

6 Zusammenfassung

6 Zusammenfassung

Der Relaxin-ähnliche Faktor (RLF) wurde ursprünglich als Leydigzell-Insulin-ähnliches Peptid charakterisiert, da er zu großen Anteilen von den Leydigzellen des Schweines exprimiert wird. Jüngste Studien zeigten, daß beim Rind eine starke Expression des RLF-Gens auch von den Thekazellen (TZ) des Follikels und vom Gelbkörper (CL) während des Zyklus und der Trächtigkeit ausgeht (Bathgate *et al.*, 1996). Da die stärkste Expression der RLF mRNA des bovinen Follikels in den TZ zu verzeichnen ist, wurde in dieser Arbeit eine TZ-Kultur etabliert, um die Expression und Regulation der RLF mRNA zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, daß die RLF mRNA-Expression abhängig vom hormonellen Milieu und damit vom Differenzierungsgrad der Zellen ist, womit sich RLF als neuer Marker erwiesen hat, um die Theka-Luteal-Zelldifferenzierung verfolgen zu können. Relativ undifferenzierte TZ, die unter serumhaltigen Bedingungen mit 5% FCS (fetal calf serum) kultiviert worden waren und morphologisch den fibroblastenähnlichen Zellen des jungen CL *in vivo* glichen, zeigten schon nach 3 Tagen einen rapiden Abfall der RLF mRNA-Expression auf den Northern Blots, parallel zu den gemessenen Progesteron- und Androstendion-Werten aus dem Kulturmedium der Zellen. Unter serumfreien Bedingungen mit Insulineinfluß (100ng/ml) erreichten die TZ einen teil-differenzierten Zustand und glichen morphologisch den kleinen Zellen des CL *in vivo*. Diese Zellen zeigten von Tag 3-6 der Kultur eine starke RLF mRNA-Expression, gefolgt von einer Expressionslücke von Tag 6-9 und einen erneuten Anstieg von Tag 9-15, wobei ein deutlicher Unterschied in der Größe des RLF-Transkriptes, im Vergleich zu den ersten Tagen der Expression, zu erkennen war. Die Durchführung des RNase H-Verdau demonstrierte, daß die beobachteten unterschiedlichen Transkriptgrößen auf differierende Polyadenylierungsenden zurückzuführen sind. Wurde den TZ unter den gleichen Kulturbedingungen zusätzlich LH (10ng/ml) angeboten, war eine morphologische Luteinisierung der Zellen *in vitro* zu beobachten. Die RLF mRNA-Expression nahm von Tag 6 an kontinuierlich ab und kehrte über den Zeitraum von 15 Tagen nicht wieder. Die Progesteronproduktion stieg über die gesamte Kulturdauer signifikant an, begleitet von der nur unter diesen Bedingungen ebenfalls zunehmenden Expression des P450 Side-Chain-Cleavage Enzyms, kennzeichnend für die Luteinisierung der Zellen. Die Expression der RLF mRNA in den luteinisierten TZ-Kulturen schien damit die Expression der RLF mRNA der Theka-Luteinzellen des jungen CL *in vivo* wiederzuspiegeln. Wurde die RLF mRNA-Expression frisch preparierter TZ bestimmt, zeigte

6 Zusammenfassung

sich eine deutliche Abhängigkeit zum Entwicklungsstadium und Zustand des Follikels. Insgesamt waren die Expressionsmuster des RLF denen von Relaxin bei anderen Tierarten sehr ähnlich, was die These unterstützt, daß RLF das scheinbar deletierte oder nicht exprimierte Relaxin-Gen des Wiederkäuers ersetzt.

7 Summary

Nicole Moniac

Regulation of relaxin-like factor (RLF) mRNA expression in bovine thecal cell cultures.

The relaxin-like-factor (RLF) was initially characterized as an Leydig-insulin-like peptide as it is predominantly expressed in porcine Leydig cells. Recently, it has been shown that the RLF gene is highly expressed in the bovine ovary, particularly in the follicular theca cells (TC) and in the corpus luteum (CL) of the cycle and pregnancy (Bathgate *et al.*, 1996). As the highest expression of RLF mRNA in the bovine follicle is in TC, a thecal culture system was established to study the expression and regulation of the RLF mRNA. It is shown that RLF mRNA expression is dependent upon the the differentiation status of the cells, which is regulated by the hormonal environment. It can, therefore, be argued that RLF can be used as a new marker to follow theca-luteal-celldifferentiation. Relatively undifferentiated TC, which were cultured under serumfree conditions with 5% FCS (fetal calf serum), appeared to be morphologically similar to fibroblast cells of the early CL *in vivo*. Northern blot analysis shows that after stimulation with 5% FCS, RLF mRNA expression decreased dramatically after 3 days, paralleling the decrease in both progesterone and androstendione levels in the culture medium secreted by the TC. Under serum-free conditions, insulin stimulation (100ng/ml) results in partially differentiated cells and these cells resemble morphologically the small cells of the CL *in vivo*. These cells show a strong RLF mRNA expression from days 3-6, a hiatus in expression from day 6-9 followed by an increase in mRNA expression until day 15. The transcripts vary not only in the pattern of expression, but also in the size of the mRNA over the 15 day period. RNase H-digestion shows that this difference in the various sizes of the transcript lies in the polyadenylation tails. When LH (10 ng/ml) was added to the TC under the same culture conditions, morphological luteinization of the cells was observed. RLF mRNA

7 Summary

expression steadily declined from day 6, and no further expression was detected over the 15 day period. Progesterone secretion increased significantly over the 15 days, accompanied by an increase in expression of the P450 Side-chain-cleavage enzyme, marking luteinization of the cells. The expression of RLF mRNA in the TC cultures appears to reflect the expression of RLF mRNA of theca-lutein-cells of the early cycle *in vivo*. As the RLF mRNA expression is detected in freshly prepared TZ, a definite dependence on the development and status of the follicle could be shown. In summary, the expression pattern of RLF in the bovine, in comparison to the expression pattern of Relaxin in other species, supports the idea that RLF is substituting for the missing relaxin gene in ruminants.