der Untersuchungen wurde das Wachstumsverhalten der humanen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 nach Inkubation mit 100 ng/ml und 500 ng/ml rekombinantem humanem Relaxin 2 untersucht. Dabei zeigte sich, dass Relaxin 2 die Motilität der MDA-MB-231 Brustkrebszellen signifikant erhöht (**Abb. 12**).



**Abb. 12:** Motilitäts-Assay der MDA-MB-231 Zelllinie nach Inkubation mit 100 ng/ml und 500 ng/ml rekombinantem Relaxin 2 nach 24 Stunden, \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,005$ .

Der gleiche Effekt wurde deutlich, als die MDA-MB-231 Brustkrebszelllinie mit den Überständen der RLN2 überexprimierenden MDA/RLN2 Transfektanten und der Vektorkontrolle inkubiert wurde. Es zeigte sich, dass das bioaktive sekretierte RLN2 der MDA/RLN2 Transfektante auf parakrinem Wege im Vergleich zur Vektorkontrolle effektiv die Motilität der MDA-MB-231 Zellen erhöht (**Abb. 13**).



**Abb. 13:** Motilitäts-Assay der MDA-MB-231 Zellen nach Inkubation mit den Zellkulturüberständen der RLN2 überexprimierenden MDA/RLN2 Transfektanten im Vergleich zur Vektorkontrolle MDA/EGFP, \*\* $p \leq 0,005$ .

Nach einer Langzeitinkubation der MDA-MB-231 Brustkrebszelllinie von 8 Tagen mit 500 ng/ml rhRLN2 konnte jedoch gezeigt werden, dass sich die Motilität der MDA-MB-231 Zellen nicht mehr durch Relaxin 2 erhöhen ließ (**Abb. 14**).

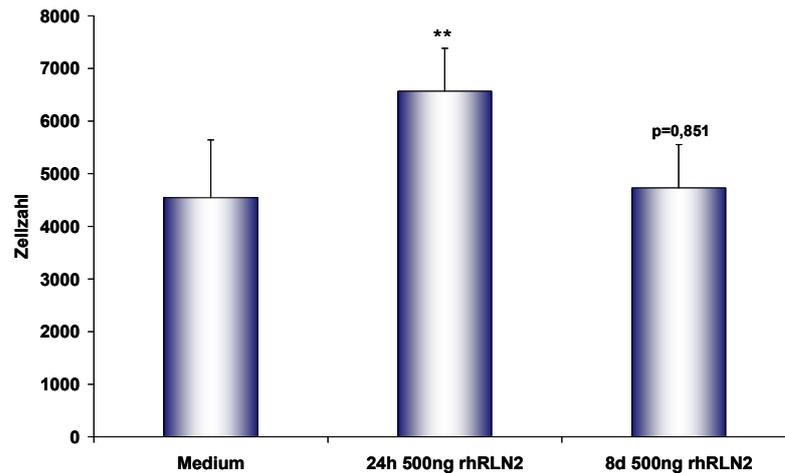


Abb. 14: Motilitäts-Assay der MDA-MB-231 Zellen nach 24 h und nach einer Langzeitinkubation von 8 Tagen mit 500 ng/ml rekombinatem humanem Relaxin 2, \*\* $p \leq 0,005$ .

Bei den Untersuchungen der MDA/RLN2 Transfektanten im Vergleich zu der Vektorkontrolle MDA/EGFP ließ sich in 4 von 5 MDA/RLN2 Transfektanten eine signifikante Erniedrigung der Motilität erkennen (**Abb. 15**).

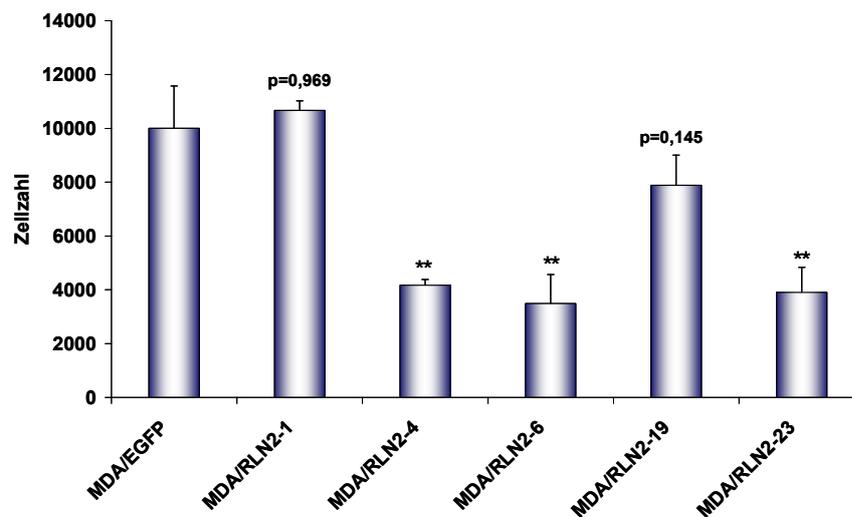


Abb. 15: Motilitäts-Assay der RLN2 exprimierenden Transfektanten im Vergleich zur Vektorkontrolle MDA/EGFP, \*\* $p \leq 0,005$ .

### 3.2.7 Einfluss von Relaxin 2 auf die Migration humaner Brustkrebszelllinien

Bei diesem Migrations-Assay wurden wie bereits bei den Motilitäts-Assays zuvor Polykarbonat-Filter mit 8  $\mu\text{m}$  großen Poren verwendet. Diese wurden vor der Durchführung jedoch mit Laminin, Gelatine, Kollagen A und Elastin beschichtet. Anschließend wurde getestet, wie gut die RLN2 überexprimierenden Transfektanten im

Vergleich zur Vektorkontrolle MDA/EGFP innerhalb von 24 h durch die beschichteten Filter migrieren. Nach dieser Zeit wurden die Zellen fixiert, angefärbt und die Zellzahl bestimmt.

Es stellte sich heraus, dass die MDA/RLN2 Transfektanten durch alle untersuchten Bestandteile der extrazellulären Matrix im Vergleich zu den MDA/EGFP Transfektanten eine signifikante Erniedrigung der Migration aufwiesen (**Abb. 16A-B**).

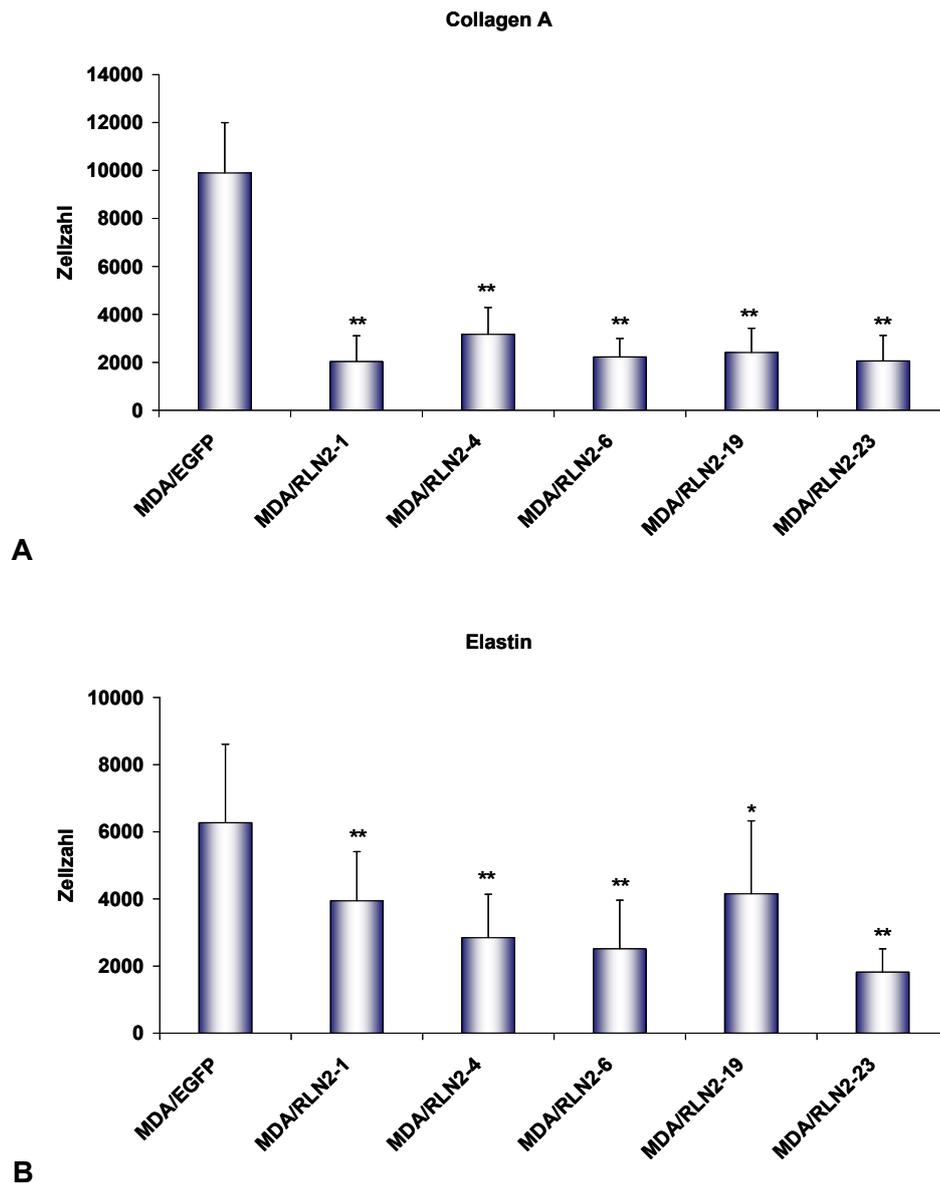
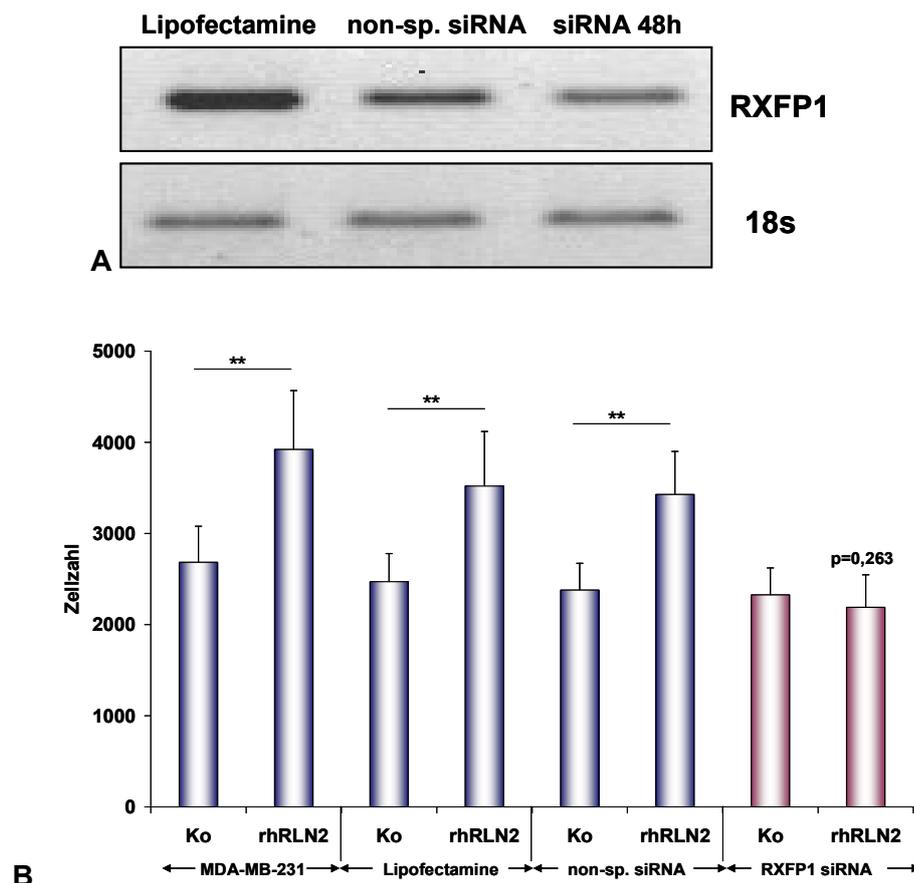


Abb. 16: Migrations-Assay der RLN2 überexprimierenden MDA Transfektanten im Vergleich zur Vektorkontrolle MDA/EGFP auf mit Kollagen A [A] und Elastin [B] beschichteten Polykarbonat-Filtern \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,005$ .

### 3.2.8 RXFP1 vermittelter Einfluss von Relaxin 2 auf die Motilität der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231

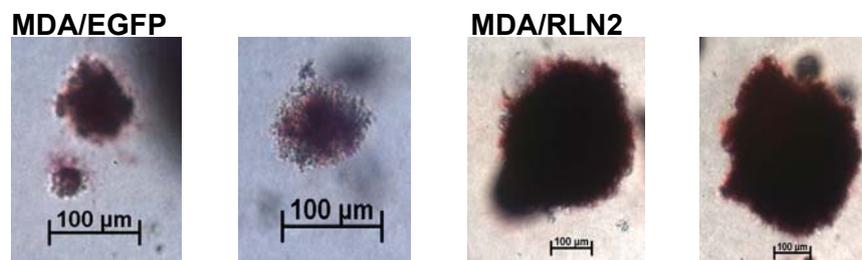
Um sicher zu gehen, dass die unter 3.2.6.1 beschriebenen Ergebnisse tatsächlich durch den Einfluss von Relaxin 2 entstanden sind, wurde der Relaxin 2 Rezeptor RXFP1 ausgeschaltet. Mit Hilfe einer spezifischen siRNA gegen RXFP1 konnte dieser Rezeptor transient in der MDA-MB-231 Brustkrebszelllinie herunterreguliert werden. Von diesen Zellen wurde anschließend ein Motilitätsassay mit 500 ng/ml rekombinatem humanem Relaxin 2 durchgeführt. Eine semiquantitative PCR mit spezifischen RXFP1 Primern zeigte, dass 48 h nach Transfektion eine Reduktion des RXFP1 Rezeptors erreicht wurde (**Abb. 17A**). Die Auswertung des Motilitätsassays mit den transient transfizierten MDA-MB-231 Zellen ließ deutlich erkennen, dass es bei den mit siRNA gegen RXFP1 behandelten Zellen nicht mehr zu einer Erhöhung der Motilität nach Inkubation mit rhRLN2 kam (**Abb. 17B**).



**Abb. 17:** [A] Semiquantitative RT-PCR von RXFP1 der MDA-MB-231 Brustkrebszelllinie nach transienter Transfektion mit 150 nM spezifischer siRNA gegen RXFP1. [B] Motilitätsassay der MDA-MB-231 Zellen mit 500 ng/ml rhRLN2 nach transienter Transfektion mit einer siRNA gegen RXFP1, \*\* $p \leq 0,005$ .

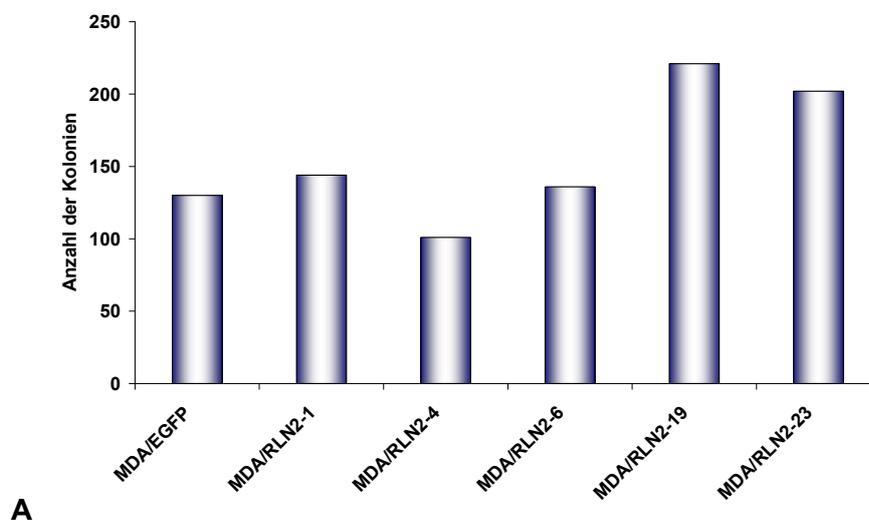
### 3.2.9 Softagar-Assay

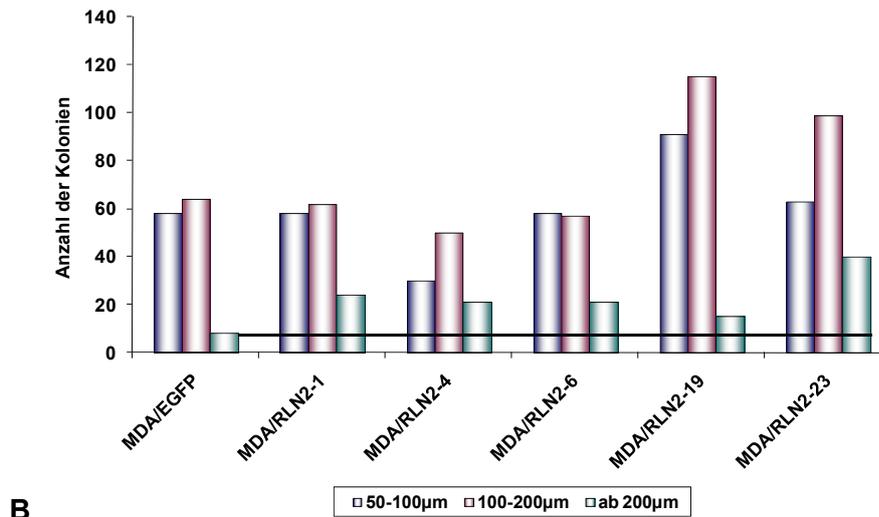
Maligne Zellen besitzen die Fähigkeit, ohne Kontakt zu einem spezifischen Untergrund in einer 3D-Matrix Kolonien zu bilden. Dadurch lassen sich später Schlüsse über den Einfluss von Relaxin 2 auf das Metastasierungsverhalten der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 schließen. Mittels eines solchen Softagar-Assays wurde das Wachstumsverhalten der RLN2 exprimierenden MDA/RLN2 Transfektanten im Vergleich zur Vektorkontrolle MDA/EGFP untersucht. Nach 4 Wochen Kultivierung bei 37°C wurden die gebildeten Kolonien mit Iodotetrazoliumchlorid über Nacht bei 37°C angefärbt. Der Farbstoff wird nur von lebenden Zellen eingebaut und lässt die Kolonien rot erscheinen (**Abb. 18**).



**Abb. 18:** Darstellung einzelner mit Toluidinblau gefärbter Kolonien eines Softagar-Assays der MDA/RLN2 Transfektanten im Vergleich zur Vektorkontrolle MDA/EGFP.

Anschließend wurden die Anzahl sowie die Größe der gefärbten Kolonien bestimmt. Es zeigte sich, dass sich nur bei 2 von 3 Transfektanten die Anzahl der Kolonien erhöht hat (**Abb. 19A**). Besonders fiel auf, dass sich die Anzahl der größeren Kolonien (ab 200 µm) erhöhte (**Abb. 19B**).





**Abb. 19:** Softagar-Assay zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens der MDA/RLN2 Transfektanten im Vergleich zur Vektorkontrolle MDA/EGFP. **A.** Gesamtzahl der Kolonien; **B.** Anzahl der Kolonien in definierten Durchmessern.

### 3.2.10 Einfluss von Relaxin 2 auf das Zytoskelett von humanen Brustkrebszelllinien

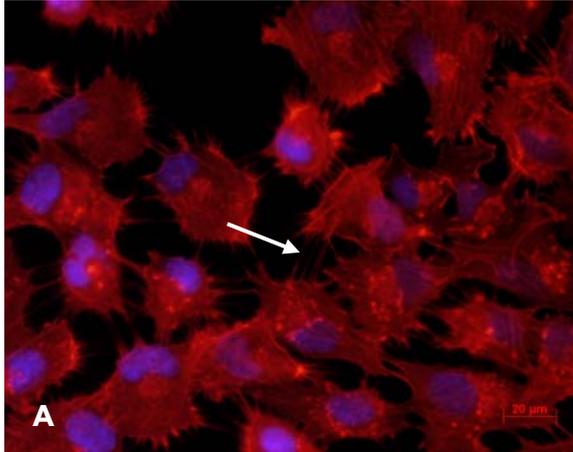
Um besser den möglichen Einfluss von Relaxin 2 auf das Zytoskelett und somit auf die Motilität zeigen zu können, wurden Immunfluoreszenzen von Phalloidin (F-Aktin), alpha Tubulin sowie acetyliertem Tubulin von [a] den RLN2 überexprimierenden MDA/RLN2 Transfektanten im Vergleich zu der Vektorkontrolle sowie [b] von den MDA-MB-231 und MDA/EGFP Zelllinien nach Inkubationen mit 500 ng rhRLN2 für verschiedene Zeitpunkte durchgeführt. Bei der Untersuchung der Aktinfilamente über Phalloidin (F-Aktin) konnten deutliche Veränderungen der Aktin-Strukturen nachgewiesen werden. So war bei den MDA/RLN2 Transfektanten im Vergleich zu der MDA/EGFP Vektorkontrolle eine deutliche Rückbildung der Filopodien (weißer Pfeil) sowie eine starke Ausprägung von Stressfasern (weißer gestrichelter Pfeil) zu erkennen (**Abb. 20 A-B**). Desweiteren ließen sich ähnliche Phänomene nach Inkubationen mit rekombinantem humanem RLN2 für 24 Stunden erkennen. So konnte in den MDA-MB-231 Mutterzellen wie in den RLN2 Transfektanten eine deutlich beginnende Ausbildung von Stressfasern nach Inkubationen mit rhRLN2 gezeigt werden (**Abb. 20 C-D**). Im Gegensatz zu den MDA/RLN2 Transfektanten traten bei den MDA-MB-231 Mutterzellen nach der 24-stündigen Inkubation mit RLN2 aber auch verstärkt Filopodien auf (**Abb. 20 C-D**). Nach der Inkubation der MDA/EGFP Vektorkontrolle mit rekombinantem RLN2 konnten ähnliche Ergebnisse wie bei den MDA-MB-231 Zellen beobachtet werden (Abb. 20 E-F). Auch hier war eine vermehrte Ausbildung der sogenannten Stressfasern nach der Inkubation mit RLN2 zu erkennen (**Abb. 20 E-F**).

Außerdem konnte bei diesen Zellen wie zuvor bei der Mutterzelllinie eine erhöhte Bildung von Filopodien beobachtet werden (**Abb. 20 F**).

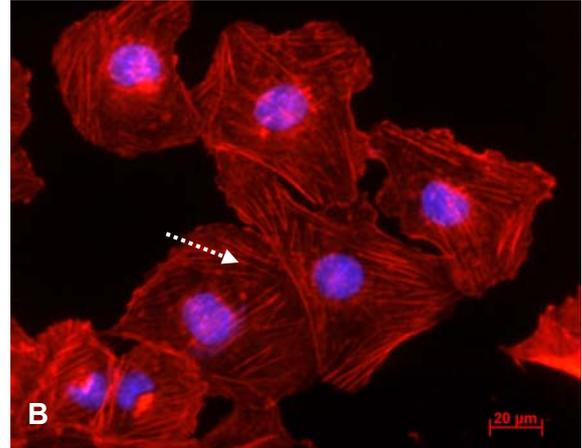
Einen weiteren wichtigen Bestandteil des Zytoskeletts für die zelluläre Motilität stellen die Mikrotubuli dar. Auch hier wurden von den verschiedenen Zelllinien dieser Arbeit Immunfluoreszenzen von alpha Tubulin sowie von acetyliertem Tubulin durchgeführt (**Abb. 21**). So konnten in den RLN2 überexprimierenden Transfektanten MDA/RLN2 im Vergleich zur MDA/EGFP Vektorkontrolle signifikante Lokalisationsveränderungen von alpha Tubulin (**Abb. 21 A,C,E**) aber auch des acetylierten Tubulins (**Abb. 21 B,D,F**) beobachtet werden. Es zeigte sich bei den MDA/EGFP Transfektanten eine diffuse Ausbreitung von alpha Tubulin (**Abb. 21 A**) aber auch von acetyliertem Tubulin (**Abb. 21 B**). Im Gegensatz dazu ließ sich bei den RLN2 überexprimierenden Transfektanten bei alpha Tubulin (**Abb. 21 C,E**) als auch bei acetyliertem Tubulin (**Abb. 21 D,F**) eine deutliche Ansammlung dieser Filamente an einer Seite des Zellkerns beobachten. Diese Veränderungen der Lokalisation und Verdichtung der Tubulin-Filamente konnte ebenfalls bei einer Inkubation der MDA-MB-231 Mutterzellen mit humanem rekombinantem RLN2 erzielt werden (**Abb. 22**). So zeigten sich im Vergleich zur Kontrolle (**Abb. 22 A-B**) nach 24-stündiger Inkubation mit RLN2 bei alpha Tubulin als auch bei acetyliertem Tubulin deutliche Lokalisationsveränderungen dieser Filamente (**Abb. 22 C-D**). Diese konnten nach einer 72 stündigen Inkubation mit RLN2 sogar noch verstärkt werden (**Abb. 22 E-F**).

## Phalloidin

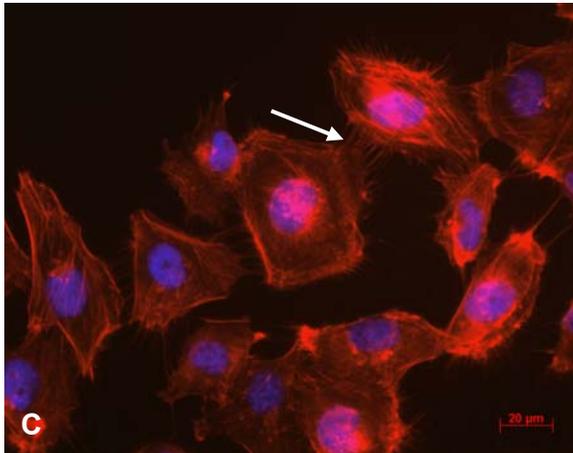
## MDA/EGFP



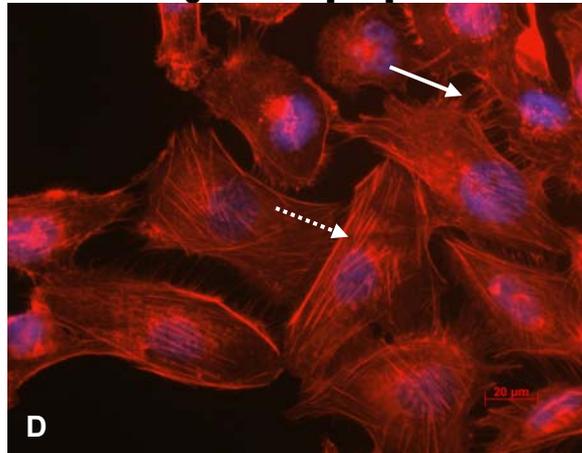
## MDA/RLN2-23



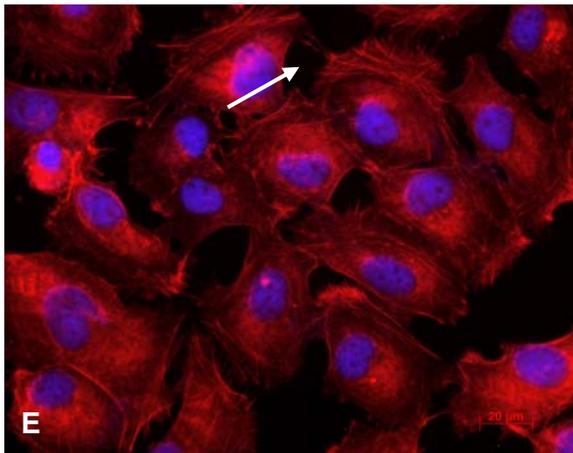
## MDA-MB-231



## MDA + 500 ng rhRLN2 [24h]



## MDA/EGFP



## MDA/EGFP + 500ng rhRLN2 [24h]

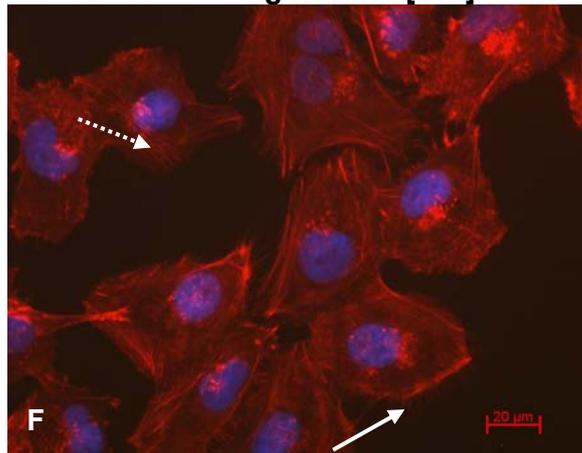
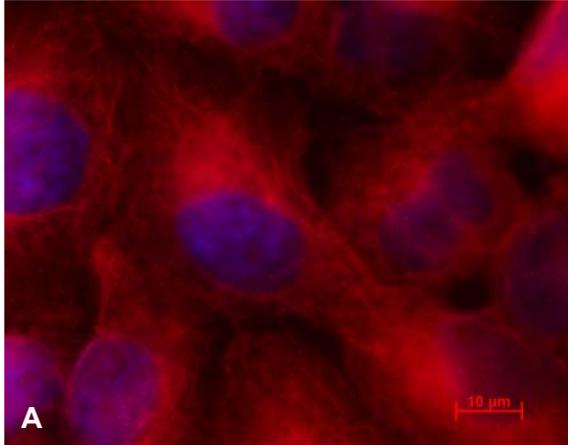


Abb. 20: Immunfluoreszenzen von Phalloidin zur Darstellung von Veränderungen des Zytoskeletts sowie der Ausbildung von Filopodien (weißer Pfeil) und Stressfasern (weißer gestrichelter Pfeil) durch den Einfluss von Relaxin in RLN2 überexprimierenden MDA/RLN2 Transfektanten im Vergleich zur Vektorkontrolle MDA/EGFP (A-B) sowie bei den Zelllinien MDA-MB-231 (C-D) und MDA/EGFP (E-F) nach 24 stündiger Inkubation mit 500 ng rekombinantem RLN2.

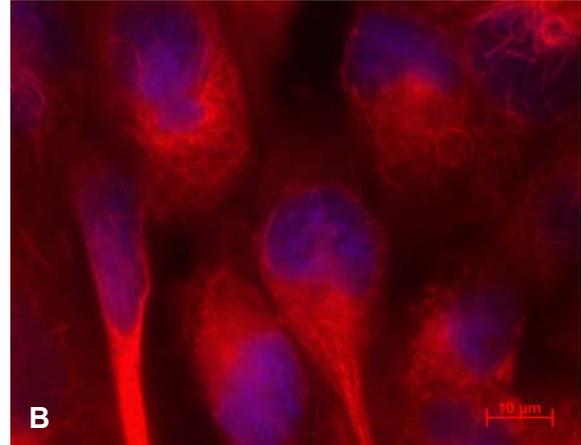
## Alpha Tubulin

## Acetyliertes Tubulin

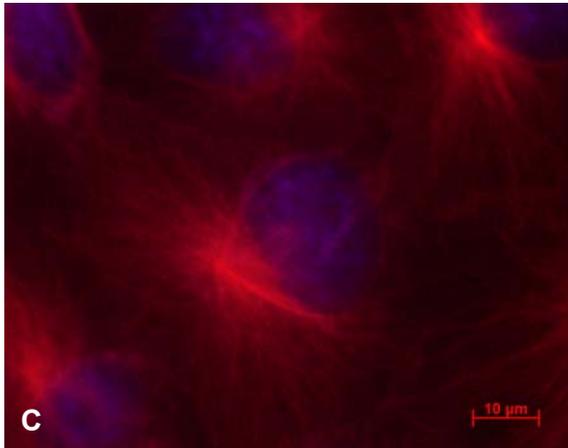
MDA/EGFP



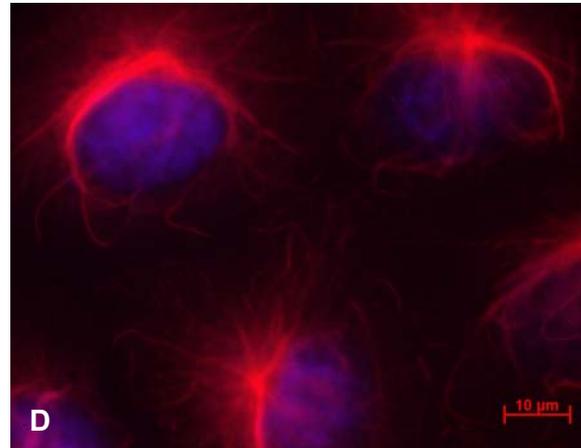
MDA/EGFP



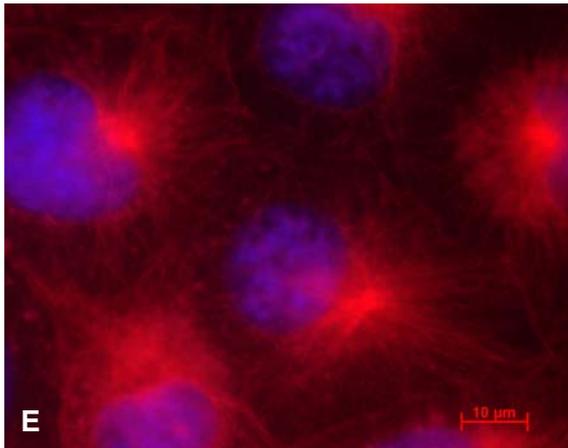
MDA/RLN2-19



MDA/RLN2-19



MDA/RLN2-23



MDA/RLN2-23

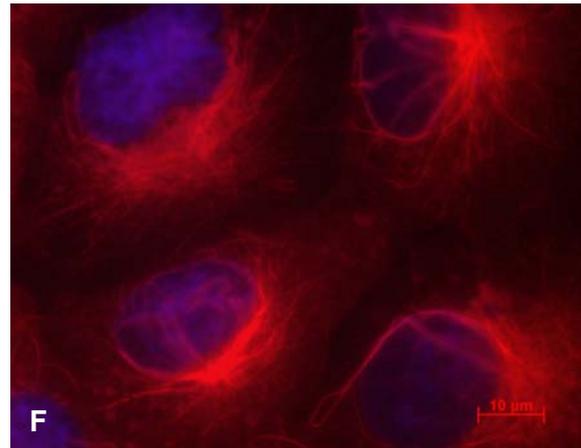
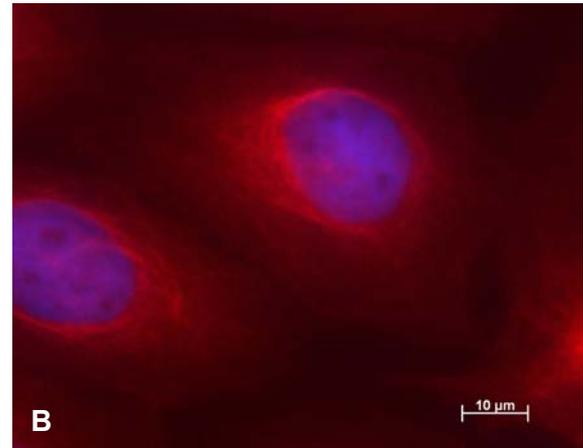
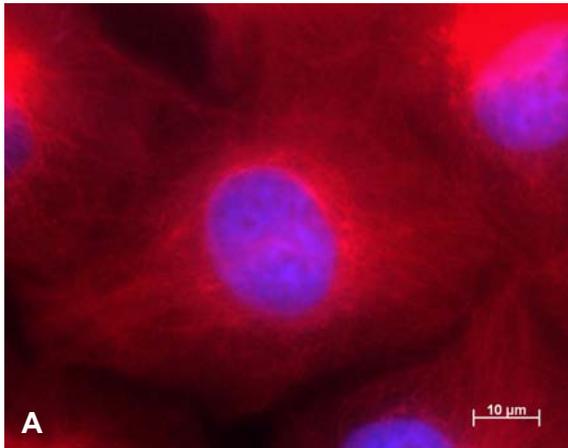
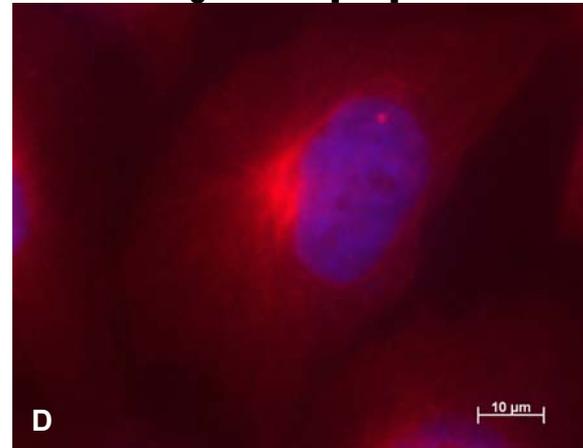
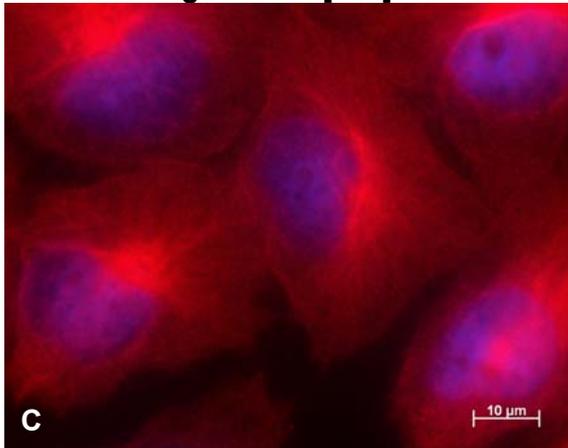
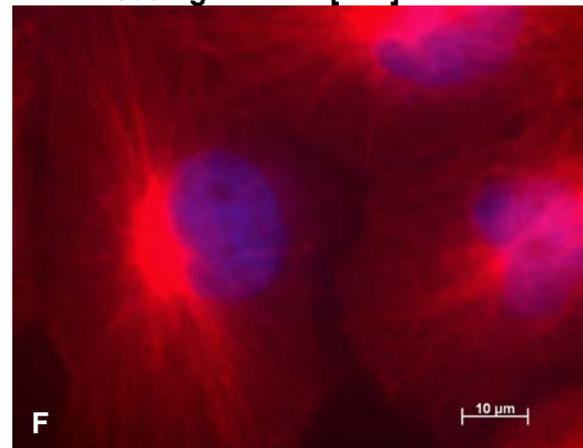
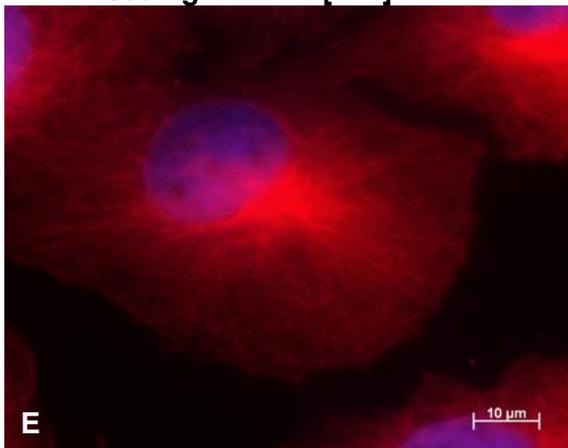


Abb. 21: Immunfluoreszenzen von alpha Tubulin (A,C,E) und acetyliertem Tubulin (B,D,F) bei RLN2 überexprimierenden MDA/RLN2 Transfektanten im Vergleich zu der MDA/EGFP Vektorkontrolle.

**Alpha Tubulin****Acetyliertes Tubulin****MDA-MB-231****MDA-MB-231****MDA + 500 ng rhRLN2 [24h]****MDA + 500 ng rhRLN2 [24h]****MDA + 500 ng rhRLN2 [72h]****MDA + 500 ng rhRLN2 [72h]**

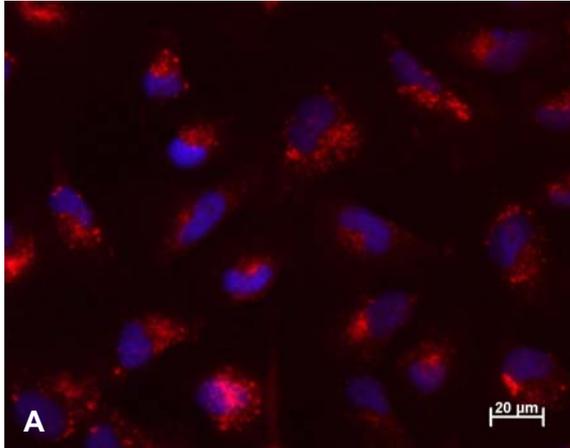
**Abb. 22: Immunfluoreszenzen von alpha Tubulin (A,C,E) und acetyliertem Tubulin (B,D,F) bei den MDA-MB-231 Mutterzellen nach 24 und 72 stündiger Inkubation mit 500 ng humanem rekombinantem Relaxin.**

Ein weiterer Bestandteil der Mikrotubuli ist gamma Tubulin, was an der Keimung neuer Tubulin-Filamente am Zentrosom beteiligt ist. In Fluoreszenzen werden diese als punktförmige Strukturen sichtbar. Im Vergleich zu den MDA/EGFP Vektorkontrollen,

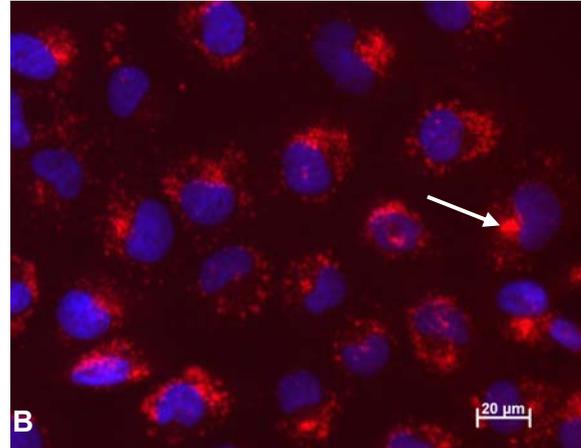
wo gamma Tubulin meist auf einer Seite der Zelle erkennbar war, zeigten sich in den MDA/RLN2 überexprimierenden Transfektanten mehr gamma Tubulin Strukturen, welche um den gesamten Kern angeordnet waren (**Abb. 23 A-D**).

### Gamma Tubulin

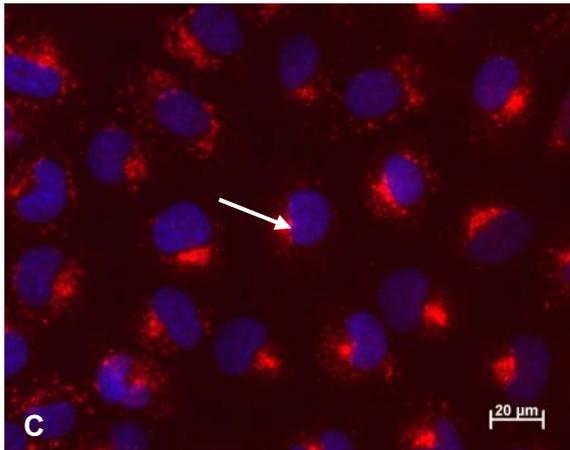
MDA/EGFP



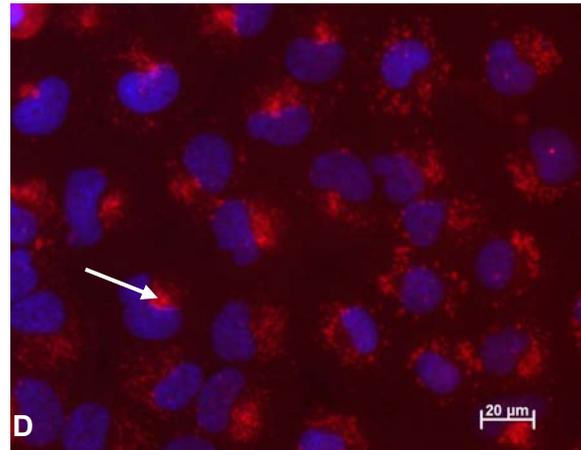
MDA/RLN2-4



MDA/RLN2-19



MDA/RLN2-23



**Abb. 23:** Immunfluoreszenzen von gamma Tubulin bei den RLN2 überexprimierenden MDA/RLN 2 Transfektanten im Vergleich zur Vektorkontrolle MDA/EGFP.

### 3.3 S100A4 eine neues Zielmolekül von Relaxin 2

Um einen genaueren Überblick zu erhalten, welche Gene durch eine Überexpression von Relaxin 2 beeinflusst werden, wurde von den stabilen MDA/RLN2 Transfektanten im Vergleich zur Vektorkontrolle MDA/EGFP ein Microarray durchgeführt. Dieser Array wurde in Kollaboration mit Dr. Dirk Koczan durchgeführt (Institut für Immunologie, Universität Rostock, Medizinische Fakultät, Schillingallee 70, 18055 Rostock). Dabei konnte das Calcium bindende Protein S100A4 (Metastasin) als neues Zielmolekül von Relaxin 2 in den humanen Brustkrebszelllinien identifiziert werden.

### 3.3.1 Expressionsnachweis von S100A4 auf RNA Ebene

Zur Überprüfung der Microarray-Daten wurden RT-PCR Analysen der stabilen MDA/RLN2 Transfektanten im Vergleich zur Vektorkontrolle MDA/EGFP sowie der MDA-MB-231 Mutterzelllinie durchgeführt. Dabei wurden spezifische Oligonukleotidprimer für S100A4 und dessen Rezeptor RAGE (**Tab. 3**) verwendet. Das Vorhandensein von Transkripten für S100A4 und RAGE, einem potentiellen Rezeptor für S100A4, konnte gezeigt werden. Obwohl diese RT-PCR Analysen keine quantitativen Rückschlüsse zulassen, konnte ein Trend zur Verminderung der S100A4 Transkriptmenge in den RLN2 exprimierenden Transfektanten detektiert werden. (**Abb. 24**).

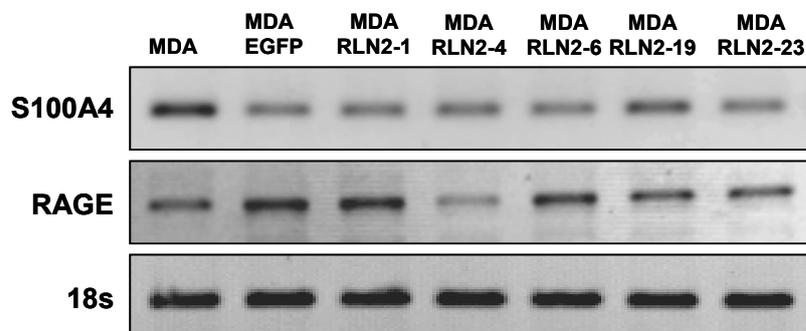


Abb. 24: RT-PCR Analyse von S100A4 und dessen potentiellen Rezeptor RAGE der RLN2 überexprimierenden MDA/RLN2 Transfektanten im Vergleich zu den MDA/EGFP Vektorkontrollen und der MDA-MB-231 Mutterzellen. 18s wurde als interner Standard mitgeführt.

### 3.3.2 Expressionsnachweise von S100A4 auf Protein Ebene

Zu Beginn der Untersuchungen auf Protein Ebene wurde die Expression von S100A4 in verschiedenen humanen Brustkrebszelllinien untersucht. Die Western Blot Analysen der verschiedenen Zelllinien ergaben, dass in den MDA-MB-231 und T-47D Zelllinien der S100A4 Monomer als auch der Dimer exprimiert wird (**Abb. 25**). Hingegen konnte in der MCF-7 Zelllinie keine Expression des S100A4 Monomers detektiert werden (**Abb. 25**).

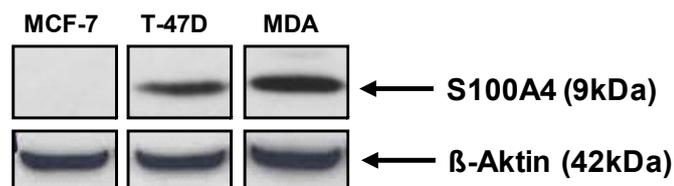
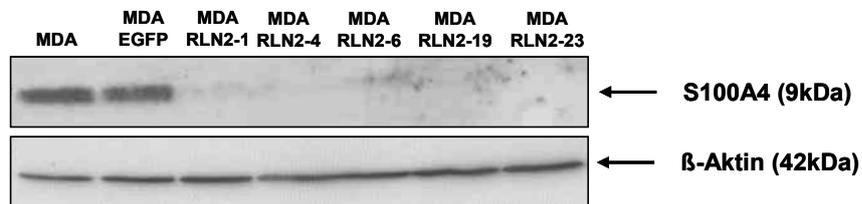


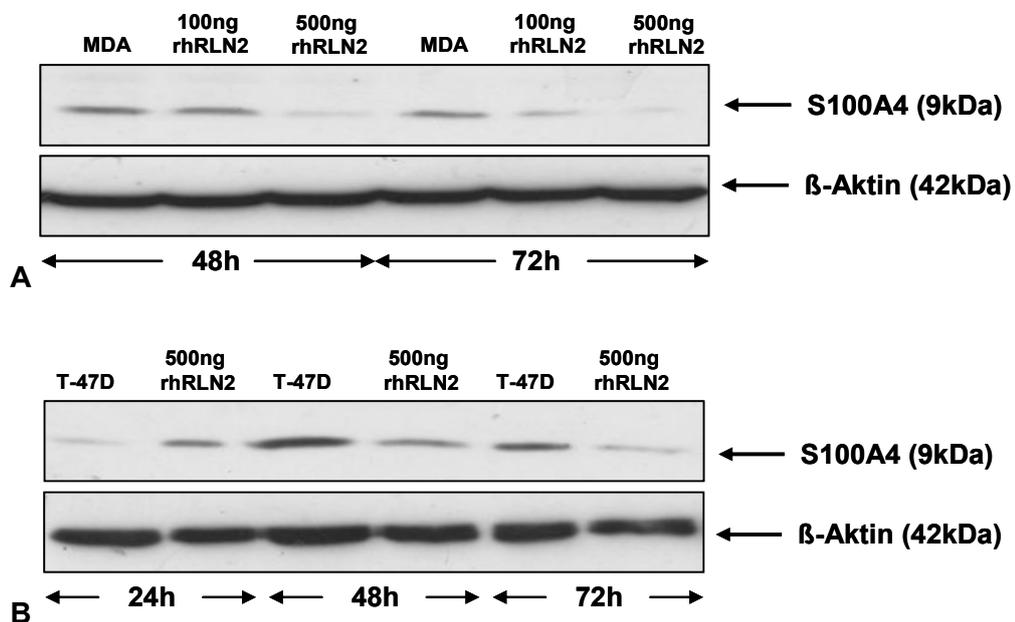
Abb. 25: Western Blot Analysen der S100A4 Expression in verschiedenen humanen Brustkrebszelllinien. Beta Aktin diente als interner Standard.

Zum Nachweis der Expression von S100A4 in den MDA/RLN2 Transfektanten wurden von diesen Zelllinien Western Blot Analysen durchgeführt. Es zeigte sich in den MDA/RLN2 Transfektanten im Vergleich zur Vektorkontrolle MDA/EGFP eine signifikante Reduzierung der S100A4 Proteinexpression (**Abb. 26**).



**Abb. 26:** Western Blot Analysen zeigen die S100A4 Expression in den RLN2 überexprimierenden Transfektanten der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 im Vergleich zu den jeweils dazugehörigen Kontrollen.

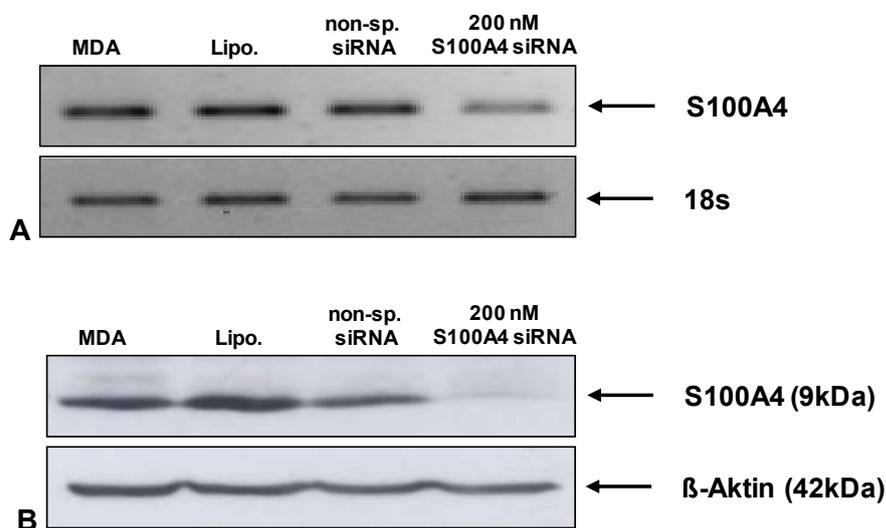
Zur Überprüfung, ob es sich bei den Veränderungen der S100A4 Expression in den RLN2 überexprimierenden Transfektanten der Brustkrebszelllinien um einen direkten Einfluss von Relaxin handelt, wurden diese für verschiedene Zeitpunkte mit rekombinantem humanem RLN2 inkubiert. Western Blot Analysen zur Expression von S100A4 der inkubierten MDA-MB-231 und T-47D Brustkrebszelllinien zeigten wie die MDA/RLN2 Transfektanten eine Erniedrigung der S100A4 Expression (**Abb. 27 A-B**).



**Abb. 27:** Western Blot Analysen der S100A4 Expression nach Inkubationen mit 100 ng/ml oder 500 ng/ml rhRLN2 in den Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 [A] und T-47D [B]. Beta Aktin diene als interner Standard.

### 3.3.3 Einfluss von S100A4 auf die Motilität der humanen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231

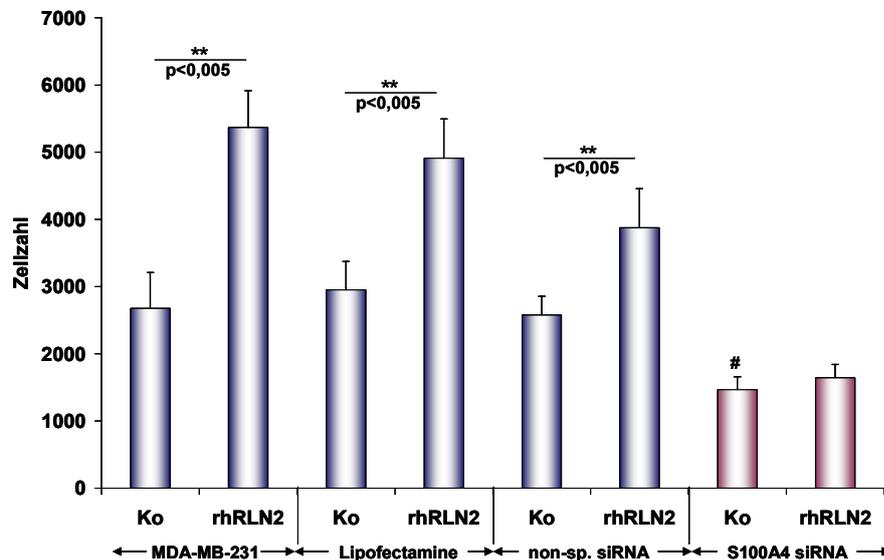
Um den Einfluss von S100A4 auf die Motilität der humanen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 besser untersuchen zu können, wurde die Expression von S100A4 in diesen Zellen mit Hilfe einer spezifischen siRNA gegen S100A4 signifikant reduziert (**Tab. 2**). Dabei wurden die MDA-MB-231 Zellen mit 200 nM siRNA gegen S100A4 transient transfektiert. Als Kontrollen dienten Zellen, welche nur mit Lipofectamine oder mit der gleichen Konzentration einer Negativ Control (non-sp.) siRNA inkubiert wurden. Anschließende PCR (**Abb. 28 A**) und Western Blot (**Abb. 28 B**) Analysen zeigten, dass in den MDA-MB-231 Zellen erfolgreich die Expression von S100A4 mittels siRNA signifikant reduziert wurde.



**Abb. 28:** Semiquantitative RT-PCR [A] und Western Blot [B] Analysen der Expression von S100A4 nach transienter Transfektion mit spezifischer siRNA gegen S100A4 in der humanen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231. 18s und beta Aktin wurde als interne Standards mitgeführt.

Nach erfolgreicher Ausschaltung von S100A4 durch eine spezifische siRNA gegen S100A4 in der humanen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 wurden Motilitäts-Assays durchgeführt. Dabei wurden die Zellen transient mit 200 nM siRNA gegen S100A4 transfiziert. 24 Stunden nach erfolgreicher Transfektion wurde mit den transfizierten Zellen ein Motilitäts-Assay für weitere 24 Stunden durchgeführt. Außerdem wurden die transfizierten MDA-MB-231 während des Motilitäts-Assays zusätzlich mit 500 ng/ml rhRLN2 inkubiert. Dieser wurde dann 48 h nach der Transfektion ausgewertet. Bei der Auswertung der Assays von den MDA-MB-231, welche eine Expression des S100A4 Monomers aufwiesen, war eine signifikante Erniedrigung der Motilität der mit siRNA behandelten Zellen zu erkennen (**Abb. 29**). Außerdem zeigte sich bei den mit rhRLN2

inkubierten Kontrollen wie zuvor in 3.2.6.1 beschrieben eine deutliche Erhöhung der Motilität (**Abb. 29**). Hingegen konnte keine Relaxin-bedingte Erhöhung der Motilität nach Inkubation der Zellen mit siRNA gezeigt werden (**Abb. 29**).



**Abb. 29:** Motilitäts-Assay der humanen Karzinomzelllinien MDA-MB-231 nach Behandlung mit siRNA gegen S100A4 und zusätzlicher Inkubation mit 500 ng/ml rhRLN2 für 24 h. Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen sowie Zellen welche nur mit Lipofectamine oder mit einer unspezifischen siRNA (non-sp.) inkubiert wurden, \*p≤ 0,05, \*\*p≤ 0,005 für Erhöhungen, # p≤ 0,005 für Erniedrigung.

### 3.3.4 RLN2 bedingtes Tumorwachstum in Nacktmäusen

Um den Einfluss von Relaxin 2 auf das Tumorwachstum genauer untersuchen zu können, wurden die RLN2 exprimierenden Transfektanten MDA/RLN2-19 und MDA/RLN2-23 sowie die Vektorkontrolle MDA/EGFP mit einer Zellzahl von  $2 \times 10^7$  pro ml subkutan in die Seiten von Nacktmäusen injiziert. Das Tumorwachstum wurde 2 mal pro Woche kontrolliert sowie dokumentiert (**Abb. 30**). Dabei wurden die Größen der Tumore bestimmt und das Wohlbefinden der Mäuse geprüft.

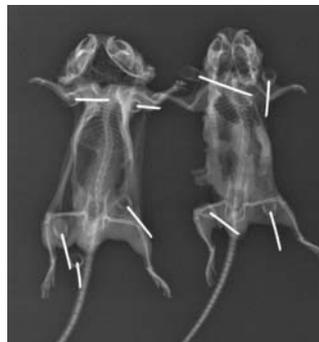
#### MDA/EGFP



**MDA/RLN2-19****MDA/RLN2-23**

**Abb. 30:** Tumorwachstum der RLN2 exprimierenden MDA/RLN2-19 und MDA/RLN2-23 Transfektanten im Vergleich zur Vektorkontrolle MDA/EGFP.

Nach 6 Wochen wurden die Mäuse getötet und die Tumore für spätere RNA und Protein Analysen entnommen, geteilt, in flüssigem Stickstoff oder in Pikrinsäure konserviert. Nicht nur die Tumore, auch andere Organe wie Leber, Lunge oder Gehirn wurden entnommen, auf Metastasen untersucht und konserviert. Es konnten jedoch in allen anderen Organen keine Metastasen identifiziert werden. Zur Untersuchung auf mögliche gebildete Knochenmetastasen wurden von den toten Mäusen Röntgenaufnahmen gemacht. Die Ergebnisse zeigten, dass sich in dieser Zeit keine Metastasen in den Knochen gebildet hatten (**Abb. 31**).

**MDA/EGFP****MDA/RLN2-19****MDA/RLN2-23**

**Abb. 31:** Röntgenaufnahmen der getöteten Nacktmäuse zur Untersuchung auf ausgebildete Knochenmetastasen.

Des Weiteren wurden die erfassten Tumordaten ausgewertet. Dabei wurde zuerst das Tumolvolumen mit Hilfe der Formel zur Berechnung des Volumenes eines Ellipsoiden

( $4/3 \cdot \text{Pie} \cdot a \cdot b \cdot c$ , wobei a, b und c die Halbachsen darstellen) bestimmt. Anhand der ermittelten Tumorgößen ließ sich so das Tumorwachstum der RLN2 exprimierenden Transfektanten MDA/RLN2-19 und MDA/RLN2-23 im Vergleich zur Vektorkontrolle MDA/EGFP grafisch in einem Box Blot Diagramm darstellen. Die Auswertung der Daten zeigte deutlich, dass das Tumorwachstum der RLN2 exprimierenden Transfektanten MDA/RLN2-19 und MDA/RLN2-23 signifikant reduziert wurde im Vergleich zu dem Tumorwachstum der Vektorkontrolle MDA/EGFP (**Abb. 32**).

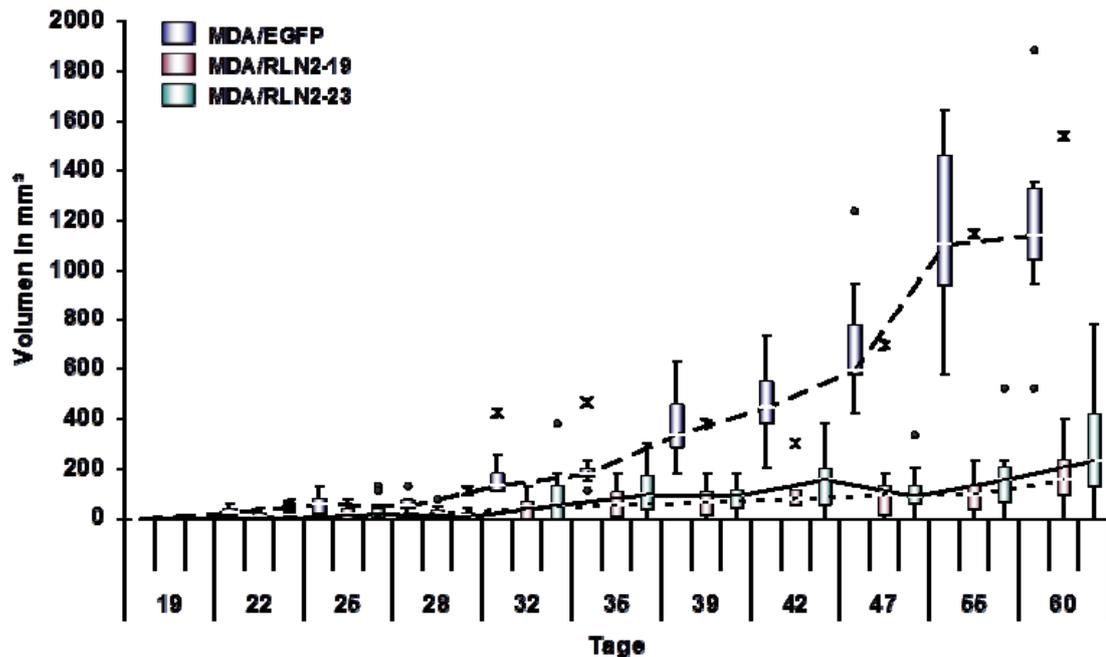


Abb. 32: Tumorwachstum der MDA/RLN2 Tumoren im Vergleich zu den MDA/EGFP Tumoren. Dabei stellen • = Extremwerte und × = Ausreißer dar.

### 3.3.5 RLN2 indizierte morphologische Veränderungen der Maustumore

Nach den Untersuchungen zum Tumorwachstum wurde die Tumormorphologie der RLN2 exprimierenden Tumoren im Vergleich zu den Tumoren der Vektorkontrolle untersucht. Dabei wurden die in Paraffin eingebetteten Tumorgewebe geschnitten und anschließend eine HE-Färbung angefertigt. Diese zeigte, dass sich in den Tumoren der MDA/RLN2 Transfektanten kleinere Gruppen von Tumorzellen detektieren ließen, als in den Tumoren der Vektorkontrolle MDA/EGFP (**Abb. 33**).

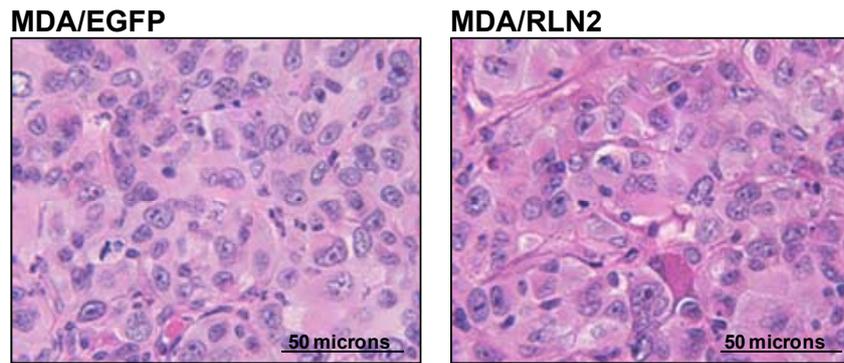


Abb. 33: HE-Färbungen zur Untersuchungen der Morphologie der verschiedenen Tumoren der Transfektanten MDA/EGFP im Vergleich zu den Tumoren der MDA/RLN2 Transfektanten.

### 3.3.6 Expressionsanalysen von RLN2 und S100A4 der Maustumoren

Für die Expressionsuntersuchungen wurden die im Stickstoff gelagerten Tumorgewebe homogenisiert und aus dem Gewebepulver RNA und Proteine gewonnen. Zu Beginn der Untersuchungen wurde eine semiquantitative RT-PCR von humanem RLN2 durchgeführt. Auch hier konnte eine Expression von RLN2 in den Tumoren der MDA/RLN2 Transfektanten (R-T1, R-T2, R-T3) im Vergleich zu Tumoren der MDA/EGFP Vektorkontrolle (E-T1, E-T2, E-T3) festgestellt werden (**Abb. 34 A**). Mausleber diente als Negativkontrolle. In S100A4 Western Blot Analysen zeigte sich, dass wie zuvor in den in-vitro Untersuchungen, die Expression von S100A4 in den Tumoren der MDA/RLN2 Transfektanten ((R-T1, R-T2, R-T3) im Vergleich zu den Tumoren der Vektorkontrolle MDA/EGFP (E-T1, E-T2, E-T3) signifikant erniedrigt war (**Abb. 34 B**).

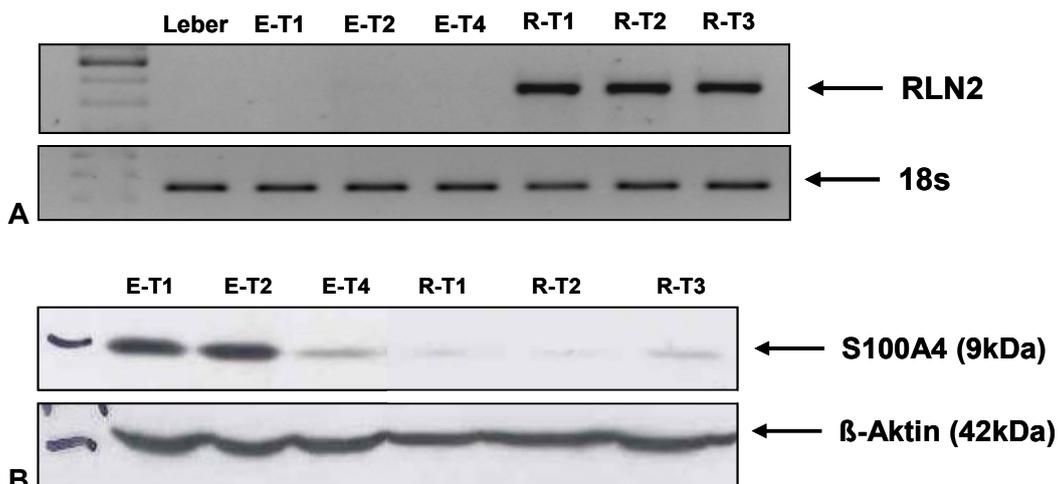


Abb. 34: [A] Durchgeführte semiquantitative RT-PCR für humanes RLN2 in den Tumoren der MDA/RLN2 (R-T1,2,3) Transfektanten im Vergleich zu den Tumoren der Vektorkontrolle MDA/EGFP (E-T1,2,3). [B] Western Blot Analyse der Expression von S100A4 in den Maustumoren der MDA/RLN2 Transfektanten im Vergleich zu MDA/EGFP Transfektanten.

## 4 Diskussion

Um die Östrogen Rezeptor alpha unabhängige Rolle von Relaxin 2 besser in humanen Brustkrebszellen analysieren zu können, wurde in dieser Arbeit ein neues Modellsystem etabliert.

Als Modellsystem diente die humane MDA-MB-231 Brustkrebszelllinie, welche keinen Östrogen-Rezeptor alpha exprimiert und kaum detektierbare Expression von Relaxin 2 aufweist. Nach einer erfolgreichen stabilen Transfektion mit dem eukarioten Expressionsvektor pIRES-EGFP mit einem pre/pro Relaxin 2 Konstrukt, sollten die parakrinen und autokrinen Wirkungsweisen des sezernierten Relaxin 2 der Transfektanten der humanen Brustkrebszelllinie untersucht werden. Es wurden jeweils 5 Relaxin überexprimierende MDA/RLN2 Transfektanten im Vergleich zur Vektorkontrolle und der MDA-MB-231 Mutterzelllinie untersucht. Nach erfolgreicher Transfektion konnte eine deutliche stabile Überexpression von Relaxin 2 auf RNA und Protein Ebene nachgewiesen werden. In allen Transfektanten konnte auf Protein-Ebene eine Expression des 18 kDa großen pro-Relaxin detektiert werden. Pro-Relaxin enthält noch das C-Peptide und ist – genau wie das komplett prozessierte 6kDa große heterodimere Relaxin Peptid - biologisch aktiv [69, 107-108]. Semiquantitative RT-PCR Analysen haben die Expression des Relaxin Rezeptors RXFP1 in den Transfektanten nachgewiesen. Es zeigte sich, dass eine Überexpression von Relaxin 2 auf RNA Ebene keinen Einfluss auf die Expression des spezifischen Relaxin 2 Rezeptors RXFP1 in den MDA-MB-231 Brustkrebszellen besitzt. Eine Sekretion von Relaxin 2 in den MDA/RLN2 Transfektanten konnte im Relaxin-ELISA gezeigt werden. Hier ließ sich die 50 fach höhere Konzentration an sezerniertem Relaxin als in den Vektorkontrollen nachweisen. Um die Bioaktivität des sezernierten Relaxin 2 unserer Transfektanten eindeutig beweisen zu können, nutzen wir einen kommerziell erhältlichen cAMP Assay. Aus Literaturangaben konnten wir bereits entnehmen, dass sich in der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 nach Inkubationen mit Relaxin 2 ein biphasischer Anstieg des cAMP Gehaltes beobachten ließ [52]. Übereinstimmend mit den Literaturangaben konnten wir nach Inkubationen mit gewonnen Überständen der MDA/RLN2 Transfektanten als auch mit rekombinantem Relaxin sowohl in der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 als auch in den für uns interessanten MDA-MB-231 Mutterzellen eine signifikante Erhöhung des intrazellularen cAMP Gehaltes hervorrufen. Einerseits machte diese Erhöhung deutlich, dass das von den MDA/RLN2 Transfektanten sezernierte Relaxin 2 bioaktiv ist. Desweiteren ließen diese Ergebnisse darauf schließen, dass die humane Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 ein funktionales RXFP1 Rezeptor System besitzt. Die Ergebnisse vieler Studien zeigen,

dass die Tumorentwicklung bei Brustkrebs ein Prozess ist, welcher in mehreren Schritten abläuft und viele verschiedene Faktoren wie der Östrogen-Rezeptor-alpha oder das Peptidhormon Relaxin mit seinen pleiotropen Eigenschaften an verschiedenen Signalwege involviert sind [109]. Je mehr über die Entwicklung von Brustkrebs bekannt ist, desto besser können Behandlungsstrategien wie Hormontherapien, Chemotherapien oder Immuntherapien entwickelt und angewandt werden. Durch die verbesserten Methoden der Früherkennung und Therapien lässt sich dann die Überlebensrate der betroffenen Patientinnen begünstigen.

Es stellt sich nun die Frage, wie sieht es bei humanen Brustkrebszelllinien aus, bei denen der Östrogen-Rezeptor alpha nicht vorhanden ist? Reagieren die Zelllinien auf die gleiche Weise auf Inkubationen mit Relaxin 2 wie Östrogen-Rezeptor-alpha positive Brustkrebszelllinien?

#### **4.1 Einfluss von RLN2 auf die Motilität und Invasivität von humanen Brustkrebszelllinien**

Die Ausbreitung von Krebs im menschlichen Organismus durch Motilität, Migration und Invasion wird assoziiert mit Veränderungen der Zellproliferation, intrazellulären Veränderungen sowie Veränderungen der Zelladhäsion, erhöhter Motilität und der Fähigkeit von Krebszellen, in entfernte Regionen einzuwandern [110] und Anschluss an die Vaskularisation zu organisieren [111].

Um einen genaueren Einblick auf die parakrine (Einfluss auf benachbarte Zellen) und autokrine (Einfluss auf die sezernierende Zelle selbst) Wirkungsweise von Relaxin auf diese zellulären Eigenschaften zu erhalten, wurden in dieser Arbeit verschiedene Motilitäts-, Migrations- und Softagar-Assays durchgeführt. Bei Untersuchungen an humanen Schilddrüsenkarzinomzelllinien innerhalb unserer Forschungsgruppe war Relaxin in der Lage, die Motilität dieser Zellen signifikant zu steigern [103]. Die in dieser Arbeit durchgeführten Motilitäts-Assays zeigen übereinstimmend mit der Literatur, dass sich die Motilität der humanen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 durch eine 24-stündige Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen (100 ng/ml und 500 ng/ml) von rekombinantem Relaxin signifikant erhöhen ließ. Die Motilität konnte nicht nur erhöht werden mit rekombinantem Relaxin sondern auch mit Zellkulturüberstand der MDA/RLN2 Transfektanten für 24 Stunden im Vergleich zu den Inkubationen mit Überständen der Vektorkontrollen, obwohl die Konzentration von Relaxin mit einer Menge von 60 bis 80 pg/ml eine Potenz niedriger war als bei den Inkubationen mit rekombinantem Relaxin. Es bleibt anzumerken, dass parakrin höhere RLN2

Konzentrationen vorliegen können als im ELISA gemessen wurde. Ausserdem wurde kürzlich beschrieben, dass in kardialen Fibroblasten der Ratte und in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293 Zellen) durch die Bindung eines aktiven GPCR Signalosoms an den Relaxin Rezeptor RXFP1 bereits niedrige Relaxinkonzentration im sub-picomolaren Bereich zu einer Erhöhung der cAMP Konzentration führte [63]. Erstaunlicherweise brachten die durchgeführten Motilitäts Assays mit den Relaxin exprimierenden Transfektanten ganz andere Resultate zum Vorschein. Entgegen der erwarteten erhöhten Motilität zeigten sich bei vier von fünf getesteten MDA/RLN2 Transfektanten im Vergleich zur Vektorkontrolle MDA/EGFP eine signifikante Erniedrigung der Motilität trotz unveränderter RXFP1 Expression. Wir können derzeit nicht erklären weshalb die stabile Transfektante MDA/RLN2-1 keine Veränderungen der Motilität im Vergleich zur Kontrolle und den anderen Transfektanten aufweist, da wir keine Unterschiede in den sezernierten Relaxin Konzentrationen zwischen den einzelnen Transfektanten ermitteln konnten. Anhand von semiquantitativen RT-PCR Analysen konnte der Nachweis erbracht werden, dass diese Reduktion der Motilität in den MDA/RLN2 Transfektanten nicht mit einer Erniedrigung der Expression des Relaxin Rezeptors RXFP1 verbunden ist [112]. Außerdem wurde in humanen deciduellen Zellen eine Zeit- und Konzentrations-abhängige Erhöhung der RXFP1 Expression beschrieben [113-114]. Durchgeführte siRNA Knock-down Versuche, bei denen transient RXFP1 ausgeschaltet wurde, zeigten, dass es sich bei der positiven Beeinflussung der Motilität der MDA-MB-231 Mutterzellen um eine spezifische Relaxin Antwort handelt, welche über den spezifischen Relaxin Rezeptor RXFP1 vermittelt wird.

Die reduzierte Motilität der MDA/RLN2 Transfektanten stand kontrovers zu den Resultaten der MDA-MB-231 Mutterzellen, welche auf Relaxin mit erhöhter Motilität reagieren. Wie bereits erwähnt spielt bei dem Einfluss von Relaxin auf die Proliferation der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 der Zeitfaktor eine wichtige Rolle [51, 64]. Die Expositionsdauer könnte auch die gegensätzlichen Ergebnisse der Motilität zwischen MDA/RLN2 Transfektanten und den MDA-MB-231 Mutterzellen erklären. Unter dieser Fragestellung wurden die MDA-MB-231 Mutterzellen 7 Tage mit rekombinantem Relaxin inkubiert und anschließend ein 24-stündiger Motilitäts Assay unter Relaxin Inkubation durchgeführt. Die Ergebnisse machten deutlich, dass es nach einer 8-tägigen dauerhaften Inkubation mit Relaxin nicht mehr zu einer Relaxin vermittelten Erhöhung der Motilität der MDA-MB-231 Zellen kommt. Anhand dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass die nachgewiesene Erhöhung der Motilität der MDA-MB-231 Wildtypzellen durch eine 24 stündige Inkubation mit Relaxin ein

temporäres Phänomen darstellt. Eine weitere Erklärung für die zeitliche Abhängigkeit der Zellmotilität von Relaxin könnte auch zurückzuführen sein auf einen eventuellen switch in der Kopplung von G-Proteinen an den Relaxin Rezeptor RXFP1 [56, 61]. Dieser zeitbedingte Effekt von Relaxin könnte nun die gegensätzlichen Ergebnisse zwischen den kurzzeitig inkubierten MDA-MB-231 Mutterzellen und den MDA/RLN2 Transfektanten erklären. Dadurch, dass die MDA/RLN2 Transfektanten permanent Relaxin produzieren, ähnelt ihr Verhalten vergleichsweise eher Zellen in einem Brustkrebskarzinom, wo bereits eine Überexpression von Relaxin nachgewiesen wurde [90-91]. Jedoch besteht auch die Möglichkeit, dass durch die heterogene Tumorpopulation, welche im Mammakarzinom existiert, beide Relaxinwirkungen auf die Motilität der Zellen aktiv sein können.

Einen weiteren wichtigen Aspekt während der Tumorprogression spielt die Migration und Invasion der Tumorzellen. In dieser Arbeit bezieht sich der Begriff „Migration“ auf die in-vitro Invasivität von Tumorzellen durch extrazelluläre Matrix. Literaturangaben zufolge ist bekannt, dass Relaxin in vitro eine Erhöhung der Migration durch die extrazelluläre Matrix in humanen Brustkrebszelllinien [115], in humanen Prostatakarzinomzellen [69], in humanen Schilddrüsenkarzinomzelllinien [103] sowie in humanen endometrialen Karzinomzelllinien [92] induziert, welche durch RXFP1 vermittelt wird [115]. Bei der Durchführung verschiedener Migrations Assays mit einzelnen Bestandteilen der Extrazellulären Matrix wie Kollagen A, Elastin, Gelatine und Laminin zeigte sich, dass eine konstante Produktion von Relaxin einen negativen Einfluss auf die invasiven Fähigkeiten der humanen MDA-MB-231 Brustkrebszelllinie besitzt. Es sollte erwähnt werden, dass wir bewusst auf den Einsatz eines sogenannten Matrigel verzichtet haben, um den Einfluss von verschiedenen Wachstumsfaktoren wie EGF, bFGF, NGF, PDGF, IGF und TGF- $\beta$  sowie einem Gemisch von Komponenten der extrazellulären Matrix wie Laminin, Collagen N und Entactin ausschließen zu können. Die Expression und Sekretion von Metalloproteasen (MMP) mit kollagenolytischer und geltinolytischer Aktivität und deren Inhibitoren (TIMP) spielt für die Migration und Invasion von Zellen eine bedeutende Rolle. Welchen Einfluss eine erhöhte Expression von Relaxin 2 auf die Expression der verschiedenen MMPs und somit auf die Migration und Invasion der hier zu untersuchenden Brustkrebszellen hat, war nicht Teil dieser Arbeit, die sich auf S100A4 als Relaxin Zielmolekül konzentrierte. So zeigte sich bei früheren Experimenten mit verschiedenen Brustkrebszelllinien (MCF-7, SK-BR3) eine Relaxin vermittelte Erhöhung der Sekretion von MMP2, MMP7 und MMP9 sowie einer erhöhten mRNA Expression von MMP2, 9, 13 und 14, was zu einer damit verbundenen Steigerung der Invasivität der Zellen führte

[116]. In Schilddrüsenkarzinomzelllinien, in speziellen Trophoblastenzellen (EVTs) oder in zervikalen Fibroblasten, konnte zusätzlich zu der Erhöhung von verschiedenen MMPs noch eine deutliche Erniedrigung von dessen Inhibitoren (TIMPs) nachgewiesen werden [117, 115, 118]. Im Gegensatz dazu fand sich eine Relaxin-bedingte Herunterregulation des pro-MMP1 Proteins in endometrialen Zellen [119]. Die verminderte Migration der MDA/RLN2 Transfektanten in dieser Studie ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf die verminderte Zell-Motilität zurückzuführen.

Bei der Durchführung eines Softagar Assays sollte die Fähigkeit zur Koloniebildung in einer 3D Agarose Matrix in Abhängigkeit von Relaxin genauer untersucht werden. Softagar Assays werden durchgeführt zur Untersuchung des „anchorage-independent growth“, einer Eigenschaft, die Tumorzellen von nicht-tumorigenen Zellen unterscheidet. Im Falle dieser Studie wurden MDA-MB-231 Tumorzellen verwandt, um das Wachstum von Kolonien von RLN2-exprimierenden Transfektanten im Vergleich zu Leervektortransfektanten zu untersuchen. Unsere Softagar Assays zeigten, dass in 3 von 5 untersuchten MDA/RLN2 Transfektanten keine erhöhte Anzahl von Kolonien auftrat. Insgesamt war jedoch der Prozentsatz von größeren Kolonien mit einer Größe von mehr als 200 µm bei den MDA/RLN2 Transfektanten deutlich höher im Vergleich zu der Vektorkontrolle MDA/EGFP. Dabei haben frühere Untersuchungen unserer Forschungsgruppe an humanen Schilddrüsenkarzinomzellen eine Relaxin-abhängige Erhöhung der Anzahl von kleineren Kolonien gezeigt [103]. Um eine genauere Erklärung zu finden, können bereits proliferative Veränderungen der Zellen ausgeschlossen werden. In den durchgeführten BrdU und MTT Assays zeigten sich keine Proliferations förderenden Eigenschaften von Relaxin in den MDA-MB-231 Mutterzellen. Auch eine erhöhte mitochondriale Aktivität als Basis für ein erhöhtes Überleben der Zellen konnte in den von uns durchgeführten ATP Assays nicht beobachtet werden. Dass Relaxin über anti-apoptotische Fähigkeiten verfügt, konnte bereits in verschiedenen Experimenten gezeigt werden [120-122]. Es ist nicht auszuschließen, dass Relaxin über eine anti-apoptotische Wirkung das Überleben der Zellen im Softagar und das Wachstum größerer Kolonien ermöglicht hat.

Weitere mögliche Anhaltspunkte zur Klärung der Motilitäts-, Migrations- und Softagar Ergebnisse lieferte der durchgeführte mRNA Expressions-Microarray der Transfektanten. Hier wurde die Genexpression der Relaxin-exprimierenden Transfektanten mit der der Leervektor-Transfektante verglichen. Darin konnte eine 4-fach erniedrigte Genexpression von S100A4 unter dem Einfluss von Relaxin ausgemacht werden. Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Arbeit bestand nun darin, die Relaxin abhängige Expression dieses neuen Proteins bezüglich der Motilität,

---

Migration und Invasion genauer zu untersuchen. Das kleine Calcium-bindende Protein S100A4 (Metastasin) ist bekannt, die Invasion von Krebszellen und das Tumorwachstum in vivo zu fördern [123]. Mittels semiquantitativen RT-PCR konnte die Expression von S100A4 nachgewiesen werden. In Western Blot Analysen zeigte sich eine deutlich höhere Expression von S100A4 in den hoch invasiven humanen MDA-MB-231 Zellen im Vergleich zu den weniger invasiven MCF7 und T-47D Brustkrebszellen. Aus früheren Studien ist bekannt, dass S100A4 hoch exprimiert ist in metastasierenden Tumoren sowie in aktivierten und motilen Fibroblasten [124] und einen Marker für epithelial-mesenchymale Transition (EMT) darstellt [124]. In vivo Studien mit S100A4 Transfektanten der Brustkrebszelllinie MCF-7 verdeutlichten, dass S100A4 Transfektanten im Vergleich zum Wildtyp in den Nacktmäusen ein erhöhtes Tumorwachstum mit Invasionen in umgebende Muskelpartien und fetthaltiges Gewebe sowie in regionale Lymphknoten und die Lungen zeigten [125]. Wie lassen sich nun die Ergebnisse der Motilitäts- und Migrations-Assays erklären? Bereits in einer früheren Publikation haben wir berichtet, dass die Expression von S100A4 in den Relaxin exprimierenden MDA/RLN2 Transfektanten auf RNA als auch auf Protein Ebene signifikant runterreguliert wird [126]. Dieses Phänomen lässt sich auch auf den MDA-MB-231 Mutterzellen nach einer mehrtägigen Inkubation mit rekombinantem Relaxin zeigen und deutet erstmals darauf hin, dass S100A4 als ein neues Zielmolekül von Relaxin zu betrachten ist. Dieselbe Relaxin abhängige Runterregulation von S100A4 ließ sich bei den Östrogen Rezeptor alpha positiven T-47D Brustkrebszellen nach 48- und 72- stündiger Inkubation nachweisen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Relaxin vermittelte Erniedrigung von S100A4 unabhängig vom Östrogen Rezeptor alpha Status ist, aber von der Zeitdauer der Exposition abhängt. Untersuchungen der Zellmotilität nach einem Knock-down mittels siRNA gegen S100A4 verdeutlichten, dass eine 24-stündige Inkubation mit Relaxin nicht mehr in der Lage war, die Zellmotilität zu erhöhen. Diese Resultate demonstrieren, dass die Relaxin induzierte Regulation der zellulären Motilität von S100A4 abhängig ist und verdeutlichen die Bedeutung von S100A4 als Relaxinzielgen.

Die Migration ist ein wichtiger Bestandteil verschiedener physiologischer und pathologischer Prozesse inklusive bei der Entwicklung, der Wundheilung, im Immunsystem, der Angiogenese und der Metastasierung. Die Fähigkeit von Tumorzellen zu migrieren, ist ein entscheidendes Merkmal von Invasion und ein wesentlicher Schritt zur Metastasierung [127-128]. Dabei trägt die zelluläre Migration und Metastasierung bei Brustkrebserkrankungen wesentlich zur Patienten Morbidität und Mortalität bei [128]. Die verschiedenen Komponenten des Zytoskeletts

insbesondere die Mikrotubuli, die Intermediärfilamente sowie die Aktinfilamente [129-130] sind integriert in diverse Prozesse der zellulären Signaltransduktion, bei der Modulation der Zellmorphologie und Motilität [110]. Die Reorganisation des Zytoskeletts wird temporär und räumlich durch kleine GTPasen der Rho Familie reguliert [131]. Sie beeinflussen die Reorganisation von Aktin, die fokale Komplex/Adhäsion, die Zellmotilität, die Zellpolarität, den Zellzyklus und die Transkription einzelner Gene [132]. Rho, Rac und Cdc42 sind hochkonservierte Mitglieder der einzelnen Subfamilien und regulieren die zytoskelettale Reorganisation und Genexpression [133-134]. In Brustkrebsgeweben wurde eine Hyperaktivität einiger Rho GTPasen und ihre Signalkomponenten gezeigt und eine Rolle der GTPasen bei der Metastasierung von Brustkrebszellen in vivo beobachtet werden [132]. In Krebszellen sind Aktinfilamente organisiert in Bündeln, welche Lammelopodien, Filopodien, Invadopodien sowie Stressfasern bilden [128-129, 135-136]. Die kleinen aktiven GTPasen Rac und Cdc42 induzieren an den Membranvorderkanten der Zellen fingerähnliche Strukturen (Filopodien) und blattähnliche Strukturen (Lammelopodien) [131]. RhoA reguliert die Formation von Stressfasern und fokale Adhäsionen [137-139]. In Brustkrebsgeweben konnte eine erhöhte Expression von Cdc42 sowie von Rac und Rho nachgewiesen werden [140-142]. Rac 1 ist ein positiver Regulator der Motilität von Brustkrebszellen und korreliert mit einem erhöhten metastasierenden Potential [143-146]. In unseren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass es nach langzeitlicher Expression von Relaxin 2 zu deutlichen Veränderungen der Aktinstrukturen in den MDA/RLN2 Transfektanten kommt. So zeigte sich eine nahezu vollständige Reduktion der Filopodien bzw. eine verstärkte Bildung von Stressfasern. Diese sind zusammengesetzt aus Aktinbündeln mit hohen Zugkräften [147]. Stressfasern unterscheiden sich im Vergleich von motilen und nicht motilen Zellen in ihrer Struktur, Funktion und Polarität [147-148]. Literaturangaben zufolge besteht die Funktion der Stressfasern darin, die Zellstabilisierung und Adhäsion zu verstärken, isometrische Zugkräfte zu erzeugen, welche mechanische Informationen vom Zelläußeren umwandeln, um Änderungen der Zellform zu bewegen bzw. ein remodeling der extrazellulären Matrix durchzuführen. Aufgrund dieser Eigenschaft sind diese Strukturen oft in nicht motilen Zellen zu finden [148-149]. Unsere Beobachtungen zeigten, dass in den MDA-MB-231 Zellen die Relaxin-induzierte Erhöhung der Motilität mit verstärkter Ausbildung von Filopodien einherging. Umgekehrt ließ sich nach Langzeitinkubationen mit rekombinatem Relaxin eine Reduktion der Filopodien nachweisen. Diese Ergebnisse sind erste Indizien, dass Relaxin einen zeitabhängigen Einfluss auf die Expression von aktiven GTPasen und die damit verbundene Ausbildung von Filopodien und Stressfasern besitzt. Laufende

Untersuchungen zum Einfluss von Relaxin auf Rho-GTPasen in unserer Arbeitsgruppe werden zur Klärung dieser Zusammenhänge beitragen. In Myofibroblasten aus der Lunge konnte kürzlich gezeigt werden, dass Relaxin über eine Regulation von RhoA die Kontraktilität vermindert [150]. Untersuchungen in dieser Arbeit konnten nicht nur Veränderungen in Aktin Strukturen beobachten, sondern wiesen auch Veränderungen an der Lokalisation von alpha und acetyliertem Tubulin auf. Es wurde deutlich, dass durch Relaxin 2 die diffuse Anordnung der Mikrotubuli verändert wurde und es zu einer Ansammlung dieser Filamente in der Nähe des Zellkerns kam. Mikrotubuli sind wichtig für die mechanische Fähigkeit, die Stabilität und Bewegung sowie den Transport von Molekülen innerhalb der Zelle [130]. Nicht nur die Dynamik und Organisation der Plus Enden der Mikrotubuli sondern auch die Formation von glytamyliertem Mikrotubuli scheint durch RhoA reguliert zu werden [151]. Literaturangaben zufolge besitzt extrazelluläres S100A4 einen signifikanten Einfluss auf die Expression von verschiedenen GTPasen und somit auf das Migrationsverhalten von Zellen [152]. Erste Untersuchungen unsererseits deuten darauf hin, dass es zu einer Erhöhung der RhoA Expression in den MDA/RLN2 Transfektanten kommt und sich somit die erhöhte Darstellung von den Stressfasern in diesen Zellen erklären ließe. Der Einfluss von Relaxin auf die Expression und Aktivität verschiedener GTPasen wird derzeit untersucht. Der Einblick in die Regulation und Dynamik des Zytoskeletts sowie die Rolle der GTPasen ist essentiell für die Entwicklung neuer Strategien zur Voraussage, Behandlung und möglicherweise Schutz (Prävention) von Krebserkrankungen[130, 132].

## **4.2 Bedeutung von RLN2 für die Proliferation und das Tumorwachstum humaner Brustkrebszelllinien**

### **4.2.1 Proliferation**

In humanen Prostatakarzinomzellen konnte nicht nur eine Erhöhung der Migration, Invasion und Adhäsion nachgewiesen werden, sondern auch eine Relaxin-abhängige Erhöhung der Proliferation [105].

Mittels MTT Assays konnte keine signifikante Wirkungsweise des exprimierten Relaxin 2 auf die mitochondriale Aktivität der MDA/RLN2 Transfektanten im Vergleich zu den Vektorkontrollen nachgewiesen werden. Da dem MTT Assay ein NADPH<sub>2</sub>-abhängiger Substratumsatz zugrunde liegt, kann es sowohl als Proliferations – als auch als Zytotoxizitäts Assay verwendet werden. Die MTT Daten der MDA-MB-231

Transfektanten zeigten, dass die stabile Expression von RLN2 weder proliferationsfördernd noch zytotoxisch wirkte. Relaxin 2 hat demnach keine mitogene Wirkung in MDA-MB-231 humanen Brustkrebszellen. Ähnliche Resultate zeigten sich bei einem durchgeführten ATP Assay. Hier zeigte sich, dass eine erhöhte Expression von Relaxin 2 in den Transfektanten keine Veränderungen der metabolischen Aktivität dieser Zellen im Vergleich zu den Vektorkontrollen MDA/EGFP verursacht. Untersuchungen unserer Forschungsgruppe an humanen Schilddrüsenzelllinien, welche durch eine stabile Transfektion ebenfalls wie die MDA/RLN2 Transfektanten Relaxin vermehrt exprimieren, zeigten einen deutlich positiven und signifikanten Einfluss von Relaxin 2 auf den ATP Umsatz dieser Zellen [103]. Durch die deutlich unterschiedlichen Resultate, sollte von einer möglichen zellspezifischen Wirkungsweise von Relaxin 2 in verschiedenen Krebszelllinien ausgegangen werden. Unterschiedlichen Literaturangaben zufolge fördert Relaxin die Proliferation in verschiedenen Zelllinien und agiert in diesen Zellen als Wachstumsfaktor. So konnte erfolgreich die Proliferation in humanen Prostatakarzinomzelllinien [105], epithelialen und stromalen Zellen des Cervix und der Vagina der Maus [153] oder in humanen Schilddrüsenzelllinien [103] mittels Relaxin erhöht werden. Proliferationsuntersuchungen an der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 verdeutlichten, dass die Wirkungsweise von Relaxin biphasisch ist. So konnte ein mitogener Effekt von Relaxin auf diese Zelllinie bei einer Konzentration im nanomolar Bereich erreicht werden. Bei höheren Relaxin Konzentrationen (mikromolar Bereich) konnten keine Veränderungen bzw. eine Inhibition der Proliferationen provoziert werden [51]. Inwiefern diese biphasische Reaktion mit der kürzlich beschriebenen Aktivierung des RXFP1 im GPCR Signalosom zusammenhängt, ist in diesem Zusammenhang unbekannt [63]. In dem in dieser Arbeit durchgeführten BrdU Assay, bei dem MDA-MB-231 Mutterzellen mit Überständen der MDA/EGFP Zellen als Kontrolle, sowie mit den Überständen der MDA/RLN2 Transfektanten als auch mit 100 ng rekombinantem Relaxin für 24 Stunden inkubiert wurden, konnte eine signifikante Relaxin abhängige Reduktion der Proliferation dieser Zelllinie gezeigt werden. Der mit den MDA/RLN2 Transfektanten durchgeführte BrdU Assay zeigte ebenfalls keine Erhöhung der Proliferation in den meisten getesteten Transfektanten. Deshalb gehen wir davon aus, dass eine langfristige Überexpression von Relaxin keine signifikanten Veränderungen der Proliferation der MDA-MB-231 Transfektanten bewirkt. Dies steht zum Teil in Widerspruch zu den bisher in der Literatur bekannten Wirkungsweisen von Relaxin auf die Proliferation verschiedener humaner Krebszelllinien wie z.B. der MCF-7 [51] oder der Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-133 [103] und weist auf zellspezifische Reaktionen hin. Ein weiterer Aspekt könnte der sogenannte Zeitfaktor

sein. In einer Studie von [64] zeigte sich zum ersten Mal, dass es unterschiedliche zeitabhängige Wirkungsweisen auf die Proliferation der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 gibt. So wurde deutlich, dass Relaxin nach kurzen Inkubationen eine Proliferations-fördernde und nach Langzeitinkubationen Proliferation-hemmende Funktion besitzt. Außerdem ist Relaxin in der Lage, direkt in vivo eine Zelldifferenzierung zu stimulieren. So zeigte sich in Östrogen behandelten Nacktmäusen eine durch Relaxin induzierte Differenzierung der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 in epitheliale sowie myoepitheliale-ähnliche Zellen [154]. Zusammenfassend lassen diese Daten darauf schließen, dass eine Langzeitexpression von Relaxin 2 womöglich eine Zelldifferenzierung sowie anti-invasive Veränderung in humanen Brustkrebszelllinien fördert.

#### **4.2.2 Tumorwachstum**

Nun stellte sich die Frage, ob sich dieses Verhalten auch in vivo widerspiegeln würde. Um dies herauszufinden, wurden in vivo Tumorwachstumsstudien in Nacktmäusen, bei denen subkutan die stabilen MDA/RLN2 Transfektanten im Vergleich zu den MDA/EGFP Vektorkontrollen injiziert wurden, durchgeführt. Wie sich bereits nach den in vitro Ergebnissen angedeutet hat, war das Tumorwachstum der MDA/RLN2 Transfektanten erheblich reduziert, was sich mit einer deutlich verringerten Größe der Tumoren im Vergleich zur Vektorkontrolle bemerkbar machte. Diese Resultate liegen abermals im Kontrast zu den in der Literatur beschriebenen Wirkungsweisen von Relaxin auf das Tumorwachstum. So zeigte sich bei stabilen Relaxin 2 überexprimierenden Transfektanten der humanen Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-133 [155] und bei der humanen Prostatakarzinomzelllinie PC3 [156] ein erhöhtes Relaxin abhängiges Tumorwachstum in vivo. Dieses erhöhte Relaxin abhängige Tumorwachstum ließ sich durch die Ausschaltung von RXFP1 mittels siRNA unterdrücken, was zu einer erniedrigten Tumorgröße, Zellproliferation und Metastasierungsrate führte [105]. Frühere Studien an der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 zeigten eindeutig, dass die Konzentration von Relaxin sowie die Länge der Inkubation eine Differenzierung der Zellen fördern und einen Wachstums-hemmenden Effekt auf diese Zellen nach einer 7-tägigen Inkubation besitzen [64]. So zeigte sich in einer Nacktmausstudie mit der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7, bei denen die Mäuse mit Östrogen behandelt wurden, nach einer systematischen 19-tägigen Applikation von Relaxin eine erhöhte Differenzierung in epitheliale und myoepitheliale Zellen, ohne die Größe der Tumoren zu verändern [154]. Möglicherweise könnte so eine Freigabe von Relaxin über einen längeren Zeitraum die Differenzierung fördern

sowie anti-invasive intrazelluläre Veränderungen verursachen. In unserem Nacktmausmodell konnte in immunhistochemischen Untersuchungen der MDA/RLN2 Tumore eine erhöhte Anzahl von Zellen mit positiver Färbung für *smooth muscle actin* detektiert werden [Daten nicht gezeigt, siehe 112]. Diese Färbungen deuten auf ein erhöhtes Vorhandensein von myoepithelialen Zellen in diesen Tumoren hin. Außerdem wiesen Färbungen mit Picrosirius Rot mehr regelmäßiger verteilte Kollagenfasern in den MDA/RLN2 Tumoren im Vergleich zu den Tumoren der MDA/EGFP Gruppe auf. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die MDA/RLN2 Tumore eine veränderte Differenzierung besitzen [155]. Keine der Xenograft-Tumore inklusive der MDA/EGFP injizierten Mäuse wiesen makroskopisch sichtbare Metastasen auf. Dies lässt sich womöglich mit der zu kurzen Untersuchungszeit (60 Tage) erklären, in der sich noch keine Metastasen gebildet haben. Auch ist die subkutane Applikation von Tumorzellen nicht geeignet, um Metastasierung nachzuweisen.

Untersuchungen der Tumorgewebe bestätigten die Expression von Relaxin in MDA/RLN2 Tumoren. Bei Western Blot Untersuchungen von den MDA/RLN2 Tumorgeweben im Vergleich zu den Tumorgeweben der MDA/EGFP Kontrollen, konnte auch hier eine signifikante Runterregulierung von S100A4 nachgewiesen werden. Diese Relaxin abhängige Erniedrigung von S100A4 könnte für das reduzierte Tumorstadium verantwortlich sein. Eine ebenfalls wichtige Eigenschaft von S100A4 ist die duale Funktionsweise dieses Proteins, nämlich innerhalb als auch außerhalb der Zelle [157]. Es wurde bereits beschrieben, dass extrazelluläres S100A4 die Funktion eines angiogenetischen Faktors aufweist. So konnten diese Eigenschaften in S100A4 transgenen Mäusen [158-159] und in vitro an endothelialen Zellen der Maus [160] sowie an humanen Cerebro-mikrovaskulären endothelialen Zellen getestet werden [161]. Unsere Gruppe hat zu einem späteren Zeitpunkt anhand von in-vitro tubeformation Assays einen pro-angiogenetischen Effekt von RLN2-induziertem extrazellulärem S100A4 auf HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) gezeigt [157]. Dieser ist mitverantwortlich für die Induktion des Xenograft Tumorstadiums von RLN2-sezierenden Schilddrüsenkarzinomzellen. In den von uns untersuchten MDA-MB-231 Xenograft Tumorgeweben fanden sich große nekrotische Bereiche bei den MDA/EGFP als auch bei den MDA/RLN2 Transfektanten [112]. Einige Hinweise deuteten darauf hin, dass bei den MDA/RLN2 Tumoren weniger Blutzellen zu finden waren. Diese Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass die reduzierte Tumorstadiums potentiell ein Ergebnis aus der Kombination der erniedrigten Zellmotilität und Proliferation und einer reduzierten Sekretion des angiogenetischen Faktors S100A4 der Tumorzellen ist. Mittels durchgeführter TUNEL Assays an Gewebeschnitten der

MDA/RLN2 Tumore konnte ausgeschlossen werden, dass es durch Apoptose zu einem vermindertem Tumorwachstum gekommen ist [Daten nicht gezeigt, siehe 112]. Untersuchungen haben gezeigt, dass S100A4 an den Tumorsuppressor p53 bindet und in Kooperation mit dem Wildtyp von p53 Apoptose induzieren kann [162]. Diese Relaxin abhängige Runterregulation des Metastasen fördernden Proteins S100A4 ist von hoher medizinischer Wichtigkeit. In normalem Brustgewebe ist S100A4 nicht nachweisbar. Höhere Expressionen von S100A4 konnten sowohl in frühen als auch in fortgeschrittenen Stadien bei nicht infiltrierenden duktales sowie in lobulären Karzinomen im Vergleich zu infiltrierenden Karzinomen beider Typen der Brust detektiert werden. Bei einem Vergleich zwischen infiltrierenden Tumoren und den Lymphknotenmetastasen konnte jedoch eine höhere S100A4 Expression auf Seite der Metastase detektiert werden [163]. Dieses Phänomen konnte auch in humanen papillären Schilddrüsen-Tumorgeweben (PTC) nachgewiesen werden. So zeigten papilläre Primärtumoren mit bekannten Lymphknotenmetastasen eine deutlich höhere Expression von S100A4 als PTC Gewebe ohne nodale oder entfernte Metastasen [155]. In verschiedenen Untersuchungen wurde deutlich, dass S100A4 Signale einen Focus auf Faktoren haben können, welche assoziiert sind mit Proliferation, Apoptose, Wachstum sowie Differenzierung, Remodelling der Zellmembran und der ECM, der Modulation zytoskelettaler Dynamiken, dem Erwerben von Invasivität und der Induktion von Angiogenese [110, 164-165]. All diese Eigenschaften weisen darauf hin, dass S100A4 eine bedeutende Rolle in der Tumorprogression und Metastasierung spielt. Umso wichtiger sind die von uns erhaltenen Daten. Zurzeit besitzt S100A4 eine prognostische Rolle bei Patienten mit verschiedenen Arten von Krebserkrankungen wie Pankreas [166] aber auch der Brust [167] und der Schilddrüse [168-169]. Außerdem dient S100A4 als Metastasierungsmarker [170] bei Brustkrebspatientinnen [171-172]. Bekannte Regulatoren der S100A4 Expression sind DNA Methylierung des ersten Introns von S100A4 [173], die Aktivierung des ErbB2 Signalweges [174] und eine Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors GATA-4 [175]. Kürzlich wurde eine Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -catenin Signalweges als Induktor der S100A4 Expression in Kolonkarzinomen identifiziert [176-177]. Es bleibt zu klären, welche regulatorischen Mechanismen nach RXFP1 Aktivierung die Expression von S100A4 beeinflussen. In dieser Arbeit wurde S100A4 als neues Zielmolekül von Relaxin in Östrogenrezeptor-negativen humanen Brustkrebszellen identifiziert und damit eine Grundlage geschaffen für weiterführende Untersuchungen zur Regulation des metastasierungsfördernden S100A4.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden Transfektanten der hoch invasiven Östrogen Rezeptor alpha negativen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 etabliert, welche stabil Relaxin-2 überexprimieren. Unsere Untersuchungen zeigten, dass in diesen Zellen eine deutlich erhöhte Expression und Sekretion von bioaktivem Relaxin-2 stattfindet. Anschließend wurden die stabilen MDA/RLN2 Transfektanten auf Relaxin-2 bedingte biologische Veränderungen zellulärer Prozesse untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine Überexpression von Relaxin-2 keine zytotoxische sowie keine proliferationsfördernde Wirkung in den MDA-MB-231 Brustkrebszellen besitzt. Daraufhin wurden intensivere Untersuchungen im Bereich des zellulären Wachstumsverhaltens durchgeführt. Diese Experimente sollten mögliche Einflüsse von Relaxin-2 auf die Motilität, Migration bzw. Invasion in humanen Brustkrebszellen untersuchen. Die verschiedenen Assays wurden unter Berücksichtigung unterschiedlicher Inkubationszeiten durchgeführt um eventuelle zeitabhängige Einflüsse von Relaxin-2 aufzudecken. Es zeigte sich, dass die Wirkung von Relaxin-2 auf die Zellmotilität und Zellmigration der Brustkrebszellen zeitabhängig ist. Nach einer kurzfristigen Inkubation mit Relaxin-2 für 24 Stunden erhöht sich die Motilität der Zellen, hingegen es bei einer langfristigen Inkubation mit Relaxin 2 mit mehr als 3 Tagen es zu einer Hemmung der Motilität der Zellen kommt. In dieser Arbeit wurde auch die Einflussnahme von Relaxin 2 auf die Expression anderer Gene in der humanen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 untersucht. So konnte das Calcium-bindende Protein S100A4 (Metastasin) als ein neues Zielmolekül des RLN2/RXPF1 Signalweges in humanen Brustkrebszellen identifiziert werden. Es zeigte sich bei den Untersuchungen, dass es durch eine langfristige Exposition von RLN2 zu einer transkriptionellen Reduktion von S100A4 kommt. Nicht nur stabil exprimiertes Relaxin, sondern auch exogen einwirkendes Relaxin konnte in den Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 und T-47D die Expression von S100A4 erniedrigen. Diese deutliche Verminderung von S100A4 führt zu einer signifikanten Hemmung der Zellmotilität in den stabilen MDA/RLN2 Transfektanten sowie in den Mutterzellen. Aber auch Einflüsse von Relaxin auf zytoskelettale Bestandteile konnten beobachtet werden. So konnten wir zeigen, dass Relaxin-2 die zelluläre Verteilung von Aktin- und Tubulinfilamenten in humanen Brustkrebszellen verändert und zu einer verstärkten Ausbildung von Stressfasern führt. Nach den abgeschlossenen in-vitro Experimenten wurde das Tumorwachstum der stabilen Relaxin-2 Transfektanten im Nacktmausmodell untersucht. Dabei wurde deutlich, dass die stabilen MDA/RLN2 Transfektanten ein reduziertes Tumorwachstum aufwiesen und ebenfalls reduzierte S100A4 Protein Level

in-vivo besitzen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutlich, dass eine permanente Expression von Relaxin-2 zu einer Inhibition des Tumorwachstums und zu anti-invasiven Fähigkeiten in Östrogen-unabhängigen Brutkrebszellen in-vivo führte. Dies wird zum Teil durch eine Runterregulation von S100A4 vermittelt. In zukünftigen Untersuchungen mit dem Ziel neue therapeutische Angriffspunkte im Zusammenspiel von Relaxin 2, RXFP1 und dessen Interaktion mit S100A4 zu identifizieren, sollte es uns ermöglichen, unser Verständnis zu ergänzen, wie diese klinischen Marker die Motilität, Migration und Invasion verschiedener Krebszellen verändern. Dabei sollte auf transkriptioneller Ebene genauer untersucht werden, wie es zu einer Relaxin-2 bedingten Regulation von S100A4 in Abhängigkeit von RXFP1 kommt. Desweiteren ist es wichtig zu untersuchen in welcher Art und Weise Relaxin-2 die kleinen GTPasen und deren Bindungspartner reguliert und dessen Expression an der Migrationsfront von Tumorzellen beeinflusst. Dieses Verständnis wird klären, ob Relaxin und sein Rezeptor RXFP1 nicht nur als diagnostische und prognostische Marker verwendet werden können sondern auch als Zielmoleküle therapeutische Verwendung in der Zukunft haben werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- 1 Katalinic A, Bartel C (2006) Epidemiologie Mammakarzinom. Institut für Krebsepidemiologie e.V. an der Universität zu Lübeck
- 2 Robert Koch Insitut (2008) Krebs in Deutschland 2003-2004, Häufigkeiten und Trends [http://www.rki.de/DE/Content/Service/Presse/Pressemitteilungen/2008/03\\_2008.html](http://www.rki.de/DE/Content/Service/Presse/Pressemitteilungen/2008/03_2008.html) (letzter Zugriff 15.11.2012)
- 3 Krebs in Deutschland 2003 – 2004 Häufigkeiten und Trends Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 6. überarbeitete Auflage 2008
- 4 Becker N (2001) Entwicklung der Inzidenz und Mortalität an Brustkrebs. Der Radiologe, Springer Berlin / Heidelberg, April Volume 41, Number 4
- 5 Becker N, Seidel D, Stegmaier C und Ziegler H (2008) Entwicklung von Inzidenz (1970–2003) und Mortalität (1952–2003) an Krebs in Deutschland. Der Onkologe Springer Berlin / Heidelberg, März Volume 14, Number 3
- 6 Lemmer A (2009) Epidemiologie des Mammakarzinoms unter Berücksichtigung aktueller Trends der Nutzung von Hormontherapie. Institut für Krebsepidemiologie e.V. der Universität Lübeck
- 7 Backe J (2002) Brustkrebs beim Mann. Deutsches Ärzteblatt/ Jg.99 / Heft 17/ 26. April
- 8 Stratton MR, Rahman N (2008) The emerging landscape of breast cancer susceptibility. Nat Genet.;Jan; 40(1):17-22.
- 9 Gerlind Souza-Offtermatt (2012) Genetische Faktoren erhöhen das Risiko für Brustkrebs <http://www.vitanet.de/krankheiten-symptome/brustkrebs/ursachen-risikofaktoren/genetische-faktoren> (letzer Zugriff: 15.11.2012)
- 10 Deutsches Krebsforschungszentrum, Krebsinformationsdienst (2009) Risikofaktoren für Brustkrebs: Worauf müssen Frauen achten? <http://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/brustkrebs/brustkrebsrisiken-uebersicht.php> (letzter Zugriff: 15.11.2012)
- 11 Jungermann M (2012) Brustkrebsrisiko <http://www.dr-gumpert.de/html/brustkrebsrisiko.html> (letzter Zugriff: 15.11.2012)
- 12 Rutherford T, Brown WD, Sapi E, Aschkenazi S, Muñoz A, Mor G (2000) Absence of estrogen receptor-beta expression in metastatic ovarian cancer. Obstet Gynecol.;Sep; 96(3):417-21.
- 13 Skliris GP, Munot K, Bell SM, Carder PJ, Lane S, Horgan K, Lansdown MR, Parkes AT, Hanby AM, Markham AF, Speirs V (2003) Reduced expression of oestrogen receptor beta in invasive breast cancer and its re-expression using DNA methyl transferase inhibitors in a cell line model. J Pathol.;Oct; 201(2):213-20.
- 14 Deutsche Krebsgesellschaft (2011) Brustkrebs, Mammakarzinom - Ursachen und Risikofaktoren [http://www.krebsgesellschaft.de/pat\\_ka\\_brustkrebs\\_ursache,107712.html](http://www.krebsgesellschaft.de/pat_ka_brustkrebs_ursache,107712.html) (letzter Zugriff: 15.11.2012)
- 15 Gerlind Souza-Offtermatt (2012) Brustkrebs (Mammakarzinom): Hormone als Ursache <http://www.vitanet.de/krankheiten-symptome/brustkrebs/ursachen-risikofaktoren/hormone> (letzer Zugriff: 15.11.2012)
- 16 Hisaw FL (1926) Experimental relaxation of the pubic ligament of guinea pig. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 23, 661-663
- 17 Sherwood OD (1994) Relaxin. The Physiology of Reproduction, Second Edition, edited by E. Knobil and J.d. Neill, Raven Press, Ltd., New York ©
- 18 Bani D (1997a) Relaxin: a pleiotropic hormone. Gen Pharmacol. Jan;28(1):13-22.
- 19 Sherwood OD (2004) Relaxin's physiological roles and other diverse actions. Endocr Rev. Apr;25(2):205-34.

- 20 Le Bouc Y, Dreyer D, Jaeger F, Binoux M, Sondermeyer P (1986) Complete characterization of the human IGF-I nucleotide sequence isolated from a newly constructed adult liver cDNA library. *FEBS Lett.* Feb 3;196(1):108-12.
- 21 Bell GI, Merryweather JP, Sanchez-Pescador R, Stempien MM, Priestley L, Scott J, Rall LB (1984) Sequence of a cDNA clone encoding human preproinsulin-like growth factor II. *Nature.* Aug 30-Sep 5;310(5980):775-7.
- 22 Hudson P, Haley J, John M, Cronk M, Crawford R, Haralambidis J, Tregear G, Shine J, Niall H (1983) Structure of a genomic clone encoding biologically active human relaxin. *Nature.* Feb 17-23;301(5901):628-31.
- 23 Hudson P, John M, Crawford R, Haralambidis J, Scanlon D, Gorman J, Tregear G, Shine J, Niall H (1984) Relaxin gene expression in human ovaries and the predicted structure of a human preprorelaxin by analysis of cDNA clones. *EMBO J.* Oct;3(10):2333-9.
- 24 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 (2002) Human relaxin gene 3 (H3) and the equivalent mouse relaxin (M3) gene. Novel members of the relaxin peptide family. *J Biol Chem.* Jan 11;277(2):1148-57.
- 25 Adham IM, Burkhardt E, Benahmed M, Engel W (1993) Cloning of a cDNA for a novel insulin-like peptide of the testicular Leydig cells. *J Biol Chem.* Dec 15;268(35):26668-72.
- 26 Chassin D, Laurent A, Janneau JL, Berger R, Bellet D (1995) Cloning of a new member of the insulin gene superfamily (INSL4) expressed in human placenta. *Genomics.* Sep 20;29(2):465-70.
- 27 Conklin D, Lofton-Day CE, Haldeman BA, Ching A, Whitmore TE, Lok S, Jaspers S (1999) Identification of INSL5, a new member of the insulin superfamily. *Genomics.* Aug 15;60(1):50-6.
- 28 Lok S, Johnston DS, Conklin D, Lofton-Day CE, Adams RL, Jelmsberg AC, Whitmore TE, Schrader S, Griswold MD, Jaspers SR (2000) Identification of INSL6, a new member of the insulin family that is expressed in the testis of the human and rat. *Biol Reprod.* Jun;62(6):1593-9.
- 29 Büllesbach EE, Schwabe C (2000) The relaxin receptor-binding site geometry suggests a novel gripping mode of interaction. *J Biol Chem.* Nov 10;275(45):35276-80.
- 30 Bryant-Greenwood GD, Schwabe C (1994) Human relaxins: chemistry and biology. *Endocr Rev.* Feb;15(1):5-26.
- 31 Schwabe C, Büllesbach EE (1994) Relaxin: structures, functions, promises, and nonevolution. *FASEB J.* Nov;8(14):1152-60.
- 32 Crawford RJ, Hudson P, Shine J, Niall HD, Eddy RL, Shows TB (1984) Two human relaxin genes are on chromosome 9. *EMBO J.* Oct;3(10):2341-5.
- 33 Hsu SY, Nakabayashi K, Nishi S, Kumagai J, Kudo M, Sherwood OD, Hsueh AJ (2002) Activation of orphan receptors by the hormone relaxin. *Science.* 2002 Jan 25;295(5555):671-4. Comment in: *Science.* Jan 25;295(5555):637-8.
- 34 Ivell R, Einspanier A (2002a) Relaxin peptides are new global players. *Trends Endocrinol Metab.* Oct;13(8):343-8.
- 35 Sudo S, Kumagai J, Nishi S, Layfield S, Ferraro T, Bathgate RA, Hsueh AJ (2003) 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.* Mar 7;278(10):7855-62.
- 36 Bogatcheva NV, Truong A, Feng S, Engel W, Adham IM, Agoulnik AI (2003) GREAT/LGR8 is the only receptor for insulin-like 3 peptide. *Mol Endocrinol.* Dec;17(12):2639-46.
- 37 Halls ML, Bond CP, Sudo S, Kumagai J, Ferraro T, Layfield S, Bathgate RA, Summers RJ (2005) Multiple binding sites revealed by interaction of relaxin family peptides with native and chimeric relaxin family peptide receptors 1 and 2 (LGR7 and LGR8). *J Pharmacol Exp Ther.* May;313(2):677-87.

- 38 Kamat AA, Feng S, Bogatcheva NV, Truong A, Bishop CE, Agoulnik AI (2004) Genetic targeting of relaxin and insulin-like factor 3 receptors in mice. *Endocrinology*. Oct;145(10):4712-20.
- 39 Liu C, Eriste E, Sutton S, Chen J, Roland B, Kuei C, Farmer N, Jörnvall H, Sillard R, Lovenberg TW (2003a) Identification of relaxin-3/INSL7 as an endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPCR135. *J Biol Chem*. Dec 12; 278(50):50754-64.
- 40 Liu C, Chen J, Sutton S, Roland B, Kuei C, Farmer N, Sillard R, Lovenberg TW (2003b) Identification of relaxin-3/INSL7 as a ligand for GPCR142. *J Biol Chem*. Dec 12; 278(50):50765-70.
- 41 Liu C, Kuei C, Sutton S, Chen J, Bonaventure P, Wu J, Nepomuceno D, Kamme F, Tran DT, Zhu J, Wilkinson T, Bathgate R, Eriste E, Sillard R, Lovenberg TW (2005) INSL5 is a high affinity specific agonist for GPCR142 (GPR100). *J Biol Chem*. Jan 7;280(1):292-300.
- 42 Dschietzig T, Bartsch C, Stangl V, Baumann G, Stangl K (2004) Identification of the pregnancy hormone relaxin as glucocorticoid receptor agonist. *FASEB J*. Oct;18(13):1536-8.
- 43 Dschietzig T, Bartsch C, Greinwald M, Baumann G, Stangl K (2005) The pregnancy hormone relaxin binds to and activates the human glucocorticoid receptor. *Ann N Y Acad Sci*. May;1041:256-71.
- 44 Braddon SA (1978) Relaxin-dependent adenosine 6',5'-monophosphate concentration changes in the mouse pubic symphysis. *Endocrinology*. Apr;102(4):1292-9.
- 45 Sanborn BM, Kuo HS, Weisbrodt NW, Sherwood OD (1980) The interaction of relaxin with the rat uterus. I. Effect on cyclic nucleotide levels and spontaneous contractile activity. *Endocrinology*. Apr;106(4):1210-5.
- 46 Hsu CJ, McCormack SM, Sanborn BM (1985) The effect of relaxin on cyclic adenosine 3',5'-monophosphate concentrations in rat myometrial cells in culture. *Endocrinology*. May;116(5):2029-35.
- 47 Toth M, Taskinen P, Ruskoaho H (1996) Relaxin stimulates atrial natriuretic peptide secretion in perfused rat heart. *J Endocrinol*. Sep;150(3):487-95.
- 48 Piedras-Rentería ES, Sherwood OD, Best PM (1997a) Effects of relaxin on rat atrial myocytes. I. Inhibition of I(to) via PKA-dependent phosphorylation. *Am J Physiol*. Apr;272(4 Pt 2):H1791-7.
- 49 Cronin MJ, Malaska T, Bakhit C (1987) Human relaxin increases cyclic AMP levels in cultured anterior pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun*. Nov 13;148(3):1246-51.
- 50 Chen GA, Huang JR, Tseng L (1988) The effect of relaxin on cyclic adenosine 3',5'-monophosphate concentrations in human endometrial glandular epithelial cells. *Biol Reprod*. Oct;39(3):519-25.
- 51 Bigazzi M, Brandi ML, Bani G, Sacchi TB (1992) Relaxin influences the growth of MCF-7 breast cancer cells. Mitogenic and antimitogenic action depends on peptide concentration. *Cancer*. Aug 1;70(3):639-43.
- 52 Nguyen BT, Yang L, Sanborn BM, Dessauer CW (2003) Phosphoinositide 3-kinase activity is required for biphasic stimulation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate by relaxin. *Mol Endocrinol*. Jun;17(6):1075-84. Epub 2003 Feb 20.
- 53 Nguyen BT, Dessauer CW (2005) Relaxin stimulates protein kinase C zeta translocation: requirement for cyclic adenosine 3',5'-monophosphate production. *Mol Endocrinol*. Apr;19(4):1012-23.
- 54 Dessauer CW, Nguyen BT (2005) Relaxin stimulates multiple signaling pathways: activation of cAMP, PI3K, and PKCzeta in THP-1 cells. *Ann N Y Acad Sci*. May;1041:272-9.
- 55 van der Westhuizen ET, Halls ML, Samuel CS (2008) Bathgate RA, Unemori EN, Sutton SW, Summers RJ. Relaxin family peptide receptors--from orphans to therapeutic targets. *Drug Discov Today*. Aug;13(15-16):640-51.

- 
- 56 Halls ML, Bathgate RA, Summers RJ (2006) Relaxin family peptide receptors RXFP1 and RXFP2 modulate cAMP signaling by distinct mechanisms. *Mol Pharmacol.* Jul;70(1):214-26.
- 57 Halls ML, van der Westhuizen ET, Wade JD, Evans BA, Bathgate RA, Summers RJ (2009) Relaxin family peptide receptor (RXFP1) coupling to G(alpha)i3 involves the C-terminal Arg752 and localization within membrane Raft Microdomains. *Mol Pharmacol.* Feb;75(2):415-28.
- 58 Bartsch O, Bartlick B, Ivell R (2001) Relaxin signalling links tyrosine phosphorylation to phosphodiesterase and adenylyl cyclase activity. *Mol Hum Reprod.* Sep;7(9):799-809.
- 59 Bartsch O, Bartlick B, Ivell R (2004) Phosphodiesterase 4 inhibition synergizes with relaxin signaling to promote decidualization of human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* Jan;89(1):324-34.
- 60 Ivell R (2002b) Endocrinology. This hormone has been relaxin' too long! *Science.* Jan 25;295(5555):637-8.
- 61 Ivell R, Anand-Ivell R, Bartsch O (2005) Relaxin signaling from natural receptors. *Ann N Y Acad Sci.* May;1041:280-7.
- 62 Nikolaev VO, Bünemann M, Hein L, Hannawacker A, Lohse MJ (2004) Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem.* Sep 3;279(36):37215-8.
- 63 Halls ML, Cooper DM (2010) Sub-picomolar relaxin signalling by a pre-assembled RXFP1, AKAP79, AC2, beta-arrestin 2, PDE4D3 complex. *EMBO J.* Aug 18;29(16):2772-87.
- 64 Bani Sacchi T, Bani D, Brandi M, Falchetti A, Bigazzi M (1994) Relaxin influences growth, differentiation and cell-cell adhesion of human breast-cancer cells in culture. *Int. J. Cancer* 57, 129-134.
- 65 Bani D, Masini E, Bello MG, Bigazzi M, Sacchi TB (1995a) Relaxin activates the L-arginine-nitric oxide pathway in human breast cancer cells. *Cancer Res.* Nov 15;55(22):5272-5.
- 66 Bani D, Failli P, Bello MG, Thiemermann C, Bani Sacchi T, Bigazzi M, Masini E (1998a) Relaxin activates the L-arginine-nitric oxide pathway in vascular smooth muscle cells in culture. *Hypertension.* Jun;31(6):1240-7.
- 67 Bani D, Baronti R, Vannacci A, Bigazzi M, Sacchi TB, Mannaioni PF, Masini E (2002) Inhibitory effects of relaxin on human basophils activated by stimulation of the Fc epsilon receptor. The role of nitric oxide. *Int Immunopharmacol.* Jul;2(8):1195-204.
- 68 Masini E, Nistri S, Vannacci A, Bani Sacchi T, Novelli A, Bani D (2004) Relaxin inhibits the activation of human neutrophils: involvement of the nitric oxide pathway. *Endocrinology.* Mar;145(3):1106-12.
- 69 Silvertown JD, Summerlee AJ, Klonisch T (2003a) Relaxin-like peptides in cancer. *Int J Cancer.* Nov 20;107(4):513-9.
- 70 Yki-Järvinen H, Wahlström T, Seppälä M (1983) Immunohistochemical demonstration of relaxin in the genital tract of pregnant and nonpregnant women. *J Clin Endocrinol Metab.* Sep;57(3):451-4.
- 71 Kuenzi MJ, Sherwood OD (1995a) Immunohistochemical localization of specific relaxin-binding cells in the cervix, mammary glands, and nipples of pregnant rats. *Endocrinology.* Apr;136(4):1367-73.
- 72 Kohsaka T, Min G, Lukas G, Trupin S, Campbell ET, Sherwood OD (1998) Identification of specific relaxin-binding cells in the human female. *Biol Reprod.* Oct;59(4):991-9.
- 73 Hurley WL, Doane RM, O'Day-Bowman MB, Winn RJ, Mojonier LE, Sherwood OD (1991) Effect of relaxin on mammary development in ovariectomized pregnant gilts. *Endocrinology.* Mar;128(3):1285-90.
- 74 Zaleski HM, Winn RJ, Jennings RL, Sherwood OD (1996) Effects of relaxin on lactational performance in ovariectomized gilts. *Biol Reprod.* Sep;55(3):671-5.
-

- 
- 75 Hwang JJ, Lee AB, Fields PA, Haab LM, Mojonier LE, Sherwood OD (1991) Monoclonal antibodies specific for rat relaxin. V. Passive immunization with monoclonal antibodies throughout the second half of pregnancy disrupts development of the mammary apparatus and, hence, lactational performance in rats. *Endocrinology*. Dec;129(6):3034-42.
- 76 Kass L, Ramos JG, Ortega HH, Montes GS, Bussmann LE, Luque EH, Muñoz de Toro M (2001) Relaxin has a minor role in rat mammary gland growth and differentiation during pregnancy. *Endocrine*. Aug;15(3):263-9.
- 77 Winn RJ, Baker MD, Merle CA, Sherwood OD (1994) Individual and combined effects of relaxin, estrogen, and progesterone in ovariectomized gilts. II. Effects on mammary development. *Endocrinology*. Sep;135(3):1250-5.
- 78 Kuenzi MJ, Sherwood OD (1992) Monoclonal antibodies specific for rat relaxin. VII. Passive immunization with monoclonal antibodies throughout the second half of pregnancy prevents development of normal mammary nipple morphology and function in rats. *Endocrinology*. Oct;131(4):1841-7.
- 79 Zhao L, Roche PJ, Gunnensen JM, Hammond VE, Tregear GW, Wintour EM, Beck F (1999) Mice without a functional relaxin gene are unable to deliver milk to their pups. *Endocrinology*. Jan;140(1):445-53.
- 80 Krajnc-Franken MA, van Disseldorp AJ, Koenders JE, Mosselman S, van Duin M, Gossen JA (2004) Impaired nipple development and parturition in LGR7 knockout mice. *Mol Cell Biol*. Jan;24(2):687-96.
- 81 Kuenzi MJ, Connolly BA, Sherwood OD (1995b) Relaxin acts directly on rat mammary nipples to stimulate their growth. *Endocrinology*. Jul;136(7):2943-7.
- 82 Min G, Sherwood OD (1996) Identification of specific relaxin-binding cells in the cervix, mammary glands, nipples, small intestine, and skin of pregnant pigs. *Biol Reprod*. Dec;55(6):1243-52.
- 83 Summerlee AJ, O'Byrne KT, Poterski RS (1998) Relaxin inhibits the pulsatile release of oxytocin but increases basal concentrations of hormone in lactating rats. *Biol Reprod*. Apr;58(4):977-81.
- 84 Mazoujian G, Bryant-Greenwood GD (1990) Relaxin in breast tissue. *Lancet*. Feb 3;335(8684):298-9.
- 85 Ivell R, Balvers M, Pohnke Y, Telgmann R, Bartsch O, Milde-Langosch K, Bamberger AM, Einspanier A (2003) Immunoexpression of the relaxin receptor LGR7 in breast and uterine tissues of humans and primates. *Reprod Biol Endocrinol*. Nov 24;1:114.
- 86 Stemmermann GN, Mesiona W, Greenwood FC, Bryant-Greenwood GD (1994) Immunocytochemical identification of a relaxin-like protein in gastrointestinal epithelium and carcinoma: a preliminary report. *J Endocrinol*. Feb;140(2):321-5.
- 87 Alfonso P, Núñez A, Madoz-Gurpide J, Lombardia L, Sánchez L, Casal JI (2005) Proteomic expression analysis of colorectal cancer by two-dimensional differential gel electrophoresis. *Proteomics*. Jul;5(10):2602-11.
- 88 Gunnensen JM, Roche PJ, Tregear GW, Crawford RJ (1995) Characterization of human relaxin gene regulation in the relaxin-expressing human prostate adenocarcinoma cell line LNCaP.FGC. *J Mol Endocrinol*. Oct;15(2):153-66.
- 89 Klonisch T, Mustafa T, Bialek J, Radestock Y, Holzhausen HJ, Dralle H, Hoang-Vu C, Hombach-Klonisch S (2005) Human medullary thyroid carcinoma: a source and potential target for relaxin-like hormones. *Ann N Y Acad Sci*. May;1041:449-61.
- 90 Tashima LS, Mazoujian G, Bryant-Greenwood GD (1994) Human relaxins in normal, benign and neoplastic breast tissue. *J Mol Endocrinol*. Jun;12(3):351-64.
- 91 Binder C, Simon A, Binder L, Hagemann T, Schulz M, Emons G, Trümper L, Einspanier A (2004) Elevated concentrations of serum relaxin are associated with metastatic disease in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. Sep;87(2):157-66.
-

- 
- 92 Kamat AA, Feng S, AgoulNIK IU, Kheradmand F, Bogatcheva NV, Coffey D, Sood AK, AgoulNIK AI (2006) The role of relaxin in endometrial cancer. *Cancer Biol Ther.* Jan;5(1):71-7.
- 93 Kietz S, Feng S, AgoulNIK A, Hombach-Klonisch S (2009) Estrogen and TCDD influence RLN2 gene activity in estrogen receptor-positive human breast cancer cells. *Ann N Y Acad Sci.* Apr;1160:367-73.
- 94 Bani D (1997c) Relaxin and breast cancer. *Bull Cancer.* Feb;84(2):179-82.
- 95 Rivoltini L, Carrabba M, Huber V, Castelli C, Novellino L, Dalerba P, Mortarini R, Arancia G, Anichini A, Fais S, Parmiani G (2002) Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocyte-tumor cell interaction. *Immunol Rev.* Oct;188:97-113.
- 96 Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG (1999) Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol.*;43 Suppl:S42-51.
- 97 Stetler-Stevenson WG (1999) Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest.* May;103(9):1237-41.
- 98 Duffy MJ, Maguire TM, Hill A, McDermott E, O'Higgins N (2000) Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res.*;2(4):252-7. Epub 2000 Jun 7.
- 99 Nabeshima K, Inoue T, Shimao Y, Sameshima T (2002) Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol Int.* Apr;52(4):255-64.
- 100 Bialek J, Kunanuvat U, Hombach-Klonisch S, Spens A, Stetefeld J, Sunley K, Lippert D, Wilkins JA, Hoang-Vu C, Klonisch T (2011) Relaxin enhances the collagenolytic activity and in vitro invasiveness by upregulating matrix metalloproteinases in human thyroid carcinoma cells. *Mol Cancer Res.* Jun;9(6):673-87. Epub 2011 Apr 14.
- 101 Silvertown JD, Geddes BJ, Summerlee AJ (2003b) Adenovirus-mediated expression of human prorelaxin promotes the invasive potential of canine mammary cancer cells. *Endocrinology.* Aug;144(8):3683-91.
- 102 Silvertown JD, Ng J, Sato T, Summerlee AJ, Medin JA (2006) H2 relaxin overexpression increases in vivo prostate xenograft tumor growth and angiogenesis. *Int J Cancer.* Jan 1;118(1):62-73.
- 103 Hombach-Klonisch S, Bialek J, Trojanowicz B, Weber E, Holzhausen HJ, Silvertown JD, Summerlee AJ, Dralle H, Hoang-Vu C, Klonisch T (2006) Relaxin enhances the oncogenic potential of human thyroid carcinoma cells. *Am J Pathol.* Aug;169(2):617-32.
- 104 Lamp O, Honscha KU, Jakob J, Lamp J, Schweizer S, Reischauer A, Gottschalk J, Hahn A, Ebert M, Rothemund S, Blaschzik S, Einspanier A (2009) Investigation of the local expression of the relaxin system in canine mammary tumours. *Reprod Domest Anim.* Jul;44 Suppl 2:224-9.
- 105 Feng S, AgoulNIK IU, Li Z, Han HD, Lopez-Berestein G, Sood A, Ittmann MM, AgoulNIK AI (2009) Relaxin/RXFP1 signaling in prostate cancer progression. *Ann N Y Acad Sci.* Apr;1160:379-80.
- 106 Feng S, AgoulNIK IU, Truong A, Li Z, Creighton CJ, Kaftanovskaya EM, Pereira R, Han HD, Lopez-Berestein G, Klonisch T, Ittmann MM, Sood AK, AgoulNIK AI (2010) Suppression of relaxin receptor RXFP1 decreases prostate cancer growth and metastasis. *Endocr Relat Cancer.* Oct 29;17(4):1021-33. Print 2010 Dec.
- 107 Reddy GK, Gunwar S, Green CB, Fei DT, Chen AB, Kwok SC (1992) Purification and characterization of recombinant porcine prorelaxin expressed in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys.* May 1;294(2):579-85.
- 108 Zarreh-Hoshyari-Khah R, Bartsch O, Einspanier A, Pohnke Y, Ivell R (2001) Bioactivity of recombinant prorelaxin from the marmoset monkey. *Regul Pept.* Mar 2;97(2-3):139-46.
- 109 Frasor J, Danes JM, Komm B, Chang KC, Lyttle CR, Katzenellenbogen BS (2003) Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. *Endocrinology.* Oct;144(10):4562-74.
-

- 
- 110 Sherbet GV (2009) Metastasis promoter S100A4 is a potentially valuable molecular target for cancer therapy. *Cancer Lett.* Jul 18;280(1):15-30.
- 111 Furuya M, Nishiyama M, Kasuya Y, Kimura S, Ishikura H (2005) Pathophysiology of tumor neovascularization. *Vasc Health Risk Manag.*;1(4):277-90.
- 112 Radestock Y, Hoang-Vu C, Hombach-Klonisch S (2008) Relaxin reduces xenograft tumour growth of human MDA-MB-231 breast cancer cells. *Breast Cancer Res.*;10(4):R71.
- 113 Mazella J, Tang M, Tseng L (2004) Disparate effects of relaxin and TGFbeta1: relaxin increases, but TGFbeta1 inhibits, the relaxin receptor and the production of IGFBP-1 in human endometrial stromal/decidual cells. *Hum Reprod.* Jul;19(7):1513-8.
- 114 Li Z, Burzawa JK, Troung A, Feng S, AgoulNIK IU, Tong X, Anderson ML, Kovanci E, Rajkovic A, AgoulNIK AI (2009) Relaxin signaling in uterine fibroids. *Ann N Y Acad Sci.* Apr;1160:374-8.
- 115 Klonisch T, Bialek J, Radestock Y, Hoang-Vu C, Hombach-Klonisch S (2007) Relaxin-like ligand-receptor systems are autocrine/paracrine effectors in tumor cells and modulate cancer progression and tissue invasiveness. *Adv Exp Med Biol.*;612:104-18.
- 116 Binder C, Hagemann T, Husen B, Schulz M, Einspanier A (2002) Relaxin enhances in-vitro invasiveness of breast cancer cell lines by up-regulation of matrix metalloproteases. *Mol Hum Reprod.* Sep;8(9):789-96.
- 117 Palejwala S, Stein DE, Weiss G, Monia BP, Tortoriello D, Goldsmith LT (2001) Relaxin positively regulates matrix metalloproteinase expression in human lower uterine segment fibroblasts using a tyrosine kinase signaling pathway. *Endocrinology.* Aug;142(8):3405-13.
- 118 Maruo N, Nakabayashi K, Wakahashi S, Yata A, Maruo T (2007) Effects of recombinant H2 relaxin on the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor metalloproteinase in cultured early placental extravillous trophoblasts. *Endocrine.* Dec;32(3):303-10.
- 119 Palejwala S, Tseng L, Wojtczuk A, Weiss G, Goldsmith LT (2002) Relaxin gene and protein expression and its regulation of procollagenase and vascular endothelial growth factor in human endometrial cells. *Biol Reprod.* Jun;66(6):1743-8.
- 120 Bani D, Nistri S, Sacchi TB, Bigazzi M (2005) Basic progress and future therapeutic perspectives of relaxin in ischemic heart disease. *Ann N Y Acad Sci.* May;1041:423-30.
- 121 Masini E, Cuzzocrea S, Mazzon E, Muià C, Vannacci A, Fabrizi F, Bani D (2006) Protective effects of relaxin in ischemia/reperfusion-induced intestinal injury due to splanchnic artery occlusion. *Br J Pharmacol.* Aug;148(8):1124-32.
- 122 Feng S, AgoulNIK IU, Bogatcheva NV, Kamat AA, Kwabi-Addo B, Li R, Ayala G, Ittmann MM, AgoulNIK AI (2007) Relaxin promotes prostate cancer progression. *Clin Cancer Res.* Mar 15;13(6):1695-702.
- 123 Kim EJ, Helfman DM (2003) Characterization of the metastasis-associated protein, S100A4. Roles of calcium binding and dimerization in cellular localization and interaction with myosin. *J Biol Chem.* Aug 8;278(32):30063-73.
- 124 Schneider M, Hansen JL, Sheikh SP (2008) S100A4: a common mediator of epithelial-mesenchymal transition, fibrosis and regeneration in diseases? *J Mol Med.* May;86(5):507-22.
- 125 Grigorian M, Ambartsumian N, Lykkesfeldt AE, Bastholm L, Elling F, Georgiev G, Lukanidin E (1996) Effect of mts1 (S100A4) expression on the progression of human breast cancer cells. *Int J Cancer.* Sep 17;67(6):831-41.
- 126 Radestock Y, Hoang-Vu C, Hombach-Klonisch S (2005) Relaxin downregulates the calcium binding protein S100A4 in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Ann N Y Acad Sci.* May;1041:462-9.
- 127 Wang W, Wyckoff JB, Goswami S, Wang Y, Sidani M, Segall JE, Condeelis JS (2007) Coordinated regulation of pathways for enhanced cell motility and chemotaxis is conserved in rat and mouse mammary tumors. *Cancer Res.* Apr 15;67(8):3505-11.
-

- 
- 128 Jiang P, Enomoto A, Takahashi M (2009) Cell biology of the movement of breast cancer cells: Intracellular signalling and the actin cytoskeleton. *Cancer Lett.* Mar 18. [Epub ahead of print]
- 129 Pollard TD, Borisy GG (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell.* Feb 21;112(4):453-65.
- 130 Alberti C (2009) Cytoskeleton structure and dynamic behaviour: quick excursus from basic molecular mechanisms to some implications in cancer chemotherapy. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* Jan-Feb;13(1):13-21.
- 131 Yamazaki D, Kurisu S, Takenawa T (2005) Regulation of cancer cell motility through actin reorganization. *Cancer Sci.* Jul;96(7):379-86.
- 132 Burbelo P, Wellstein A, Pestell RG (2004) Altered Rho GTPase signaling pathways in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* Mar;84(1):43-8.
- 133 Heasman SJ, Ridley AJ (2008) Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Sep;9(9):690-701.
- 134 Matozaki T, Nakanishi H, Takai Y (2000) Small G-protein networks: their crosstalk and signal cascades. *Cell Signal.* Aug;12(8):515-24.
- 135 Schmidt A, Hall MN (1998) Signaling to the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol.*;14:305-38.
- 136 Allingham JS, Klenchin VA, Rayment I (2006) Actin-targeting natural products: structures, properties and mechanisms of action. *Cell Mol Life Sci.* Sep;63(18):2119-34.
- 137 Kozma R, Ahmed S, Best A, Lim L (1995) The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol.* Apr;15(4):1942-52.
- 138 Chrzanowska-Wodnicka M, Burridge K (1996) Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol.* Jun;133(6):1403-15.
- 139 Wheeler AP, Ridley AJ (2004) Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp Cell Res.* Nov 15;301(1):43-9.
- 140 Fritz G, Just I, Kaina B (1999) Rho GTPases are over-expressed in human tumors. *Int J Cancer.* May 31;81(5):682-7.
- 141 Fritz G, Brachetti C, Bahlmann F, Schmidt M, Kaina B (2002) Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters. *Br J Cancer.* Sep 9;87(6):635-44.
- 142 Kleer CG, van Golen KL, Zhang Y, Wu ZF, Rubin MA, Merajver SD (2002) Characterization of RhoC expression in benign and malignant breast disease: a potential new marker for small breast carcinomas with metastatic ability. *Am J Pathol.* Feb;160(2):579-84.
- 143 O'Connor KL, Mercurio AM (2001) Protein kinase A regulates Rac and is required for the growth factor-stimulated migration of carcinoma cells. *J Biol Chem.* Dec 21;276(51):47895-900.
- 144 Baugher PJ, Krishnamoorthy L, Price JE, Dharmawardhane SF (2005) Rac1 and Rac3 isoform activation is involved in the invasive and metastatic phenotype of human breast cancer cells. *Breast Cancer Res.*;7(6):R965-74.
- 145 Chan AY, Coniglio SJ, Chuang YY, Michaelson D, Knaus UG, Philips MR, Symons M (2005) Roles of the Rac1 and Rac3 GTPases in human tumor cell invasion. *Oncogene.* Nov 24;24(53):7821-9.
- 146 Han G, Fan B, Zhang Y, Zhou X, Wang Y, Dong H, Wei Y, Sun S, Hu M, Zhang J, Wei L (2008) Positive regulation of migration and invasion by vasodilator-stimulated phosphoprotein via Rac1 pathway in human breast cancer cells. *Oncol Rep.* Oct;20(4):929-39.
-

- 
- 147 Mogilner A (2012) Filopodia: Basic Description. <http://www.mechanobio.info/Home/Dynamic-Structures-in-Mechanosensing/filopodia> (letzter Zugriff: 02.01.2013)
- 148 Pellegrin S, Mellor H (2007) Actin stress fibres. *J Cell Sci.* Oct 15;120(Pt 20):3491-9.
- 149 Schmalholz, Silke (2008) Deskriptive und funktionelle Analyse der Mitglieder der Calponin-Genfamilie Xclp1, Xclp2 und Xclp3 während der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis*. Universität Hohenheim
- 150 Huang X, Gai Y, Yang N, Lu B, Samuel CS, Thannickal VJ, Zhou Y. (2011) Relaxin regulates myofibroblast contractility and protects against lung fibrosis. *Am J Pathol.* Dec;179(6):2751-65. Epub Oct 6
- 151 Watanabe T, Noritake J, Kaibuchi K (2005) Regulation of microtubules in cell migration. *Trends Cell Biol.* Feb;15(2):76-83.
- 152 Belot N, Pochet R, Heizmann CW, Kiss R, Decaestecker C (2002) Extracellular S100A4 stimulates the migration rate of astrocytic tumor cells by modifying the organization of their actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta.* Nov 4;1600(1-2):74-83.
- 153 Yao L, Agoulnik AI, Cooke PS, Meling DD, Sherwood OD (2008) Relaxin acts on stromal cells to promote epithelial and stromal proliferation and inhibit apoptosis in the mouse cervix and vagina. *Endocrinology.* May;149(5):2072-9. Epub 2008 Jan 24.
- 154 Bani D, Flagiello D, Poupon MF, Nistri S, Poirson-Bichat F, Bigazzi M, Bani Sacchi T (1999b) Relaxin promotes differentiation of human breast cancer cells MCF-7 transplanted into nude mice. *Virchows Arch.* Nov;435(5):509-19.
- 155 Radestock Y, Willing C, Kehlen A, Hoang-Vu C, Hombach-Klonisch S (2010) Relaxin enhances S100A4 and promotes growth of human thyroid carcinoma cell xenografts. *Mol Cancer Res.* Apr;8(4):494-506.
- 156 Silvertown JD, Symes JC, Neschadim A, Nonaka T, Kao JC, Summerlee AJ, Medin JA (2007) Analog of H2 relaxin exhibits antagonistic properties and impairs prostate tumor growth. *FASEB J.* Mar;21(3):754-65.
- 157 Tarabykina S, Griffiths TR, Tulchinsky E, Mellon JK, Bronstein IB, Kriajevska M (2007) Metastasis-associated protein S100A4: spotlight on its role in cell migration. *Curr Cancer Drug Targets.* May;7(3):217-28.
- 158 Ambartsumian N, Klingelhöfer J, Grigorian M, Christensen C, Kriajevska M, Tulchinsky E, Georgiev G, Berezin V, Bock E, Rygaard J, Cao R, Cao Y, Lukanidin E (2001) The metastasis-associated Mts1(S100A4) protein could act as an angiogenic factor. *Oncogene.* Aug 2;20(34):4685-95.
- 159 Ambartsumian N, Grigorian M, Lukanidin E (2005) Genetically modified mouse models to study the role of metastasis-promoting S100A4(mts1) protein in metastatic mammary cancer. *J Dairy Res.*;72 Spec No:27-33.
- 160 Schmidt-Hansen B, Ornås D, Grigorian M, Klingelhöfer J, Tulchinsky E, Lukanidin E, Ambartsumian N (2004) Extracellular S100A4(mts1) stimulates invasive growth of mouse endothelial cells and modulates MMP-13 matrix metalloproteinase activity. *Oncogene.* Jul 15;23(32):5487-95.
- 161 Semov A, Moreno MJ, Onichtchenko A, Abulrob A, Ball M, Ekiel I, Pietrzynski G, Stanimirovic D, Alakhov V (2005) Metastasis-associated protein S100A4 induces angiogenesis through interaction with Annexin II and accelerated plasmin formation. *J Biol Chem.* May 27;280(21):20833-41.
- 162 Grigorian M, Andresen S, Tulchinsky E, Kriajevska M, Carlberg C, Kruse C, Cohn M, Ambartsumian N, Christensen A, Selivanova G, Lukanidin E (2001) Tumor suppressor p53 protein is a new target for the metastasis-associated Mts1/S100A4 protein: functional consequences of their interaction. *J Biol Chem.* Jun 22;276(25):22699-708.
- 163 Ismail NI, Kaur G, Hashim H, Hassan MS (2008) S100A4 overexpression proves to be independent marker for breast cancer progression. *Cancer Cell Int.* Sep 5;8:12.
-

- 
- 164 Pathuri P, Vogeley L, Luecke H (2008) Crystal structure of metastasis-associated protein S100A4 in the active calcium-bound form. *J Mol Biol.* Oct 31;383(1):62-77.
- 165 Schneider M, Hansen JL, Sheikh SP (2008) S100A4: a common mediator of epithelial-mesenchymal transition, fibrosis and regeneration in diseases? *J Mol Med.* May;86(5):507-22.
- 166 Ikenaga N, Ohuchida K, Mizumoto K, Yu J, Fujita H, Nakata K, Ueda J, Sato N, Nagai E, Tanaka M (2009) S100A4 mRNA is a diagnostic and prognostic marker in pancreatic carcinoma. *J Gastrointest Surg.* Oct;13(10):1852-8.
- 167 Jenkinson SR, Barraclough R, West CR, Rudland PS (2004) S100A4 regulates cell motility and invasion in an in vitro model for breast cancer metastasis. *Br J Cancer.* Jan 12;90(1):253-62.
- 168 Ito Y, Yoshida H, Tomoda C, Uruno T, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F, Kakudo K, Kuma K, Miyauchi A (2004) S100A4 expression is an early event of papillary carcinoma of the thyroid. *Oncology.*;67(5-6):397-402.
- 169 Zou M, Famulski KS, Parhar RS, Baitei E, Al-Mohanna FA, Farid NR, Shi Y. Microarray analysis of metastasis-associated gene expression profiling in a murine model of thyroid carcinoma pulmonary metastasis: identification of S100A4 (Mts1) gene overexpression as a poor prognostic marker for thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Dec;89(12):6146-54.
- 170 Lee WY, Su WC, Lin PW, Guo HR, Chang TW, Chen HH (2004) Expression of S100A4 and Met: potential predictors for metastasis and survival in early-stage breast cancer. *Oncology.*;66(6):429-38.
- 171 Platt-Higgins AM, Renshaw CA, West CR, Winstanley JH, De Silva Rudland S, Barraclough R, Rudland PS (2000) Comparison of the metastasis-inducing protein S100A4 (p9ka) with other prognostic markers in human breast cancer. *Int J Cancer.* Mar 20;89(2):198-208.
- 172 Rudland PS, Platt-Higgins A, Renshaw C, West CR, Winstanley JH, Robertson L, Barraclough R (2000) Prognostic significance of the metastasis-inducing protein S100A4 (p9Ka) in human breast cancer. *Cancer Res.* Mar 15;60(6):1595-603.
- 173 Grigorian MS, Tulchinsky EM, Zain S, Ebralidze AK, Kramerov DA, Kriajevska MV, Georgiev GP, Lukanidin EM (1993) The mts1 gene and control of tumor metastasis. *Gene.* Dec 15;135(1-2):229-38.
- 174 Hernan R, Fasheh R, Calabrese C, Frank AJ, Maclean KH, Allard D, Barraclough R, Gilbertson RJ (2003) ERBB2 up-regulates S100A4 and several other prometastatic genes in medulloblastoma. *Cancer Res.* Jan 1;63(1):140-8.
- 175 Lawrie A, Spiekerkoetter E, Martinez EC, Ambartsumian N, Sheward WJ, MacLean MR, Harmar AJ, Schmidt AM, Lukanidin E, Rabinovitch M (2005) Interdependent serotonin transporter and receptor pathways regulate S100A4/Mts1, a gene associated with pulmonary vascular disease. *Circ Res.* Aug 5;97(3):227-35.
- 176 Stein U, Arlt F, Walther W, Smith J, Waldman T, Harris ED, Mertins SD, Heizmann CW, Allard D, Birchmeier W, Schlag PM, Shoemaker RH (2006) The metastasis-associated gene S100A4 is a novel target of beta-catenin/T-cell factor signaling in colon cancer. *Gastroenterology.* Nov;131(5):1486-500.
- 177 Stein U, Arlt F, Smith J, Sack U, Herrmann P, Walther W, Lemm M, Fichtner I, Shoemaker RH, Schlag PM (2011) Intervening in  $\beta$ -catenin signaling by sulindac inhibits S100A4-dependent colon cancer metastasis. *Neoplasia.* Feb;13(2):131-44.
-

## Verwendete Geräte

### Zelllabor

Brutschrank, Cytoperm 2	Heraeus, Gera
Kühlzentrifuge, Hettich POTANTA/RP	Heraeus, Gera
Lichtmikroskop, Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena
Neubauer-Zählkammer	Superior, Marienfeld
Sterilbank, HS12	Heraeus, Gera
Sterilbank, Steril Gard	Funeralia, Würzburg
Wasserbad, WB14	Memmert, GmbH

### RNA-Labor

3 TRIO Thermozykler	Biometra, Göttingen
High Speed Kühlzentrifuge	Heraeus, Gera
Horizontales Gelelektrophorese System	BioRad, München
Kodak Image Station 440 CF	Kodak, Stuttgart
Mikro-Dismembrator S	Braun Biotech, Melsungen
Tischzentrifuge	Denver Instruments
UV-Transilluminator	Biometra, Göttingen
Vortex-Genie 1	Scientific Industries Ink., Bohemia, USA

### Western Blot-Labor

Blotkammer	Trans Blot, BioRad, München
Elektronik-Rührer Poly 15	VARIOMAG, München
Gel-Elektrophorese-Kammer	BioRad, München
Kühlsystem WK230 LAUDA	Boehringer Ingelheim, Heidelberg
Kühlzentrifuge Biofuge 28RS	Heraeus, Gera
pH Meter	InoLab
Power Pac 300	BioRad, München
Thermoschüttler	HCL Haep Labor Consult, Borenden

### Mess-Labor

Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2	Carl Zeiss, Jena
Sirius Luminometer	Berthold Detection System GmbH, Pforzheim
Spectra Rainbow ELISA	TECAN
Spektrophotometer	UV-1602, Shimadzu, Kyoto, Japan

### Geräteraum

-80°C Gefrierschränke	Heraeus, Gera
Stickstoffbehälter (Chronos® Biosafe®)	Messer Griesheim, Krefeld

## Materialien

### Materialien

Deckgläser	Superior, Marienfeld
Einbettkassetten	Engelbrecht, Edermünde
Einweg-Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	TPP, Schweiz
Eppendorfgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Gewebekulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Gewebekulturplatten (96-Well, 24-Well, 6-Well)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Geweberöhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Hyperfilm-MP	Amersham Bioscience, Schweden
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen

### Herkunft

Superior, Marienfeld
Engelbrecht, Edermünde
TPP, Schweiz
Greiner Bio-One, Frickenhausen
Amersham Bioscience, Schweden
Greiner Bio-One, Frickenhausen

Objektträger	Superior, Marienfeld
PP-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	TPP, Schweiz
PVDF Membran	Amersham Bioscience, Schweden
Thin Cherts™ TC Filter	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Whatman Blotting Papier (Filterpapier)	Biometra, Göttingen

## Chemikalien

Chemikalien und Biochemikalien	Herkunft
10xPCR Puffer	Applied Biosystems, New Jersey, USA
5xPuffer	Invitrogen, Karlsruhe
acetyliertes Tubulin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agarose	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
alpha-Tubulin	Sigma-Aldrich, Steinheim
AmpliAq Polymerase	Applied Biosystem, New Jersey; USA
AmpliAq gold Polymerase	Applied Biosystem, New Jersey; USA
APS	Merck, Darmstadt
APTEX	Sigma-Aldrich, Steinheim
Broad Range Marker	Promega GmbH, Madison, USA
Bromphenol Blau	SERVA, Heidelberg
Chloroform	Merck, Darmstadt
Collagen A	Biochrom AG, Berlin
DEPC	Sigma-Aldrich, Steinheim
dNTP	Invitrogen, Karlsruhe
DTT	Invitrogen, Karlsruhe
ECL™-Lösung	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
EDTA	Merck, Darmstadt
EGTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Elastin	Sigma, Steinheim
Entellan	Merck, Darmstadt
Entwickler	Kodak, Stuttgart
Eosin	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	SERVA, Heidelberg
Fixierer	Kodak, Stuttgart
Fluorescent Mounting Medium	DaKo
Formaldehyde	Sigma-Aldrich, Steinheim
Forskolin	Calbiochem, San Diego, USA
gamma Tubulin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Gelatine	Biochrom AG, Berlin
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	SERVA, Heidelberg, Germany
Goat-anti-mouse IgG	Santa Cruze Biotechnology, Heidelberg
Goat-anti-rabbit IgG	Santa Cruze Biotechnology, Heidelberg
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Hämalaun	Merck, Darmstadt
HEPES	Sigma Aldrich, Steinheim
Hoechstfarbstoff	Sigma Aldrich, Steinheim
IBMX	Sigma, Steinheim

<b>Chemikalien und Biochemikalien</b>	<b>Herkunft</b>
Isopropanol	Merck, Darmstadt
KCl	SERVA, Heidelberg
Laminin	Sigma, Steinheim
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen, Burlington, ON, Canada
Magermilchpulver	TSI GmbH & Co.KG, Zeven
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Metafectene™	Biontex, München
Methanol	Merck, Darmstadt
MgCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
NaCl	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumcarbonat	Roth GmbH, Karlsruhe
NP-40	EuroClone, Pero, Italien
PBS	AppliChem GmbH, Darmstadt
Phalloidin	Biotium, USA
Pikrinsäure	Fluka, Steinheim
PIPES	Sigma-Aldrich, Steinheim
Polyacrylamid	Roth GmbH, Karlsruhe
Ponceau-S	Sigma Aldrich, Steinheim
Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Random Primer	Invitrogen, Karlsruhe
Rhodamin gelabelter GAM	Jackson ImmunoResearch
RNAse freies Wasser	Qiagen, Hilden
RNasin	Invitrogen, Karlsruhe
S100A4	Neomarkers, Fremont CA, USA
SDS	Sigma-Aldrich, Steinheim
β-Aktin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Superscript™ II	Invitrogen, Karlsruhe
TEMED	BioRad, München
Toluidinblau	Merck, Darmstadt
Tris-HCl	Fluka, Steinheim
Triton-X100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trizol Reagents	Life Technologies, Karlsruhe
Tween 20	SERVA, Heidelberg
Xylol	Roth GmbH, Karlsruhe
<b>Reagenzien für Zellkultur</b>	<b>Herkunft</b>
Amphotericin	Sigma, Steinheim
DMEM/F12 Medium	Gibco, Berlin
DMSO	Sigma, Steinheim
Earl's MEM Medium	Biochrom AG, Berlin
FCS	BioWest, Nuaille
Geneticin	Invitrogen, Karlsruhe
Gentamycin	Sigma, Steinheim
HBSS	Gibco, Berlin
Hydrocortison	Sigma-Aldrich, Steinheim
Insulin	Gibco, Berlin
Insulin-Transferin-Selentite	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin	Merck, Darmstadt

---

<b>Chemikalien und Biochemikalien</b>	<b>Herkunft</b>
NaHCO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Opti-MEM Medium	Gibco, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Berlin
rhRLN2	Phoenix Pharmaceuticals Inc., USA
RPMI 1640 Medium	Gibco, Berlin
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe

## Thesen

Ziel der Arbeit war, den Einfluss von Relaxin 2 auf das Motilitäts-, Migrations- und Invasionsverhalten der Brustkrebszelllinie MDA- MB-231 sowie deren Tumorwachstum zu untersuchen.

1. Stabile Transfektanten der Era-negativen humanen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 mit Expression von humanem RLN2 (MDA/RLN2) zeigten im Vergleich zu den Leervector (MDA/EGFP) Transfektanten eine signifikante Expression und Sekretion von RLN2.
2. Das von den MDA/RLN2 Transfektanten sezernierte RLN2 war bioaktiv und induzierte eine Erhöhung von cAMP ohne zytotoxische oder proliferationsfördernde Effekte zu haben..
3. Sowohl humanes rekombinantes Relaxin als auch das von MDA/RLN2 Transfektanten sezernierte Relaxin führten nach 24 Stunden zu einer signifikanten Erhöhung der Motilität.
4. S100A4 wurde als neues Zielmolekül der Relaxin-RXFP1 Signalkaskade in humanen Brustkrebszellen identifiziert.
5. Die Relaxin-induzierte Motilitätssteigerung war RXFP1-vermittelt und abhängig von der Expression von S100A4.
6. MDA-MB-231 nach Langzeitinkubation mit rekombinantem Relaxin (3-8 Tage) zeigten ebenso wie stabile MDA/RLN2 Transfektanten eine verminderte Expression von S100A4 und eine Erniedrigung der Motilität.
7. MDA/RLN2 Transfektanten zeigten eine signifikant verringerte Migration durch verschiedene Bestandteile der extrazellulären Matrix
8. Exposition zu Relaxin beeinflusste das Zytoskelett mit Veränderungen der Aktin-Strukturen sowie signifikanten Lokalisationsveränderungen von alpha Tubulin und acetyliertem Tubulin.
9. Die stabile Expression von Relaxin in MDA-MB-231 führte im Vergleich zu Leervektortransfektanten zu einem deutlich reduziertes Tumorwachstum in Nacktmäusen.
10. In den Tumoren ließ sich ebenfalls ein reduziertes Level von S100A4 Protein nachweisen.

---

## LEBENS LAUF

**Persönliche Daten:**

Yvonne Radestock  
Freiligrathstr. 3  
39108 Magdeburg  
deutsch  
geb. am 13.04.1978 in Leipzig  
ledig

**Schulbildung:**

1984 – 1992 22.POS „Maxim Gorki“, Leipzig  
1992 – 1996 Gustav Theodor Fechner Gymnasium, Leipzig  
Abschluss: Abitur

**Hochschulbildung:**

1996 – 2002 Biologiestudium an der Universität Leipzig  
Studienschwerpunkt: Molekularbiologie

2002 Diplomarbeit, Diplomarbeit am Institut für Virologie der  
Universität Leipzig zum Thema: „Etablierung eines PCR-  
Verfahrens zum Nachweis der transkriptionellen Aktivität  
von Masernvirus-Genen in Einzelzellen“

12/2002 – 10/2004 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Anatomie  
und Zellbiologie Halle/Wittenberg

11/2004 - 01/2005 Praktikum im Department of Human Anatomy and Cell  
Science der University of Manitoba in Winnipeg, Kanada

02/2005 – 12/2008 wissenschaftliche Mitarbeiterin im Labor für experimentelle  
chirurgische Onkologie der Medizinischen Fakultät der  
Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg mit  
angestrebter Promotion

09/2009 – 12/2009 freie wissenschaftliche Mitarbeiterin im Labor für  
experimentelle chirurgische Onkologie der Medizinischen  
Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg

seit 01/2010 Pharmaberaterin bei Berlin Chemie AG

## **Selbstständigkeitserklärung**

Gemäß §6 der Promotionsordnung der Universität Halle erkläre ich hiermit an Eides statt, das ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Ich versichere, nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen zu haben. Zudem hat keine Person von mir geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Frühere Promotionsversuche bestehen nicht. Die vorliegende Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle,

Yvonne Radestock

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Anatomie und Zellbiologie sowie in der Arbeitsgruppe Experimentelle und Chirurgische Onkologie der Universitätsklinik und Polyklinik für Allgemein -, Visceral – und Gefäßchirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg erstellt.

Zu Beginn möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer und Herrn Prof. Henning Dralle danken, dass sie es mir ermöglicht haben, meine Doktorarbeit in ihren Arbeitsgruppen zu erstellen.

Mein nächster Dank gilt vor allem meiner Betreuerin Prof. Dr. Sabine Hombach-Klonisch vom Department of Human Anatomy und Cell Science der University of Manitoba, Medical Faculty, für die engagierte Betreuung auch nach der Auswanderung nach Kanada. Vorallem für die stetige Diskussionsbereitschaft und die wissenschaftliche aber auch individuelle Betreuung möchte ich ihr danken.

Desweiteren möchte ich mich bei dem Arbeitsgruppenleiter Herrn Prof. Dr. Cuong Hoang-Vu recht herzlich bedanken, dass er mich so selbstverständlich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen hat und mir somit die Fertigstellung meiner Promotionsarbeit ermöglicht hat.

Mein weiterer Dank gilt den technischen Mitarbeiterinnen Frau Christine Fröhlich, Frau Elisabeth Schlüter und Frau Kathrin Hammje für die tatkräftige Unterstützung im Laboralltag sowie für die freundliche und kollegiale Zusammenarbeit.

Außerdem möchte ich mich recht herzlich bei meinen lieben Kollegen Frau Dr. Joanna Bialek, Herrn Dr. Bogusz Trojanowicz, Herrn Dr. Lars Brodauf, Herrn Dr. Mabruk Erhuma und Herrn Dr. Zhouxun Chen für die langen und sehr hilfreichen Diskussionen im Denkerzimmer aber auch für die fröhliche Zeit außerhalb des Labors bedanken.

Und nicht zuletzt gilt ein großer Dank meiner Familie und meinen Freunden für die moralische Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.