Charakterisierung des Ecdysteroidrezeptors als ,target' für arthropodenspezifische Insektizide

Inauguraldissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Marco Grebe

aus Hilden

Düsseldorf 2000

Inhaltsverzeichnis1		
Abkü	rzungen	4
I	Einleitung	7
I.1	Ziele der Arbeit	16
Π	Material und Methoden	18
II.1	Material	18
II.1.1	Chemikalien	18
II.1.2	Immunochemikalien	19
II.1.3	Radiochemikalien	
II.1.4	Biologisches Material	
II.1.5	DNA-Elemente	20
II.1.6	Geräte	21
II.1.7	Sonstiges Material	22
II.2	Methoden	23
II.2.1	Chironomus tentans-Zellkultur	23
П.2.1.1	Inkubation der Chironomus-Zellen mit 20-Hydroxy-Ecdyson	23
II.2.1.2	Herstellen von Chironomus-Zellextrakten (verändert nach	
	Quack et al. 1995)	23
II.2.2	Expression von Chironomus EcR/USP als GST-Fusions-	
	proteine in <i>E. coli</i>	
II.2.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA und Transformation kompetenter BL21(DE3)-Zellen	24
II.2.2.2	Bakterielle Expression von GST-cEcR/GST-cUSP	25
II.2.2.3	Herstellen von <i>E. coli</i> -Rohextrakten	25
II.2.2.4	Affinitäts-Reinigung von GST-cEcR/GST-cUSP	25
II.2.2.5	Enzymatische Abspaltung von GST mit Thrombin	26
II.2.3	Expression der Liganden-bindenden Domänen von EcR und US	Р
	aus Drosophila	
II.2.3.1	Transformation kompetenter Y190-Hefezellen (verändert nach	
	Clontech, Yeast Protocols Handbook PT3024-1)	27

II.2.3.2	Herstellen von S. cerevisiae-Hefeextrakten	28
II.2.4	Nachweismethoden	
II.2.4.1	Quantifizierung von DNA	
II.2.4.2	Photometrische Proteinbestimmung	
II.2.4.3	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur	
	Auftrennung von Proteinen (verändert nach Lämmli 1970)	
II.2.4.4	Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen zum Nachweis des	
	Gesamtproteins (nach Blum et al. 1987)	30
II.2.4.5	Proteintransfer auf Nitrozellulose-Membran (Western-Blot)	
	und Ponceau-Färbung	31
II.2.4.6	Immunologische Detektionen zum Nachweis von cEcR, cUSP,	
	GST-cEcR/GST-cUSP, Gal4-AD-dEcR und Gal4-DBD-dUSP	32
II.2.4.7	Digitalisierung und Quantifizierung von Proteinbanden	33
II.2.5	Rezeptorfunktionen	33
П.2.5.1	Untersuchungen zur Hormon-Bindung	33
II.2.5.2	Untersuchungen zur DNA-Bindung	35
II.2.6	Chromatographische Methoden	37
II.2.6.1	Entsalzen mit Molekular-Siebchromatographie	
II.2.6.2	Analytische und präparative High Performance Liquid	
	Chromatography (HPLC) von [³ H]-Ponasteron A	37
III	Ergebnisse	
III.1	Reinigung von [³ H]-Ponasteron A	38
		40
III.2	Charakterisierung von EcR/USP der <i>Chironomus</i> -Zellinie	
Ш.2.1	Dependent Ernmanie und meetter meletion alle Medifikation	
Ш.2.2	Rezeptor-Expression und posttranslationelle Modifikation	42
Ш.2.5	Delegativitien der grazifischen Harmon Dindung.	
III.2.3.1	Kekonsuluuon der spezifischen Hormon-Bindung	4/
III.3	Charakterisierung bakteriell exprimierter Rezeptor-Proteine	40
ш о 1	aus Chironomus tentans	
ш.з.1	Expression und Affinitats-Reinigung	
ш.3.2	Abspattung des GST-Anteils mit Thrombin	
Ш.5.5	Infinunologische Detektion gereinigter Kezeptoren	52
ш.5.4	Untersuchungen zur Hormon-Bindung	
ш.э.4.	Ongereningte Rezeptoren	52

III.3.4.2	Gereinigte Rezeptoren	53
III.3.4.2.1	Abschätzung der spezifischen Aktivität gereinigter Rezeptoren	54
III.3.4.2.2	2 Vergleich von bakteriell exprimiertem EcR/USP mit dem Wildtyp der <i>Chironomus</i> -Zellinie	55
III.3.4.2.3	Einfluss von Methopren auf die Ponasteron A-Bindung	55
	gereinigter Rezentoren	58
III.3.5	Bindung an spezifische DNA-Abschnitte (hormone responsive	20
	elements')	59
		07
III.4	Charakterisierung der Liganden-bindenden Domänen (LBD's)	
	von EcR und USP aus Drosophila	63
III.4.1	Immunologischer Nachweis der Gal4-Fusionsproteine	63
III.4.2	Hormon-Bindung der dEcR-LBD des Wildtyps	65
III.4.2.1	Bestimmung der optimalen USP-Konzentration	66
III.4.3	Hormon-Bindung der Liganden-bindenden Domäne des dEcR's	
	(Trunkationen und Punktmutationen)	67
III.4.3.1	Trunkationen	69
III.4.3.2	Punktmutationen	70
III.4.4	Einfluss von dUSP-LBD (Punktmutationen und Trunkationen) auf	
	die Hormon-Bindung der dEcR-LBD	74
III.4.5	Kombinationen von dEcR/dUSP-Mutationen	.77
IV D	Piskussion	78
IV.1	Der Ecdysteroidrezeptor resistenter Chironomus tentans-Zellklone –	
	Mechanismen der Hormon-Resistenz	78
IV.2	Bakterielle Expression und Reinigung nukleärer Rezeptoren –	
	Hormonbindung und DNA-Spezifität von cEcR/cUSP	86
IV.3	Hormonbindung der EcR-LBD aus Drosophila	.91
IV.3.1	Einfluss von USP (LBD-Mutationen) auf die Dimerisierungs-	
	abhängige Ligandenbindung der EcR-LBD aus Drosophila	.97
IV.4	Modulation der hormonellen Signaltransduktion	99
v Z	usammenfassung	.101
VI L	iteraturverzeichnis	103
Anhang		.121
Danksagu	ing	122

Abkürzungen

Abb	Abbildung
	trong altiviaranda Euroption
АГ	
AK	Antikorper
APS	Ammoniumpersulfat
AR	.Androgen-Rezeptor
AS	Aminosäure
Bm	Bombyx mori
bp	Basenpaar
BS	Bindestellen
BSA	Rinder Serum Albumin
CAIS	Komplettes Androgen-Insensitivitäts-
	Syndrom
cEcR	Chironomus-EcR
cpm	counts pro Minute
DBD	.DNA-bindende Domäne
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethen
dEcR	Drosophila-EcR
DMSO	.Dimethylsulfoxid
DNA	.Desoxyribonukleinsäure
DO	dropout
DR	.direct repeat
DTBHIB	5-di-tert-butyl-4-hydroxy-N-isobutyl-
	benzamide
DTT	Dithiotreitol
dUSP	Drosophila-USP
20E	20-Hydroxy-Ecdyson
Ec	Ecdysteroid
EcR	.Ecdysteroid-Rezeptor
Ecre	Ecdysteroid responsive element
EDTA	.Ethylendiamintetraacetat
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
ER	Östrogen-Rezeptor
GR	.Glucocorticoid-Rezeptor

GSH	reduziertes Glutathion
GST	.Glutathion-S-Transferase
h	. Stunde
HAc	.Essigsäure
HEPES	.N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-
	ethansulfonsäure
HPLC	high performance liquid chromatography
hre	hormon responsive element
hsp	.Hitzeschock-Protein
HSP	. Hochsalzpuffer
IC	"Inhibition conzentration"
IPTG	Isopropyl-thio-ß-D-Galaktopyranosid
IgG	. Immunglobulin G
JH	.Juvenilhormon
JHA	.Juvenilhormon-Analoge
kDa	.Kilodalton
K _D	Gleichgewichts-Dissoziationskonstante
LBD	Liganden-bindende-Domäne
Leu	. Leucin
LiAc	. Lithiumacetat
MG	.Molekulargewicht
min	. Minute
MurA	Muristeron A
n	. Probenzahl
NCoR	.nuclear receptor co-repressor
NR	.nukleärer Rezeptor
OD	Optische Dichte
NSP	. Niedersalzpuffer
NZ	. Nitrozellulose
PAA	. Polyacrylamid
PAGE	.Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pal	. Palindrom
PEG	.Polyethylenglycol
PBS	. "phosphat buffered saline"
PBS-T	"phosphat buffered saline" mit Tween 20
pers	.persönlich

Pon A	Ponasteron A
PMSF	Phenylmethyl-sulfonyl fluoride
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PR	Progesteron-Rezeptor
PTTH	prothoracicotropes Hormon
RAC 3	Rezeptor-assoziierter Coaktivator 3
RAR	Retinsäure-Rezeptor
RH	.Rohm & Haas
Rpm	rounds per minute
RU	.resonance unit
RXR	Retinoic X receptor
s	.siehe
SD	Standardabweichung
SDS	.Sodium-Dodecylsulfat
sec	Sekunde
Ser	. Serin
SHP	short heterodimer partner
SHR	Steroidhormon-Rezeptor
SMRT	silencing mediator for RXR and TR
SP	.Scatchard-Plot
SPR	Surface plasmon resonance
SRC	.Steroid-Rezeptor-Coaktivator
SVP	. seven-up (Orphan Rezeptor)
Tab	Tabelle
TBS-T	"Tris buffered saline" mit Tween 20
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
TR	Thyroxin-Rezeptor
TRIS	.2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Trp	Tryptophan
Tyr	.Tyrosin
ü/N	über Nacht
USP	.,,ultraspiracle"
VDR	.Vitamin-D ₃ -Rezeptor
Wt	Wildtyp

I Einleitung

Das Auftreten von resistenten Schädlings-Populationen gegen angewendete Insektizide/Pestizide stellt ein weltweit verbreitetes Problem dar. In über 500 verschiedenen Insekten-Spezies ist dieses Phänomen bereits beobachtet worden (Georghiou & Lagunes-Tejeda 1991). 1957 wurde von der WHO (World Health Organisation) Resistenz definiert als "die erbliche Fähigkeit eines Stammes oder einiger Organismen, eine toxische Dosis zu überleben, die den Grossteil der Individuen einer normalen Population dieses Spezies abtöten würde". Dabei kann die Ausbildung einer Resistenz zur Nutzlosigkeit einer ganzen Insektizid-Klasse führen. Dies hat zur Folge, dass die Anzahl kommerziell eingesetzter Pestizide, die in einem Wettlauf mit neu entwickelnden Resistenzen stehen, stetig abnehmen (Hammock & Soderlund 1986).

Zu den konventionellen Insektiziden zählen die Acetylcholinesterase-Hemmer (z.B. Parathion E605, Organophosphate, Carbamate) und solche, die auf Ionenkanäle wirken (z.B. DDT, Organochlorine, Pyrethroide, Cyclodiene). Die Erlangung einer Insektizid-Resistenz kann im Wesentlichen auf zwei unterschiedlichen Mechanismen beruhen (Scott 1999). Zum Einen kann durch erhöhten Metabolismus durch detoxifizierende Enzyme die Substanz beschleunigt abgebaut werden. Zu diesen Enzymen zählen neben den Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen (Scott 1991) auch Esterasen (Small & Hemingway 2000) und Glutathion-S-Transferasen (Yu 1996). Zum Anderen kann auch das Zielprotein (,target-site-resitance'), über das die insektizide Eigenschaft vermittelt wird, betroffen sein (ffrench-Constant 1999). So sind eine Reihe von Punktmutationen des GABA-Rezeptors, der Acetylcholinesterase und von Ionenkanal-Proteinen bekannt, die im Zusammenhang mit Insektizid-Resistenz stehen (Feyereisen 1995, Williamson et al. 1996). Rufingier et al. (1999) beschreiben mit der Blattlaus Nasonovia ribisnigri einen Fall, der verdeutlicht, dass auch Mehrfach-Resistenzen (,crossresistance') erworben werden können. In dieser Spezies wurde sowohl eine reduzierte Sensitivität der Acetylcholinesterase gegenüber Primicarb (Carbamat) beobachtet als auch eine Überexpression der Glutathion-S-Transferase und daraus resultierenden erhöhten Detoxifikations-Raten für Primicarb und Endosulfan (Cyclodien).

Neben der Resistenzentwicklung sind weitere Nachteile der konventionellen Insektizide zu nennen. Da sie im Allgemeinen relativ unspezifisch auf das Nervensystem wirken, ist nur geringe Selektivität gegeben und die Toxizität ist weder auf eine bestimmte Spezies noch auf Invertebraten beschränkt. Weiterhin sind Pestizide z.T. nur gering biologisch abbaubar und können sich so in der Nahrungskette anreichern. Als Paradebeispiel gilt in diesem Zusammenhang das Dichlordiphenyltrichlorethen (DDT), für das globales Vorkommen als auch Vertebraten-Toxizität nachgewiesen wurde.

Die bisher beschriebenen Nachteile der klassischen Pestizide führten schon früh zur Entwicklung alternativer Methoden. Ein Beispiel sind die Insektenwachstums-Regulatoren (,insect growth regulators'), die untergliedert werden können in Chitinsynthese-Hemmer, Juvenilhormon-Analoga und Ecydysteroid-Agonisten. Schon vor ca. 30 Jahren wurde erstmals von Williams (1967) vorgeschlagen, dass Verbindungen, die als Insektenhormone ihre endokrine Wirkung entfalten, ein Potential als Insektizide besitzen könnten. Die Vorteile der Insektenwachstums-Regulatoren liegen in ihrer geringen Toxizität gegenüber Vertebraten, in hoher Selektivität und Artenspezifität selbst innerhalb der Invertebraten. Da sie gezielt in Stoffwechselwege der Arthropoden eingreifen, können sie deren Entwicklung empfindlich stören.

Die Entwicklung der Insekten wird durch das Zusammenspiel mehrerer Hormone kontrolliert. Larven-Stadien und deren Häutungsprozesse als auch die Metamorphose zum adulten Tier werden durch Peptidhormone, Juvenilhormone und Ecdysteroide reguliert (Henrich et al. 1999, Spindler-Barth & Spindler, im Druck). Mittlerweile werden über 100 polyhydroxylierte Steroide, die im Gegensatz zu den Steroiden der Vertebraten das komplette C²⁷-Kohlenstoff-Gerüst aufweisen und in einer nicht-planaren Konfiguration vorliegen, zu den Ecdysteroiden gezählt. Arthropoden sind nicht in der Lage, das Steroid-Grundgerüst *de novo* zu synthetisieren, sondern müssen es über die Nahrung aufnehmen (Spindler 1991). Wie auch für Vertebraten bekannt, sind Cytochrom-P450abhängige Enzyme an der weiteren Modifikation des Steroidgerüstes beteiligt (Gilbert et al. 1997), die sich wie auch der Hormon-Metabolismus Spezies-spezifisch unterscheiden kann (Spindler et al., im Druck).

Namensgebend für die Ecdysteroide, die sich strukturell vom Cholesterol ableiten, war das Ecdyson (Abb. 46), dessen regulatorische Funktion bei der Insekten-Häutung schon lange bekannt ist. Schon vor gut 45 Jahren wurde Ecdyson erstmals isoliert (Butenand & Karlson 1954) und ein Jahrzehnt später die Struktur aufgeklärt (Huber & Hoppe 1965). Die funktionelle Definition (alle Ecdysteroide sind Insekten-Hormone) musste bald einer strukturellen Definition weichen, da sich das Vorkommen der Ecdysteroide keineswegs auf Arthropoden beschränkt (Slama et al. 1996), sondern auch Coelenteraten, Plathelminten, Nemathelminten, Mollusken, Anneliden und die im Organisations-Niveau höherentwickelten Echinodermen einschliesst (Rees 1989). Selbst aus Pflanzen wurden mittlerweile mehr als 150 Verbindungen isoliert, die als "Phytoecdysteroide' bezeichnet werden (Lafont & Horn 1989, Dinan et al. 1997).

Als die innerhalb der Gliederfüsser weit verbreitete und physiologisch aktivste Form der Ecdysteroide gilt 20-Hydroxy-Ecdyson (Abb. 46). Allerdings konnte vor Kurzem nachgewiesen werden, dass auch Ecdyson an der Metamorphose des Tabakschwärmers *Manduca sexta* gewebespezifisch involviert ist (Champlin & Truman 1998, Fisk & Thummel 1998). Bei einigen Schnabelkerfen (Blattläuse, Wanzen) und Hautflüglern (Wespen, Bienen, Ameisen) ist auch Makisteron A, ein weiteres Mitglied der Ecdysteroide, an der Regulation der Häutung beteiligt (Feldlaufer 1989).

Während der Insektenentwicklung zur Imago wird Ecdyson in den Prothoraxdrüsen synthetisiert und in den Zielgeweben durch Hydroxylierung in das aktivere 20-Hydroxy-Ecdyson umgewandelt. Die endokrine Ausschüttung in die Hämolymphe steht durch den Einfluss des prothoracicotropen Hormons (PTTH) unter neurosekretorischer Kontrolle (Henrich et al. 1999). Neben diesem hierarchischen Prinzip wird das Hormon auch autoregulatorisch kontrolliert. So unterliegt die Ecdysteroid-Konzentration während der larvalen Entwicklung bis zum adulten Tier deutlichen Schwankungen. Durch Regulationen auf Ebene der Synthese und Sekretion in die Hämolymphe einerseits und auf Ebene der Exkretion und Degradation in weniger aktive Produkte wie das 26-Hydroxy-Ecdyson andererseits kann der Hormontiter verändert werden (Williams et al. 1996).

Die umfangreichsten Untersuchungen zur hormonellen Regulation postembryonaler Entwicklungsprozesse wurden mit der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Diptera) durchgeführt. Das temporäre Signal, das die larvalen Häutungsprozesse gewebespezifisch reguliert, ist 20-Hydroxy-Ecdyson. Zu Beginn des letzten Larvenstadiums treten zusätzliche Effekte auf. Definierte Wechsel der Hormon-Konzentration führen zu einer Serie von Veränderungen im Verhalten und der Entwicklung, bis die Verpuppung und Differenzierungs-Prozesse zum adulten Tier abgeschlossen sind. Zu Anfang stellt die Larve das Fressen ein und beginnt zu wandern, bis sie sich schliesslich auf einen geeigneten Untergrund festsetzt. In diesem Stadium wird mit der Metamorphose der letzte Entwicklungs-Schritt holometaboler Insekten vollzogen (Riddiford 1996, Henrich et al. 1999). Dabei reguliert 20-Hydroxy-Ecdyson zwei divergente Entwicklungsvorgänge: Larvales Gewebe wird abgebaut, während sich imaginales Gewebe (Imaginalscheiben) in determinierte adulte Strukturen differenziert (Karim & Thummel 1992).

In alle Entwicklungsprozesse ist auch das Juvenilhormon, das den Charakter der Häutung bestimmt, beteiligt (Hodin & Riddiford 1998). Hohe Konzentrationen in der Hämolymphe erhalten den juvenilen Typ der Häutung und erst das Absinken des Hormon-Titers lässt die Häutung zur Imago zu. Auch das Juvenilhormon steht unter hierarchischer Kontrolle durch die Neuropeptid-Hormone Allatropin und Allastatin.

Bereits vor gut 20 Jahren wurde mit Methopren eine Terpenoid synthetisiert, das als Juvenilhormon-Analog (JHA) zur kommerziellen Schädlingsbekämpfung eingesetzt wurde (Staal 1975). Aufgrund der JH-analogen Wirkung führt die Anwendung ganz allgemein zu abnormer Larvenentwicklung. Die Effizienz im Pflanzenschutz war allerdings eingeschränkt, da die Substanz unter Feldbedingungen nicht sehr stabil ist und der toxische Effekt nur langsam eintritt (Dhadialla et al. 1998).

Der Einsatz natürlicher Häutungshormone hat sich nicht bewährt, da sie für eine eventuelle Synthese in ihrer Struktur zu komplex sind (Watkinson & Clarke 1973). Weiterhin sind sie durch leicht hydrophilen Charakter und photolytischer Anfälligkeit unter Freilandbedingungen nicht sehr effektiv und können darüber hinaus vom Tier schnell wieder ausgeschieden oder metabolisiert werden.

Mittlerweile sind z.B. mit Fenoxycarb, Pyriproxyfen und Diofenolan nicht-terpenoide Juvenilhormon-Analoge auf dem Markt, die wesentlich effekiver sind (Grenier & Grenier 1993, Miyamoto et al. 1993, Sechser et al. 1994). Der Nachteil dieser Verbindungen liegt im relativ breiten Wirkspektrum innerhalb der Insekten, sodass auch nicht-Schädlinge betroffen sein können. Für Fische, Vögel und Säugetiere besteht allerdings nur sehr geringe Toxizität (Dhadialla et al. 1998). Interessanterweise ist zwar die Wirkung der JHA's schon lange bekannt, aber der molekulare Mechanismus noch ungeklärt. Das heisst, dass man das ,target' von Juvenilhormon bzw. Analogen noch nicht zweifelsfrei nachweisen konnte. Thomas et al. (2000) schlagen mit der JuvenilhormonEsterase, die an der Regulation des JH-Titers beteiligt ist, ein anderes Zielprotein vor, auf dessen biologischer Basis neue Insektizide entwickelt werden könnten.

Eine Alternative zu den JHA's stellen die Ecdysteroid-Agonisten dar. 1983 wurde erstmals ein Diacylhydrazin als nicht-steroidaler Ecdysteroid-Agonist entdeckt (Hsu 1991). Weitere chemische Modifikationen führten schon bald zur Verbindung RH-5849 (Abb. 46), für die erstmals auch insektizide Eigenschaft nachgewiesen werden konnte (Wing et al. 1988). In Larven des Tabakschwärmers *Manduca sexta* bewirkt RH-5849 nach wenigen Stunden ein vorzeitiges Einstellen der Nahrungsaufnahme. Gleichzeitig wird mit der Ausbildung einer neuen Kutikula der Häutungsprozess begonnen. Die effektive Diacylhydrazin-Konzentration verhindert aber die Freisetzung des Eclosion-Hormons (Schlüpfhormon), dessen Ausschüttung im Normalfall erst durch einen abfallenden Ecdysteroid-Titer stimuliert wird. Damit fehlt ein notwendiges Häutungssignal, was letztlich zum Absterben der Tiere führt. In allen bisher untersuchten Schmetterlingen rufen RH-Verbindungen die Effekte des 20-OH-Ecdysons hervor, führen aber zu lethalen Häutungen (Wing & Aller 1990, Smagghe & Degheele 1992, Pszczólkowski & Kuszcak 1996, Farkas & Slama 1999, Swevers & Iatrou 1999). Die Toxizität für Krebse, Fische, Vögel und Säuger ist nur sehr gering (Dhadialla et al. 1998).

Mit RH-5992 (Tefubenozid, Abb. 46) konnte ein weiteres Diacylhydrazin synthetisiert werden (Heller et al. 1992), das in seiner insektiziden Wirkung wesentlich effizienter ist mit hoher Schmetterlings-Spezifität (Retnakaran et al. 1995, Sundaram et al. 1998) und für Läuse, Wanzen, Schrecken und Käfer nicht toxisch ist (Slama 1995, Smagghe & Degheele 1995). Ein weiteres Diacylhydrazin RH-2485, das erst vor 4 Jahren vorgestellt wurde, soll die Effektivität von Tefubenozid noch signifikant übertreffen (Le et al. 1996). Weitere nicht-steroidale Ecdysteroid-Agonisten, die sich in ihrer molekularen Struktur von den RH-Verbindungen deutlich unterscheiden, sind in den letzten Jahren synthetisiert (DTBHIB, Mikitani 1996) bzw. aus Pflanzenextrakten isoliert worden (8-O-Acetylharpagid, Elbrecht et al. 1996).

Im Gegensatz zu den Juvenilhormon-Analogen ist für Ecdysteroid-Agonisten der molekulare Wirkmechanismus dieser Verbindungen bekannt. Wie auch durch das natürliche Häutungshormon 20-Hydroxy-Ecdyson wird die hormonelle Wirkung über ein Rezeptor-Protein vermittelt und dadurch die Expression Ecdysteroid-abhängiger Gene moduliert. Neben den bisher beschriebenen Funktionen während der larvalen Häutung und Metamorphose kommen den Ecdysteroiden weitere Funktionen bei der Entwicklung der Arthropoden zu, da sie auch an der Regulation der Diapause, Spermatogenese und Eireifung beteiligt sind ("Pleiotropie").

Aufgrund dieser Vielfältigkeit der durch 20-Hydroxy-Ecdyson vermittelten Effekte stellte man sich die Frage, durch welchen molekularen Mechanismus die regulatorische Funktion der Steroide überhaupt erklärbar wäre. Eine erste Antwort lieferten Clever & Karlson (1960), die demonstriert haben, dass gereinigtes Ecdyson nach Injektion in Larven der Zuckmücke *Chironomus tentans* die Ausbildung veränderter ,Puff[°]-Strukturen an polytänen Chromosomen von Speicheldrüsen bewirkte. Diese Beobachtung lieferte einen Hinweis, dass Steroidhormone in bestimmten Geweben die Genexpression beein-

flussen und führte zur Hypothese eines Ecdysteroid-Rezeptors, der als Ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor an der Regulation beteiligt ist (Karlson 1963). Ein Jahrzehnt später wurde von Ashburner (1974) durch Untersuchungen von Speicheldrüsen aus *Drosophila melanogaster* dieses Modell erweitert. Nach einem hierarchischen Prinzip stimuliert Ecdyson zu Beginn der Metamorphose die Aktivität ,früher Gene' und reprimiert gleichzeitig die Aktivität ,später Gene' (direkte Antwort). Die Produkte früher Gene aktivieren als Transkriptionsfaktoren eine Vielzahl später Gene, wobei gleichzeitig ihre eigene Expression reprimiert wird.

Das "Ashburner-Modell" der durch Ecdysteroide zeitlich koordinierten Regulation der Genexpression ist in den letzten Jahren vielfach bestätigt und verfeinert worden (Karim & Thummel, Hill et al. 1993, Thummel 1995). Mittlerweile sind mehr als 100 Ecdysteroid-induzierbare Gene bekannt, von denen einige für Transkriptionsfaktoren kodieren, die während der larvalen Entwicklung und Metamorphose Gewebe- und Stadienspezifisch exprimiert werden (Buszczak & Segraves 1998, Fisk & Thummel 1998, Lan et al. 1999). Einige Jahre später konnte der Rezeptor für Ecdysteroide in Imaginalscheiben von *Drosophila melanogaster* (Yund et al. 1979) bzw. in einer Insekten-Zellinie von *Chironomus tentans* (Turberg et al. 1988) nachgewiesen werden. Koelle et al. (1991) und Imhof et al. (1993) konnten die Strukturgene, die für die Rezeptoren dieser beiden Spezies kodieren, sequenzieren.

Der Ecdysteroid-Rezeptor (EcR) ist ein Mitglied der Familie nukleärer Rezeptoren, die die Expression von Genen regulieren, die an Entwicklung, Reproduktion und Homöostase beteiligt sind. Von ihnen sind innerhalb der Invertebraten und Vertebraten über 150 bekannt (Tenbaum & Baniahmad 1997). Sie repräsentieren eine evolutiv sehr konservierte Klasse von Transkriptionsfaktoren, die im Gegensatz zu Membrangebundenen Rezeptoren im Zellkern kleine, lipophile Hormon-Moleküle binden können und als Liganden-abhängige Transkriptionsfaktoren durch Bindung an kurze spezifische DNA-Elemente (,hormone responsive elements') die Expression benachbarter Gene (,hormone responsive genes') modulieren (Evans 1988, Mangelsdorf et al. 1995).

Mehrere Klassifizierungen der nukleären Rezeptoren (NR's) werden vorgeschlagen. Bezogen auf den Liganden gibt es die Steroidhormon-Rezeptoren (Glucocorticoide, Mineralocorticoide, Androgene, Östrogene), nicht-Steroid-Rezeptoren (Thyroxin, Retinsäure, Vitamin-D₃, Prostaglandine) und sogenannte Orphan-Rezeptoren, für die keine Liganden bekannt sind (Laudet & Adelmant 1995, Mangelsdorf & Evans 1995, Blumberg & Evans 1998). Augrund ihrer Fähigkeit zur DNA-Bindung ist eine andere Einteilung möglich. Danach sind Typ I Steroidhormon-Rezeptoren (SHR) der Vertebraten in Abwesenheit des Liganden mit Hitzeschock-Proteinen assoziiert und im Cytoplasma lokalisiert (Tsai & O'Malley 1994). Hormonbindung führt zu einer Konformationsänderung, sodass aggregierte Proteine dissoziieren und nach Homodimerisierung und Translokation in den Kern spezifische Bindung an palindromischen DNA-Sequenzen möglich wird. Typ II wird durch Rezeptoren für Thyroxin, Retinsäure und Vitamin-D₃ repräsentiert, die im Kern lokalisiert sind und in Abwesenheit des Liganden DNA-Sequenzen (bevorzugt ,direct repeats') als Heterodimer mit Retinsäure-X-Rezeptor (RXR) binden können. Durch Hormonbindung findet eine Konformationsänderung statt, die die transkriptionelle Kontrolle beeinflusst. Orphan-Rezeptoren stellen Typ III und IV dar, je nach dem, ob sie als Monomer oder Homodimer DNA binden können (Mangelsdorf et al. 1995).

Allen NR's ist der strukturelle Aufbau, der erstmals für den Glucocorticoid-Rezeptor nachgewiesen wurde (Hollenberg et al. 1985), gemeinsam. So werden nukleäre Rezeptoren nach einem ,5-Domänen-Konzept' untergliedert in eine hochvariable A/B-Domäne am N-Terminus, eine C-Domäne (DNA-bindende-Region), eine "hinge'-Region (D-Domäne), eine E-Domäne (Liganden-Bindung) und eine C-terminale F-Domäne (Abb. 42). Aufgrund der Strukturähnlichkeit und des phylogenetisch weit verbreiteten Vorkommens geht man von einem evolutiv gemeinsamen "Vorläufer-Protein" aus (Tenbaum & Baniahmad 1997). Die DNA-bindende Domäne (DBD) ist für die spezifische ,hormone responsive element'-Erkennung essentiell (Freedman 1992). Charakteristisch sind zwei hochkonservierte "Zinkfinger-Motive", die über jeweils 4 Cystein-Reste verfügen, die je ein Zn²⁺-Ion komplexieren können. Hohe Sequenz-Spezifität wird eher über das näher am N-Terminus gelegene Motiv vermittelt (Umesono & Evans 1989), während der zweite "Zinkfinger' den Rezeptor-DNA-Komplex stabilisiert (Power et al. 1992) und auch eine Funktion zur Dimerisierung besitzt (Henrich & Brown 1995). Allerdings sind noch weitere N- und C-terminale Bereiche der DBD für die effiziente DNA-Bindung erforderlich (Mader et al. 1993). Kürzlich wurde mit DAX1 ein weiteres Mitglied identifiziert, dessen DNA-bindendes Motiv von bisher beschriebenen Rezeptoren deutlich abweicht (Zanaria et al. 1994).

Der N-terminale Bereich ist innerhalb der NR's sowohl in Länge als auch Aminosäuresequenz hochvariabel und charakterisiert durch eine Liganden-unabhängige transaktivierende Funktion AF-1 (trans- \underline{a} ctivation \underline{f} unction) (Hollenberg & Evans 1988, Tasset et al. 1990). In der Liganden-bindenden Domäne (LBD) nukleärer Rezeptoren sind mehrere Funktionen lokalisiert. Neben der Hormon-Bindung ist diese Region auch in Dimerisierung und Liganden-abhängiger Transaktivierung (AF-2) involviert. Ein Kuriosum stellt der Orphan-Rezeptor SHP (\underline{s} hort \underline{h} eterodimer \underline{p} artner) dar, der einzig aus einer LBD besteht (Johansson et al. 2000).

Weiterhin verfügt der C-terminale Rezeptor-Abschnitt über Motive, die die Bindung regulatorischer Cofaktoren (Aktivatoren/Repressoren) ermöglicht (Glass et al. 1997, Torchia et al. 1998). In Abhängigkeit des Liganden werden sowohl transkriptionelle Repression als auch Aktivierung der Rezeptoren durch Comodulatoren reguliert (Leo et al. 2000). Für einige Typ II-Rezeptoren, die in einem Komplex mit den Corepressoren SMRT (silencing mediator for RXR and TR) und NCoR (nuclear receptor co-repressor) vorliegen können, konnte gezeigt werden, dass sie in Abwesenheit eines Liganden basale Transkription reprimieren (Horlein et al. 1995, Chen & Evans 1995). In diesen Komplexen wurden auch Histon-Deacetylasen identifiziert, die vermuten lassen, dass die Struktur der Nukleosomen an der Regulation der Transkription beteiligt ist (Alland et al. 1997). Mittlerweile wurde mit "Alien" ein weiterer Corepressor identifiziert, der auch in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* nachgewiesen werden konnte (Dressel et al. 1999). Liganden-Bindung führt zur Dissoziation von Corepressoren. Durch nachfolgende Konformationsänderung der LBD wird die Bindung von Coaktivatoren

erleichtert und dadurch die transkriptionelle Aktivierung der Rezeptoren begünstigt (Nolte et al. 1998).

In diese Aktivierung sind Histon-Acetylasen involviert. Zur Bindung an nukleäre Rezeptoren besitzen Cofaktoren ein gemeinsames LXXLL-Motiv (Heery et al. 1997, Johansson et al. 2000). Nagy et al. (1999) postulieren dieses Motiv auch als Bindestelle von Corepressoren. Weitere Coaktivatoren wurden mittlerweile identifiziert (McKenna et al. 1999) und zur Familie der Steroid-Rezeptor-Coaktivatoren (,SRC family') zusammengefasst (Leo & Chen 2000). Mit RAC3 (<u>r</u>eceptor <u>a</u>ssociated <u>c</u>oactivator 3) wird von einem Cofaktor berichtet, der durch Bindung an das typische LXXLL-Motiv die Funktion verschiedener nukleärer Rezeptoren unterschiedlich regulieren kann (Leo et al. 2000).

Neben der DNA-Spezifität verschiedener Rezeptor-Variationen (Monomere, Homodimere, Heterodimere) und dem Einfluss von Coaktivatoren/Corepressoren bzw. der Chromatin-Struktur (Acetylierung/Deacetylierung der Histone) kann die Gewebe- und Entwicklungs-spezifische Regulation der hormonellen Signaltransduktion auch durch veränderte Rezeptor-Konzentrationen moduliert werden. Weiterhin sind eine Reihe von Rezeptor-Isoformen innerhalb der Vertebraten und Invertebraten nachgewiesen worden, die sich nur in der N-terminalen Region unterscheiden und häufig von einem Strukturgen kodiert werden und durch alternatives Splicen hervorgehen. Z.B. existiert RAR in einer α -, β - und γ -Isoform (Krust et al. 1989). Dabei scheint die Existenz von Isoformen eher die Regel als eine Ausnahme zu sein (Keightley 1998).

Eine weitere Möglichkeit der Regulation ist auf der Ebene posttranslationeller Modifikation gegeben. Reversible Phosphorylierungen von Proteinen sind in viele biochemische Prozesse involviert. Vor wenigen Jahren konnten Kuiper & Brinkmann (1994) die Steroidhormon-Rezeptoren der Vertebraten als Phosphoproteine identifizieren. Diese Charakteristik wurde von Weigel (1996) für alle Vertebraten-NR's erweitert. Auch wenn noch kein einheitliches Modell der Rezeptor-Phosphorylierung existiert und die physiologische Bedeutung noch nicht klar verstanden wird, gibt es Hinweise dafür, dass posttranslationelle Modifizierungen via Phosphorylierung beteiligt sind an Aktivierungsprozessen, Dimerisierung, Modulation der DNA-Erkennung, Interaktion mit anderen Faktoren, Rezeptor-Halbwertzeiten und am Transport zwischen Cytoplasma und Kern (Kuiper & Brinkmann 1994, Weigel 1996).

Rauch et al. (1998) haben zeigen können, dass der Ecdysteroid-Rezeptor (EcR) aus einer Dipteren-Zellinie von *Chironomus tentans* und sein Heterodimerisierungs-Partner ,Ultraspiracle' (USP) in mehreren Phosphorylierungs-Zuständen vorkommen. Damit konnte die Phosphorylierung nukleärer Rezeptoren erstmals für Invertebraten nachgewiesen werden. Auch für den Schmetterling *Manduca sexta* wurde gezeigt, dass USP phosphoryliert ist (Song & Gilbert 1998).

USP ist das Insekten-Homolog zu RXR aus Vertebraten (Oro et al. 1990, Henrich et al. 1990), während EcR Sequenzähnlichkeit mit dem Farnesol-X-Rezeptor (FXR) der Vertebraten aufweist (Forman et al. 1995). Der funktionelle Ecdysteroid-Rezeptor, der Li-

ganden-abhängig die Expression Ecdysteroid-abhängiger Gene moduliert, ist ein Heterodimer aus EcR und USP, wobei ,Ultraspiracle' funktionell durch RXR ersetzt werden kann (Yao et al. 1993, Thomas et al. 1993). Dieses Modell, das erstmals für *Drosophila* vorgeschlagen wurde, konnte mittlerweile auch für *Bombyx mori* (Swevers et al. 1996), *Aedes aegypti* (Kapitskaya et al. 1996), *Chironomus tentans* (Elke et al. 1997), *Manduca sexta* (Song et al. 1997), *Choristoneura fumiferana* (Perea et al. 1999), *Anthonomus grandis* (Dhadialla & Tzertzinis 1997), *Amblyomma americanum* (Guo et al. 1997), *Amblyomma hebraeum* (Mao & Kaufman 1998) und für den Crustaceen *Uca pugilator* (Chung et al. 1998) bestätigt werden. Offensichtlich scheint bei der Wahl des Heterodimerisierungs-Partners eine gewisse ,Flexibilität' zu bestehen, denn sowohl für EcR (Zelhof et al. 1995) als auch USP (Sutherland et al. 1995) konnte gezeigt werden, dass sie auch mit anderen NR's heterodimerisieren.

Die Klassifizierung der Rezeptor-Superfamilie in 4 Typen (I-IV) basiert auf molekularbiologischen und biochemischen Ergebnissen innerhalb nukleärer Rezeptoren der Vertebraten. Für EcR und USP der Invertebraten ist eine klare Zuteilung in eine bestimmte Klasse nicht möglich. Zwar wird EcR eher dem Typ II zugeordnet, da Rezeptoren dieser Klasse mit RXR heterodimerisieren und auch in Abwesenheit eines Liganden als Heterodimer DNA binden können. Allerdings erfüllt EcR auch Charakteristika eines Typ I-Rezeptors gegeben durch einen steroidalen Liganden (Ecdysteroide) und die Lokalisation im Kern und Cytoplasma (Lammerding-Köppel et al. 1998, Rauch et al. 1998). Vor Kurzem wurde berichtet, dass zum Einen im EcR/USP-Komplex von Manduca sexta Chaperone assoziiert sind (Song & Gilbert 1997) und zum Anderen zur Aktivierung des EcR/USP-Komplexes aus Drosophila melanogaster Hitzeschock-Proteine notwendig sind (Arbeitman & Hogness 2000). Interessanterweise war die Notwendigkeit assoziierter Chaperone zur Rezeptor-Aktivierung bisher auf Steroidhormon-Rezeptoren des Typ's I beschränkt (Pratt & Toft 1997). Dagegen scheint USP ein Vertreter der Orphan-Rezeptoren zu sein, für die keine Liganden bekannt sind und als Dimer DNA binden können. In zwei Arbeiten wird USP als lang gesuchter Juvenilhormon-Rezeptor vorgeschlagen (Jones & Sharp 1997, Jones & Jones 2000). Ein hinreichender Beweis steht allerdings noch aus, sodass USP auch weiterhin als typischer Vertreter der Orphan-Rezeptoren betrachtet werden muss.

Zwei Promotoren des EcR-Gens aus *Drosophila* und alternatives Splicen führen zu den Rezeptorvarianten EcR-A, EcR-B1 und EcR-B2, die sich nur in der N-terminalen Sequenz unterscheiden (Talbot et al. 1993). Damit wurde zum ersten Mal auch für Invertebraten gezeigt, dass NR's in verschiedenen Isoformen gebildet werden. Diese Isoformen werden Stadien- und Gewebe-spezifisch exprimiert mit unterschiedlichen regulatorischen Funktionen (Hodin & Riddiford 1998, Henrich et al. 1999, Lezzi et al. 1999). EcR-Isoformen mit zeitlich verändertem Expressions-Muster konnten auch in den Schmetterlingen *Manduca sexta* (Jindra et al. 1996) bzw. *Bombyx mori* (Kamimura et al. 1997) und im Mehlkäfer *Tenebrio molitor* (Mouillet et al. 1997) nachgewiesen werden.

Zwei USP-Isoformen, die bisher in Gelbfiebermücken (Aedes aegypti), Tabakschwärmern (Manduca sexta), Schildzecken (Amblyomma americanum) und Zuckmücken (*Chironomus tentans*) charakterisiert wurden (Kapitskaya et al. 1996, Jindra et al. 1997, Guo et al. 1998, Vögtli et al. 1999), konnten in Fruchtfliegen (*Drosophila*) nicht nachgewiesen werden. Die Beobachtungen, dass USP-Isoformen aus *Manduca* entwicklungsspezifisch exprimiert werden (Hiruma et al. 1999) und nach Heterodimerisierung die Hormonbindung des EcR aus *Chironomus* unterschiedlich beeinflussen (Vögtli et al. 1999) und auch die DNA-Spezifität der EcR/USP-Varianten verändern können (Lan et al. 1999), beschreiben USP mittlerweile als einen "aktiven Regulator" des Ecdysteroid-Rezeptors.

In den letzten Jahren konnte auf verschiedenen Ebenen das Verständnis der molekularen Wirkungsweise nukleärer Rezeptoren deutlich gesteigert werden. Z.B. kann durch die Charakterisierung neu identifizierter transkriptioneller Mediatoren (Intermediärfaktoren, Coactivatoren/Corepressoren) und deren Einfluss auf die Chromatinstruktur ein erweitertes Modell der Interaktion zwischen NR's, Mediatoren, Chromatin und der basalen Transkriptionsmaschinerie entwickelt werden (Glass et al. 1997, Wolffe 1997, Pazin & Kadonaga 1997). Auch die Identifizierung von Liganden neuer oder schon bekannter ,Orphans' zählt zu aktuellen Schwerpunkten der Hormonrezeptor-Forschung. So haben Kliewer et al. (1998) jetzt zeigen können, dass der Orphan-Rezeptor PXR durch ein Steroidhormon aktiviert werden kann.

Von Bedeutung ist auch die Aufklärung 3-dimensionaler Strukturen von Ligandenbindenden Domänen (LBD's) verschiedener NR's in der apo-Form (ohne Ligand) bzw. holo-Form (mit Ligand) zur Vorhersage einer generellen Struktur der LBD's aller nukleärer Rezeptoren (Moras & Gronemeyer 1998). Durch Röntgen-Analysen konnten bisher die LBD-Kristallstrukturen folgender nukleärer Rezeptoren der Vertebraten aufgeklärt werden: Thyroxin-Rezeptor (TR) (Wagner et al. 1995), Retinsäure-X-Rezeptor (apo-hRXRa) (Bourguet et al. 1995), Retinsäure-Rezeptor (holo-hRAR γ) (Renaud et al. 1995), Östrogen-Rezeptor (holo-ERa bzw. Raloxifen-gebundener ERa) (Brzozowski et al. 1997), Progesteron-Rezeptor (Tanenbaum et al. 1998) und Peroxisomen-Proliferatoraktivierter-Rezeptor (apo- und holo-PPAR γ) (Milburn et al. 1997).

Allen LBD's ist der strukturelle Aufbau gegeben durch 11-12 α -helikale Bereiche und ein β -Faltblatt, die ein dreischichtiges "Sandwich" in antiparalleler Anordnung ausbilden, gemeinsam (Moras & Gronemeyer 1998). Daraus lässt sich eine generelle räumliche Struktur der Liganden-bindenden Tasche nukleärer Rezeptoren ableiten (Wurtz et al. 1996). Anhand eines Homologie-Modells konnte auch eine 3-dimensionale Anordnung der Liganden-bindenden Tasche des EcR aus *Chironomus tentans* berechnet werden, obwohl die Röntgen-Struktur noch nicht aufgeklärt ist (Wurtz et al. 2000).

Die rekombinante Expression und Reinigung von Proteinen hat es nicht nur ermöglicht, Strukturen von DBD's und LBD's einiger Rezeptoren aufzuklären, sondern erlaubt auch funktionelle Untersuchungen einzeln exprimierter Domänen bezüglich ihrer Fähigkeit zur Liganden-, DNA-Bindung, Dimerisierung und Transaktivierung (Chen et al. 1994, Nemoto et al. 1994, Jalaguir et al. 1996). In diesem Zusammenhang ist von Interesse, wie sich die Domänen durch allosterische Wechselwirkungen (,interdomain signaling') in ihrer Funktion beeinflussen können (Doesburg et al. 1997, Kumar et al. 1999). Auch die Liganden-bindenden Domänen von EcR und USP aus *Drosophila* konnten erfolgreich in Bakterien exprimiert und über Affinitäts-Chromatographie gereinigt werden, sodass Untersuchungen der Hormon-Bindung möglich wurden (Halling et al. 1999). Im Gegensatz dazu ist die erfolgreiche bakterielle Expression von funktionellen ,full length'-Proteinen bisher auf Rezeptoren der Vertebraten beschränkt (Wittliff et al. 1990, Ahrens et al. 1992, Swamy et al. 1999). Zwar konnten Elke et al. (1997) mit cEcR und cUSP Rezeptoren eines Invertebraten in *Escherichia coli* exprimieren, die noch DNA binden konnten. Doch weitere Charakterisierungen zeigten, dass die gereinigten Proteine in ihrer Fähigkeit zur Hormon-Bindung deutlich eingeschränkt waren.

I.1 Ziele der Arbeit

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete epitheliale Insekten-Zellinie wurde von Wyss (1982) aus Embryonen der Zuckmücke Chironomus tentans etabliert. Durch Aufzucht der Zellen in ständiger Gegenwart von 20-Hydroxy-Ecdyson bzw. dem Insektizid Tefubenozid (RH 5992) konnten Ecdysteroid-resistente Suklone selektioniert werden (Spindler-Barth & Spindler 1998a). Die Hormon-Sensitivität des Wildtyps bezüglich morphologischer und physiologischer Effekte ist mittlerweile gut untersucht worden (Spindler-Barth et al. 1992, Baumeister et al. 1992, Quack et al. 1995, Rauch et al. 1998, Spindler-Barth & Spindler 1998b, Fretz & Spindler 1999). Die vielfältigen Hormoneffekte sind in resistenten Zellklonen nicht mehr nachzuweisen (Spindler-Barth & Spindler 1998a, Grebe et al. 2000). Ein Aspekt dieser Arbeit bestand darin, die Zellinie mit Defekten in der hormonellen Signaltransduktion näher zu charakterisieren, um mögliche molekulare Ursachen zur Erlangung einer Ecdysteroid-Resistenz aufzuklären. Da Diacylhydrazine mittlerweile als Pestizide eingesetzt werden, können diese Untersuchungen dazu beitragen, Mechanismen der Tefubenozid-Resistenz, die unter längerer Anwendung im Freiland auftreten können, im Labor vorweg zu nehmen. Z.B. konnte vor wenigen Jahren erstmals in einer Population des Apfelwicklers (Cydia pomonella) RH 5992-Insensitivität beobachtet werden (Sauphanor & Bouvier 1995). Neben dem Hormon-Metabolismus sollten vor allem die nukleären Rezeptoren EcR und USP, die als Heterodimer den funktionellen Ecdysteroid-Rezeptor bilden, näher untersucht werden.

Zum besseren Verständnis der Wirkungsweise des funktionellen Ecdysteroid-Rezeptors bestand ein weiteres Ziel darin, die vollständigen Proteine EcR und USP aus *Chironomus tentans* in getrennten Bakterien-Kulturen zu exprimieren und in einer Form zu reinigen, sodass die biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften dieser nukleären Rezeptoren charakterisiert werden konnten. Sowohl die Hormon- als auch DNA-Bindung der Rezeptoren sollte in Abwesenheit und Gegenwart des Heterodimerisierungs-Partners untersucht werden. Zusätzlich sollte geklärt werden, ob weitere Faktoren für die untersuchten Funktionen notwendig sind. Neben der Frage, wie sich vollständige Rezeptor-Proteine intermolekular beeinflussen können, ist von weiterem Interesse, welche Wechselwirkungen zwischen einzeln exprimierten Domänen auftreten können. Dazu sollten die Liganden-bindenden Domänen (LBD's) von EcR und USP aus *Drosophila melanogaster*, die in Hormon-Bindung und Dimerisierung involviert sind, als Gal4-Fusionsproteine in Hefen exprimiert und die Ecdysteroid-Bindung der EcR-LBD in Abwesenheit und Gegenwart des Heterodimerisierungs-Partners charakterisiert werden. Neben den Wildtyp-Konstrukten sollten weiterhin Punktmutationen bzw. Deletionen untersucht werden, um herauszufinden, welche Protein-Sequenz notwendig ist, um eine dem Gesamtmolekül vergleichbare Hormon-Bindung zu erhalten und wie durch Austausch von Aminosäuren die Funktion der LBD's verändert wird.

Diese Untersuchungen können dem weiteren Verständnis der molekularen Interaktion zwischen Hormon bzw. Ecdysteroid-Agonisten und dem Ecdysteroid-Rezeptor dienen und dazu beitragen, neue Arthropoden-spezifische Insektizide mit verbesserten Eigenschaften zu synthetisieren (,directed drug design^c).

II Material und Methoden

II.1 Material

II.1.1 Chemikalien

- Acrylamid Adenin
- Aminosäuren (s. II.2.3.1)
- BSA
- DTT
- 20-OH-Ecdyson
- ECL Western Blotting Reagent
- Glutathion
- Glutathion Sepharose 4B
- Hefe Stickstoff Base
- IPTG
- Lithiumacetat
- LSC-Cocktails

•	Methanol
•	Methopren
•	Molekulargewichts-Standard

- Muristeron A
- PEG 3350
- Pepton
- Ponceau S Concentrate
- Proteaseinhibitoren: •
 - Antipain Sigma Sigma
 - Aprotinin

MDE-Gelsolution, Serva, distributed by Boehringer, Ingelheim Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen Sigma Sigma Sigma Dr. Farkas, Szeged, Ungarn Amersham, Buckinghamshire/England Sigma Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden Difco Laboratories, Detroit, MI, USA Boehringer Mannheim GmbH Sigma Emulsifier-Safe, Canberra Packard, Frankfurt Filter-Count, Canberra Packard Ultimo-FloM (HPLC), Canberra Packard HPLC-Reagent, J.T. Baker Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg SDS-PAGE, 29-205 kDa, Sigma Sigma Sigma Difco

Sigma

Sigma
Sigma
Sigma
Sigma
Sigma
Rohm & Haas Company, Spring House,
PA, USA
Sigma
Sigma
Sigma

Nicht explizit aufgeführte Chemikalien wurden von verschiedenen Herstellern bezogen. Alle Chemikalien (ausgenommen Methanol mit HPLC-Qualität) lagen in p.A.-Qualität vor.

II.1.2 Immunochemikalien

•	Anti-D-EcR, polyklonal, IgG-Kaninchen	pABcE/D gerichtet gegen die 'D-Domäne'
		des EcR, freundlicherweise von Prof. Lezzi,
		ETH Zürich, zur Verfügung gestellt
•	Anti-USP, monoklonal, IgG-Maus	AB11, gerichtet gegen die DNA-Domäne
		des Drosophila-USP, freundlicherweise von
		Dr. Kafatos, New York, zur Verfügung ge-
		stellt
•	Anti-GST, monoklonal, IgG-Maus	# G-1160, Sigma
•	Anti- Gal4-AD, monoklonal, IgG Maus	# 5398-1, Clontech Laboratories, CA, USA
•	Anti-Gal4-DBD, polykl., IgG-Kanincher	n# sc-577, Santa Cruz Biotech, CA, USA
	Anti-Kaninchen-IgG	# A-6667 mit Peroxidase gekonnelt Sigma
•	And Rammenen 150	"I 0007 mit i croxiduse gekoppen, sigma
•	Anti-Maus-IgG	# A-5906 mit Peroxidase gekoppelt, Sigma

II.1.3 Radiochemikalien

 [³H]-Ponasteron A
 Spezifische Aktivität 213 Ci/mmol, freundlicherweise von Prof. Kayser (Syngenta, Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt • [³²P]-Oligonukleotide

siehe II.1.5

II.1.4 Biologisches Material

• Epitheliale Zellinie von *Chironomus tentans:*

Die hormonsensitive, epitheliale Zellinie wurde von Wyss (1982) etabliert und der Arbeitsgruppe Spindler-Barth freundlicherweise von Prof. Lezzi (ETH Zürich) zur Verfügung gestellt. Seit 1986 wird die Zellkultur im Institut gehalten. Ausgehend von dieser Linie erfolgte die Selektion einzelner Klone, die gegen 20-Hydroxy-Ecdyson bzw. den nicht steroidalen Ecdysteroid-Agonisten RH 5992 resistent sind (Spindler-Barth & Spindler 1998).

- *Escherichia coli* Stamm BL21 (DE3) (Studier et al., 1990)
 Ausgehend von einer ausplattierten Einzelkolonie (s. II.2.2.1) wurden kompetente Zellen nach Hanahan (1985) hergestellt und als Glyzerin-Stocks bis zur Verwendung bei –80°C aufbewahrt.
- *Saccharomyces cerevisiae* Stamm Y190 (Harper et al, 1993): Kultivierung der Hefezellen wurde gemäss den Instruktionen des Clontech Handbuches durchgeführt (handbook PT3024-1, Clontech Laboratories, CA, USA). Hefe-Transformationen wurden mit Lithiumacetat durchgeführt (Guthre & Fink 1991)

II.1.5 DNA-Elemente

• Plasmide zur Transformation von Bakterien:

Das für cEcRH (Imhof et al. 1993) kodierende DNA-Fragment wurde in die *Bam*H1 Schnittstelle des *E. coli* Plasmids pGEX-KT (Hakes und Dixon 1992) kloniert. Die für CtUSP-2 (Vögtli et al. 1999) kodierende Sequenz wurde in die *Hind*III Schnittstelle von pGEX-KG (Guan und Dixon 1991) kloniert. Die Expressionsplasmide wurden freundlicherweise von Dr. Elke (Universität Ulm) zur Verfügung gestellt.

• Plasmide zur Transformation von Hefen:

Die für die Liganden-bindende Domäne (LBD) des EcR aus *Drosophila* kodierende Sequenz wurde in den Expressionsvektor pACT2 (Li et al. 1994) kloniert. Entsprechend wurde die Sequenz der LBD des *Drosophila* USP in den Vektor pAS2-1 (Harper et al. 1993) kloniert. Als Gal4-AD-dEcR- bzw. Gal4-DBD-cUSP-Konstrukte wurden die Plasmide zur Expression der Wildtyp-Domänen von Prof. Lezzi (ETH Zürich, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Ausgehend von den Wildtyp-Sequenzen wurden durch site-directed-mutagenesis dEcR-LBD- bzw. dUSP-LBD-Punkt-mutationen und Deletionen hergestellt, die der Arbeitsgruppe Spindler-Barth ebenfalls von Prof. Lezzi als Plasmide überlassen wurden. • Oligonukleotide für Gelverzögerungs-Experimente (EMSA): Folgende mit [a-³²P]-dCTP markierte DNA-Elemente (freundlicherweise von Frau Bader hergestellt, Universität Ulm) wurden zur Untersuchung von DNA-Rezeptor-Interaktionen eingesetzt:

- DR5	5'-GATCTAGAGAGGTCAACGAAAGGTCATGTCCAAG-3'
- PAL1	5'-GATCTAGAGAGGTCAATGACCTTGTCCAAG-3'
- SINGLE	5'-GATCTAGAGAGGTCAACGTTGACCTCCAAG-3'

•	Poly[dI-dC]	Boehringer Mannheim GmbH
•	DNA aus Herings-Sperma	Boehringer

II.1.6 Geräte

Elektrophorese-Apparaturen	SDS-Gel: Biometra, Göttingen
	EMSA-Gel: Modell V15-17, Life Techno-
	logies, GibcoBRL, Gaithersburg, MD, USA
• Filtrationsapparatur	sechsfach, Hölzel
• Flüssigkeits-Szintillationszähler	1600 TR, Canberra Packard, Frankfurt
• Fotokammer	Storage Phosphor Screen,
	35 x 43 cm, Molecular Dynamics,
	Pharmacia Biotech AB, Uppsala,
	Schweden
• Gel-Glasplatten	mit 1mm Spacern, Biometra
• Geltrockner	Modell 583, BioRad Laboratories, CA,USA
Glashomogenator	Allglas Typ Potter, Braun, Melsungen
• HPLC-Anlage	Controller 600, Pump 600, In-Line-
	Degasser, Tunable Absorbance Detektor;
	Fraction Collector; Waters, Eschborn;
	Radiomatic 500 TR, Canberra Packard,
	Frankfurt
• HPLC-Säule	reversed phase column, Radial-Pak, type
	8NVC186, Waters, Milford, MA, USA
• Kühlfalle	Bachhofer, Reutlingen
Mikro-Dismembrator S	B. Braun Biotech International, Melsungen
Phosphorimager	Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia
	Biotech AB
• Scanner	JX-325, Sharp

• Spektrometer	Ultrospec 2000, Pharmacia
• Speed-Vac-Concentrator	Bachhofer
• SPR Spektroskopie	Modell X, Biacore AB, Uppsala, Schweden
• Trans-Blot-Apparatur	cti-GmbH, Idstein
• Trockeninkubator	RO-8, Memmert
• Ultraschall-Tip	Branson Sonifier B-12 Power
	Supply,Branson, Danbury, CT
	Standardresonator 20 kHz mit Mikrospitze
	Nucleonik GmbH
• Umkehr-Durchlicht-Mikroskop	Leitz
• Vakuum-Pumpen	Pfeiffer
	HydroTech, BioRad Laboratories
• Werkbank	Lamin Air HLB 2448, Haraeus
• Zentrifugen	Modell J2-21,Rotor Ja 20, Beckman
	Industrial Estate, Mervue, Galway, Irland
	Megafuge 1.0 R, Haraeus
– Tischzentrifugen	3E-1, Sigma
	5415, Eppendorf
– Ultrazentrifugen	TGA-65, Rotor 23698, Kontron
	RC M120EX, Rotor RP 120 AT, Sorvall
	(Deutschland) GmbH, Bad Homburg

II.1.7 Sonstiges Material

Chromatographie-Papier	3MM, Whatman, Maidstone/England
• Kits	Plasmid Midi Kit, Qiagen, Hilden
	TNT ^R T7/T3 Coupled Reticulocyte Lysate
	System, Promega, Madison
• Molekularsiebchromatographie-Säule	PD-10, Ausschlussgrenze 5kDa,
	Sephadex G25, Pharmacia
Nitrozellulose-Membran	BA85, 0,45µm, Schleicher & Schuell,
	Dassel
Nitrozellulose-Membranfilter	0,45µm, Ø25mm, NC45, Schleicher &
	Schuell
Röntgen-Film	Biomax MR, Kodak

• Software:

- Flo-One 2.0	Canberra Packard
– ImageQuant	Molecular Dynamics
– Phoretix 1D-Gel-Analysis	Nonlinear Dynamics Ltd., Newcastle, UK
– Vice Versa Scan 1.2	Krystec EDV-Beratung, Norderstedt
- Biacore X control software 2.1	Biacore, Uppsala, Schweden
• Sterilfilter	Millex-GV, 0,22µm Filter Unit, Millipore

II.2 Methoden

II.2.1 Chironomus tentans-Zellkultur

Die Zellen wurden in 500 ml bzw. 1000 ml Erlenmeyerkolben (Duran, Schott) bei einem Füllvolumen von maximal 60 ml bzw. 120 ml und einer Temperatur von 25°C in Sus-pensionskultur gezüchtet.

Im Abstand von 10-12 Tagen wurde die Zellkultur in frischem Medium nach Wyss (1982) im Verhältnis 1:10 bzw. 1:20 verdünnt. Durch 10-15maliges Auf- und Abpipettieren mit einer Glaspipette wurden die in einschichtigen, multizellulären Vesikeln wachsenden Zellen durch die dabei entstehenden Scherkräfte wieder zu Einzelzellen dispergiert.

Die Hormon-resistenten Subklone wurden in ständiger Gegenwart von 1 μ M 20-Hydroxy-Ecdyson bzw. 0,1 μ M RH 5992 angezüchtet (Spindler-Barth & Spindler 1998).

Vor dem Ernten der Zellen bzw. vor jeder Verdünnung wurde die Güte und das Wachstum der Zellen mikroskopisch kontrolliert.

II.2.1.1 Inkubation der Zellen mit 20-Hydroxy-Ecdyson

Über eine Inkubationszeit von 4 Tagen wurden den Zellen 20-Hydroxy-Ecdyson, das in einer steril filtrierten (0,22 μ m Millipore) Lösung vorlag, in einer Endkonzentration von 1 μ M zugegeben. Bis zur Ernte wurden die Zellen bei einer Temperatur von 25°C gehalten.

II.2.1.2 Herstellen von *Chironomus* Zellextrakten (verändert nach Quack et al. 1995)

Zur Ernte der Zellen wurden je 50 ml Zellkultur in 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und 4 min. bei 4°C pelletiert (Sigma 3E-1, 2000 rpm). Nach Entnahme des Überstandes wurden die Zellen in Niedersalz-Puffer (NSP) resuspendiert und erneut durch Zentrifugation (20 sec., 4°C, Eppendorf 5415) bei 4°C pelletiert. Die nachfolgend in Hochsalz-

Puffer (HSP) aufgenommenen Zellen wurden durch 10 Schübe in einem eisgekühlten Glashomogenator (Allglas, Braun) aufgeschlossen. Um zu gewährleisten, dass auch die Zellkerne vollständig eröffnet waren, wurde das Zellmaterial dreimal für jeweils 3 sec. mit Ultraschall behandelt (Standardresonator 20 kHz, 90 Watt, Branson Sonifier, Nucleonik GmbH). Das Rohhomogenat wurde in Zentrifugenröhrchen überführt und für 1h bei 100.000 g und 4°C zentrifugiert (Kontron TGA-65, Rotor 23698). Nach Beendigung der Ultrazentrifugation wurde der Überstand ohne die aufschwimmende Lipidschicht abgenommen und sofort auf Eis gestellt.

Da die Hormonbindungs-Kapazität des Ecdysteroid-Rezeptors (EcR) nach längerer Inkubation unter Hochsalz-Bedingungen abnimmt (Turberg et al. 1988), mussten die Extrakte mittels Molekularsiebchromatographie auf Niedersalz umgestellt werden (s. II.2.6.1). Allen Puffern wurde 2-Mercaptoethanol zugegeben, um die reaktiven SH-Gruppen der Rezeptormoleküle, die für die Ausbildung des Hormon-Rezeptor-Komplexes wichtig sind, zu stabilisieren (Dinan & Spindler 1986). Unmittelbar vor Verwendung wurden die oben genannten Puffer mit einem Mix aus Proteaseinhibitoren supplementiert.

•	NSP	20 mM HEPES, 20 mM NaCl, 20% Glyzerin, 1 mM EDTA, 1 mM 2-Mercaptoethanol, pH 7.9
•	HSP	20 mM HEPES, 0,4 M NaCl, 20% Glyzerin, 1 mM EDTA, 1 mM 2-Mercaptoethanol, pH 7.9
•	Protease-Inhibitoren	Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin, je1µg/ml End- konzentration

II.2.2 Expression von *Chironomus* EcR/USP als GST-Fusionsproteine in *E. coli*

pGEX-Plasmide wurden entwickelt zur induzierbaren, intrazellulären ,high level'-Expression von DNA-Fragmenten als Fusion mit *Schistosoma japonicum*-GST (Smith & Johnson 1988). Durch die Konstruktion der Expressionsplasmide pGEX-KT-cEcR und pGEX-KG-cUSP2 konnten cEcR und cUSP als vollständige Rezeptoren fusioniert an die Glutathion-S-Transferase (GST) in Bakterien exprimiert werden.

II.2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA und Transformation kompetenter BL21(DE3)-Zellen

Ausgehend von BL21(DE3)-Einzelkolonien mit den entsprechenden Expressionsplasmiden wurden Starterkulturen in LB-Medium angesetzt und gemäss der Anleitung des Herstellers (Plasmid Midi Prep, Qiagen, Hilden) Plasmid-DNA isoliert.

Je 200 µl nach Hanahan (1985) hergestellte kompetente BL21(DE3)-Zellen wurden aufgetaut und mit 15-20 µg Plasmid-DNA für 30 min. auf Eis inkubiert, 90 sek. unter 42°C-Hitzeschock gesetzt und weitere 2 min. auf Eis inkubiert. Nach Zusatz von 800 µl 2xYTG-Medium pro Ansatz wurden die Zellen für 1 h bei 37°C regeneriert. Nachfolgend wurden 200-400 µl Zellen auf 2xYTGA ausplattiert und \ddot{u}/N inkubiert.

•	LB-Medium	1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1,5% NaCl
•	2xYTG (1L)	16 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, Ampicillin (100 μg/ml), pH 7.0
•	2xYTGA	2xYTG-Medium mit 0.2% Glucose

II.2.2.2 Bakterielle Expression von GST-cEcR/GST-cUSP

ü/N-Kulturen frisch transformierter Bakterien, die nicht älter als 3 Tage waren, wurden mit 2xYTGA-Medium 1:50 verdünnt und bis zu einer $OD_{600} \sim 0.6$ bei 37°C unter Schütteln (150 rpm) inkubiert. Ältere Kolonien und solche, die in Glyzerin eingefroren waren, erwiesen sich als problematisch, sowohl was das Wachstum als auch die Expression anging. Durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,2 mM) zu 400 ml Bakterienkultur wurde die Expression der GST-Fusionsproteine für weitere 3 h bei 28°C induziert. Die pelletierten Zellen (15 min., 4°C, 4000 g) wurden mit PBS gewaschen und in 10 ml TE-Puffer resuspendiert.

•	PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.3
•	TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0

II.2.2.3 Herstellen von E.coli-Rohextrakten

Die unter II.2.2.2 in TE-Puffer resuspendierten Zellen wurden mit DTT (Endkonzentration 5 mM) und PMSF (Endkonzentration 0,5 mM) ergänzt und für 15 min. auf Eis inkubiert. Mit Ultraschall (3x 3 sek, 90 Watt, Branson B-12 Sonifier) wurden die Zellen auf Eis aufgeschlossen und die Rohextrakte bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

II.2.2.4 Affinitäts-Reinigung von GST-cEcR/GST-cUSP

Auf Eis aufgetautes Sonifikat (siehe II.2.2.1) wurde für 20 min. bei 30.000 g und 4°C zentrifugiert (Beckman, JA20 Rotor). Der Überstand wurde entnommen und mit einer 5 M NaCl-Stammlösung eine Salzkonzentration von 0,15 M eingestellt. Nach Zugabe von 2 ml Sepharose (50% slurry Glutathion Sepharose 4B, Pharmacia) pro 10 ml Puffer wurde der Überstand anfangs für 45 min. unter leichtem Schwenken bei 4°C und nachfolgend weitere 45 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Sedimentierte Affinitäts-Matrix (5 min., 4°C, 500 g) wurde 2x mit je 10 ml NSP, 4x mit je 10 ml HSP und abschlie-

ssend 4x mit je 10 ml Elutions-Puffer gewaschen. Im ersten Elutionsschritt wurde die gewaschene Matrix, an der die GST-Fusionsproteine gebunden haben, in 2,5 ml GSH-Puffer resuspendiert und 45 min. bei 4°C gefolgt von weiteren 20 min. bei Raumtemperatur (RT) unter Schwenken inkubiert. Nach Abzentrifugation der Sepharose (5 min. 4°C, 500 g) wurde der Überstand mit gereinigtem GST-cEcR bzw. GST-cUSP abgenommen und in Aliquots bei -80°C eingefroren. Der Elutionsschritt wurde 2x wiederholt mit der Ausnahme, dass Inkubationen nur noch für jeweils 20 min. bei RT durchgeführt wurden.

•	NSP bzw. HSP	s. II.2.1.2
•	Elutions-Puffer	100 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20% Glyzerin, pH 8.0
•	GSH-Puffer	10 mM reduziertes Glutathion, 5 mM DTT, 100 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0

II.2.2.5 Enzymatische Abspaltung von GST mit Thrombin

Zur Entfernung des GST-Anteils wurde die gewaschene Sepharose (s. II.2.2.4), an der die Fusionsproteine gebunden haben, in 5 ml Thrombin-Puffer resuspendiert und für 1 h bei 4°C unter leichtem Schwenken vorinkubiert. Anschliessend wurde die Inkubation für weitere 2 h bei RT fortgesetzt und die Matrix sedimentiert (5 min., 4°C, 500 g). Die Überstände mit gereinigtem cEcR bzw. cUSP wurden bei -80°C in Aliquots gelagert.

Alternativ wurde der GST-Rest eluierter Proteine in Lösung abgespalten. In diesem Fall wurden die Elutionen mit Thrombin (25 U/ml) und Aprotinin (200 pg/ml) supplementiert und für 2 h bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert. Freies GST und nicht geschnittene GST-Fusionsproteine wurden abschliessend durch Affinitäts-Reinigung (s. II.2.2.5) entfernt und die Überstände ebenfalls in Aliquots bei -80°C eingefroren.

• Thrombin-Puffer 20 mM HEPES, 20 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM 2-Mercaptoethanol, 20 % Glyzerin, 40 U/ml Thrombin, 200 pg/ml Aprotinin, pH 7.3

II.2.3 Expression der Liganden-bindenden Domänen von EcR und USP aus Drosophila

Die Liganden-bindenden Domänen (LBD's) nukleärer Rezeptoren aus *Drosophila* wurden als Gal4-Fusionsproteine in der Hefe *S. cerevisiae* exprimiert (Abb. 1).



Abb. 1: Strukturmodell der Gal4-Fusionsproteine, die zur Untersuchung Ligandenbindender Domänen (LBD's) von EcR und USP aus *Drosophila* in der Hefe *S. cerevisiae* exprimiert wurden.

II.2.3.1 Transformation kompetenter Y190-Hefezellen (verändert nach Clontech, Yeast Protocols Handbook PT3024-1)

1 ml YPD-Medium wurde mit einer Einzelkolonie des Hefestammes *S. cerevisiae* Y190 angeimpft. Die Kolonie sollte nicht älter als 3 Wochen sein und einen minimalen Durchmesser von 2-3 mm haben. Um optimales Wachstum zu gewährleisten, wurden die Zellen durch Schütteln suspendiert und erst nachfolgend in 50 ml YPD-Medium überführt.

Die Inkubation bei 30°C und 250 rpm erstreckte sich über 16-18 h bis zum Erreichen der stationären Phase (OD₆₀₀ > 1,5). Nachfolgend wurden 30 ml der ü/N-Kultur mit YPD-Medium 1:10 verdünnt und für weitere ca. 3 h bei 30°C und 250 rpm inkubiert bis zu einer geeigneten OD₆₀₀ ~ 0,5. Der Zellernte bei Raumtemperatur (5 min., 1000 g) folgte ein Waschschritt mit 50 ml sterilem TE-Puffer. Das Zellpellet wurde in 1,5 ml sterilem 1xTE/LiAc resuspendiert.

Die kompetenten Y190-Zellen wurden direkt für die nachfolgende Transformation verwendet. Pro Reaktionsgefäss wurde 0,1 μ g Plasmid-DNA, 0,1 mg Heringssperma-Carrier-DNA (Boehringer), 100 μ l kompetente Y190-Zellen und 600 μ l steriles PEG/LiAc gut gemischt und für 30 min. bei 30°C und 200 rpm inkubiert. In Einzel-Transformationen wurden die Wildtyp-Konstrukte als Plasmide pACT2-dEcR und pAS2-1-dUSP bzw. die durch site-directed-mutagenesis hergestellten Punkt- und Deletionsmutanten eingesetzt. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 70 μ l DMSO gestoppt. Nach einer Hitzeschock-Behandlung für 15 min. bei 42°C wurden die Zellen für 1-2 min. auf Eis gekühlt und anschliessend für 5 sek. mit 10.000 g pelletiert.

Nach Resuspendierung in 500 μ l sterilem TE-Puffer wurden je 100 μ l auf entsprechenden Agar-Medien ausplattiert und bei 30°C für mehrere Tage inkubiert. Wildtyp-Transformanten wurden auf YPD-Vollmedium ausplattiert. Mutanten wurden entsprechend ihrer nach erfolgreicher Transformation erlangten Protothrophie (Leu⁺ bzw. Trp⁺) auf Synthetic-dropout-Minimalmedium (SD) ausplattiert. Als Selektionsmarker kodiert pACT2 für Leucin und pAS2-1 für Tryptophan. Zur Herstellung von Agarplatten wurden 20 g Agar pro L Medium verwendet.

•	YPD-Medium (1L)	20 g Pepton, 10 g Hefeextrakt, 2% Glucose, pH 5.8
•	10x TE-Puffer	0,1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7.5
•	10x LiAc	1 M LiAc mit verdünnter Essigsäure auf pH 7.5 eingestellt
•	PEG/LiAc-Lösung	1x TE, 1x LiAc, 40% PEG
•	10x DO-Lösung (1L)	300 mg L-Isoleucin, 1500 mg L-Valin, 200 mg L-Adenin, 200 mg L-Arginin, 200 mg L-Histidin, 300 mg L-Lysin, 200 mg L-Methionin, 500 mg L-Phenylalanin, 2000 mg L-Threonin, 300 mg L-Tyrosin, 200 mg L-Uracil
•	SD(+Leu)-Medium (1L)	6,7 g Hefe-Stickstoff-Base, 100 ml 10x DO-Lösung, 2% Glucose, 100 mg L-Leucin, pH 5.8

• SD(+Trp)-Medium (1L) 6,7 g Hefe-Stickstoff-Base, 100 ml 10x DO-Lösung, 2% Glucose, 20 mg Tryptophan, pH 5.8

II.2.3.2 Herstellen von S. cerevisiae-Hefeextrakten

Mit Einzelkolonien frisch transformierter Zellen (s. II.2.3.1) wurden 5 ml einer ü/N-Kultur angeimpft und durch Schütteln gewährleistet, dass die Zellen der Kolonie vollständig dispergieren. Hefen zur Expression von Gal4-AD-dEcR- bzw. Gal4-DBD-dUSP-Wildtyp wurden in YPD-Vollmedium angesetzt. Zur Expression der entsprechenden Gal4-AD-dEcR- bzw. Gal4-DBD-dUSP-Mutanten wurden Einzelkolonien in den Selektionsmedien (s. II.2.3.1) angezüchtet. Nach einer Inkubation bei 30°C und 150-200 rpm über Nacht wurden die Starterkulturen auf 50 ml YPD-Vollmedium verdünnt und unter identischen Bedingungen bis zu einer OD₆₀₀ ~ 0,7 inkubiert.

Wenn nicht explizit erwähnt, wurden alle weiteren Schritte der Extraktherstellung auf Eis durchgeführt.

Nach Erreichen der gewünschten OD wurden die Hefekulturen in eisgekühlte Zentrifugengefässe überführt und die Zellen für 5 min. bei 4°C und 1500 g pelletiert. Nach einem Waschschritt mit 50 ml eisgekühltem NSP wurden die Zellpellets in 100 μ l Extrakt-Puffer resuspendiert.

Der Zellaufschluss erfolgte mechanisch unter Verwendung eines Mikro-Dismembrators S (B. Braun Biotech International) ohne Zusatz von Detergenzien. Dazu wurden die Zellen gemeinsam mit einer Stahlkugel in eine verschliessbare Kunststoff-Küvette überführt und für ca. 20 sek. unter Stickstoff_{flüssig} gefroren. Anschliessend wurde die Küvette umgehend in die Apparatur gespannt und die Hefezellen 2 min bei 2000 rpm durch die routierende Stahlkugel aufgebrochen.

Das auftauende Rohlysat wurde in 1 ml Extrakt-Puffer verdünnt und in ein Reaktionsgefäss überführt. Nach einer kurzen Behandlung mit Ultraschall (2x 2 sek., Standardresonator 20 kHz mit Mikrospitze, 90 Watt, Branson Sonifier, Nucleonik GmbH) erfolgte eine Ultra-Zentrifugation für 1 h bei 4°C und 100.000 g. Der Überstand wurde mit PMSF (1 mM Endkonzentration) ergänzt und in Aliquots bei –80°C eingefroren. Die erhaltenen Hefeextrakte wurden für Liganden-Bindungstests, Western-Blots und EMSA's verwendet.

- NSP s. II.2.1.2
- Extrakt-Puffer NSP unmittelbar vor Verwendung ergänzt mit 1 mM PMSF und einem Mix folgender Protease-Inhibitoren: Antipain, Aprotinin, Benzamidin, Chymostatin, Leupeptin, Pepstatin, alle je 2 µg/ml Endkonzentration

II.2.4 Nachweismethoden

II.2.4.1 Quantifizierung von DNA

Die Konzentrationsbestimmungen der Plasmid-DNA-Lösungen wurden UV-spektrometrisch (Ultrospec 2000, Pharmacia) durchgeführt. Dabei ergibt sich die Konzentration in [μ g/ml] durch Multiplikation der OD₂₆₀ mit dem Faktor 50. Der Quotient aus OD₂₆₀/ OD₂₈₀ als Mass für die Reinheit lag zwischen 1,8-2,0.

II.2.4.2 Photometrische Proteinbestimmung

Proteinkonzentrationen wurden nach Bradford (1976) bestimmt. Als Eichstandard diente BSA über einen Konzentrationsbereich von 1-10 μ g/Testansatz. Die Extinktionen wurden bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen.

• Bradford-Reagenz 0,05% Coomassie Brillant Blue, 25% Ethanol 50% Phosphorsäure, gelagert bei -20°C

II.2.4.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Auftrennung von Proteinen (verändert nach Lämmli 1970)

Proben, deren Proteingehalt nach Bradford (1976) bestimmt werden konnten, wurden direkt mit Probenpuffer auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Proben, deren Proteinmengen gering waren, wurden mit gleichem Volumen 15%-iger TCA-Lösung versetzt und Proteine durch Inkubation ü/N auf Eis präzipitiert. Die TCA-gefällten Proteinpellets (20 min. 4°C, 10.000 g) wurden getrocknet und in Probenpuffer (30-100 µl) gelöst. Nach einer Inkubation für 3 min. in kochendem Wasser wurden die Elektrophorese-Proben bis zum Auftragen auf Eis gekühlt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 10%-igen Polyacrylamid-Trenngel (MDE-Gelsolution, Boehringer), das mit

einem Sammelgel überschichtet wurde. Die Herstellung der Gele wurde nach folgendem Pipettierschema durchgeführt:

	Trenngel	Sammelgel
H ₂ O _{Millipore}	5,04 ml	2,05 ml
Acrylamid	3,6 ml	450 µl
Trenngelpuffer	3,0 ml	
Sammelgelpuffer		390 µl
10% SDS	120 µl	
TEMED	4,8 µl	3 µl
40% APS	60 µl	15 µl
Summe / 2 Gele	ca. 12 ml	ca. 3 ml

 Tab 1: Pipettierschema zur Herstellung der PAA-Gele. Die Polymerisationszeit betrug mindestens 15 min./ Gel

Die zwischen zwei Glasplatten (1mm Spacer, Biometra, Göttingen) polymerisierten Gele wurden in der Elektrophorese-Apparatur (Biometra) fixiert. Nach Auffüllen der Kammern mit Elektroden-Puffer erfolgte der Probenauftrag relativ zügig, um eine Diffusion der Proteine vor Anlegen der Betriebsspannung (10-15 mA pro Gel) zu minimieren. Als Kontrolle diente bei jeder Elektrophorese eine Spur mit Molekulargewichts-Standards (29-205 kDa, Sigma). Die Laufzeit variierte je nach gewünschtem Trennverhalten.

Im Anschluss wurden die Gele entweder zum Nachweis des Gesamt-Proteinmusters mit Silbernitrat gefärbt (s. II.2.4.4) oder im Western-Blot zur immunologischen Detektion einzelner Proteinspezies weiterbehandelt (s. II.2.4.5).

•	Probenpuffer	100 mM Tris/HCl, 2% 2-Mercaptoethanol, 3% SDS 10% Glyzerin, 0,05% Bromphenolblau, pH 8.8
•	Sammelgelpuffer	1 M Tris/HCl, pH 8.8
•	Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl, pH 8.8
•	Elektrodenpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS

II.2.4.4 Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen zum Nachweis des Gesamtproteins (nach Blum et al. 1987)

Nach Ablauf der SDS-PAGE wurden die Gele zügig in Fixier-Lösung überführt und für 1-2 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Gele für 20 min. in 50%-igem Ethanol gewaschen gefolgt von zwei weiteren Waschschritten für jeweils 20 min. in 30%-igem Etha-

nol. Nach 1 min. Inkubation in Verstärker-Lösung wurde dreimal für jeweils 20 sec. mit $H_2O_{Millipore}$ gewaschen.

Die anschliessende Färbung mit Silbernitrat über 20 min. wurde durch erneutes Waschen in $H_2O_{Millipore}$ gestoppt. Die Dauer der abschliessenden Entwicklung war relativ variabel (maximal 5 min.) und wurde der jeweils gewünschten Farbintensität der Proteinbanden angepasst. Bis zur Verwendung wurden die Gele bei 4°C in Fixier-Lösung gelagert. Alle Inkubationsschritte erfolgten unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur.

•	Fixierung	25% Methanol, 12% Essigsäure
•	Verstärkung	0,1 g Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O in 500 ml H ₂ O _{Millipore}
•	Färbung	0,4 g AgNO ₃ , 70 μ l Formaldehyd in 200 ml H ₂ O _{Millipore}
•	Entwicklung	30 g NaCO ₃ , 2 Körnchen Na ₂ S ₂ O ₃ x 5H ₂ O, 250 μl Formaldehyd in 500 ml H ₂ O _{Millipore}

II.2.4.5 Proteintransfer auf Nitrozellulose-Membran (Western-Blot) und Ponceau-Färbung

Die Durchführung der Western-Blots erfolgte nach einem Semi-Dry-Verfahren mit einer Trans-Blot-Apparatur (cti-GmbH, Idstein).

Die mit H₂O_{Millipore} angefeuchtete Graphit-Anode wurde wie folgt belegt:

- 3 Lagen Chromatographie-Papier (3MM, Whatman, Maidstone, England) getränkt in Anodenpuffer I
- 6 Lagen Chromatographie-Papier getränkt in Anodenpuffer II
- PAA-Gel
- Nitrozellulose-Membran (BA 85, 0,45µm, Schleicher & Schuell, Dassel), die ca. 1h in Kathodenpuffer äquilibriert wurde
- 9 Lagen Chromatographie-Papier getränkt in Kathodenpuffer

Anschliessend wurde die angefeuchtete Graphit-Kathode aufgesetzt, die Apparatur mit einem Gewicht beschwert und der Betriebsstrom angelegt (Stromstärke [mA] = Gelfläche [cm²]). Die Transfer-Zeit betrug exakt 50 min. pro 1 mm Geldicke.

Nach Beendigung des Blots wurden die Membranen für wenige Minuten in einer Ponceau-Färbelösung zum Nachweis der aufgetrennten und transferierten Proteine inkubiert.

Um Antikörper zu sparen, wurden die Membranen z.T. auf einen Molekulargewichtsbereich zugeschnitten, der bestimmt wurde durch die Grösse der zu detektierenden Proteine. Nach Entfärbung der Membranen in $H_2O_{Millipore}$ konnten die immunologischen Detektionen durchgeführt werden.

•	Anodenpuffer I	0,3 M Tris, 20% Methanol
•	Anodenpuffer II	25 mM Tris, 20% Methanol
•	Kathodenpuffer	40 mM Aminohexansäure
•	Ponceau-Färbung	2% Ponceau S Konzentrat, 30% TCA 30% Sulfosalicylsäure

II.2.4.6 Immunologische Detektionen zum Nachweis von cEcR, cUSP, GST-cEcR/ GST-cUSP, Gal4-AD-dEcR und Gal4-DBD-dUSP

Um unspezifische Bindestellen abzudecken, wurden die Membranen für 1 h bei Raumtemperatur in Blockierungs-Lösung inkubiert. Die anschliessende Reaktion des 1.Antikörpers erfolgte bei 4°C über Nacht. Je nach Blockierungs-Lösung wurden die Membranen zur Entfernung des nicht gebundenen Antikörpers dreimal für jeweils 10 min. mit PBS-T bzw. TBS-T gewaschen. Die 2.Antikörper-Reaktion erfolgte bei RT für mindestens 2 h. Alle Inkubationsschritte wurden unter leichtem Schwenken durchgeführt.

Antigen	1. Antikörper	2. Antikörper
cEcR	Anti-D-EcR, polyklonal, IgG-	Anti-Kaninchen IgG
	Kaninchen	1:2000 in PBS-T
	1:20 in M-Blockpuffer	
cUSP	Anti-USP, monoklonal, IgG-	Anti-Maus IgG
	Maus	1:1000 in PBS-T
	1:500 in M-Blockpuffer	
GST-cEcR	Anti-GST, monoklonal, IgG-	Anti-Maus IgG
/ GST cUSP	Maus	1:1000 in PBS-T
	1:500 in M-Blockpuffer	
Gal4-AD-dEcR	Anti-Gal4-AD, monoklonal,	Anti-Maus IgG
	IgG-Maus	1:1000 in TBS-T
	1:5000 in MB-Blockpuffer	
Gal4-DBD-dUSP	Anti-Gal4-DBD, polyklonal,	Anti-Kaninchen IgG
	IgG-Kaninchen	1:500 in TBS-T
	1:100 in MB-Blockpuffer	

 Tab. 2: Verwendete Antikörper-Lösungen. Die Blockierungen wurden in den zur Verdünnung eingesetzten Puffern durchgeführt

Für den Peroxidase-Fluoreszenznachweis wurden die Membranen für exakt 1 min. in ECL-Lösung inkubiert und anschliessend zwischen zwei Klarsicht-Folien gelegt. Dieser "Sandwich" wurde in die Fotokammer überführt. Die Expositionszeiten der Röntgenfilme (Biomax MR, Kodak) lagen je nach verwendeten Antiseren und gewünschten Proteinbanden-Intensitäten zwischen 30 sec. und mehreren Minuten. Abschliessend wurden die Röntgenfilme entwickelt.

•	PBS-T	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 0,05% Tween 20, pH 6.8
•	TBS-T	20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7.6
•	M-Blockpuffer	5% Milchpulver in PBS-T, 0,02% Thimerosal
•	MB-Blockpuffer	5% Milchpulver, 1% BSA, in TBS-T, 0,02% Thimerosal
•	ECL	ECL-Western Blotting Detection Reagent 1 und 2 frisch angesetzt im Verhältnis 1:1

II.2.4.7 Digitalisierung und Quantifizierung von Proteinbanden

Zur Digitalisierung der auf Röntgenfilm detektierten Proteinbanden wurden die Filme mit einem Scanner (Sharp JX 325, 600-1200 dpi Auflösung, Vice Versa Scan 1.2, Krystec EDV, Norderstedt) im Graustufenmodus eingelesen.

Anschliessend konnten die digitalisierten Proteinbanden durch Bestimmung der relativen Intensitäten über eine spezielle Software (Phoretix 1D-Gel-Analysis, Nonlinear Dynamics Ltd., Newcastle UK) quantifiziert werden.

II.2.5 Rezeptorfunktionen

II.2.5.1 Untersuchungen zur Hormon-Bindung

In diesen Studien wurden die unter II.2.1.2 erhaltenen und entsalzten *Chironomus*-Zellextrakte, die nach II.2.2.4 - II.2.2.5 hergestellten gereinigten und entsalzten Rezeptor-Präparationen sowie die unter II.2.3.2 gewonnenen Hefeextrakte eingesetzt.

Zellextrakte wurden auf eine Proteinkonzentration von 3 mg/ml eingestellt und bakterielle Rezeptor-Präparationen auf 1 mg/ml BSA umgepuffert (II.2.6.1). Hefeextrakte wurden je nach Ansatz und Fragestellung auf unterschiedliche Proteinkonzentrationen verdünnt (s. III.4.2.1).

Gereinigte Rezeptor-Präparationen von GST-cEcR / cEcR und GST-cUSP / cUSP bzw. Hefeextrakte mit Gal4-AD-dEcR und Gal4-DBD-dUSP wurden in verschiedenen Mischungsverhältnissen untersucht.

Als Ligand wurde [³H]-Ponasteron A (Spezifische Aktivität 213 Ci/mmol) eingesetzt. Je nach gewünschter Endkonzentration wurde das in einer methanolischen Lösung vorliegende Pon A in silikonisierten Eppendorf-Reaktionsgefässen bis zur Trockene eingeengt und anschliessend je nach Reaktionsvolumen im Reaktionsansatz rückgelöst. Durch Schütteln (Vortex) über 15 sek. wurde gewährleistet, dass das eingeengte Material wieder quantitativ in Lösung geht und so Verluste minimiert werden. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei Raumtemperatur wurden die Ansätze auf Eis überführt.

Die Trennung von gebundenem und nicht gebundenem Hormon (verändert nach Turberg 1992) erfolgte bei 4°C durch eine Vakuumfiltration (sechsfach Filtrationsapparatur Hölzel). Dazu wurden geeignete Volumina der Reaktionsansätze zu 4 ml vorgelegtem Waschpuffer pipettiert und dreimal mit je 8 ml über Nitrozellulose-Membranfilter (0,45 µm, \emptyset 22 mm, Schleicher & Schuell, Dassel) abgesaugt. Makromolekular gebundenes Hormon wurde auf dem Filter zurückgehalten, während freies Hormon den Filter passieren konnte.

Über 400 μ g Protein/Filter ist der Zusammenhang zwischen gebundenem Hormon und Radioaktivitäts-Ausbeute nicht mehr linear. Um dennoch eine möglichst hohe Empfindlichkeit des Hormon-Bindungstests zu gewährleisten, wurde das Limit von 400 μ g Protein nur wenig unterschritten.

Zur Bestimmung der gebundenen Radioaktivität wurden die Filter in Zählglässchen überführt, mit 4 ml Cocktail gemischt (Filter-Count, Canberra Packard, Frankfurt) und in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler (1600 TR, Zählausbeute für Tritium ca. 50%, Canberra Packard) ausgezählt.

Zur Bestimmung der Gesamt-Radioaktivität der einzelnen Reaktionsansätze wurden Aliquots (10-50 µl) entnommen und mit 4 ml Cocktail (Filter-Count, Canberra Packard) ausgezählt. Die Messungen wurden in 2-3fach-Bestimmungen durchgeführt.

Um die spezifische [³H]-Ponasteron A-Bindung zu ermitteln, wurde in Parallelansätzen der einzelnen Inkubationen unmarkiertes 20-Hydroxy-Ecdyson bzw. Muristeron A als Kompetitor in einer Endkonzentration von 0,1 mM zugegeben.

Im Gegensatz zu Muristeron A, dessen Affinität zum Ecdysteroid-Rezeptor der untersuchten Zellinie im Bereich von Ponasteron A liegt, ist die Fähigkeit zur Kompetition für 20-Hydroxy-Ecdyson aufgrund geringerer Rezeptor-Affinität ca. 15fach schlechter (Spindler-Barth et al. 1997). Durch einen Überschuss des Kompetitors um den Faktor 10^5 wird dieser Effekt jedoch vollständig kompensiert.

• Die spezifische Rezeptorbindung ergibt sich aus der Gesamtbindung (= Bindung des Hormons in Abwesenheit des Kompetitors) abzüglich der unspezifischen Bindung, die der Hormonbindung in Gegenwart des Kompetitors entspricht. Durch den Kompetitor-Überschuss werden alle spezifischen Bindestellen durch unmarkiertes Hormon besetzt.

Um die Liganden-Bindung des nicht-steroidalen Ecdyson-Agonisten RH 5992 (Tefubenozid) in *Chironomus*-Zellextrakten bzw. mit gereinigten Rezeptor-Präparationen zu ermitteln, wurden wie folgt Kompetitionskurven erstellt: Die vorgelegte [³H]-Ponasteron A-Konzentration war in allen Ansätzen konstant bei 2 nM bzw. 5 nM. In absteigenden Konzentrationsreihen im Bereich von 0,1 mM - 1 nM wurde in DMSO gelöstes, nicht markiertes RH 5992 bzw. 20-OH-Ecdyson als Kompetitoren vorgelegt. Da DMSO-Konzentrationen bis zu 1% die Hormonbindung nicht beeinflussen (Spindler-Barth et al. 1991), konnten die Proben mit der entsprechenden Menge an rückgelöstem Pon A direkt zugegeben werden. Zur Bestimmung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten (k_D) der Ligand-Rezeptor-Interaktion wurde der Radioligand über einen Konzentationsbereich von minimal 0,008 nM bis maximal 5 nM angeboten. Die Auswertung der Messreihen zur Kalkulation der k_D -Werte erfolgte nach Scatchard (1949).

In Experimenten zur Rekonstitution der Ecdysteroid-Bindung hormonresistenter Subklone der *Chironomus tentans*-Zellinie (Grebe et al. 2000) wurden Zellextrakte (500 μ l) mit gereinigtem GST-cEcR (ca. 50 ng) respektive GST-cUSP (ca. 100 ng) gemischt und die spezifische Bindung von Pon A (2 nM angeboten) ermittelt. In Kontrollansätzen wurden die Extrakte ohne Zusatz von bakteriell exprimierten und gereinigten Rezeptoren gemessen.

• Waschpuffer 20 mM HEPES, 20 mM NaCL, 10% Glyzerin, 1 mM EDTA, 1 mM 2-Mercaptoethanol, pH 7.9

II.2.5.2 Untersuchungen zur DNA-Bindung

Für Gelverzögerungs-Experimente (EMSA) wurden folgende Oligonukleotide über eine ,fill-in-reaction' mit Klenow Polymerase $[a-^{32}P]$ -dCTP-markiert (freundlicherweise von Frau Bader durchgeführt, Universität Ulm). Die spezifische Aktivität lag bei ca. 10^7 cpm/µg:

- DR5 5'-GATCTAGAGAGGTCAACGAAAGGTCATGTCCAAG-3'
- PAL1 5'-GATCTAGAGAGGTCAATGACCTTGTCCAAG-3'
- SINGLE 5'-GATCTAGAGAGGTCAACGTTGACCTCCAAG-3'

In diesen Untersuchungen wurden die unter II.2.2.3 hergestellten *E.coli*-Extrakte bzw. gereinigtes GST-cEcR / cEcR und GST-cUSP / cUSP (II.2.2.4 - II.2.2.5) eingesetzt. Auf allen Elementen wurde die Bindung sowohl von cEcR- bzw. cUSP-Proben als auch cEcR/cUSP-Kombinationen untersucht. Die Rezeptor-Präparationen (1-2 ng GST-EcR bzw. 3-6 ng GST-USP und ca. 18 ng EcR bzw. ca. 7 ng USP) wurden 45-60 min. bei Raumtemperatur in Bindungspuffer mit Poly-[dI-dC] als Kompetitor-DNA (50 μ g/ml Endkonzentration, Boehringer) vorinkubiert. Reaktionsansätze gereinigter Rezeptoren wurden mit BSA (10 mg/ml Endkonzentration, Sigma) ergänzt. Für "Supershift'-Experimente wurde dem Reaktionsansatz nach ca. 30 min. Vorinkubation der USP-Antikörper AB11 (1 μ l unverdünnt) zugegeben.

Nach Zugabe der markierten Oligonukleotide (ca. 1,5 ng) und einer Inkubationszeit von 20 min. bei Raumtemperatur wurden die Reaktionsansätze (20 μ l Gesamtvolumen) auf einem 5%-igen, nicht-denaturierenden 0,5x TBE-Polyacrylamidgel für 2h bei 120V (10V/cm²) elektrophoretisch aufgetrennt (Modell V15-17, Life Technologies, Gib-coBRL). Anschliessend wurden die bei 80°C getrockneten Gele (Modell 583 Gel Dryer, HydroTechTM Vacuum Pump, BioRad Laboratories) für 1-7 Tage in einer Phosphor-kammer gelagert (Storage Phosphor Screen, Molecular Dynamics) und über einen Phosphorimager ausgewertet (ImageQuantTM software package, Molecular Dynamics).
•	Bindungspuffer	20 mM HEPES, 100 mM KCl, 2 mM DTT, 5% Glyzerin, 0,1% NP-40, pH 7.4
•	10x TBE	0,9 M Tris-HCl, 0,9 M Borsäure, 20 mM EDTA, pH 8.0
•	PAA-Gel	3 ml 10x TBE, 10 ml 30%-PAA, 44,5 ml dH ₂ O, 600 μl 10%-APS, 36 μl TEMED

Alternativ zu EMSA's wurde die Rezeptor-DNA-Interaktion spektroskopisch untersucht:

Die Plasmon-Resonanz-Spektroskopie liefert den Vorteil einer Label-freien Technologie, bei der molekulare Bindungsprozesse auf der Oberfläche eines präparierten Biosensor-Chips in Echtzeit gemessen werden können (Myszka 1997). Diese Detektion basiert auf dem Quanten-mechanischen Phänomen der ,surface plasmon resonance' (SPR), die erscheint, wenn Oberflächen-Plasmon-Wellen an einer Metall-flüssig-Schicht angeregt werden (Karlson et al. 1991). Wechselwirkungen auf der Sensor-Oberfläche bewirken über SPR eine Änderung des Brechungsindexes von eingestrahltem polarisierten Licht, die der Konzentration und der Masse der auf der Oberfläche gebundenen Komponenten proportional ist (Löfas & Johnsson 1990). Die Änderungen des reflektierten Lichtes werden während einer Echtzeit-Analyse als Resonanzeinheiten (RU) über ein Diagramm aufgenommen.

Untersucht wurden die Wechselwirkungen der unmarkierten DNA-Elemente PAL1 und SINGLE mit gereinigten Rezeptoren (s. II.2.2.4) bzw. ungereinigte Rezeptoren aus 30.000 g Überständen (s. II.2.2.3).

Biacore X (Biacore, Schweden) verfügt über zwei Fluss-Zellen, die separat angesteuert werden können. Bei einem max. Injektionsvolumen von 100 μ l lagen die Flussraten des Laufpuffers zwischen 5-50 μ l/min. Die Messungen wurden bei 25°C durchgeführt.

Immobilisiertes Avidin (Sensor Chip CM5, Biacore, Schweden) bzw. Streptavidin (Sensorchip SA, Biacore) auf der mit einer Goldschicht überzogenen Dextran-Matrix als ,capture molecules' binden mit hoher Affinität biotinylierte DNA-Fragmente (,detecting molecules').

Nach Vorbehandlung der Oberflächen mit NaOH/NaCl wurden auf Zelle 1 zur Bestimmung der unspezifischen Bindung als Referenz-Oligo SINGLE (ca. 20 pmol injiziert) fixiert, während zur Messung der Gesamtbindung Zelle 2 mit PAL1 (ca. 20 pmol injiziert) als spezifische DNA beladen wurde. Die Injektionen ergaben 1048 RU (SINGLE) und 1296 RU (PAL1) gebunden an Avidin bzw. 1030 RU (SINGLE) und 1060 RU (PAL1) an Streptavidin. Zur Regeneration der Oberflächen wurde nach jeder Injektion 5%-ige SDS-Lösung verwendet. EcR/USP-Mischproben (,target molecules') wurden 40-45 min. vorinkubiert, anschliessend in verschiedenen Konzentrationen (unverdünnt bis 1:50 verdünnt) injiziert und die Sensogramme der einzelnen Messzellen verfolgt (Biacore X control software version 2.1). Aus der Differenz der Einzelspektren (On-Line Substraction) konnte die spezifische Rezeptor-DNA-Bindung ermittelt werden. • Laufpuffer 20 mM HEPES, 100 mM KCl, 2 mM DTT, 0,1% NP-40, 1% Glyzerin, pH 7.4

II.2.6 Chromatographische Methoden

II.2.6.1 Entsalzen mit Molekularsieb-Chromatographie

Da Hochsalzbedingungen die Hormon-Rezeptor-Bindung negativ beeinflussen, wurden die unter II.2.1.2 hergestellten *Chironomus*-Zellextrakte bzw. die unter II.2.2.4 gereinigten Rezeptor-Präparationen zur Vorbereitung auf Liganden-Bindungstests mit Sephadex G-25-Säulen (5 KDa Ausschlussgrenze, Pharmacia, Schweden) bei 4°C entsalzt. Dazu wurden die zuvor mit NSP (s. II.2.1.2) äquilibrierten Säulen mit maximal 2,5 ml Probe beladen und anschliessend mit dem 1,4fachen Volumen NSP eluiert. Zur Elution gereinigter Rezeptoren wurde der Niedersalzpuffer mit BSA (Sigma) in einer Endkonzentration von 1 mg/ml ergänzt. Anschliessend wurde das auf 20 mM NaCl eingestellte Material möglichst ohne Verzögerung in Untersuchungen zur Hormon-Bindung (s. II.2.5.1) eingesetzt.

II.2.6.2 Analytische und präparative High Performance Liquid Chromatography (HPLC) von [³H]-Ponasteron A

Tritiiertes Ponasteron A (spezifische Aktivität 7,9 TBq/mmol, freundlicherweise von Prof. Kayser, Novartis, zur Verfügung gestellt), das bei -20°C gelagert wird, unterliegt einem radiolytischen Zerfall. Daher wurde die Reinheit der [³H]-Pon A-Lösungen, die für Liganden-Bindungstests verwendet wurden, routinemässig mit analytischen HPLC-Trennungen kontrolliert.

Dazu wurde ein Aliquot des in Methanol gelösten PonA bis zur Trockene eingeengt (Speed-Vac-Concentrator, Bachhofer), in einem Gemisch Methanol / $H_20_{Millipore}$ (Mischungsverhältnis 40:60) gelöst und injiziert. Vor jedem analytischen Lauf wurde das System gründlich entlüftet, um Lufteinschlüsse, die die Elutionsbedingungen empfindlich stören können, zu entfernen.

Die Trennung entgaster Proben (In-Line-Degasser, Waters, Eschborn) über die Säule (reversed phase column, Radial-Pak, type 8NVC186, Waters) erfolgte 50 min über einen Methanol / $H_2O_{Millipore}$ Gradienten mit einer Flussrate von 1 ml/min. (600^{TM} controller, 600^{TM} pump, Waters). Radioaktivität wurde mit einem Durchfluss-Szintillationszähler (Radiomatic 500TR, LSC Cocktail Ultimo FloM, Canberra Packard, Frankfurt) bestimmt. Parallel konnte mit einem Photometer (Tunable Absorbance Detektor, Waters) bei einer Wellenlänge von 254 nm das UV-Spektrum aufgenommen werden.

Ergab die Analyse eine Reinheit von < 90%, wurde die gesamte Pon A-Charge mit präparativen HPLC-Trennungen gereinigt. Nach gleicher Vorbehandlung und unter identischen Trennbedingungen (s.o.) wurden nur 3% der Elution über ein Splitter-Ventil zur Detektion in die Messzelle geleitet, während 97% des Durchflusses in je 2 ml über einen Fraktions-Sammler (Waters) aufgefangen wurden. Fraktionen den Pon A-Peaks wurden gepoolt, eingeengt und mit Methanol auf ca. 50.000 cpm/ml eingestellt. Mit einem analytischen Lauf wurde die Reinheit erneut überprüft.

III Ergebnisse

III.1 Reinigung von [³H]-Ponasteron A

In allen Untersuchungen dieser Arbeit zur Rezeptor-Bindung wurde als Ligand Ponasteron A verwendet. Dieses Hormon, das zu den Ecdysteroiden zählt, hat gegenüber dem häufigsten Häutungshormon 20-OH-Ecdyson den Vorteil, dass es mit bis zu 100fach höherer Affinität von Ecdysteroid-Rezeptoren untersuchter Arthropoden gebunden werden kann (Barker et al. 1990).

[³H]-Ponasteron A wurde mit einer spezifischen Aktivität von 7,9 TBq/mmol synthetisiert. Mit fortschreitender Lagerung bilden sich Zerfalls-Produkte, die zwar vom Rezeptor nicht mehr gebunden werden können (Daten nicht gezeigt), aber von nichtdegradiertem Hormon getrennt werden mussten, um weitere Radiolyse zu vermeiden.

Ausserdem könnten radioaktive Verunreinigungen die spezifische Aktivität von Ponasteron A, die in Berechnungen der Liganden-Bindung eingeht, verändern.

Daher wurde die Reinheit routinemässig mit HPLC überprüft. Als mobile Phase wurde ein Methanol/Wasser-Gradient (Abb. 2) verwendet, über den sich die Produkte gut abtrennen liessen (reversed phase column, Radial-Pak, type 8NVC186, Waters).



Abb. 2: Methanol/Wasser-Gradient der HPLC-Trennungen von [³H]-Ponasteron A. Die Elution mit einer Flussrate von 1 ml/min erfolgte über 50 min.

Ergaben Analysen eine Reinheit von < 90%, wurde eine präparative Reinigung durchgeführt (s. Abb. 3-4) und anschliessend Fraktionen des Pon A-Peaks gepoolt. Von Fraktionen der Peak-Flanken wurden vor dem Vereinigen Reinheits-Kontrollen durchgeführt (s. Abb. 5).



Abb. 3: Chromatogramm einer analytischen HPLC-Trennung von [³H]-Ponasteron A. Die Elutionsbedingungen sind in Abb. 2 dargestellt. Durch Integration der Peakflächen (Flo-One 2.0, Canberra Packard) konnte für diese Probe ein Reinheitsgrad von ca. 40% ermittelt werden. Retentionszeit Pon A = 33 min (Peak-Maximum).



Abb. 4: Chromatogramm einer präparativen HPLC-Trennung von [³H]-Ponasteron A. Durch Radiolyse entstehen Zerfalls-Produkte, die sich unter gegebenen Elutionsbedingungen (s. Abb. 2) in 4 Hauptpeaks (1-4) entsprechend ihrer Polarität auftrennen.



Abb. 5: Chromatogramm einer analytischen HPLC-Trennung von [³H]-Ponasteron A. Kontrolle einer Fraktion (30-32 min.) der präparativen Reinigung aus Abb. 4. Die Trennbedingungen sind der Abb. 2 zu entnehmen.

Um den Wasser-Anteil zu entfernen, wurden die vereinigten Fraktionen eingeengt und in Methanol aufgenommen. Abschliessend wurde eine erneute Analyse durchgeführt. So konnte gewährleistet werden, dass in Untersuchungen zur Hormon-Bindung die Reinheit des Radioliganden Pon A bei ca. 90% lag.

III.2 Charakterisierung von EcR/USP der Chironomus-Zellinie

Im Hormon-sensitiven Wildtyp der epithelialen *Chironomus*-Zellinie lassen sich mit dem Ecdysteroid-Agonist Tefubenozid (RH 5992), das mittlerweile zur Schädlingsbekämpfung eingesetzt wird, alle morphologischen und physiologischen Effekte induzieren, die auch mit dem Häutungshormon 20-OH-Ecdyson zu erzielen sind.

Um Resistenz-Mechanismen, die durch langfristige Insektizid-Anwendung unter Freiland-Bedingungen entwickelt werden können, im Labor vorwegzunehmen, wurden ausgehend vom Wildtyp Ecdysteroid-resistente Subklone selektioniert. Ein weiterer Aspekt war, durch hervorgerufene Defekte Rezeptor-Funktionen und hormonelle Signaltransduktion untersuchen zu können.

Die Subklone wurden durch kontinuierliche Hormongaben mit ansteigenden Konzentrationen über einen Zeitraum von ca. 2 Jahren erhalten, da sensitive Zellen unter diesen Bedingungen mit der Zeit absterben (Spindler-Barth & Spindler 1998a).

Zur Selektion diente neben morphologischen Kriterien wie Zelldifferenzierung und Veränderung der Zellgestalt die Induzierbarkeit der Acetylcholinesterase-Aktivität durch 20-OH-Ecdyson bzw. durch RH 5992 als biochemischer Nachweis (Stevens & O'Conner 1982). Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung zusammengestellt.



Abb. 6: (verändert aus Grebe et al. 2000): Einfluss von 1 μ M 20-OH Ecdyson (blau) bzw. 0,1 μ M RH 5992 (rot) auf die Aktivität der Acetylcholinesterase in Wildtyp-Zellen und resistenten Subklonen von *Chironomus tentans*. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 7 Tagen mit Hormon oder Tefubenozid inkubiert. Der Nachweis der Enzymaktivität erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszens-Test nach Parvari (1983). (Interassay-Streuungen < 38%)

Im *Chironomus*-Wildtyp wird durch Zugabe von 1 μ M 20-OH-Ecdyson (20E) die Enzymaktivität deutlich stimuliert (Spindler-Barth et al. 1988). Zellen, die keine morphologische Hormon-Sensitivität zeigten (Spindler-Barth et al. 1992) und deren Acetylcholinesterase-Aktivität durch Hormon-Behandlung nicht zu steigern war (Abb. 6), wurden als resistent betrachtet (Spindler-Barth & Spindler 1998a).

Die durch Gabe von Tefubenozid erhaltenen Subklone rh-r.1 bis rh-r.6 zeigten Resistenz sowohl gegen RH 5992 als auch gegen das Häutungshormon, das zur Selektion nicht verwendet wurde (Grebe 1997).

Die Klone ec-r.0 bis ec-r.3, die in Gegenwart steigender Konzentrationen von 20E gezüchtet wurden, zeigten anfänglich nur gegen dieses Hormon eine Resistenz (Daten nicht gezeigt). Erst später entwickelte sich eine zusätzliche Insensitivität auch gegenüber dem Insektizid.

Zur Aufklärung möglicher Ursachen für Resistenz wurden in diesen Klonen neben dem Hormon-Metabolismus auch die Ecdysteroid-Rezeptoren bezüglich der Expression und posttranslationellen Modifikation sowie der Liganden-Bindung näher charakterisiert und mit dem sensitiven Wildtyp verglichen.

III.2.1 Metabolismus des Diacylhydrazins RH 5992

Chironomus-Zellen des Wildtyp's können 20-OH-Ecdyson metabolisieren (Spindler & Spindler-Barth 1991). Einzelne Subklone, die gegen dieses Hormon selektioniert wurden, zeichnen sich durch eine erhöhte Metabolismus-Rate aus, die durch einen Anstieg des Cytochrom-P450-abhängigen oxidativen Abbaus von 20-OH-Ecdyson zu inaktivem 20,26-Dihydroxy-Ecdyson hervorgerufen wird (Kayser et al. 1997).

Auch der nicht-steroidale Agonist RH 5992 wird im Wildtyp innerhalb von 7 Tagen vollständig umgewandelt zu Verbindungen höherer Polarität (Grebe et al. 2000). Die Produkte gleicher Retentionszeit und identischer HPLC-Trennbedingungen sind biologisch inaktiv (Dhadialla, pers. Mitteilung) und wurden deshalb in ihrer chemischen Eigenschaft nicht näher charakterisiert.

Im Anschluss wurde daher untersucht, ob resistente Zellen einen im Vergleich zum Wildtyp erhöhten Metabolismus des Diacylhydrazins aufweisen.

Das Spektrum der entstandenen Produkte von [¹⁴C]-RH 5992 war bei allen untersuchten Zellen identisch. Auch wenn es innerhalb der Klone eine bis zu 5-fache Variation in der Metabolismus-Rate gab, war beim Vergleich von mehreren unabhängigen Versuchen mit rh-r.6 bzw. dem Wildtyp hohe Reproduzierbarkeit gegeben (Abb 7).



Abb. 7: (verändert aus Grebe et al. 2000): Metabolismus-Raten von RH 5992 in resistenten Subklonen der *Chironomus*-Zellinie im Vergleich zum Wildtyp. Nach einer 24-stündigen Inkubation mit ca. 2,5 μ M [¹⁴C]-RH 5992 (spez. Aktivität = 329 KBq/mmol) bei 25°C wurden Zellextrakte hergestellt, im Anschluss mit HPLC aufgetrennt und die Produkte mit Flo-One (Canberra Packard) quantifiziert. Die Proteinkonzentrationen lagen bei 0,84 ± 0,06 mg/ml. (n = 3 für Wildtyp und rh-r.6, S.D. < 34%)

Als Ergebnis konnte festgehalten werden, dass Hormon-resistente Subklone der *Chiro-nomus*-Zellinie RH 5992 langsamer metabolisieren als Wildtyp-Zellen. Somit können erhöhte Umwandlungsraten zu inaktiven Produkten als Ursache erworbener RH 5992-Resistenz ausgeschlossen werden.

III.2.2 Rezeptor-Expression und posttranslationelle Modifikation

Mit Western-Blot's konnten in Extrakten des Wildtyp's drei EcR- und bis zu fünf USP-Proteinbanden nachgewiesen werden. Rezeptor-Isotypen mit geringerer Mobilität im SDS-Gel können durch Behandlung mit Phosphatase in die nicht-phosphorylierten Formen überführt werden (Rauch et al 1998). Nach Dephosphorylierung wurde für cEcR ein apparentes Molekulargewicht von 66 kDa ermittelt, während cUSP in zwei Isoformen mit apparenten Molekulargewichten von 58 kDa und 60 kDa vorkommt. In Wildtyp-Zellen werden EcR und USP durch Hormon unterschiedlich reguliert. Unter dem Einfluss von 20-OH-Ecdyson nimmt die EcR-Konzentration um ca. 50% zu (Grebe 1997). Im Gegensatz dazu bleibt die Expression von USP nach Hormon-Gabe unverändert. Vielmehr induziert 20E eine Hyperphosphorylierung von USP auf posttranslationeller Ebene, was durch eine deutliche Zunahme der Proteinbande geringster Mobilität angezeigt wird (Abb. 8C). Im Anschluss wurden die Hormon-resistenten Klone untersucht und mit dem Wildtyp verglichen (Abb 8). Als Ergebnis konnte folgendes festgehalten werden:

- Das Ausmass der EcR- bzw. USP-Expression ist bei allen untersuchten Zellen im Bereich des Wildtyps.
- Das Phosphorylierungs-Muster von EcR ist konstant und entspricht dem des Wildtyps.
- In drei Klonen (rh-r.4, rh-r.5 und rh-r.6) weicht das Phosphorylierungsmuster von USP deutlich vom Wildtyp ab, denn Proteinbanden bei 77 kDa fehlen fast vollständig.
- Hormoneffekte bezüglich der EcR-Expression bzw. USP-Phosphorylierung, wie sie für den Wildtyp beschrieben wurden, konnten in resistenten Zellen nicht mehr nachgewiesen werden.



Abb. 8: (aus Grebe et al. 2000): Western Blot von cEcR und cUSP mit 0,4 M NaCl Extrakten des Wildtyps (wt) und resistenter Subklone der epithelialen *Chironomus tentans* Zellinie. (A) Detektion von cEcR mit pABcE/D-Antiserum. Im Vergleich zum Wildtyp (wt) ist das Phosphorylierungsmuster des cEcR der resistenten Subklone nicht signifikant verschieden. (B) Detektion von cUSP mit monoklonalem AB11. Im Gegensatz zu Wildtyp-Zellen ist die phosphorylierte cUSP-Bande mit geringster elektrophoretischer Mobilität aus Extrakten von rh-r.4, rh-r.5 und rh-r.6 deutlich schwächer ausgeprägt. (C) In Wildtyp-Zellen nimmt die Intensität der cUSP-Bande (77 kDa) mit geringster Gel-Mobilität durch Inkubation mit 1 μ M 20-OH-Ecdyson über einen Zeitraum von 4 Tagen signifikant zu, während dieser Hormon-Effekt in resistenten Klonen nicht mehr nachzuweisen war. Mehrere Wildtyp-Proben wurden aufgetragen, um die Reproduzierbarkeit der Western Blots zu demonstrieren. (-) ohne Hormon, (+) mit Hormon.

III.2.3 Untersuchungen zur Hormon-Bindung

In Bindungstests mit 0,4 M NaCl-Extrakten des *Chironomus*-Wildtyps, die nach Scatchard ausgewertet wurden, konnten zwei hochaffine-Ponasteron A-Bindestellen ermittelt werden mit $K_{D1} = 0,31 \pm 0,28$ nM und $K_{D2} = 6,5 \pm 2,4$ nM (Grebe et al. 2000). Basierend auf den Wildtyp-Daten können resistente Subklone bezüglich der Hormon-Bindung in 5 Klassen unterschieden werden, für die in der folgenden Abbildung repräsentative Vertreter der Klassen 2-4 zusammengestellt sind:

- 1. Liganden-Bindung entspricht dem Wildtyp von Chironomus (Daten nicht gezeigt)
- 2. Hormon-Bindung mit Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten wie Wildtyp, aber reduzierte Anzahl an Bindestellen (Abb. 9A)
- 3. Selektiver Verlust einer Bindestelle und Abnahme der Anzahl gebundener Hormon-Moleküle (Abb. 9B-C)
- 4. Verlust der spezifischen Hormon-Bindung (Abb. 9D)
- 5. Veränderte Liganden-Spezifität mit reduzierter Anzahl an Bindestellen (Abb. 10)



Abb. 9: [³H]-Ponasteron A-Bindung ermittelt in 0,4 M NaCl-Extrakten resistenter Klone der epithelialen Zellinie von *Chironomus tentans*, die nach Scatchard (1949) ausgewertet wurde. Unspezifische Bindung wurde durch Kompetition mit 0,1 mM 20-OH-Ecdyson ermittelt und subtrahiert. (A) Extrakt des Klons

ec-r.0 mit beiden hochaffinen Hormon-Bindestellen ($K_{D1} = 0,2$ nM, $K_{D2} = 2,3$ nM) wie im Wildtyp (Rauch et al. 1998), aber reduzierte Anzahl an Bindestellen. (B) Extrakt des Klons rh-r.6 zeigt nur die hochaffine K_{D1} -Bindung (0,8 nM) mit reduzierter Anzahl der Bindestellen. (C) Extrakt des Klons rh-r.5 zeigt nur die niederaffinere K_{D2} -Bindung (4,2 nM) mit reduzierter Anzahl der Bindestellen. (C) Im Extrakt des Klons rh-r.3 ist spezifische Bindung nicht mehr nachzuweisen (zum Vergleich siehe auch Tab. 4).

Der Subklon rh-r.2 gilt als Vertreter der fünften Klasse mit einer veränderten Liganden-Spezifität. In diesem Fall kompetiert RH 5992 wesentlich schlechter um die Ponasteron A-Bindung. Ein Vergleich mit dem Wildtyp ist in Abb. 10 bzw. Tab. 3 dargestellt.



Abb. 10: (aus Grebe et al. 2000): Veränderte Liganden-Spezifität des resistenten Subklons rh-r.2 (o) im Vergleich zum Wildtyp (Δ) von *Chironomus tentans*. 0,4 M NaCl-Extrakte wurden mit 2-5 nM [³H]-Ponasteron A und steigenden Konzentrationen von unmarkiertem RH 5992 für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. (\pm S.D., n = 3 für Wildtyp, n = 8 für rh-r.2)

Tab. 3: Hormon-Spezifitäten vom Subklon rh-r.2 und Chironomus-Wildtyp

Ligand	Wildtyp K _D [µM]	rh-r.2 K _D [μM]	Faktor K _D rh-r.2 / K _D Wildtyp
Muristeron A	0,003	$0,008 \pm 0,002$	27
20-OH-Ecdyson	0,4 ± 0.2	19 ± 12	48
RH 5992	0,02 ± 0,01	193 ± 269	9.700

Durch Kompetition der [³H]-Ponasteron A-Bindung mit verschiedenen Liganden wurden die IC₅₀-Werte ermittelt und in Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten (K_D) nach folgender Formel umgerechnet: $K_i = IC_{50} \times (1 + L/K_D)$ (Cheng & Prusoff 1973)

Die folgende Tabelle stellt eine Zusammenfassung der bisherigen Charakterisierung Hormon-resistenter Subklone der *Chironomus*-Zellinie dar.

							*cEcR	*cUSP
Chiro-	Zellen	KD	Binde-	KD	Binde-	Anzahl	Hyper-	Hyper-
nomus	selektio-	[nM]	stellen 1	[nM]	stellen 2	ausge-	phospho-	phospho-
tentans	niert	Binde-	in [fmol/	Binde-	in [fmol	werteter	rylierung	rylierung
Zellklon	mit	stelle 1	mg]	stelle 2	/mg]	Bindungs-	[% von	[% von
						tests	Gesamt	Gesamt
							rezeptor]	rezeptor]
		0,31	9,7	6,5	142		55	28
Wildtyp		±	±	±	±	10	± 5	± 3
		0,28	6,5	2,4	88		n = 7	n = 3
		0,4	5,3				50	18
rh-r.1	RH 5992	±	±			3	± 8	± 3
		0,2	3,7				n = 7	n = 4
							50	17
rh-r.2	RH 5992	0,06	1,2	3,3	15	1	± 5	± 3
							n = 7	n = 4
							46	17
rh-r.3	RH 5992					6	±6	± 1
							n = 6	n = 4
		0,08	1,6	3,6	9,3		60	8
rh-r.4	RH 5992	±	±	±	±	3	±6	±2
		0,02	0,6	2,6	5,0		n = 6	n = 4
				3,8	26		58	12
rh-r.5	RH 5992			±	±	6	± 6	± 5
				2,9	12		n = 7	n = 6
		0,96	7,0				60	9
rh-r.6	RH 5992	±	±			5	±12	± 3
		0,57	1,3				n = 7	n = 6
		0,17	3,2	4,5	45	3	49	17
ec-r.0	20E	±	±	±	±			
		0,05	0,1	2,5	17		n = 1	n = 2
		0,67	12,3	5,7	108		40	19
ec-r.1	20E	±	±	±	±	3	± 6	± 4
		0,24	1,2	1,9	31		n = 6	n = 5
							49	14
ec-r.2	20E	0,1	3,1	5,0	41	1	± 9	± 6
							n = 7	n = 5
							49	23
ec-r.3	20E					3	± 6	± 6
							n = 7	n = 5

 Tab. 4: Charakterisierung der Ecdysteroid-resistenten Subklone der epithelialen Zellinie von Chironomus tentans

Erhöhte Acetylcholinesterase-Aktivität durch Hormongaben ist in allen resistenten Zellen nicht mehr zu induzieren. In allen untersuchten Zell-Klonen liegen die Metabolismus-Raten für den nicht-steroidalen Hormon-Agonisten RH 5992 (Tefubenozid) unterhalb des Wildtyps. (*) Bande mit geringster elektrophoretischer Mobilität in der SDS-PAGE.

II.2.3.1 Rekonstitution der spezifischen Hormon-Bindung

Mit bakteriell exprimierten GST-Rezeptoren, die unter III.3 noch ausführlicher vorgestellt werden, war es jetzt möglich, in 0,4 M NaCl-Zellextrakten jeweils einen Partner des EcR/USP-Heterodimers zu ergänzen.

Aus Abb. 11 geht hervor, das im Wildtyp sowohl durch Zugabe von GST-cEcR (100 ng/ml Extrakt) als auch GST-cUSP (200 ng/ml Extrakt) die spezifische Bindung um ca. 30% erhöht werden konnte, die aber durch weitere Gaben nicht mehr zu steigern war (Daten nicht gezeigt). Das bedeutet, dass unter diesen Konzentrations-Verhältnissen ungebundene EcR- bzw. USP-Rezeptormoleküle, die noch nicht als Liganden-bindende Heterodimere vorlagen, erschöpft sind.

Ein Vergleich mit Extrakten resistenter Subklone zeigte nun, dass im Gegensatz zu USP nur durch GST-EcR die spezifische Liganden-Bindung wieder hergestellt werden konnte. Dabei lag das Niveau der rekonstituierten Ecdysteroid-Bindung im Bereich der Wildtyp-Kontrolle (Abb. 11).



Abb. 11: Rekonstitution der spezifischen [³H]-Ponasteron A-Bindung des Wildtyps und Hormon-resistenter Subklone der *Chironomus tentans*-Zellinie. 0,4 M NaCl-Extrakte (500 μ l, 3 mg/ml Protein) wurden mit 2 nM Ponasteron A für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und ergänzt mit 50 ng gereinigtem GST-cEcR (schraffiert) bzw. 100 ng gereinigtem GST-cUSP (schwarz). Extrakte ohne Zusatz dienten der Kontrolle (weiss).

Für rh-r.3, der durch den vollständigen Verlust der spezifischen Bindung charakterisiert ist, wurde ein Scatchard-Plot durchgeführt, der in der folgenden Abbildung dargestellt ist. Nach Zugabe von EcR konnte eine hochaffine Pon A-Bindestelle mit $K_D = 2,5$ nM ermittelt werden.



Abb. 12: (aus Grebe et al. 2000): Rekonstitution der spezifischen [³H]-Ponasteron A-Bindung ($K_D = 2,5$ nM) in 0,4 M NaCl-Extrakten des Hormon-resistenten *Chironomus*-Zellklons rh-r.3 durch Addition von bakteriell exprimiertem GST-cEcR (\diamond). Zugabe von GST-cUSP (Δ) bleibt ohne Einfluss auf die Bindung. Ausgewertet wurde nach Scatchard (1949).

Diese Ergebnisse zeigen an, dass die veränderte Hormon-Bindung resistenter Subklone der Insekten-Zellinie von *Chironomus tentans* auf Defekte des EcR zurückzuführen ist.

III.3 Charakterisierung bakteriell exprimierter Rezeptor-Proteine aus *Chironomus tentans*

Elke et al. (1997) haben berichtet, dass die bakterielle Expression der vollständigen Rezeptoren cEcR und cUSP als GST-Fusionsproteine möglich ist. Untersuchungen der Hormon-Bindung von gereinigten GST-Rezeptoren zeigten allerdings, dass die Ausbeute an funktionellen Proteinen mit weniger als 1% nur sehr gering war.

Deshalb wurde in der vorgestellten Arbeit weniger das Ziel verfolgt, allein die resultierenden Rezeptormengen zu steigern, sondern vielmehr die Ausbeute an funktionellem Ecdysteroid-Rezeptor (EcR/USP) zu erhöhen.

III.3.1 Expression und Affinitäts-Reinigung

Die Expression der GST-Fusionsproteine steht unter der Kontrolle des *tac*-Promoters, der durch das Lactose-Analog Isopropyl-thio- β -D-Galaktopyranosid (IPTG) induziert wird. Es zeigte sich, dass eine Reduzierung der IPTG-Konzentration von 0,5 mM auf 0,2 mM den Anteil löslicher Proteine im Überstand erhöhte, wobei sich die Expressions-Raten für GST-EcR und GST-USP (Tab. 5) nicht wesentlich unterschieden haben. Trotz Herabsetzen der Temperatur auf 28°C nach IPTG-Zugabe und verkürzten Inkubationszeiten war nach Zentrifugation des Bakterien-Lysats ein Grossteil der Fusionsproteine (> 90%) durch Einschluss in ,inclusion bodies^c in der unlöslichen Fraktion.

Auf Zusatz von Detergenz zur Erhöhung des Rezeptor-Anteils im Überstand wurde dennoch verzichtet, da frühere Experimente gezeigt haben, dass die Fähigkeit zur Liganden-Bindung Detergenz-gereinigter cEcR/cUSP-Proteine nur noch sehr schwach war (Elke et al. 1997).

Durch verlängerte Inkubationszeiten der Überstände mit Sepharose konnte die Effektivität der Elution der Fusionsproteine verbessert werden. Durch Verwendung einer bis zu 10fachen Gelmenge im Vergleich zur Hersteller-Empfehlung (Pharmacia) und wiederholten Elutionen konnten die Rezeptor-Mengen weiterhin erhöht werden.

Insgesamt waren die Ausbeuten für GST-cEcR etwa um den Faktor 2 niedriger als für GST-cUSP (Tab. 5)

Fusions- protein	Expressions- Raten [mg Rezeptor / L Kultur]	Expressions- Raten [% des Ge- samtproteins	Ausbeute nach Reinigung [µg Rezeptor / L Kultur]	Ausbeute nach Reinigung [% des Ge- samtproteins]
GST-EcR	$3,0 \pm 1,75$	$3,6 \pm 1,6$	$17,5 \pm 10$	$0,46 \pm 0,36$
	(n = 11)	(n = 9)	(n = 6)	(n = 6)
GST-USP	$3,2 \pm 1,4$	$3,3 \pm 0,9$	$37,5 \pm 10$	$0,88 \pm 0,55$
	(n = 7)	(n = 5)	(n = 3)	(n = 3)

Tab. 5: Proteinausbeuten von gereinigtem cEcR und cUSP, die als GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimert wurden



In der folgenden Abbildung sind SDS-Gele zusammengestellt, die den Verlauf der bakteriellen Expression und der anschliessenden Affinitäts-Reinigung demonstrieren sollen.

Abb. 13: Silbergele von repräsentativen SDS-Gelen zur Demonstration der bakteriellen Expression und Affinitäts-Reinigung von GST-cEcR (A) bzw. GST-cUSP (B). Lysat (3 μ g) von nicht-induzierten (1) und IPTG-induzierten Bakterien (2), 3 μ g Rohextrakt (3), 3 μ g Pellet-Fraktion (4), 2 μ g Überstände vor (5) und nach (6) Sepharose-Inkubation, 40 μ l der ersten (7) und zweiten (8) Elution gereinigter GST-Fusionsproteine, 40 μ l nach GST-Abspaltung mit Thrombin (9). In den Spuren 5 und 6 lagen die Rezeptor-Konzentrationen unterhalb des Detektions-Limits.

Aus Abb. 13 geht für GST-cEcR ein apparentes Molekulargewicht von ca. 97 kDa hervor (theoretisch 87 kDa). GST-cUSP mit einem berechneten Molekulargewicht von 77 kDa kann bei ca. 79 kDa detektiert werden.

In Präparationen beider Rezeptoren zeigt sich noch eine schwache Kontamination bei ca. 70 kDa. In Eluaten von gereinigtem GST-cEcR lässt sich bei einem apparenten Molekulargewicht von ca. 45 kDa eine weiteres Protein nachweisen, das zwar durch IPTG induziert werden kann, aber kein GST-enthält (Abb 15).

III.3.2 Abspaltung des GST-Anteils mit Thrombin

Zur Untersuchung unmodifizierter Rezeptoren wurde GST, das zur Affinitäts-Reinigung notwendig war, enzymatisch abgespalten. Für cEcR konnte anschliessend ein apparentes Molekulargewicht von 66 kDa angegeben werden (theoretisch 61 kDa). GST-freies cUSP erscheint bei 51 kDa, was auch der berechneten Grösse entspricht (Abb. 13).

Da die Fähigkeit von Rezeptoren zur Hormon-Bindung durch hohe Temperaturen beeinflusst wird (Turberg & Spindler 1992), wurden verkürzte Zeiten der Inkubationen bei Raumtemperatur gewählt. In Kontrollen wurde daher mit ansteigenden Thrombin-Mengen nach einer Konzentration gesucht, bei der unter den gewählten Bedingungen die Entfernung des GST-Restes quantitativ erfolgte (Abb 14).



Abb. 14: Abspaltung des GST-Anteils von cEcR mit Thrombin. Ca. 4 µg GST-cEcR wurde mit steigenden Enzym-Mengen (0,25 - 25 units/ml) oder in einer Kontrolle ohne Enzym für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Bei einer Thrombin-Konzentration von 25 units/ml erfolgte die Entfernung von GST quantitativ.

Insgesamt können für die Protein-Ausbeuten gereinigter Rezeptoren nach Abspaltung mit Thrombin folgende Angaben gemacht werden:

\triangleright	cEcR:	$9,5 \pm 1,3 \ \mu g / L \ Kultur$	$(=0,31\pm0,04\%$ des Gesamtproteins)
\triangleright	cUSP:	$9,4\pm0,2~\mu g$ / L Kultur	$(=0,29\pm0,02\%$ des Gesamtproteins).

III.3.3 Immunologische Detektion gereinigter Rezeptoren

GST-Rezeptoren wurden mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen. Aus der folgenden Abbildung geht weiterhin hervor, dass auch im Western-Blot die quantitative Abspaltung von GST bestätigt werden konnte.

Mit dem Antiserum pABcE/D (Wegmann et al. 1995), das gegen die D-Domäne gerichtet ist, konnte zusätzlich auch GST-freier EcR detektiert werden.



Abb. 15: Western-Blot mit gereinigten cEcR- bzw. cUSP-Fusionsproteinen vor und nach enzymatischer GST-Abspaltung mit Thrombin. (a) Detektion von GST-cEcR (+) und GST-cUSP (*) mit monoklonalen Anti-GST (Sigma). (b) Nachweis von GST-cEcR (ca. 97 kDa apparent) und cEcR (ca. 66 kDa apparent) mit dem Antiserum pABcE/D (Wegmann et al. 1995).

III.3.4 Untersuchungen zur Hormon-Bindung

III.3.4.1 Ungereinigte Rezeptoren

Untersuchungen mit ungereinigten GST-Rezeptoren ergaben, dass EcR/USP aus 30.000g-Überständen Ponasteron A binden kann. Nur in Gegenwart von USP bindet der Ecdysteroid-Rezeptor (cEcR) spezifisch Hormon (Abb. 16).



Abb. 16: [³H]-Ponasteron A-Bindung in 30.000g Überständen mit ungereinigten GST-Fusionsproteinen. Die Inkubation in Gegenwart von 4 nM Ponasteron A erfolgte für 1 h bei 25°C. Die unspezifische Bindung wurde durch Kompetition mit 0,1 mM 20-OH-Ecdyson bestimmt. (Streuungen der cpm in Doppelbestimmung < 3%)

III.3.4.2 Gereinigte Rezeptoren

Bindungstests mit gereinigten Rezeptoren bestätigten, dass für die Hormonbindung des EcR aus *Chironomus* die Zugabe von cUSP essentiell ist und nur das Heterodimer aus cEcR und cUSP in der Lage ist, spezifisch Hormon zu binden.

Aus Abbildung 17 geht weiterhin hervor, dass sich die Rezeptor-Eigenschaften nach enzymatischer GST-Abspaltung nicht verändert haben. Die Hormon-Bindung des EcR wurde durch weitere Gaben von USP nicht mehr erhöht, d.h., ein USP-Mangel konnte ausgeschlossen werden.

Arbeitman & Hogness (2000) berichten, dass durch die Zugabe von Retikulozyten-Lysat als Quelle möglicher Komodulatoren und Hitzeschock-Proteine die Hormon-Bindung gereinigter Rezeptoren verbessert werden kann. Dieser Effekt konnte von mir nicht beobachtet werden, denn die Zugabe von Retikulozyten-Lysat konnte die Liganden-Bindung von cEcR/cUSP nicht signifikant erhöhen (Abb. 17B).

Somit konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit zur Pon A-Bindung bakteriell exprimierter Rezeptoren während der Reinigungsprozedur erhalten bleibt und EcR/USP auch ohne weitere Hilfsfaktoren Hormon spezifisch binden kann.



Abb. 17: Vergleich der [³H]-Ponasteron A-Bindung von (A) gereinigten GST-Rezeptoren und (B) GST-freien Rezeptoren. (A) 50 ng GST-cEcR/Test bzw. 100 ng GST-cUSP/Test wurden entweder separat oder gemeinsam mit 2 nM Ponasteron A für 1 h bei 25°C inkubiert (\pm S.D. cpm, n = 3). (B) 15 ng cEcR/Test bzw. 50 ng cUSP/Test wurden separat oder gemeinsam für 1 h bei 25°C mit 2 nM Ponasteron A inkubiert. Sowohl die Verdopplung der USP-Menge (2x cUSP) als auch Zugabe von Retikulozytenlysat (+RL, 28 mg/ml Endkonzentration) erhöhte die spezifische Bindung nicht signifikant (\pm S.D. cpm, n = 3).

III.3.4.2.1 Abschätzung der spezifischen Aktivität gereinigter Rezeptoren

Zur Berechnung der Ausbeute an funktionell intaktem EcR war es nicht nur notwendig, einen USP-Mangel zu vermeiden, sondern auch Inkubations-Bedingungen zu wählen, die maximale Hormon-Bindung ermöglichen. Ein Vergleich der Inkubationen über 4 h bei 4°C und 1 h bei 25°C, der in der folgenden Abbildung dargestellt ist, zeigte keinen signifikanten Unterschied.



Abb. 18: Einfluss der Inkubations-Bedingungen auf die spezifische $[^{3}H]$ -Ponasteron A-Bindung von gereinigtem GST-cEcR/GST-cEcR. Eingesetzt wurden 2,3 nM Pon A. (\pm S.D. cpm, n = 3)

Weiterhin wurde überprüft, nach welcher Inkubations-Dauer die spezifische Ponasteron A-Bindung gereinigter GST-Rezeptoren ein Optimum erreicht.



Abb. 19: Spezifische Bindung von [³H]-Ponasteron A. Gereinigte GST-cEcR- und GST-cUSP-Präparationen wurden gemischt und mit 4 nM Pon A über einen Zeitraum von 2 h bei 25°C inkubiert. Alle 20 min. wurden dem Mutteransatz Aliquots entnommen und die Radioaktivität ausgezählt. (Streuungen der cpm < 10%)

Aus Abbildung 19 geht hervor, dass die Hormon-Bindung mit der Zeit zunimmt und nach 1 h ein Maximum erreicht. Somit wurden 1h Inkubation und 25 °C als geeignete Versuchs-Bedingungen bestätigt, um anhand der Bindungs-Daten Ausbeuten gereinigter Rezeptoren bestimmen zu können. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Protein	spez. Aktivität [nmol Bindestellen / mg Rezep- tor]	Hormonbindungs-fähiger Rezeptor [% von Gesamt-Rezeptor]
GST-cEcR	$5,3 \pm 3,0$	47 ± 26
	(n = 6)	(n = 6)
cEcR	$4,0 \pm 1,7$	35 ± 14
	(n = 3)	(n = 3)

Tab. 6: Ausbeuten an bakteriell exprimierten Rezeptoren nach Affinitäts-Reinigung, die spezifisch Hormon gebunden haben

Die Abschätzung an funktionellem EcR erfolgte unter der Annahme, dass pro Rezeptor-Protein ein Molekül Ponasteron A gebunden wird. Nur in Gegenwart von USP konnte Hormon-Bindung an EcR gemessen werden. Ein USP-Mangel der Reaktions-Ansätze konnte ausgeschlossen werden.

III.3.4.2.2 Vergleich von bakteriell exprimiertem EcR/USP mit dem Wildtyp der *Chironomus*-Zellinie

Nun konnte untersucht werden, ob bakteriell exprimiertes und gereinigtes cEcR/cUSP im Vergleich zum Ecdysteroid-Rezeptor des *Chironomus*-Wildtyps ein verändertes Bindungsverhalten zeigt.



Abb. 20: Scatchard-Plot's der [³H]-Ponasteron A-Bindung. Verglichen wurde ein 0,4 M NaCl-Zellextrakt des *Chironomus*-Wildtyps mit Rezeptor-Präparationen von bakteriell ex-

primiertem und gereinigtem cEcR/cUSP bzw. nach Abspaltung des GST-Anteils mit Thrombin. (Streuungen der cpm <10%)

Aus Abb. 20 geht hervor, dass beide hochaffinen Ponasteron A-Bindestellen, die für den Ecdysteroid-Rezeptor des Wildtyps von *Chironomus* charakteristisch sind (Rauch et al. 1998), auch mit gereinigten Rezeptoren bestimmt werden können und durch GST nicht beeinflusst werden.

cEcR/cUSP	K _D [nM] Bindestelle 1	K _D [nM] Bindestelle 2
Chironomus	$0,31 \pm 0,28$	$6,5 \pm 2,4$
Wildtyp	(n = 10)	(n = 10)
bakteriell exprimiert	$0,24 \pm 0,07$	3,9 ± 1,3
und gereinigt	(n = 4)	(n = 8)

Tab. 7: Vergleich von Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten für Ponasteron A, die durch Auswertungen der Hormon-Bindung nach Scatchard (1949) ermittelt wurden.

Die Liganden-Spezifitäten für 20-OH-Ecdyson und RH 5992, die mit Präparationen gereinigter GST-Rezeptoren bestimmt wurden (Abb. 21), sind identisch mit K_D -Werten aus 0,4 M NaCl-Extrakten des Wildtyps von *Chironomus* (Grebe et al. 2000).



Abb. 21: Liganden-Spezifität von bakteriell exprimiertem und Affinitäts-gereinigtem GSTcEcR/GST-cUSP. 5 nM [³H]-Ponasteron A wurde mit steigenden Konzentrationen von 20-OH-Ecdyson (\Box) bzw. RH 5992 (Δ) für 1 h bei 25°C kompetiert. Die Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten für 20E ($K_D = 0,5 \ \mu$ M) bzw. RH 5992 ($K_D = 0,03 \ \mu$ M) wurden nach Cheng & Prusoff (1973) berechnet. (Streuungen der cpm < 10%)

Zusammenfassend kann man festhalten, dass bakteriell exprimierte und gereinigte EcR/USP-Rezeptoren aus *Chironomus* sich bezüglich der Liganden-Bindung vom Wildtyp nicht unterscheiden. Damit kann ihre Verwendung zur weiteren Charakterisierung des funktionellen Ecdysteroid-Rezeptors beitragen.

III.3.4.2.3 Einfluss von Methopren auf die Ponasteron A-Bindung gereinigter Rezeptoren

Juvenilhormon (JH) moduliert die Wirkung von Ecdysteroiden. Daher wurde untersucht, ob Methopren (ein Juvenilhormon-Analogon) die Liganden-Bindung des Ecdysteroid-Rezeptors negativ beeinflussen kann.

EcR und USP, die in einem Gleichgewicht mit dem Heterodimer stehen, können auch Homodimere bilden. Nach Jones & Sharp (1997) wird durch den Liganden JH die USP-Homodimersierung stabilisiert.

Die Frage war, ob durch JH-begünstigte Homodimerisierung USP dem Gleichgewicht mit EcR entzogen werden kann. Daher wurden niedrige USP-Konzentrationen eingesetzt, um den Einfluss auf die Heterodimerisierung bestimmen zu können.



Abb. 22: Einfluss von 5 mM Methopren auf die spezifische [³H]-Ponasteron A-Bindung von gereinigten Rezeptoren. GST-cEcR-Präparationen (E) wurden mit GST-cUSP (U) entweder unverdünnt (1:1) oder mit 4fach verdünntem USP (1:4) gemischt und für 80 min. bei Raumtemperatur in Gegenwart von 4 nM Ponasteron A inkubiert. Der Vergleich zur unverdünnten Kontrolle zeigt an, dass der Methopren-Einfluss im USP-Mangel bestimmt wurde. (Streuungen der cpm < 10%)

In Abb. 22 ist gezeigt, dass in Gegenwart von 5 mM Methopren die spezifische Ponasteron A-Bindung um ca. 70% reduziert werden konnte. Daraus lässt sich ableiten, dass JH die Ecdysteroid-Bindung von EcR/USP beeinträchtigt und möglicherweise das Gleichgewicht der Heterodimerisierungs-Partner beeinflusst.

III.3.5 Bindung an spezifische DNA-Abschnitte (,hormone responsive elements')

Zur weiteren funktionellen Charakterisierung bakteriell exprimierter Rezeptoren wurde in Gelverzögerungs-Experimenten (EMSA) die DNA-Bindung überprüft. Mit bakteriellen Rohextrakten kann in Abb. 23 gezeigt werden, dass sowohl das EcR/USP-Heterodimer ungereinigter GST-Rezeptoren als auch GST-EcR auf den spezifischen Ecre's PAL1 und DR5 binden können. Dagegen bindet GST-USP nur auf DR5.

Banden mit höherer Mobilität im EMSA-Gel deuten an, dass in Präparationen ungereinigter Rezeptoren weitere Proteine vorkommen, die um die gleiche DNA-Bindestelle kompetieren können.



Abb. 23: DNA-Bindung von bakteriell exprimiertem GST-cEcR und GST-cUSP aus *E. coli*-Rohextrakten. Das EcR/USP-Heterodimer und auch GST-cEcR binden auf beiden Elementen im Gegensatz zu GST-cUSP, das nur DR5 bindet und nicht PAL1.

Anschliessend wurde die DNA-Spezifität gereinigter Rezeptoren untersucht und überprüft, ob GST einen Einfluss auf die Bindungs-Eigenschaften hat. Die Ergebnisse sind in den folgenden zwei Abbildungen dargestellt.



Abb. 24: DNA-Bindung mit Präparationen von bakteriell exprimiertem und gereinigtem GST-cEcR (1 - 2 ng) und GST-cUSP (3 - 6 ng). Auf den Elementen PAL1 und DR5 bindet sowohl das EcR/USP-Heterodimer als auch GST-cEcR. Auf der SINGLE-Kontrolle konnte kein spezifisches Signal detektiert werden.

Die DNA-Bindung gereinigter GST-Rezeptoren unterscheidet sich nicht im Vergleich zu ungereinigten Präparationen. Im Gegensatz zu Rohextrakten wurden keine zusätzlichen DNA-bindenden Proteine detektiert.



Abb. 25: DNA-Bindung mit Präparationen von bakteriell exprimiertem und gereinigtem cEcR (ca. 18 ng) und cUSP (ca. 7 ng) nach enzymatischer Abspaltung von GST mit Thrombin. Das Heterodimer bindet auf den Elementen PAL1 und DR5 im Gegensatz zu GST-freiem cEcR, das auf diesen Elementen nicht mehr zu detektieren ist. Aus Abb. 25 geht hervor, dass nach Abspaltung von GST für cEcR keine PAL1-Bindung detektiert werden kann. Daraus lässt sich ableiten, dass die Bindung von GSTcEcR auf diesem Element (Abb. 24) auf den GST-Anteil zurückzuführen ist.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass gereinigtes cEcR/cUSP vor und nach GST-Entfernung als Heterodimer spezifisch DNA binden kann. Für cUSP wurde gezeigt, dass die Bindung auf dem ,direct repeat' GST-unabhängig ist.

Zum Nachweis von USP wurde überprüft, ob der Rezeptor-DNA-Komplex durch Bindung eines spezifischen Antikörpers im Gel verzögert werden kann (,supershift').



Abb. 26: Nachweis von cUSP mit monoklonalem anti-USP AB11 (Khoury-Christianson et al. 1992) auf dem Element DR5. Durch Zugabe von 1 µl Antikörper kann der USP-DNA-Komplex im Gel verzögert werden (,Supershift').

Die Wechselwirkung bakteriell exprimierter Rezeptoren mit DNA wurde auch spektroskopisch (Plasmon-Resonanz) mit Biacore X (Biacore, Uppsala, Schweden) untersucht.

Die Auswertung der Spektren, die in den folgenden zwei Abbildungen dargestellt sind, ergaben, dass GST-Rezeptoren spezifisch auf dem Element PAL1 gebunden haben. Ein linearer Zusammenhang zwischen eingesetzter Rezeptor-Menge und DNA-gebundenen Rezeptoren konnte beobachtet werden.

Die bisherigen spektroskopischen Experimente galten allerdings erst als Vorversuche, um die generelle Tauglichkeit dieser Messung mit gereinigten Rezeptoren zu überprüfen.



Abb. 27: Spezifische DNA-Bindung von bakteriell exprimiertem GST-EcR (E) und GST-USP (U) aus ungereinigten 30.000 g-Überständen in verschiedenen Verdünnungen. Dargestellt ist das Differenz-Spektrum über die Messdauer. 80 μ l einer 1:50 verdünnten Rezeptor-Mischung wurde injiziert. Eine Differenz von 45 RU zeigt für EcR/USP eine spezifische Bindung auf PAL1 an. Die Verdopplung der Konzentrationen (1:25) konnte die Menge an DNA-gebundenem Rezeptor um den Faktor 2 erhöhen.



Abb. 28: Spezifische DNA-Bindung von bakteriell exprimierten und gereinigten GST-Rezeptoren. Dargestellt ist das Differenz-Spektrum über die Messdauer. 80 μ l einer 1:1 Rezeptor-Mischung (ca. 50 ng Rezeptor / Messzelle) wurden injiziert. Eine Differenz von 140 RU zeigt an, dass 0,14 ng Rezeptor spezifisch auf 1 ng PAL1 gebunden haben.

III.4 Charakterisierung der Liganden-bindenden Domänen (LBD's) von EcR und USP aus *Drosophila*

Neben der Charakterisierung von dEcR-LBD und dUSP-LBD des Wildtyps sollten Rezeptor-Domänen, in denen terminale Bereiche deletiert wurden, Aufschluss darüber geben, welche Peptidsequenz für die Hormon-Bindung notwendig ist.

Zusätzlich wurden durch ,site directed mutagenesis' Punktmutationen der LBD hergestellt, die von mir auf ihr Verhalten in Hormon-Bindungstests und von Frau Przibilla (Uni Ulm) in Bezug auf Dimerisierung (EMSA) untersucht wurden.

Die Mutationen bzw. Trunkationen wurden von T. Bergman und V. Henrich im Labor von Prof. Lezzi (ETH Zürich) hergestellt und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

III.4.1 Immunologischer Nachweis der Gal4-Fusionsproteine

Die Rezeptor-Domänen aus *Drosophila* wurden als Gal4-Fusionsproteine (Gal4-ADdEcR-LBD bzw. Gal4-DBD-dUSP-LBD) in der Hefe *S. cerevisiae* exprimiert und mit spezifischen Gal4-Antikörpern nachgewiesen. Quantifizierungen der Banden wurden durchgeführt, um Liganden-Bindungsdaten auf die Konzentration der exprimierten Rezeptor-Proteine normieren zu können.



Abb. 29: Western Blot von Gal4-AD-Fusionsproteinen (**dEcR-LBD-Trunkationen**) aus Extrakten von *S. cerevisiae*. Detektiert wurde mit einem monoklonalen Gal4-AD-Antikörper (Clontech). Das apparente MG von Gal4-AD-dEcR-LBD beträgt 54 kDa. Proteine, in denen die Aminosäuren 375-399, 375-416 bzw. 646-652 deletiert wurden, zeigen eine entsprechend höhere elektrophoretische Mobilität.



Abb. 30: Western Blot von Gal4-AD-Fusionsproteinen (**dEcR-LBD-Punktmutationen**) aus Extrakten von *S. cerevisiae*. Detektiert wurde mit einem monoklonalen Gal4-AD-Antikörper (Clontech). Das apparente MG von Gal4-AD-dEcR-LBD beträgt 54 kDa.



Abb. 31: Western Blot von Gal4-DBD-Fusionsproteinen (**dUSP-LBD-Mutationen**) aus Extrakten von *S. cerevisiae*. Detektiert wurde mit einem polyklonalen Gal4-DBD-Antikörper (Santa Cruz). Das apparente MG von Gal4-DBD-USP-LBD beträgt 59 kDa. Die mutierte Domäne, in der die Aminosäuren 489-508 entfernt wurden, zeigt eine entsprechend grössere elektrophoretische Mobilität.

In den Abb. 29-31 sind typische Beispiele gezeigt, die die Expressions-Raten der Fusionsproteine demonstrieren sollen. Gal4-AD-dEcR-Wildtyp und Varianten, in denen nur eine Aminosäure ausgetauscht wurde, konnten mit einem apparenten Molekulargewicht von 54 kDa nachgewiesen werden. Die LBD's von dUSP fusioniert mit Gal4-DBD (Wildtyp und Punktmutationen) hatten ein apparentes Molekulargewicht von 59 kDa.

In allen weiteren Untersuchungen zur Ponasteron A-Bindung wurde den Hefeextrakten ein Aliquot entnommen und die Expressionen von EcR bzw. USP bestimmt. Zur Standardisierung der Bindungs-Daten konnte dann auf die Rezeptormenge normiert werden bezogen auf die Wildtyp-Kontrolle.

In einigen Extrakten konnten mutierte Fusionsproteine nur sehr schwach bzw. nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Diese wurden von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

III.4.2 Hormon-Bindung der dEcR-LBD des Wildtyps

Mit in-vitro-translatierten Proteinen konnte gezeigt werden, dass dEcR auch in Abwesenheit von USP Hormon binden kann (Vögtli et al. 1999). Diese Charakteristik des Ecdysteroid-Rezeptors aus *Drosophila* wurde mit exprimierten LBD's überprüft.



Abb. 32: [³H]-Ponasteron A-Bindung des EcR aus *Drosophila* in Abwesenheit bzw. in Gegenwart von USP. Die unspezifische Bindung wurde durch Kompetition mit 0,1 mM 20-OH-Ecdyson bestimmt. (Streuungen der cpm < 10%). Die Daten in-vitro-translatierter Rezeptoren wurden von Rauch (1999) übernommen.

Aus Abb. 32 geht hervor, dass dEcR auch in Abwesenheit vom USP Hormon binden kann. Die Ergebnisse, die mit exprimierten Domänen erhalten wurden, unterscheiden sich nicht verglichen mit vollständigen Rezeptor-Molekülen, die in-vitro-translatiert wurden.

III.4.2.1 Bestimmung der optimalen USP-Konzentration

Um zu vermeiden, dass ein Mangel an USP das Ausmass der Hormon-Bindung des EcR/USP-Heterodimers limitiert, wurden verschiedene Mischungs-Verhältnisse von EcR-LBD- und USP-LBD-Hefeextrakten getestet, die in Abb. 33 dargestellt sind.



Abb. 33: Vergleich der [3 H]-Ponasteron A-Bindung verschiedener Mischungs-Verhältnisse (Ratio der Protein-Konzentrationen) zwischen dEcR-LBD und dUSP-LBD. Hefeextrakte des Wildtyps bzw. von zwei dEcR-LBD-Mutanten wurden mit 5 nM Pon A für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. (Ratio 0,7) Proteingehalt der EcR- bzw. USP-Probe = 2,6 mg/ml bzw. 1,9 mg/ml. (Ratio 1,8) Proteingehalt der EcR- bzw. USP-Probe = 1,6 mg/ml bzw. 2,9 mg/ml. (Ratio 3,2) Proteingehalt der EcR- bzw. USP-Probe = 0,6 mg/ml bzw. 1,9 mg/ml. (Streuungen der cpm < 10%)

Bei einem Mischungsverhältnis zwischen EcR/USP = 0,7 (bezogen auf den Proteingehalt der Extrakte) wird für die Hormonbindung des EcR in Abwesenheit von USP bereits 35% der Heterodimer-Kontrolle ermittelt (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet, dass durch Zugabe von USP das Ausmass der Hormon-Bindung nur um den Faktor 2,5 gesteigert werden kann (Abb. 33). Tatsächlich lag in dieser Inkubation aber ein USP-Mangel vor. Erst bei einem Mischungsverhältnis von 1,8 konnte durch Addition von USP die Ponasteron A-Bindung des Wildtyp-EcR's um den Faktor 10 gesteigert und auch durch ein weiteres Überangebot von USP nicht mehr erhöht werden.

Die Hormon-Bindung von dEcR^{S553A} (Abb. 37A) bzw. dEcR^{T619A} (Abb. 38A) in Abwesenheit von USP liegt deutlich überhalb der Wildtyp-Kontrolle, während nach Addition des Heterodimerisierungs-Partners das Niveau des Wildtyps nicht wesentlich überschritten wird (Abb. 37B-38B). Daraus resultiert eine verringerte Zunahme der Liganden-Bindung um den Faktor 6-8, die durch veränderte Rezeptor-Eigenschaften (Austausch von Aminosäuren) hervorgerufen wird. Unter III.4.3.2 werden diese Punktmutationen noch genauer vorgestellt. In den folgenden Experimenten wurden daher immer Konzentrations-Verhältnisse zwischen EcR und USP gewählt, bei denen in der Wildtyp-Kontrolle die 10-fache Erhöhung der Liganden-Bindung des EcR nach Zugabe von USP ermittelt werden konnte.

III.4.3 Hormon-Bindung der Liganden-bindenden Domäne des dEcR's (Trunkationen und Punktmutationen)

Die im folgenden Abschnitt vorgestellten Ergebnisse zur Hormon-Bindung resultieren aus zwei Fragestellungen:

- 1. Welche Aminosäure-Sequenz ist notwendig, um eine dem Gesamtmolekül vergleichbare Hormon-Bindung zu erhalten?
- 2. Wie wird die Funktion der dEcR-LBD durch Austausch von Aminosäuren verändert?

Dazu wurde das Bindungs-Verhalten der dEcR-LBD unter zwei Gesichtspunkten näher untersucht:

- Liganden-Bindung des dEcR in Abwesenheit von dUSP
- Dimerisierungs-abhängige Liganden-Bindung des dEcR in Anwesenheit von dUSP

In Abb. 34 ist die Aminosäure-Sequenz des EcR-Konstruktes dargestellt. Fusioniert an Gal4-AD wurde der C-terminale Anteil der D-Domäne (,hinge'-Region) und die komplette E-Domäne exprimiert. Punktmutationen und Trunkationen sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Liganden-bindende Domänen nukleärer Rezeptoren sind durch 11-12 Helix-Bereiche und ein ß-Faltblatt charakterisiert. Die Lage und Zuordnung der Helices wurde aus Spindler et al. (im Druck) übernommen.

Von besonderem Interesse waren Mutationen in Helix 10, die für die Dimerisierung wichtig ist (Bourguet et al. 1995) und Aminosäuren der Helix-Bereiche 4 und 12, die an der Ausbildung einer Salzbrücke (Wurtz et a. 1996) beteiligt sein können.



III.4.3.1 Trunkationen

In zwei unabhängigen Versuchsserien wurde in Doppelbestimmungen die Ponasteron A-Bindung der EcR-LBD in Abwesenheit und in Gegenwart des Heterodimerisierungs-Partners USP-LBD bestimmt. Die spezifische Hormon-Bindung bezogen auf die Expressions-Raten der Rezeptor-Fusionsproteine wurde auf Wildtyp normiert.



Abb. 35: [³H]-Ponasteron A-Bindung der (A) Deletionsmutationen von Gal4(AD)-dEcR(LBD) und (B) Hormon-Bindung des Heterodimers nach Zugabe von Gal4(DBD)dUSP(LBD). Extrakte wurden mit 5 nM Pon A für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Serien mit Streuungen in (A) < 11%und (B) < 32% [bzw. <10% für ∆375-399].

Die Mutationen dEcR^{$\Delta 375-399$} und dEcR^{$\Delta 375-416$}, in denen ein C-terminaler Bereich der D-Domäne des Rezeptors entfernt wurde, zeigten eine deutliche Abnahme in der Fähigkeit zur Liganden-Bindung (Abb. 35). Das bedeutet, dass auch die ,hinge'-Region für diese Funktion wichtig ist. Die Mutation dEcR^{$\Delta 646-652$} verdeutlicht, dass die C-terminale Helix 12 der E-Domäne von dEcR für Liganden-Bindung in Abwesenheit und Gegenwart von USP essentiell ist. Aus diesen Befunden lässt sich ableiten, dass die komplette Sequenz des gewählten dEcR-LBD-Konstruktes für die Hormon-Bindung notwendig ist.

Offensichtlich wird die Hormon-Bindung des EcR/USP-Heterodimers im Vergleich zum EcR in USP-Abwesenheit durch die Deletionen stärker beeinträchtigt. Damit ist ein erster Hinweis gegeben, dass die Liganden-bindende Tasche des EcR nicht in beiden Fällen gleich ist.

III.4.3.2 Punktmutationen

Für nukleäre Rezeptoren der Vertebraten wurde beschrieben, dass zwischen Lys der Helix 4 und Glu der Helix 12 eine Salzbrücke ausgebildet werden kann (Wurtz et al. 1996).



Abb. 36: [³H]-Ponasteron A-Bindung von (A) Gal4(AD)-dEcR(LBD) (**Punktmutationen in Helix 4 und 12**) und (B) Hormon-Bindung des Heterodimers nach Zugabe von Gal4(DBD)-dUSP(LBD). Extrakte wurden mit 5 nM Pon A für 1h bei Raumtemperatur

inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Serien mit Streuungen in (A) und (B) $\!<\!17\%$

Innerhalb der Helix 12 (dEcR-LBD) existiert Glu an zwei Positionen, das in den Mutationen dEcR^{E647R} bzw. dEcR^{E648K} substituiert wurde. Durch Einführung von Ser⁶⁴⁷ werden die Rezeptor-Bindungseigenschaften nicht wesentlich beeinträchtigt. Das bedeutet, dass nicht alle Aminosäuren der Helix 12 für die Liganden-Bindung essentiell sind. Dagegen führt Lys⁶⁴⁸ zu einer ganz wesentlichen Reduzierung der Liganden-Bindung nur in Abwesenheit von USP. Daraus lässt sich ableiten, dass die Ausbildung einer möglichen Salzbrücke zwar zur Liganden-Bindung des EcR notwendig ist, wenn kein

USP anwesend ist, aber in Gegenwart des Heterodimerisierungs-Partners dieser Effekt teilweise kompensiert werden kann. Auch durch Austausch von Lys⁴⁹⁷ in Helix 4 mit Ala⁴⁹⁷ bzw. Glu⁴⁹⁷ wird die Fähigkeit

des EcR zur Liganden-Bindung beeinträchtigt. Dabei wirkt sich die Substitution der basischen Seitenkette durch einen sauren Rest auf die Hormonbindung des EcR in Anwesenheit von USP noch drastischer aus als durch Einführung eines Methylrestes an dieser Position.



Abb. 37: [³H]-Ponasteron A-Bindung von (A) Gal4(AD)-dEcR(LBD) (Punktmutationen) und (B) Hormon-Bindung des Heterodimers nach Zugabe von Gal4(DBD)dUSP(LBD). Extrakte wurden mit 5 nM Pon A für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Serien mit Streuungen in (A) < 9% [Ausnahme M504R < 23%] und (B) < 13% [Ausnahme M505R < 34%
Helix 3 und 5 nukleärer Rezeptoren sind an der Ausbildung der Liganden-bindenden Tasche beteiligt (Moras & Gronemeyer 1998). In dEcR^{1463T} wurde innerhalb der Helix 3 durch Substitution von Ile zu Thr eine polare Seitenkette eingeführt. Ein Vergleich zum Wildtyp zeigt, dass sowohl die Ponasteron A-Bindung des EcR als von EcR/USP nicht signifikant beeinflusst werden. (Abb. 37).

Im Gegensatz dazu ist Met⁵⁰⁴ innerhalb der Helix 5, das durch Arg⁵⁰⁴ ausgetauscht wurde, für Hormon-Bindung essentiell. Arg⁵¹¹ in Helix 5 ist weniger in Hormon-Bindung des Heterodimers involviert, denn nur die Fähigkeit zur Liganden-Bindung des EcR in Abwesenheit von USP ist in der Mutante dEcR^{R511Q} stark reduziert.

Helix 10 Liganden-bindender Domänen nukleärer Rezeptoren ist ganz wesentlich an Dimerisierungs-Prozessen beteiligt. Deshalb wurde mit Mutationen innerhalb dieser Proteinsequenz untersucht, ob die Dimerisierungs-abhängige Ligandenbindung des EcR im Vergleich zur Hormon-Bindung in Abwesenheit von USP unterschiedlich beeinflusst wird. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung dargestellt.



Abb. 38: [³H]-Ponasteron A-Bindung von (A) Gal4-(AD)-dEcR(LBD) (**Punktmutationen in Helix 10**) und (B) Liganden-Bindung des Heterodimers nach Zugabe von Gal4(DBD)-

dUSP(LBD). Extrakte wurden mit 5 nM Pon A für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchsserien mit Streuungen in (A) < 11% [Ausnahmen: dEcR^{A612V} < 26% bzw. dEcR^{L615A} < 31%] und (B) < 22%

Aus Abb. 38 geht hervor, dass durch Mutationen von Ala⁶¹² bzw. Leu⁶¹⁵ nur die Fähigkeit zur Dimerisierungs-abhängigen Hormonbindung stark diskriminiert wird, während die Ponasteron A-Bindung in Abwesenheit von USP im Bereich des Wildtyps liegt bzw. durch den Austausch von Leu⁶¹⁵ noch deutlich erhöht werden kann.

Offensichtlich ist Leu an Position 615 innerhalb der Helix 10 für die Liganden-bindende Funktion des EcR nur suboptimal, gewährleistet aber Hormon-Bindung des Heterodimers.

Dagegen bewirkt der Austausch von Ile⁶¹⁷ durch Ala⁶¹⁷ bzw. Glu⁶¹⁷ eine deutliche Beeinträchtigung der Liganden-Bindung des EcR. Die Hormonbindung von EcR/USP wird durch die verkürzte Seitenkette des Ala⁶¹⁵ nicht beeinflusst. Erst durch Einführung eines sauren Aminosäure-Restes durch Glu⁶¹⁵ wird auch die Liganden-Bindung des Heterodimers beeinträchtigt.

Daraus lässt sich ableiten, dass nicht alle Aminosäuren der Helix 10 für die Dimerisierung essentiell sind. Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass durch Dimerisierung mit USP die Liganden-Bindung des EcR wesentlich beeinflusst werden kann.

Wird die hydrophile Seitenkette von Thr⁶¹⁹ durch eine Methylgruppe ersetzt, bleiben beide untersuchten Rezeptor-Funktionen unbeeinflusst. Erst durch die Einführung einer basischen Aminosäure (dEcR^{T619K}) wird offensichtlich die Fähigkeit zur Liganden-Bindung des Heterodimers beeinträchtigt, während Hormon-Bindung des EcR in Abwesenheit von USP signifikant erhöht wird. Das bedeutet, dass Thr⁶¹⁹ in Dimerisierungs-abhängiger Hormonbindung involviert ist, aber für Hormon-Bindung in Abwesenheit von USP nur eine suboptimale Aminosäure darstellt.

Zwei Mutationen, die untersucht wurden, lagen ausserhalb von Helix-Bereichen. Sowohl dEcR^{S553A} als auch dEcR^{N626K} zeigten eine leicht erhöhte Dimerisierungsabhängige Pon A-Bindung (Abb. 37).

Interessant war, dass durch den Austausch der sauren Seitenkette des Asp⁶²⁶ durch die basische Seitenkette von Lys⁶²⁶ die Liganden-Bindung des EcR in Abwesenheit von USP im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor 2,5 gesteigert werden konnte.

Zusammenfassend kann man für den EcR aus Drosophila festhalten:

- sowohl Helix 12 der E-Domäne als auch der C-terminale Bereich der D-Domäne (,hinge'-Region) des EcR sind für Liganden-Bindung essentiell.
- Mutationen von AS, die an der Ausbildung einer Salzbrücke zwischen Helix 4 und Helix 12 beteiligt sein können, führen zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Li-

ganden-Bindung des EcR. Durch Dimerisierung mit USP kann die Hormon-Bindung wieder verbessert werden.

- Die Liganden-bindende Tasche des EcR kann durch Heterodimerisierung mit USP modifiziert werden.
- mit Mutationen innerhalb der Helix 10 konnte bestätigt werden, dass diese Struktur für Heterodimerisierung wichtig ist. Aber nicht alle Aminosäuren dieser Helix sind für diese Funktion essentiell.
- Einige Aminosäuen sind beteiligt an Liganden-Bindung des EcR in Abwesenheit und Gegenwart von USP, während andere Aminosäuren nur in einer dieser Funktionen involviert sind.
- Verschiedene Aminosäuren sind für die Liganden-Bindung des EcR nur suboptimal, erleichtern aber die Dimerisierung.

In Gelverzögerungs-Experimenten (EMSA) wurden die Mutationen von Frau Przibilla (Universität Ulm) bezüglich ihrer Fähigkeit zur Heterodimerisierung überprüft, die Hormon-abhängig war.

Diese Befunde decken sich mit den in dieser Arbeit bisher vorgestellten Ergebnissen der Liganden-Bindung in Abhängigkeit von der Dimerisierung.

III.4.4 Einfluss von dUSP-LBD (Punktmutationen und Trunkationen) auf die Hormon-Bindung der dEcR-LBD

In Abb. 39 ist die Aminosäure-Sequenz des dUSP-Konstruktes dargestellt. Fusioniert an Gal4-DBD wurde ein C-terminaler Anteil der D-Domäne und die vollständige E-Domäne exprimiert.

Punktmutationen und eine Trunkation, deren Einfluss auf die Hormonbindung der dEcR-LBD in Gegenwart von dUSP-LBD untersucht wurden, sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Lage und Zuordnung der Helix-Bereiche wurde aus Spindler et al. (im Druck) übernommen.



In Abschnitt III.4.2 konnte bereits nachgewiesen werden, dass Ponasteron A von dUSP nicht gebunden werden kann. In einzelnen Kontrollen mit dUSP-LBD-Mutationen konnte dies bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Bei der Betrachtung der Daten ist weiterhin zu berücksichtigen, dass in den Inkubationen immer auch dEcR war, was schon ohne Zugabe von USP ca. 10% der Liganden-Bindung der EcR/USP-Kontrolle ausmacht (Abb. 32).



Abb. 40: [³H]-Ponasteron A-Bindung von Gal4(AD)-dEcR(LBD) (wt) nach Zugabe von Gal4(DBD)-dUSP(LBD) des Wildtyps bzw. Mutationen. Die Extrakte wurden mit 5 nM Pon A für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Serien. Streuungen < 11% [Ausnahmen: USP^{1323A} < 19% bzw. USP^{E492K} < 35%]

In dUSP^{Δ 489-508} wurde ein Teil der Helix 12 von dUSP-LBD deletiert. Diese Trunkation hat zur Konsequenz, dass die Liganden-Bindung der dEcR-LBD durch Anwesenheit von USP nicht erhöht werden kann, denn es kann nur noch die Hormon-Bindung von EcR gemessen werden, die unabhängig vom Dimerisierungspartner ist (Abb. 40).

Aber nicht alle untersuchten Mutationen innerhalb der Helix 12 haben einen Effekt, denn ein Austausch von $\text{Glu}^{492} \rightarrow \text{Lys}^{492}$ hat keinen signifikanten Einfluss auf die Dimerisierungs-abhängige Hormon-Bindung. Erst durch eine weitere Substitution in $\text{dUSP}^{\text{L489R/E492K}}$ von Leu⁴⁸⁹ \rightarrow Arg⁴⁸⁹, dass heisst, Ersetzen einer hydrophoben Seitenkette durch einen basischen Rest, wird die Fähigkeit zur Hormon-Bindung im Vergleich zur Heterodimer-Kontrolle deutlich reduziert.

Drei in Abb. 40 dargestellte Mutationen (dUSP^{L281Y}, dUSP^{I323A} und dUSP^{C329A}) innerhalb der Helix-Bereiche 3 und 5 führen zu einer Beeinträchtigung der Hormon-Bindung des EcR in Anwesenheit von USP.

Aus diesen Ergebnissen kann man schliessen, dass die Liganden-bindende Tasche des Dimerisierungspartners USP die Hormonbindung des EcR beeinflusst.

III.4.5 Kombinationen von dEcR/dUSP-Mutationen

Die Mutante Gal4(DBD)-dUSP-(LBD)^{I323A}, die mit Gal4(AD)-dEcR(LBD) (wt) in der Hefe *S. cerevisiae* koexprimiert wurde, zeigte im ,two hybrid assay' nach Hormonzugabe eine deutliche Zunahme der Gal4-spezifischen Transaktivierung im Vergleich zur Kontrolle mit USP des Wildtyps (V. Henrich, persönliche Mitteilung).

Daher wurde überprüft, ob die verstärkte Induktion der Galaktosidase-Aktivität nach Hormon-Zugabe durch eine effektivere Liganden-Bindung des Heterodimers verursacht wird. Verschiedene Kombinationen von dEcR-LBD-Mutationen mit dUSP^{I323A} wurden getestet und deren Ergebnisse in Abb. 41 zusammengefasst.



Abb. 41: [³H]-Ponasteron A-Bindung des Wildtyps (EcR-wt) und verschiedener Punktmutationen der dEcR-LBD, die als Gal4-AD-Fusionsproteine in *S. cerevisiae* exprimiert wurden, nach Zugabe von Gal4-DBD-dUSP-LBD (USP-wt) bzw. der Mutante dUSP^{I323A}. Extrakte wurden mit 5 nM Pon A für 1 h bei RT inkubiert. Die Expressions-Raten für dUSP-LBD-Wildtyp und dUSP^{I323A} waren identisch. (Streuungen der cpm < 10%)

In keinem der untersuchten Beispiele konnte die Hormonbindung des EcR durch dUSP^{I323A} im Vergleich zum USP-Wildtyp erhöht werden. Die ca. 30%-ige Reduktion der Ponasteron A-Bindung des EcR in Gegenwart von dUSP-LBD^{I323A} (III.4.3.2) wurde bestätigt. Damit sind die erhöhten Werte, die im two-hybrid-System ermittelt wurden, nicht auf verbesserte Liganden-Bindung zurückzuführen.

Auch konnte durch dUSP^{I323A} für keine EcR-Mutation auf das Niveau der Wildtyp-Kontrolle rekonstituiert werden. Vergleicht man die Mutanten, kann in den vier EcR-Varianten eine ähnliche Abnahme festgestellt werden, die offensichtlich von der Fähigkeit der EcR-Mutationen, in Abwesenheit vom Dimerisierungs-Partner Hormon zu binden, unabhängig ist (vergl. Abb. 38).

Daraus lässt sich ableiten, dass die Mutation dUSP^{I323A} mit EcR keinen Komplex bilden kann, der im Vergleich zum EcR/USP des Wildtyps eine höhere Liganden-Affinität besitzt.

IV Diskussion

IV.1 Der Ecdysteroidrezeptor resistenter *Chiromomus tentans*-Zellklone – Mechanismen der Hormon-Resistenz

Ausgehend vom Chironomus-Wildtyp konnten durch kontinuierliche Hormongaben mit ansteigenden Konzentrationen über einen Zeitraum von ca. 2 Jahren Ecdysteroid restistente Subklone erhalten werden (Spindler-Barth & Spindler 1998a). Vier 20Eselektionierte (EC-Klone ec-r.0 bis ec-r.3) bzw. sechs RH 5992-selektionierte Klone (RH-Klone rh-r.1 bis rh-r.6) wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht. Neben morphologischen Kriterien wie Zelldifferenzierung und Veränderung der Zellgestalt diente die Induzierbarkeit der Acetylcholinesterase-Aktivität als biochemischer Nachweis der erworbenen Hormon-Insensitivität (Stevens & O'Conner 1982). Die sehr hohe Stimulation der Enzymaktivität (ca. 30-fach) in Wildtyp-Zellen erlaubt es, auch noch sehr schwache Unterschiede in der Hormonantwort zu detektieren. Es zeigte sich, dass RH-Klone gegen Tefubenozid und 20E resistent sind, wobei diese Doppelresistenz synchron auftrat. Im Gegensatz dazu konnte in EC-Klonen anfangs nur eine Insensitivität gegenüber dem Häutungshormon festgestellt werden (Spindler-Barth, pers. Mitteilung), während die Enzym-Induktion durch den Agonisten RH 5992 weiterhin gegeben war. Damit wurde zum ersten Mal deutlich, dass die Erlangung einer Hormon-Resistenz auf unterschiedlichen Wegen etabliert werden kann. Diese EC-Klone, die auch weiterhin unter Selektionsdruck durch Gegenwart von 20E gezüchtet wurden, entwickelten erst zu einem späteren Zeitpunkt eine Insensitivität gegenüber Tefubenozid. Daraus lässt sich ableiten, dass auch Mehrfach-Resistenzen erworben wurden.

Einmal erlangte Ecdysteroid-Resistenz ist stabil. Zellen des Klons rh-r.3, die über einen Zeitraum von ca. 1 Jahr in Tefubenozid-freiem Medium gehalten wurden, konnten keine Ansprechbarkeit auf Hormon zurückerlangen (Rauch, pers. Mitteilung). So kann in Ecdysteroid-resistenten Zellen eine transiente "Down"-Regulation des Hormon-Rezeptors, wie für *Drosophila*-Zellen bereits beschrieben wurde (Koelle et al. 1991), ausgeschlossen werden.

Damit stehen mit der epithelialen Insekten-Zellinie von *Chironomus tentans* Subklone mit Defekten in der hormonellen Signaltransduktion zur Verfügung, die zur Aufklärung möglicher Ursachen zur Erlangung einer Ecdysteroid-Resistenz auf molekularer Ebene untersucht wurden. Neben dem Hormon-Metabolismus wurden vor allem die nukleären Rezeptoren EcR und USP, die als Heterodimer den funktionellen Ecdysteroid-Rezeptor bilden, charakterisiert.

Kayser et al. (1997) haben für EC-Klone aus früheren Selektions-Passagen erhöhten 20-OH-Ecdyson-Metabolismus zeigen können, der durch einen Anstieg des Cytochrom-P450-abhängigen oxidativen Abbaus zu biologisch inaktivem 20,26-Dihydroxy-Ecdyson hervorgerufen wird. Auch für die Lepidopteren *Manduca sexta* und *Spodoptera* *littoralis* konnte eine P450-abhängige Inaktivierung von 20E festgestellt werden (Williams et al. 1996). In EC-Klonen korrelierten die Metabolismusraten mit der Ansprechbarkeit auf Hormon. Das bedeutet, dass sich durch Anzucht der Zellen in ständiger Gegenwart des Häutungshormons erhöhter Metabolismus als Ursache der Hormon-Resistenz entwickelt hat und erst zu einem späteren Zeitpunkt ein weiterer Resistenz-Mechanismus gegen RH 5992 auftrat.

Die Induktion detoxifizierender und inaktivierender Enzyme durch Insektizide ist ein wesentlicher Mechanismus zur Erlangung einer Insensitivität (Scott 1999) und wurde bereits für Manduca sexta beschrieben (Williams et al. 1997). Daher wurde untersucht, ob auch in RH-Klonen ein veränderter Insektizid-Abbau als Urache der Tefubenozid-Resistenz beobachtet werden kann. In Zellen des Wildtyps wird RH 5992 innerhalb von 24 Stunden zu über 50% abgebaut. Dabei erfolgt die Umsetzung, die nach 7 Tagen 100% erreicht, in drei Produkte höherer Polarität (Grebe 1997). Da Produkte gleicher Retentionszeit und identischer Trennbedingungen biologisch inaktiv sind (Dhadialla, pers. Mitteilung), wurde auf eine Strukturaufklärung verzichtet. Die Untersuchung der RH-Klone ergab, dass in keinem Fall die RH 5992-Abbaurate erreicht wurde, die für den Wildtyp charakteristisch ist (Grebe et al. 2000). Auch in den zwei ausgewählten EC-Klonen ec-r.1 und ec-r.2 blieben die Metabolismusraten unterhalb des Wildtyps. Damit kann für RH-Zellklone ein erhöhter Tefubenozid-Abbau als Ursache für Hormonresistenz ausgeschlossen werden. Weiterhin kann festgehalten werden, dass die zusätzlich erworbene RH 5992-Insensitivität der EC-Klone, für die erhöhter 20E-Abbau beobachtet wurde, nicht durch veränderten Tefubenozid-Metabolismus verursacht wird.

Auch für zwei Schmetterlinge (*Spodoptera littoralis* bzw. *Spodoptera exigua*) und dem Kartoffelkäfer *Leptinotarsa decemlineata* konnte RH 5992-Metabolismus nachgewiesen werden (Smagghe & Degheele 1993). Interessanterweise korrelierten die Abbauraten innerhalb der untersuchten Spezies nicht mit der biologischen Wirkung des Pestizides auf die Testtiere. Da die insektizide Eigenschaft von Tefubenozid vorwiegend für Schmetterlinge gilt, müssen weitere Mechanismen gegeben sein, die über die selektive Wirkung entscheiden. Sundaram et al. (1998) haben berichtet, dass im Gegensatz zu Lepidopteren-Zellinien in zwei Zellinien von *Drosophila melanogaster* ein erhöhter aktiver Export von Tefubenozid beobachtet werden konnte.

Vergleicht man die Liganden-Spezifitäten (Tab. 8) für den Ecdysteroid-Agonisten RH 5992 und 20-OH-Ecdyson, die über [³H]-Ponsasteron A-Bindungstests mit Zellextrakten verschiedener Spezies innerhalb der Arthropoden ermittelt wurden, wird deutlich, dass die Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten (K_D's) mit der selektiven Lepidopteren-Toxizität korrelieren (Dhadialla et al. 1998). Mögliche Erklärungen für diese Spezies-Spezifitäten liefert ein Homologie-Modell der LBD des EcR aus *Chironomus*, das auf Röntgen-Kristallstruktur-Analysen des RAR und VDR basiert (Wurtz et al. 2000). Aufgrund dieser Vorhersage der Sekundärstruktur können innerhalb der Ligandenbindenden Tasche die meist hydrophoben Reste von 23-24 Aminosäuren mit dem Liganden in Wechselwirkung treten. Drei Positionen (Val³²⁶, Met³⁶⁸ und Ile³⁷⁹) sind zwar innerhalb der Dipteren und Coleopteren konserviert, aber in Lepidopteren mit anderen Aminosäuren (Met³²⁶, Val³⁶⁸ und Val³⁷⁹) besetzt. Interessant ist nun, dass gerade durch

Valin an Position 326 (nicht bei Lepidopteren) der Kontakt mit der C5-Methyl-Gruppe bzw. der C4-Ethyl-Gruppe des RH 5992 erschwert sein müsste, was die herabgesetzte Rezeptor-Affinität erklären kann. Eine Ausnahme stellt die EcR-Sequenz von *Chironomus* dar, die an Position 326 ein Ile besitzt. Im Vergleich zum Val anderer Dipteren besitzt der Ile-Rest eine verlängerte Kohlenstoff-Kette. Auffallend ist, dass RH 5992 zum cEcR eine um den Faktor 10 höhere Affinität besitzt verglichen mit dEcR (Tab. 8). Möglicherweise kann durch Ile³²⁶ ein stabilisierender Kontakt ausgebildet werden, der die Diacylhydrazin-Bindung des EcR aus *Chironomus* begünstigt. Anhand des Homologie-Modells der cEcR-LBD (Wurtz et al. 2000) kann für den EcR aus *Tenebrio molitor* (Coleoptera) die Vorhersage getroffen werden, dass die Affinität für Diacylhydrazine verschlechtert sein muss, da im Vergleich zu anderen EcR-Sequenzen zwei AS-Reste verändert sind (I323T und A382V), die für den Kontakt mit dem Liganden wichtig sind. Allerdings können präzisere Aussagen erst dann getroffen werden, wenn vom EcR die Röntgen-Kristallstruktur vorliegt.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass die Spezifität der biologischen Wirkung von Tefubenozid eher über veränderte Liganden-Affinitäten und modifizierte Transportmechanismen erreicht wird und erhöhte Metabolismus-Raten dabei nicht involviert sind.

Da veränderte Liganden-Spezifitäten durch Rezeptor-Modifikationen auch im Zusammenhang mit Hormon-Resistenz stehen können, wurden Zellextrakte verschiedener *Chironomus*-Klone in Kompetitionstests mit [³H]-Ponasteron A untersucht. So konnte für den Zellklon rh-r.2 eine im Vergleich zum Wildtyp deutlich herabgesetzte Tefubenozid-Bindung ermittelt werden. Ein Vergleich mit dem *Chironomus*-Wildtyp und weiterer Insekten ist in Tab. 8 dargestellt.

Tab. 8: Vergleich von Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten (K _D , Angaben in nM) für
Tefubenozid (RH 5992) und 20-OH-Ecdyson (20E) verschiedener Arthropoden und einem
Hormon-resistenten Chironomus-Klon (rh-r.2).

Ligand	<i>Chir</i> Klon rh-r.2	Chironomus- tentans (Diptera)	Drosophila melanogaster (Diptera)	Plodia interpunctella (Lepidoptera)	Anthonomus grandis (Coleoptera)
20E	19.000	400	60	210	247
RH 5992	193.000	20	200	3	12.500*

Die Angaben für *Drosophila*, *Plodia* und *Anthonomus* wurden aus Dhadialla et al. (1998) übernommen. (*) Im AgEcR, für den die Sequenz erst teilweise bekannt ist, wurde im Vergleich zu anderen EcR's innerhalb der Liganden-bindenden Tasche ein AS-Austausch (T327A) gefunden (Dhadialla & Tzertzinis 1997). Thr \rightarrow Ala hätte zur Folge, dass zwischen RH 5992 und Thr keine stabilisierende Wasserstoff-Brücke ausgebildet werden kann und somit die Spezifität für Tefubenozid herabgesetzt wäre (Wurtz et al. 2000).

Wang et al. (2000) haben nach Ursachen gesucht, die über die unterschiedliche Liganden-Bindung des Ecdvsteroid-Rezeptors verschiedener Spezies entscheiden können. Sie konnten zeigen, dass eine Aminosäure innerhalb der Liganden-bindenden Domäne (Phe⁵²⁹ des Aedes-EcR bzw. Tyr⁶¹¹ des Drosophila-EcR) die Liganden-Spezifität wesentlich beeinflusst. Interessanterweise konnte auch im EcR der resistenten Zellklone rhr.2 bzw. ec-r.3 innerhalb der für die Dimerisierung wichtigen Helix 10 der Ligandenbindenden Domäne eine Transversion von Met zu Ile (M481I) gefunden werden (Zöllner 2000), die im Zusammenhang mit Ecdysteroid-Resistenz stehen kann. Die Tatsache, dass die Doppelresistenz gegen Tefubenozid und dem natürlichen Häutungshormon in rh-r.2 synchron auftrat und die Dissoziationskonstanten für RH 5992 als auch für 20E im Vergleich zum Wildtyp deutlich grösser sind, unterstützen den Verdacht, dass diese Rezeptor-Mutation die Ursache einer Hormon-Insensitivität ist. Allerdings scheint diese Rezeptor-Modifikation im Vergleich zum Steroidhormon 20E einen grösseren Einfluss auf die Bindung des nicht-steroidalen Ecdysteroid-Agonisten auszuüben. In einem Gelverzögerungs-Experiment von Rauch (1999) wurde gezeigt, dass in rh-r.2-Extrakten die EcR/USP-Dimerisierung nicht nachzuweisen war. Diese Beobachtungen stützen die Annahme, dass durch eine EcR-Mutation im Bereich der Helix 10 neben der Liganden-Spezifität auch die Dimerisierung beeinträchtigt ist.

Für den Ecdysteroid-Rezeptor aus rh-r.3 konnte Zöllner (2000) innerhalb der für alle EcR's hoch konservierten Helix 3 eine weitere Mutation (I323L) nachweisen. Nach Vorhersagen der cEcR-Sekundärstruktur (Wurtz et al. 2000) kann Ile³²³ mit dem Liganden durch Ausbildung einer Wasserstoff-Brücke in Kontakt treten. Die sich die C4-Reste von Leu bzw. Ile in der Verzweigung der Kohlenstoff-Kette unterscheiden, können sich die Abstände für hydrophobe Wechselwirkungen ändern, was die Ligand-Rezeptor-Interaktion beeinflussen würde.

Für den Wildtyp der epithelialen Zellinie von *Chironomus tentans* wurden zwei hochaffine Ponasteron A-Bindestellen ermittelt mit K_D-Werten von $0,31 \pm 0,28$ nM und $6,5 \pm 2,4$ nM (Rauch et al. 1998, Grebe et al. 2000). Basierend auf diesen Eigenschaften des Wildtyps können für die resistenten Zellklone bezüglich ihrer Hormon-Bindung neben veränderter Liganden-Spezifität 4 weitere Klassen angegeben werden.

- Liganden-Bindung entspricht dem Wildtyp
- Hormon-Bindung mit K_D-Werten wie Wildtyp, aber stark reduzierte Anzahl an Bindestellen
- Selektiver Verlust einer Bindestelle und Abnahme der Anzahl gebundener Hormon-Moleküle
- Verlust der spezifischen Hormon-Bindung

Auffallend ist, dass Zellen mit normaler Hormon-Bindung durch 3 EC-Klone (ec-r.0 – ec-r.2) repräsentiert werden. Das heisst, dass Subklone, in denen gestörte Ligand-

Rezeptor-Bindung nicht ursächlich sein kann für Hormon-resistente Zelleigenschaften, durch Selektion mit 20-OH-Ecdyson hervorgegangen sind. Diese Beobachtung ist ein weiteres Indiz dafür, dass durch Selektionsdruck mit unterschiedlichen Substanzen (RH 5992 und 20E) verschiedene Mechanismen zur Erlangung einer Hormon-Insensitivität entwickelt wurden. Rauch (1999) konnte in Gelverzögerungs-Experimenten zeigen, dass in diesen drei EC-Klonen die DNA-Bindung des EcR/USP-Heterodimers im Vergleich zum Wildtyp unverändert war. Diese Beobachtungen lassen die Vermutung zu, dass in solchen Zellen die Rezeptor-vermittelte Transaktivierung gestört sein könnte oder Rezeptor-assoziierte Proteine mit regulatorischen Funktionen (Comodulatoren) modifiziert sind.

Bei Zellklonen, die durch den selektiven Verlust einer hochaffinen Bindestelle charakterisiert sind, ist eine Ursache der Hormon-Resistenz auf Ebene der Liganden-Bindung wahrscheinlich. Die Beschreibung von zwei Bindestellen ist keineswegs auf *Chironomus tentans* beschränkt. So haben bereits Spindler et al. (1984) in *Artemia salina* und Dinan (1985) in einer *Drosophila*-Zellinie diese Beobachtung gemacht. Um die hochaffine Bindestelle im K_D-Bereich von 10⁻¹⁰ M aber überhaupt erfassen zu können, muss der verwendete Radioligand über eine ausreichend hohe spezifische Aktivität verfügen. Das in dieser Arbeit verwendete Ponasteron A aus einer Sonder-Synthese (Prof. Kayser, Syngenta, Schweiz) hat mit 213 Ci/mmol eine sehr hohe spezifische Aktivität und erlaubt auch noch die Detektion der höheraffinen Bindestelle.

In zwei Klonen (rh-r.3 und ec-r.3) mit Mutationen innerhalb der Liganden-bindenden Domäne des EcR (Zöllner 2000) ist die spezifische Hormon-Bindung nicht mehr nachzuweisen. Punktmutationen, die im Zusammenhang mit ,target site resistance' stehen, konnten bisher nur für Zielproteine der konventionellen Pestizide beschrieben werden (ffrench-Constant 1999). Mit Tefubenozid-resistenten Klonen, die Modifikationen in der Liganden-bindenden Domäne des EcR aufweisen und deren Rezeptoren die Fähigkeit zur Hormon-Bindung verloren haben, wäre ein erster Fall von Mutationen beschrieben, die zur ,target site resistance' gegenüber einem Insektizid der Ecdysteroid-Agonisten geführt haben.

Bender et al. (1997) haben für *Drosophila* zeigen können, dass durch chemisch induzierte Mutagenese hauptsächlich Mutationen innerhalb der Liganden- (LBD) und DNAbindenden Domäne (DBD) des EcR generiert werden. Somit scheinen diese Bereiche nukleärer Rezeptoren für Mutationen besonders anfällig zu sein. Z.B. konnte in einigen Fällen der ,testikulären Feminisierung' mit vollständiger Androgen-Insensitivität (CAIS) ein Zusammenhang mit Androgenrezeptor-Mutationen innerhalb dieser Domänen gezeigt werden (Spindler et al. 1998, Peters et al. 1999).

Western-Blot-Analysen ergaben, dass für keinen Zellklon eine im Vergleich zum Wildtyp signifikant abweichende Expression der nukleären Rezeptoren EcR und USP festgestellt werden konnte. Damit können Rezeptor-Mangelmutanten, wie sie in einer *Drosophila*-Zellinie beschrieben wurden (Swevers et al. 1996), ausgeschlossen werden. Allerdings konnten Unterschiede auf Ebene der posttranslationellen Rezeptor-Modifikation beobachtet werden. So weicht in drei RH-Klonen das Phosphorylierungs-Muster von USP deutlich ab. Für Steroidhormon-Rezeptoren der Vertebraten werden der Phosphorylierung regulatorische Funktionen bezüglich der DNA-Bindung, transkriptioneller Aktivierung und Rezeptor-Stabilität zugesprochen (Weigel 1996). Da mittlerweile auch in Insekten stabile Rezeptor-Phosphorylierungsformen (Isotypen) nachgewiesen werden konnten (Rauch et al. 1998), sollte dieser Modifikation auch innerhalb der Invertebraten eine regulatorische Aufgabe zugesprochen werden. So berichten Song & Gilbert (1998), dass in *Manduca sexta* die Phosphorylierung von USP an der Regulation des EcR-Komplexes beteiligt ist.

Experimente zur Rekonstitution der Liganden-Bindung mit bakteriell exprimierten Rezeptoren ergaben, dass in Zellextrakten RH 5992-resistenter *Chironomus*-Klone nur durch Zugabe von cEcR die hochaffine Ponasteron A-Bindung des Wildtyps wiederhergestellt werden konnte. Dagegen hatte die Zugabe von cUSP keinen Einfluss auf die Hormon-Bindung. Damit sind Rezeptordefekte des EcR, die zur Hormon-Resistenz führen, evident und zeigen, wie gegen ein Insektizid ,target site resistance' erworben werden kann. Ob neben der Dimerisierungs-abhängigen Hormon-Bindung weitere Rezeptor-Funktionen beeinträchtigt sind, ist noch nicht geklärt.

Nach Zugabe von gereinigtem EcR konnte nicht für alle resistenten Klone die Hormon-Bindung auf das Niveau der Wildtyp-Kontrolle rekonstituiert werden. In diesen Fällen können weitere Rezeptor-Defekte auch auf USP-Ebene nicht ausgeschlossen werden. Zur weiteren Aufklärung wird es notwendig sein, auch USP dieser Zellklone zu sequenzieren. Da für die Liganden-Bindung des EcR aus *Chironomus* USP essentiell ist, könnten z.B auch USP-Mutationen innerhalb der für die Dimerisierung wichtigen Rezeptor-Bereiche zur Hormon-Resistenz beitragen.

Neben EcR und USP können weitere Proteine im Rezeptor-Komplex assoziiert sein, die an der Regulation des Ecdysteroidrezeptors beteiligt sind. Für Steroidhormon-Rezeptoren der Vertebraten ist bekannt, dass zur Aktivierung Hitzeschock-Proteine notwendig sind (Pratt & Toft 1997). Auch für *Manduca sexta* konnte mittlerweile gezeigt werden, dass ein Chaperon im Rezeptor-Komplex assoziiert ist (Song et al. 1997). Rybczynski & Gilbert (2000) schlagen vor, dass HSP 70 über einen negativen ,feedback'-Mechanismus in der Regulation des EcR gewebespezifisch involviert ist. Weiterhin konnten Arbeitman & Hogness (2000) zeigen, dass rekombinant exprimiertes und gereinigtes HSP 70 zur Aktivierung des funktionellen Ecdysteroid-Rezeptors *in-vivo* notwendig ist. So ist grundsätzlich möglich, dass Defekte Rezeptor-assoziierte Proteine die hormonelle Signaltransduktion beeinflussen können und somit zur Ausprägung einer Hormon-Resistenz führen. Dies wäre neben veränderter Enzymaktivität und ,target site resistance' ein weiterer Mechanismus, denn in diesem Fall wäre mit einer veränderten Regulation des Ecdysteroidrezeptors das ,Zielprotein' nur indirekt betroffen.

Von besonderer Bedeutung sind in diesem Zusammenhang Comodulatoren, die ein molekulares Bindeglied zwischen dem Liganden-aktivierten Steroidhormon-Rezeptor und der Transkriptionsmaschinerie darstellen (Torchia et al. 1998). So kann durch Bindung von Corepressoren und Coaktivatoren die transkriptionelle Aktivierung unterschiedlich reguliert werden (Nagy et al. 1999, Leo & Chen 2000). Hier wäre auf Ebene Rezeptor-assoziierter Proteine eine weitere Möglichkeit gegeben, wie durch modifizierte Proteine die hormonelle Signaltransduktion gestört werden kann. Tatsächlich haben Weiss et al. (1999) mit ,knockout'-Mäusen zeigen können, dass die fehlende Expression des Coaktivators SRC-1 zur Thyroxin-Resistenz führt. RTH (,resistance to thyroid hormone') ist eine erbliche Humankrankheit. Bisher ist man allerdings davon ausgegangen, dass hauptsächlich durch Mutationen innerhalb der Liganden-bindenden Domäne des TR und daraus resultierender verringerter Affinität für Thyroxin dieses Krankheitsbild hervorgerufen wird (Refetoff & Weiss 1997). Jetzt kann die Hypothese aufgestellt werden, dass auch defekte Comodulatoren zur Hormon-Resistenz führen.

In Analogie zu Vertebraten wäre dieser Mechanismus auch für Hormon-resistente Klone der Chironomus-Zellinie denkbar. Besonders für solche Zellen, die in bisherigen Untersuchungen der Wildtyp-Charakteristik entsprachen, wäre vorstellbar, dass modifizierte Cofaktoren an der Ausbildung einer Hormon-Insensitivität beteiligt sind. Für Vertebraten-Rezeptoren ist bekannt, dass zur Liganden-abhängigen Transaktivierung nach Dissoziation von Corepressoren die Bindung von Coaktivatoren notwendig ist. Ein defekter Comodulator würde die hormonelle Antwort unterbinden und damit die Expression Ecdysteroid-abhängiger Gene negativ beeinflussen. Allerdings konnten Coaktivatoren in Insekten noch nicht nachgewiesen werden. Mittlerweile konnten aber in Drosophila die Corepressoren SMRTER und "Alien" identifiziert werden. Für SMRTER, der funktionelle Homologien zum SMRT der Vertebraten aufweist, wurde eine Interaktion mit EcR gezeigt (Tsai et al. 1999). Interessanterweise waren EcR-Mutanten nicht mehr in der Lage, diesen Cofaktor zu binden. Dieser Effekt resultierte in lethaler Larvenentwicklung und verdeutlicht die essentielle Bedeutung eines Corepressors in hormoneller Signaltransduktion. Im Gegensatz zu SMRTER stellt "Alien", der wohl in allen Metazoen verbreitet ist, ein konserviertes Protein mit 90% Sequenzähnlichkeit zwischen Drosophila und Mensch dar (Dressel et al. 1999). Damit scheint auch der Mechanismus der transkriptionellen Regulation evolutiv sehr konserviert zu sein. Dies wird auch dadurch gestützt, dass Thormeyer et al. (1999) zeigen konnten, dass EcR aus Drosophila mit den bisher nur in Vertebraten nachgewiesenen Corepressoren SMRT und NCoR im ,two hybrid'-System interagieren kann. Damit ist mehr als anzunehmen, dass bei Invetebraten neben Corepressoren auch Coaktivatoren an der Regulation der hormonellen Signaltransduktion beteiligt sind.

Von einem potentiellen Coaktivator, der an Insektizid-Resistenz beteiligt sein könnte, berichtet Feyereisen (1998). Danach wird in Methopren-resistenten *Drosphila* ein mutiertes Met-Protein (<u>Me</u>thopren-<u>t</u>olerant) exprimiert, das zur Familie der bHLH-PAS-Regulatoren zählt. Diese Proteine verfügen über ein LXXLL-Motiv, das für Coaktivatoren charakteristisch ist (Leo & Chen 2000, Leo et al. 2000) und über das die Bindung mit nukleären Rezeptoren vermittelt wird. Daraus leitet Feyereisen die Hypothese ab, dass MET ein "Rezeptor-Coaktivator" sein könnte für einen potentiellen JH-Rezeptor und/oder für den Ecdysteroidrezeptor. Da aber ein JH-Rezeptor noch nicht nachgewiesen werden konnte, bleibt dieser "Comodulator", dessen Defekt zur Resistenz gegen ein Juvenilhormon-Analogon führt, doch sehr spekulativ.

Von Lier et al. (2000) wird berichtet, dass der Corepressor ,Alien' aus *Drosophila* gewebespezifisch exprimiert wird und EcR binden kann, aber nicht USP. Da für USP noch kein Ligand bekannt ist, zählt dieser nukleäre Rezeptor auch weiterhin zu den Orphans. Interessanterweise konnte diese Arbeitsgruppe aber zeigen, dass mit SVP und ßFTZ-F1 zwei andere Vertreter der Orphan-Rezeptoren von ,Alien' gebunden werden können. Für *Drosophlia* sind mittlerweile 21 Vertreter dieser Klasse bekannt, von denen 8 durch 20-OH-Ecdyson reguliert werden (Fisk & Thummel 1998). Die Tatsache, dass ßFTZ-F1 als Kompetenz-Faktor für stadienspezifische Hormonantwort eine wesentliche Rolle zugesprochen wird in der spätlarvalen-vorpupalen Insekten-Entwicklung (Lam et al. 1999) und in der Regulation der Dopa-Decarboxylase-Expression (Hiruma & Riddiford 2000) bzw. der Kutikula-Bildung beteiligt ist, unterstützt die Aussage, dass Cofaktoren wie ,Alien' während der Metamorphose eine funktionelle Bedeutung zukommen.

Die Expression von ßFTZ-F1 wird durch den 20E-induzierbaren *Drosophila*-Transkriptionsfaktor DHR3 (*Drosophila* hormone receptor 3) stimuliert (Fisk & Thummel 1998). DHR3-Mutanten sind lethal, da die Ausbildung der Kutikula gestört ist (Lam et al. 1999). In diese durch Stadien- und Gewebe-spezifisch koordinierte Expression nukleärer Rezeptoren vermittelten Prozesse der Metamorphose einzugreifen, würde zur Folge haben, dass die Insekten-Entwicklung gestört wird. Tatsächlich haben Retnakaran et al. (2000) berichtet, dass Tefubenozid in einer Zellinie des Schmetterlings *Choristoneura fumiferana* die Expression von CHR3, einem DHR3-Homolog, induziert. Durch die höhere Stabilität von RH 5992 gegenüber dem Häutungshormon wird eine Hormon-Konzentration aufrecht gehalten, wodurch Prozesse während der späten Entwicklung, die normalerweise erst durch einen Abfall des 20E-Titers induziert werden, nicht mehr stattfinden. Damit wäre auf molekularer Ebene demonstriert, wie Tefubenozid im Tier seine insektizide Wirkung entfalten kann.

Man geht heute davon aus, dass Orphan-Rezeptoren die Gewebe- und Stadienspezifische Hormon-Antwort dadurch modulieren, dass sie zum Einen mit dem Ecdysteroidrezeptor um DNA-Bindestellen kompetieren und zum Anderen um die Dimerisierung mit EcR und/oder USP konkurrieren können (Buszczak & Segraves 1998). Aus diesen Beispiel lässt sich ableiten, dass modifizierte Rezeptoren der Orphan-Familie zur Ausbildung einer Hormon-Resistenz führen könnten. Z.B. werden zu Anfang der Entwicklung durch 20E frühe Gene aktiviert, die für die nukleären Orphans BR-C, E74 und E75 kodieren, die ihrerseits die Expression später Gene regulieren. So hat Iatrou (pers. Mitteilung) beobachtet, dass durch Bm75, dem *Bombyx mori*-Homolog zu E75, die Expression von BmHR3 (*Bombyx* hormone receptor 3) reprimiert wird. Dies lässt die Vermutung zu, dass ein defekter Bm75 zur Stadien-unspezifisch verfrühten Ausprägung eines HR3-Effektes führen könnte und damit zu gestörter Metamorphose. Tatsächlich berichtet Thummel (pers. Mitteilung) von einer E75-Mutation in *Drosophila*, die zu einer verfrühten Verpuppung schon nach dem zweiten Larven-Stadium führt.

IV.2 Bakterielle Expression und Reinigung nukleärer Rezeptoren – Hormonbindung und DNA-Spezifität von cEcR/cUSP

Zur weiteren Charakterisierung des Ecdysteroidrezeptors wurde in dieser Arbeit das Ziel verfolgt, die vollständigen Rezeptor-Proteine EcR und USP aus *Chironomus* mit einer Methode aufzuarbeiten, die es erlauben sollte, dass die Rezeptorfunktionen erhalten bleiben. Dazu wurden cEcR und cUSP als GST-Fusionsproteine in getrennten Bakterien-Kulturen exprimiert und anschliessend über Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt.

Die Expressionsraten für GST-EcR (87 kDa) und GST-USP (77 kDa) lagen mit ca. 3 mg/L Zellkultur auf einem relativ niedrigen Niveau. Aufgrund der Molekulargewichte war diese Grössenordnung zu erwarten, da schon Nemoto et al. (1990, 1992) in früheren Untersuchungen beobachtet haben, dass mit zunehmender Molekülgrösse von Steroidhormon-Rezeptoren die Expressions-Raten abnehmen. Zum Vergleich konnte für GST-AR (137 kDa) nur ca. 1 µg/L Zellen angegeben werden (Roehborn et al. 1992), während für den VDR (48 kDa) Konzentrationen von bis zu 60 mg/L möglich waren (Hsieh et al. 1995). Aus diesen Gründen sind Nemoto et al. (1994) dazu übergegangen, AR nicht als vollständiges Protein zu exprimieren, sondern als Liganden- und DNA-bindende Domänen. Dadurch konnten die Expressions-Raten deutlich erhöht werden. Allerdings konnten Liganden-bindende Domänen (LBD's) von EcR und USP aus *Drosophila* mit nur vergleichsweise niedrigen Raten exprimiert werden (Halling et al. 1999). Daraus lässt sich ableiten, dass für den Ecdysteroidrezeptor neben der Peptid-Grösse weitere Faktoren wie Hydrophobizität und Löslichkeit auf die Expressions-Raten in Bakterien Einfluss nehmen können.

Es ist bekannt, dass die Herstellung rekombinanter Proteine aus *E. coli*-Expressions-Systemen oftmals begleitet wird durch bakterielle, cytoplasmatische Einlagerungen des Fremdproteins in Form von Aggregaten, die als ,inclusion bodies' bezeichnet werden (Caspers et al. 1994). Über diesen Mechanismus können Peptide mit unkorrekter Faltung oder Fremdproteine inaktiviert werden (Thomas et al. 1997). So lag im Fall von GST-EcR/GST-USP der Verlust bei mehr als 90 % der Gesamt-Rezeptormenge und damit in einem Bereich, der auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet wurde (Proudfoot et al. 1996, Jalaguier et al. 1996). Durch herabgesetzte Temperaturen während der IPTG-Induktion kann der Anteil des löslichen Proteins erhöht werden. So berichten Ball et al. (1995), dass bei 37°C exprimiertes GST-TR durch Aggregat-Bildung zu annähernd 100% unlöslich war. Im Gegensatz dazu konnten bei Raumtemperatur 30-60 % des Rezeptors im löslichen Überstand erhalten werden.

Neben dem Temperatur-Effekt ist im Fall des GST-TR aber ganz wesentlich, dass die Aufarbeitung der Zellen unter Verwendung von Detergenz erfolgte, wodurch sich der hohe Anteil löslicher Proteine gut erklären lässt (Frangioni & Neel 1993). Allerdings muss man berücksichtigen, dass Fremdproteine, die durch Aggregation inaktiviert wurden, zum Teil irreversibel denaturiert sind (Proudfoot et al. 1996). Dies kann durch mehrere Beobachtungen bestätigt werden: Z.B wurde für die Detergenz-gereinigten GST-Fusionsproteine cEcR/cUSP (Elke et al. 1997) und MR-LBD (Jalaguier et al.

1996) beobachtet, dass die Fähigkeit zur hochaffinen Hormonbindung nur noch sehr gering war und erst durch Zugabe von Retikulozytenlysat als Quelle renaturierender Hitzeschock-Proteine eine nennenswerte Liganden-Bindung ermittelt werden konnte. Nach Sambrook et al. (1989) können Proteine aus isolierten ,inclusion bodies' extrahiert werden. Allerdings zeigten EcR-LBD/USP-LBD, die nach dieser Methode renaturiert wurden, im Bindungstest mit Ponasteron A mehrere Hormon-Bindestellen mit unterschiedlichen Affinitäten (Halling et al. 1999). Offensichtlich lag ein Rezeptor-Anteil in unkorrekter Faltung vor, sodass Konformationen des Heterodimers mit veränderten Bindungseigenschaften gebildet wurden. Basierend auf diesen Beobachtungen wurde in der vorliegenden Arbeit auf jegliche Verwendung von Detergenz verzichtet und damit zu Gunsten einer funktionell homogenen Rezeptor-Population quantitative Verluste in Kauf genommen.

Durch Koexpression Liganden-bindender Domänen von dEcR und dUSP liessen sich die Rezeptor-Ausbeuten deutlich erhöhen (Halling et al. 1999). Auf diese Variante wurde in dieser Arbeit jedoch verzichtet, da es nur durch getrennte Expressionen möglich ist, die Rezeptor-Eigenschaften von cEcR und cUSP in Abwesenheit und Gegenwart des jeweiligen Komplex-Partners auf molekularer Ebene untersuchen zu können. Auch durch wiederholte Einfrier/Auftau-Zyklen und intensiver Ultraschallbehandlung kann der lösliche Rezeptor-Anteil erhöht werden (Cheng et al. 1994). Allerdings hat Rauch (1999) festgestellt, das dadurch die Fähigkeit zur Hormonbindung negativ beeinflusst wird. Offensichtlich gehen durch dieses Verfahren denaturierte Rezeptor-Proteine in die lösliche Fraktion über, sodass in dieser Arbeit auch auf dieses Vorgehen verzichtet wurde.

Nach Frangioni & Neel (1993) korreliert die Sättigbarkeit der Sepharose unabhängig von der Proteinstruktur mit der Molekülgrösse von GST-Fusionsproteinen. Danach nimmt die Absorption an die Matrix mit zunehmendem Molekulargewicht bis zu einem Grenzwert im Bereich von 100 kDa deutlich ab. Aus dieser Korrelation liess sich die Vorhersage machen, dass für ein Protein im Bereich von 80 kDa eine Sättigung bei ca. 50 μ g GST-Protein pro 1 ml Matrix zu erwarten ist. Weiterhin geht aus dieser Arbeit hervor, dass selbst unter Verwendung von Sarkosyl die Elution der GST-Proteine nicht quantitativ erfolgt, sondern mit 30-40 % ein beachtlicher Anteil auf dem Gel verbleibt. Tatsächlich lagen nach einem im Vergleich zur Hersteller-Empfehlung bis zu 10-fach erhöhtem Gelvolumen die erhaltenen Mengen mit 37,5 ± 10 μ g GST-USP/L (77 kDa) und 17,5 ± 10 μ g GST-EcR/L (87 kDa) in der erwarteten Grössenordnung und bestätigen die Korrelation zwischen Gel-Sättigung und Molekulargewicht. Somit lagen die Ausbeuten gereinigter Rezeptoren im Bereich von 1% des Gesamtproteins.

Trotz intensiver Waschprozedur können nach Silberfärbung in Präparationen gereinigter Rezeptoren im Bereich von 45 kDa bzw. 70 kDa zwei schwache Kontaminationen detektiert werden. In *E. colis*, die mit pGEX-KG-cEcR transformiert wurden, zeigte sich, dass nach Zugabe von IPTG neben GST-EcR die Expression eines weiteren Proteins mit einer Grösse von ca. 45 kDa induziert wurde. Allerdings besitzt dieses Protein keinen GST-Anteil, da es von Anti-GST im Western-Blot nicht erkannt wird. Da die Glutathion-S-Transferase an den N-Terminus des EcR fusioniert wurde, kann es sich folglich nicht um ein unvollständiges GST-EcR-Molekül handeln, das durch verfrühten Abbruch der Translation gebildet wurde. Wenn auch die genauen Eigenschaften dieses Proteins unklar bleiben, scheint das Auftreten vermutlich Vektor-spezifisch zu sein.

Die Kontamination mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 70 kDa deutet ein bakterielles Hitzeschockprotein an. DnaK, das grosse Homologien zum HSP70 aufweist, ist normalerweise in Degradations-Prozesse veränderter E. coli-Proteine involviert. Dabei scheint DnaK für rekombinant exprimierte Proteine kein "Abbau-Signal" zu sein (Sherman & Goldberg 1992). So berichten auch andere Arbeitsgruppen, dass bei der Reinigung rekombinanter Proteine, die in E. coli exprimiert wurden, eine Assoziation von Dnak an Fremdprotein beobachtet werden kann (Wang et al. 1995, Pool et al. 1998). Z.B konnten Swamy et al. (1999) feststellen, dass DnaK mit rekombinantem VDR interagieren kann. Allerdings beeinflusst DnaK weder die Ligandenbindung des VDR noch die Wechselwirkung mit dem Heterodimerisierungs-Partner RXR. Interessanterweise konnten Thomas et al. (1997) und weitere Autoren (Proudfoot et al. 1996, Lee et al. 1997) zeigen, dass bei der Gewinnung rekombinanter Proteine in E. coli durch Ko(über)expression von DnaK der lösliche Anteil des gewünschten Proteins deutlich erhöht werden konnte. Vermutlich erleichert dieses HSP die korrekte Faltung rekombinanter Proteine, die sonst durch Aggregationsbildung in ,inclusion bodies' übergehen würden.

Hormon-Bindungstests ergaben, dass mit 46 \pm 26 % ein hoher Anteil von gereinigtem GST-EcR in der Lage war, nach Zugabe von USP den Radioliganden [³H]-Ponasteron A hochaffin zu binden. Das entspricht einer spezifischen Aktivität von 5,3 \pm 3 nmol Bindestellen/mg Rezeptorprotein. Im Gegensatz dazu konnten für bakteriell exprimierte LBD's des Detergenz-gereinigten Mineralocorticoid-Rezeptors (Jalaguir et al. 1996) bzw. von EcR und USP aus *Drosophila*, die getrennt exprimiert wurden (Halling et al. 1999), Ausbeuten funktionell intakter Proteine angegeben werden, die um den Faktor 1000 kleiner waren. Erst durch Koexpression von dEcR-LBD/dUSP-LBD und damit verbesserter Löslichkeit (Li et al. 1997) konnte eine spezifische Aktivität von 6 nmol Bindestellen/mg gereinigter Rezeptoren erreicht werden (Halling et al. 1999).

Die Bestimmung des Rezeptor-gebundenen Hormons setzt die physikalische Trennung von freiem und gebundenem Hormon voraus. Dadurch wird das Reaktionsgleichgewicht nach dem Massenwirkungsgesetz gestört, sodass der Anteil des gebundenen Hormons zu niedrig bestimmt werden kann. Ein Vergleich des Aktivkohle-Absorptionstests und der Bestimmung des Hormon-Rezeptor-Komplexes über Fluoreszenz-Messung im Fall der RXR-Retinsäure-Interaktion (Cheng et al. 1994) bestätigen diese Vermutung. Der Anteil des funktionell intakten EcR ist daher im Filtertest eher zu niedrig bestimmt worden. Trotzdem wurde in der vorliegenden Arbeit der Filtertest (Turberg & Spindler 1992) bevorzugt, weil er sowohl für Rohextrakte als auch gereinigte Rezeptoren verwendet werden kann und damit der Verlauf der Reinigung kontrolliert werden kann.

Zur Ligandenbindung des EcR aus *Chironomus tentans* ist ,Ultraspiracle' (USP) essentiell. Nur in Gegenwart des Heterodimerisierungs-Partners kann spezifische Hormonbindung gemessen werden. Ein Vergleich zur Ligandenbindung des EcdysteroidRezeptors aus *Drosophila* zeigt, dass die Rezeptor-Eigenschaften innerhalb der Dipteren unterschiedlich sind. So konnte für in-vitro-translatierten dEcR gezeigt werden, dass spezifische Bindung auch in Abwesenheit von USP möglich ist (Vögtli et al. 1999, Rauch 1999). Diese Eigenschaft konnte für die dEcR-LBD erweitert werden (vorliegende Arbeit). Damit ist neben der Hormon-Bindung des EcR/USP-Komplexes durch Liganden-Bindung des EcR eine zusätzliche hormonelle Regulation während der Entwicklung von *Drosophila* vorhanden.

Scatchard-Plot-Analysen ergaben, dass mit gereinigtem cEcR/cUSP im Vergleich zu Chironomus-Zellextrakten identische Ergebnisse erhalten wurden. Sowohl die für den Hormon-sensitiven Wildtyp charakteristischen zwei hochaffinen Ponasteron A-Bindestellen (Rauch et al. 1998) als auch die Liganden-Spezifitäten für 20-OH-Ecdyson und Tefubenozid (Grebe et al. 2000) konnten nachgewiesen werden. Zur spezifischen Hormon-Bindung des Ecdysteroidrezeptors sind keine weiteren Faktoren notwendig, da durch Zugabe von Retikulozyten-Lysat als Quelle möglicher Kofaktoren die Liganden-Bindung von gereinigtem cEcR/cUSP nicht signifikant erhöht wurde. Hsieh et al. (1995) und Swamy et al. (1999) berichten, dass zur Bestimmung der Liganden-Bindung von rekombinantem VDR die Zugabe von Rattenleber-Extrakt erforderlich war. Allerdings wurde während der Reinigungs-Prozedur Detergenz verwendet, sodass man davon ausgehen kann, dass renaturierende Hitzeschock-Proteine zur korrekten Faltung der Rezeptoren notwendig waren und weniger die Ligandenbindung per se verbessern. Auch Arbeitman & Hogness (2000) haben gezeigt, dass rekombinante dEcR/dUSP-Proteine, die in einer Insekten-Zellinie exprimiert wurden, zur Hormonbindung ausreichen. Allerdings konnte durch Zugabe von Retikulozyten-Lysat die Ligandenbindung um den Faktor 2-3 verbessert werden. Eine Überschlagsrechnung ergab, dass in dieser Arbeit nur noch ein geringer Rezeptor-Anteil (1-3 %) aktiv war.

GST, dass die Reinigung rekombinanter Fusionsproteine über Affinitäts-Chromatographie ermöglicht, kann mit Thrombin enzymatisch abgespalten werden. Da Rezeptorproteine Temperatur-empfindlich sind, wurde in der vorliegenden Arbeit mit relativ hohen Thrombin-Konzentrationen über einen kurzen Zeitraum inkubiert. Scatchard-Plots nach Entfernung des GST-Anteils ergaben, dass GST die Hormon-Bindung nicht beeinflusst. Auch für VDR (Swamy et al. 1999) und TR (Ball et al. 1995) konnte gezeigt werden, dass GST die Fähigkeit zur Liganden-Bindung nicht verändert. Für GSTfreies cEcR konnte durch Western-Blot ein apparentes Molekulargewicht von 66 kDa nachgewiesen werden. Dies entspricht dem unphosphorylierten Anteil von cEcR aus *Chironomus*-Zellextrakten (Rauch et al. 1998). Da sich die Hormonbindung im Vergleich zu EcR/USP aus *Chironomus*-Zellextrakten, die hauptsächlich in phosphorylierter Form vorliegen, nicht unterscheidet, kann daraus abgeleitet werden, dass Rezeptor-Phosphorylierungen die Ligandenbindung nicht beeinflussen.

In Gegenwart und Abwesenheit des GST-Anteils können die gereinigten Rezeptoren als EcR/USP-Heterodimer in Gelverzögerungs-Experimenten an die DNA-Elemente PAL1 und DR5 binden. Damit entspricht die DNA-Spezifität den endogenen (Elke et al. 1999) bzw. in-vitro-translatierten Rezeptoren (Vögtli et al. 1999) aus *Chironomus*. Die Bindung von USP an ein ,direct repeat' in Abwesenheit von EcR, wie sie schon von Vögtli

et al. (1998) für in-vitro-translatiertes dUSP beschrieben wurde, konnte nachgewiesen werden und war ebenfalls unabhängig vom GST-Anteil. Auch D'Avino et al. (1995) konnten beobachten, dass USP von hre's gebunden werden kann und erst durch Gegenwart von EcR die Heterodimerisierung begünstigt wird. Nach Niedziela-Majka et al. (2000) erfordert die Bindung an ein Palindrom bzw. an ein ,direct repeat' unterschiedliche Orientierungen (Polaritäten) der Rezeptor-Komplexbildung. Damit beeinflussen auch ,hormone responsive elements' die Selektivität der DNA-Erkennung.

Elke et al. (1997) haben berichtet, dass GST-cEcR von PAL1 gebunden wird. In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass gereinigtes EcR als GST-Fusionsprotein an dieses Palindrom bindet. Nach enzymatischer Abspaltung des GST-Anteils konnte für EcR eine DNA-Bindung nicht mehr nachgewiesen werden. Dies steht im Einklang mit Vögtli et al. (1998), die festgestellt haben, dass in-vitro-translatierter dEcR in Abwesenheit von USP mit DNA keinen Komplex bilden kann. Die Beobachtung, dass der GST-Anteil durch die Tendenz zur Oligomerisierung die Rezeptoreigenschaften verändert (Elke & Spindler, im Druck), konnte auch von Nemoto et al. (1994) und Niedziela-Majka et al. (1998) gemacht werden. Festzuhalten bleibt, dass im Gegensatz zur DNA-Erkennung die Hormonbindung durch GST nicht beeinflusst wird. Widersprüchlich scheint die Beobachtung von Dela Cruz & Mak (1997), die zeigen konnten, dass dEcR in Hefen als konstitutiver Transkriptionsfaktor wirken kann und damit zur DNA-Bindung in Abwesenheit von USP fähig ist. Allerdings stellt die Hefe ein artifizielles System dar und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Hefe-Faktoren die EcR-DNA-Komplexbildung begünstigt haben.

Zur DNA-Bindung von gereinigtem cEcR/cUSP sind keine weiteren Faktoren notwendig. Allerdings ist das Ausmass der DNA-Bindung im Vergleich zu *Chiromomus*-Zellextrakten wesentlich schlechter, das aber durch Zugabe von Retikulozyten-Lysat verbessert werden kann (Polifke, pers. Mitteilung). Nach Arbeitman & Hogness (2000) ist gereinigtes GST-EcR aus *Drosophila* auch in Gegenwart von USP nicht in der Lage, spezifische DNA zu binden. Erst durch Zugabe rekombinanter HSP's war DNA-Erkennung möglich. Dies zeigt, dass der Ecdysteroidrezeptor bevorzugt als Komplex mit weiteren Proteinen an die DNA bindet. Mittlerweile ist bekannt, dass EcR/USP aus *Chironomus*-Zellextrakten z.T. in hochmolekularen Komplexen vorliegt (Rauch 1999). Für den Ecdysteroidrezeptor aus *Manduca sexta* wurde von Song & Gilbert (1997) gezeigt, dass HSP's in diesen Komplexen assoziiert sind. Da es Anzeichen dafür gibt, dass sich die Charakterisitik der DNA-Bindung von bakteriellen bzw. in-vitro-translatierten Rezeptoren im Vergleich zu Zellextrakten unterscheidet (Elke & Spindler, im Druck), wäre ein zukünftiger Ansatz darin zu sehen, wie sich die DNA-Bindung gereinigter Rezeptoren durch Zugabe rekombinanter Chaperone oder Cofaktoren verändert.

Aus Vorversuchen geht hervor, dass die Qualität der bakteriell exprimierten Proteine EcR und USP ausreichend war, um Rezeptor-Interaktionen über ,surface plasmon resonance' (SPR) zu bestimmen. Dies ermöglicht in Zukunft Untersuchungen zur Kinetik der DNA- und Liganden-Bindung, wie sie bereits für VDR/RXR (Cheskis & Freedman 1996) und ER (Cheskis et al. 1997) durchgeführt wurden als auch Untersuchungen der Wechselwirkungen mit rekombinanten HSP's (Graumann & Jungbauer 2000). Für wei-

tere biophysikalische Untersuchungen wird es allerdings notwendig sein, Rezeptorproteine in grösserem Massstab zu produzieren. Im Anschluss könnte dann neben den Ligand-Rezeptor-DNA-Wechselwirkungen auch untersucht werden, ob durch Zugabe von gereinigten Kofaktoren die Eigenschaften des Ecydsteroid-Rezeptors verändert werden.

Mittlerweile liegen dem Institut Plasmide vor, in denen die Sequenzen verschiedener Rezeptor-Domänen von EcR und USP aus *Drosophila* bzw. *Chironomus* einkloniert wurden (freundlicherweise von Dr. Elke zur Verfügung gestellt). Das vorliegende Reinigungs-Protokoll wäre geeignet, diese Domänen in Bakterien herzustellen. So ist ein Vergleich mit Rezeptor-Domänen möglich, die in Hefen exprimiert wurden und erlaubt die Untersuchung der wechselseitigen Einflüsse von verschiedenen Rezeptor-Abschnitten aus unterschiedlichen Expressions-Systemen.

IV.3 Hormonbindung der EcR-LBD aus Drosophila

Die Liganden-bindenden Domänen (LBD's) von EcR und USP aus *Drosophila*, die in Hormonbindung und Dimerisierung involviert sind, wurden als Gal4-Fusionsproteine in der Hefe *S. cerevisiae* exprimiert und die Ecdysteroid-Bindung der dEcR-LBD in Abwesenheit und Gegenwart von dUSP-LBD untersucht. Der Vergleich mit in-vitrotranslatierten Rezeptoren (Rauch 1999) zeigt, dass sich die Ponasteron A-Bindung der gewählten Konstrukte (vorliegende Arbeit) von vollständigen Rezeptor-Molekülen nicht unterscheidet. Es konnte gezeigt werden, dass EcR-LBD aus *Drosophila* im Gegensatz zum EcR aus *Chironomus* in der Lage ist, auch in Abwesenheit von USP spezifisch Hormon zu binden. Durch Zugabe des Heterodimer-Partners USP lässt sich die Liganden-Bindung maximal um den Faktor 10 erhöhen.

Der Molekülabschnitt (Abb. 34) wurde so gewählt, dass neben der E-Domäne auch der C-terminale Abschnitt der D-Domäne (,hinge'-Region) exprimiert wurde. Interessant ist nun, das durch Mutationen der dEcR-LBD, in denen Teile der D-Domäne deletiert wurden ($EcR^{\Delta 375-399}$ bzw. $EcR^{\Delta 375-416}$), sowohl die Ligandenbindung der dEcR-LBD als auch die Dimerisierungs-abhängige Hormonbindung in Anwesenheit von dUSP stark reduziert wird. Przibilla (pers. Mitteilung) konnte in Gelverzögerungs-Experimenten beobachten, dass für beide Trunkationen die Liganden-abhängige Dimerisierung mit USP nicht mehr möglich war. Daraus lässt sich ableiten, dass die ,hinge'-Region sowohl für die Hormonbindung als auch Dimerisierung notwendig ist.

Im EcR des Hormon-resistenten *Chironomus*-Zellklons rh-r.1, der durch reduzierte Ligandenbindung charakterisiert ist, konnte Zöllner (2000) innerhalb der D-Domäne eine Mutation (S281P) nachweisen. Das bedeutet, dass eine AS ausserhalb der Ligandenbindenden Tasche, die mit dem Liganden nicht in Kontakt treten kann, die Hormon-Bindung verändert. Perera et al. (1999) berichten, dass neben der E-Domäne auch die D-Domäne des EcR aus *Choristoneura fumiferana* für die Dimerisierung mit cfUSP wichtig ist. Gelverzögerungs-Experimente, in denen gezeigt werden konnte, dass die E- Domäne die DNA-Spezifität des Heterodimers beeinflusst, verfeinern diese Beobachtung (Perera, pers. Mitteilung). Die Bedeutung der D-Domäne des EcR für die Dimerisierung konnte ebenfalls für *Bombyx mori* beobachtet werden (Suhr et al. 1998).

Für nukleäre Rezeptoren der Vertebraten, die mit dem USP-Homolog RXR heterodimerisieren können (Typ II), ist dieser Einfluss nicht bekannt. Modellberechnungen der Sekundärstruktur des EcR (Spindler et al., im Druck) zeigen, dass innerhalb des Cterminalen Bereiches der D-Domäne die Ausbildung weiterer helikaler Strukturen möglich ist (Abb. 34), die mit der Bedeutung der D-Domäne für die Hormon-Bindung und Dimerisierung, wie sie bisher nur für EcR beobachtet wurde, im Zusammenhang stehen können. Dagegen konnte mit bakteriell exprimierten D/E-Konstrukten des Mineralocorticoid-Rezeptors (MR), der als Vertreter der Typ I-Klasse Homodimere ausbildet, gezeigt werden, das die D-Domäne die Liganden-Bindung nicht beeinflusst (Jalaguir et al. 1996).

Aufgrund der beschriebenen Beobachtungen kann die Einteilung der Rezeptor-Domänen erweitert werden (Abb. 42).



Abb. 42: Schematisches Struktur-Modell der nukleären Rezeptoren, die in 5 Domänen eingeteilt werden (verändert nach Tenbaum & Baniahmad 1997): Eine variable A/B-Domäne am N-Terminus, eine hochkonservierte C-Domäne und ein mässig konservierter Carboxy-Terminus (D-, E- und F-Domänen). Rezeptor-Bereiche, deren funktionelle Eigenschaften bekannt sind, wurden durch Balken angedeutet. Rote Balken sind Erweiterungen des Domänen-Konzeptes, die in der vorliegenden Arbeit beschrieben wurden. Grüne Balken deuten Erweiterungen an, die aus verschiedenen Veröffentlichungen hervorgehen (Glass et al. 1997, Torchia et al. 1998, Nagy et al. 1999, Egea et al. 2000), in die aber Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht involviert sind. Der blaue Balken deutet Funktionen der F-Domäne an, deren Existenz nicht für alle nukleären Rezeptoren gilt. Sowohl "intramolekulare Repressor-Eigenschaften" (Nichols et al. 1998, Sladek et al. 1999) als auch Bindung von Cofaktoren (Dressel et al. 1999, Thormeyer et al. 1999) wird dieser Domäne zugesprochen.

Durch Röntgen-Kristallstruktur-Analysen verschiedener nukleärer Rezeptoren der Vertebraten konnte aufgeklärt werden, dass Liganden-bindende Domänen durch 11-12 helikale Bereiche und ein β-Faltblatt in antiparalleler Anordnung charakterisiert sind (Wurtz et al. 1996). Durch Bindung eines Liganden findet eine deutliche Änderung der Konformation statt und überführt die LBD nukleärer Rezeptoren von der ,offenen' apo-Form in die ,geschlossene' holo-Form. Vergleiche von Agonist-gebundenen zu Antagonist-gebundenen holo-LBD-Stukturen zeigen, dass unterschiedliche Anordnungen der C-terminalen Helix 12 in zwei konservierten, hydrophoben "Furchen" der Protein-Oberfläche möglich sind (Egea et al. (2000). So können in Abhängigkeit eines Liganden variable Konformationen eingegangen werden, in denen die Position der Helix 12 eine entscheidende Rolle spielt (Moras & Gronemeyer 1998).



Abb. 43: Schematische Darstellung von 3-dimensionalen Konformationen der Liganden-bindenden Domäne nukleärer Rezeptoren mit 11-12 Helix-Bereichen (H1-H12) und ein β -Faltblatt, die sich zu einem dreischichtigen, antiparallelen "Sandwich" ausbilden. (A) holo-(Agonist-gebundene)-LBD gemäss der Kristallstruktur des γ RAR mit *trans*-Retinsäure als Ligand (Renaud et al. 1995). (B) apo-LBD gemäss der Kristallstruktur des α RXR ohne Ligand (Bourguet et al. 1995). In der Liganden-freien Konformation (apo- α RXR) "streckt" sich Helix 12 vom Protein-Kernbereich weg. Durch Liganden-Bindung induziert, findet eine Rotation und Umfaltung der Helix 12 in Richtung der Liganden-bindenden Tasche statt, die bewirkt, dass der AF-2-Bereich auf der Oberfläche präsentiert wird (holo- γ RAR). Diese Umorientierung von AF-2 macht Interaktionen mit Coaktivatoren möglich, die die transkriptionelle Aktivierung regulie-

ren. Durch Bindung eines Liganden erfährt Helix 3 eine Konformations-Änderung. Dadurch wird Helix 11 in der Positionierung verdrängt. Diese induzierte Helix 11-Rotation bewirkt eine Stabilisation der Liganden-Bindung und eine Konformations-Änderung der H11-12-Schleife (Ω -Loop) und und führt so zum "Einklappen" der Helix 12 (Egea et al. 2000).

Nach Modellberechnungen der dEcR-Sekundärstruktur (Spindler et al., im Druck) und einem Homologie-Modell der LBD des cEcR, das auf Röntgen-Kristallstrukturen von RAR und VDR beruht (Wurtz et al. 2000), existiert auch in der dEcR-LBD eine Helix 12 (Abb. 43). Interessant ist nun, dass durch Deletion der Helix 12 (dEcR-LBD^{$\Delta 646-652$}) die Hormon-Bindung eleminiert wird. Dass bedeutet, dass zur Liganden-Bindung der EcR-LBD Helix 12 essentiell ist. Diese Funktion der Helix 12 scheint nicht für alle Steroidhormon-Rezeptoren zu gelten, denn für die LBD des Östrogen-Rezeptors (ER) der Vertebraten hat die Deletion der Helix 12 (AH12) keinen Einfluss auf die Ligandenbzw. DNA-Bindung (Johansson et al. 2000). Allerdings konnten Norris et al. (1998) zeigen, dass ER-LBD^{AH12} die Fähigkeit zur Hormon-Erkennung beeinflusst. Nach Wurtz et al. (1998) lassen sich 45 von 48 Mutationen der Liganden-bindenden Domäne des Östrogen-Rezeptors mit veränderter Liganden-Bindung anhand eines Computer-Modells der LBD-Struktur erklären. 2 Mutationen, deren Einfluss anhand des Modell nicht bestätigt werden konnte, liegen in der Helix 12. Dass verdeutlicht einerseits, dass 3-dimensionale LBD-Modelle und daraus abgeleitete Sequenzen bzw. Aminosaüre-Reste von besonderer Wichtigkeit für die Ligandenbindung zwar hilfreich sind, aber erst in Kombination mit funktionellen Untersuchungen zu hinreichenden Aussagen führen. Andererseits zeigt dieses Beispiel, dass auch einzelne AS der Helix 12 von Bedeutung sind, obwohl ein direkte Wechselwirkungen mit dem Liganden unwahrscheinlich ist.

Die Proteinschleifen zwischen Helix 6-7 und vor allem Helix 11-12 (loop 11-12) sind Schlüsselregionen, die die Liganden-bindende Tasche in Form und Grösse beeinflussen (Wurtz et al. 2000). Bemerkenswert ist, dass Punktmutationen des AR (Peters et al. 1999) bzw. PR (Letz et al. 1999) zwischen Helix 11 und Helix 12 zu einer Beeinträchtigung der Ligandenbindung führen. Da die räumliche Anordnung dieser Proteinschleife die Position der Helix 12 bestimmt, können diese Befunde den Einfluss der Helix 12 auf die Liganden-Bindung bestärken. Offensichtlich ist Helix 12 weniger für die Hormonerkennung wichtig (da Wechselwirkungen über Wasserstoff-Bindungen unwahrscheinlich sind), sondern scheint durch das induzierte "Einklappen" die LBD so zu modulieren, dass der Ligand-Rezeptor-Komplex stabilisiert wird. Möglicherweise hat Helix 12 beim "Eintritt" des Liganden keinen Einfluss auf die Geschwindingkeit der Komplexbildung (Assoziation), sondern stabilisiert die Liganden-bindende Tasche in einer Form, die den ,Austritt' des Liganden (Dissoziation) verlangsamt. Auch Apriletti et al. (1998) schlagen anhand von Kinetik-Studien mit TR vor, dass die Affinität der Hormon-Rezeptor-Bindung durch die Proteinfaltung der LBD um den Liganden bestimmt wird und leiten daraus eine Struktur-Aktivitäts-Beziehung ab.

Hellal-Levy et al. (2000) konnten zeigen, dass einzelne Mutationen in Schleife H11-H12 der MR-LBD zwar ohne Einfluss auf die Hormon-Bindung waren, aber die Ligandenabhängige Transaktivierung als auch Wechselwirkungen mit Coaktivatoren entscheidend modifizieren können. Somit stellt dies ein weiteres Beispiel dar, welch zentrale Rolle der Helix 12 in verschiedenen Rezeptor-Funktionen zukommt.

Eine weitere Funktion der Helix 12, die zur Stabilisation der Liganden-bindenden Tasche führt, wäre die Ausbildung einer Salzbrücke mit Helix 4, wie sie für den γRAR bereits beschrieben wurde (Renaud et al. 1995). Auch die dEcR-LBD besitzt aufgrund der Sequenz das Potential, zwischen Lys der Helix 4 und Glu der Helix 12 ein Salzbrücke auszubilden. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass Lys⁴⁹⁷ und Glu⁶⁴⁸ für die Hormon-Bindung wichtig sind, denn Mutationen auf diesen Positionen führen zu einer deutlichen Reduktion der Liganden-Bindung. Daher liegt die Vermutung nahe, dass auch die dEcR-LBD zwischen diesen Aminosäuren eine Salzbrücke ausbilden kann, die die Liganden-bindende Tasche stabilisiert.



Abb. 44: 2-Dimensionale Ansicht der generellen Struktur der LBD's nukleärer Rezeptoren in der ,geschlossenen' holo-Form (verändert nach Vivat et al. 1997). Dargestellt sind mögliche Salzbrücken zwischen Lys (Helix 4) und Glu (Helix 12) an. K497, E647 und E648 sind Aminosäuren der dEcR-LBD, deren Funktion in der vorliegenden Arbeit durch Mutationsanalysen untersucht wurden.

Direkte Wechselwirkungen mit dem Liganden ist auch für Helix 4 unwahrscheinlich (Wurtz et al. 2000). Die Mutation dEcR-LBD^{E647R} zeigt keinen Effekt und verdeutlicht, dass nicht alle AS der H12 für die Liganden-Bindung wichtig sind. Die Mutation dEcR-LBD^{E648K}, die vermutlich zur Aufhebung der Salzbrücke führt, zeigt in Gegenwart des Heterodimer-Partners USP nur noch leicht reduzierte Ponasteron A-Bindung. Offensichtlich kann also durch Komplexbildung mit USP die Liganden-bindende Tasche des EcR modifiziert und damit stabilisiert werden.

Im Gegensatz zu H4 und H12 können aufgrund der 3-dimensionalen Struktur vor allem Aminosäuren der Helix-Bereiche 3, 5 und 11 mit dem Liganden Wasserstoff-Brücken ausbilden (Letz et al. 1999, Wurtz et al. 2000) und dadurch in direkten Kontakt treten. Die Bedeutung dieser Bereiche für die Ligandenbindung wird schon dadurch evident, dass sich die funktionell unterschiedlichen α -, β - und γ -Isoformen des RAR- durch Austausch von maximal drei AS innerhalb dieser helikalen Bereiche in einander überführen lassen (Géhin et al. 1999). Anhand eines Computer-Modells werden für die EcR-LBD aus Chironomus 11 Aminosäuren von Helix 3, 5 und 11 vorgeschlagen, die mit den OH-Gruppen des Liganden (20-OH-Ecdyson) wechselwirken können (Wurtz et al. 2000). Da die EcR-LBD's innerhalb der Dipteren 73% Seuquenz-Homologie aufweisen und in Bereichen der H3, H5 und H11 fast völlige Sequenz-Übereinstimmung besteht, können diese Vorhersagen auch für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten EcR-LBD aus Drosophila angewendet werden. Danach sollten sich zwischen Met⁵⁰⁴ bzw. Arg⁵¹¹ der Helix 5 und OH-Gruppen von Ponasteron A Wasserstoff-Brücken ausbilden können. Tatsächlich führen Mutationen auf diesen Positionen (M504R und R511Q) zu stark reduzierter Ligandenbindung der EcR-LBD. Auffallend bleibt, dass im Fall von dEcR-LBD^{R511Q} in Gegenwart von USP der Verlust der Hormon-Bindung nahezu vollständig kompensiert werden kann. Diese Beobachtung ist ein weiteres Indiz dafür, dass USP durch Dimerisierung die Liganden-bindende Tasche des EcR so modifiziert, dass Liganden-stabilisierende Kontakte möglich sind.

Auch im Fall des Progesteron-Rezeptors (PR) führt ein Austausch von Arg^{766} (= Arg^{511} der dEcR-LBD) mit His zum Verlust der Hormon-Bindung (Letz et al. 1999) und verdeutlicht die funktionelle Bedeutung dieser Position. Anhand eines 3-dimensionalen Strukturmodells des PR hat diese Arbeitsgruppe die Vorhersage gemacht, dass zwischen Arg^{766} und der OH-3-Gruppe des Progesterons eine stabilisierende Wasserstoff-Brücke bestehen müsste. In Bindungstests konnte anschliessend der Einfluss dieser Mutation auf die Liganden-Bindung bestätigt werden.

Durch Austausch $Asn^{626} \rightarrow Lys^{626}$ in direkter, N-terminaler Nachbarschaft zur Helix 11 wird die Ligandenbindung der EcR-LBD um den Faktor 2,5 erhöht. Offensichtlich kann durch Einführung eines basischen Restes die Liganden-Bindung stabilisiert werden. Dagegen entspricht die Dimerisierungs-abhängige Liganden-Bindung in Gegenwart von USP dem Wildtyp. Damit ist Asn an dieser Position für die Hormon-Bindung zwar nur suboptimal, erleichtert aber die Dimerisierung. Dies verdeutlicht, dass eine Aminosäure in mehrere Rezeptorfunktionen involviert sein kann und zeigt, dass zusätzliche AS-Reste für die Liganden-Bindung wichtig sind, die aufgrund des Homologie-Modells der EcR-LBD (Wurtz et al. 2000) nicht vorhergesagt wurden.

Im EcR aus *Chironomus* führt ein Austausch des hochkonservierten Ile (I323L) zu reduzierter Liganden-Bindung. Einzig im EcR aus *Tenebrio molitor* existiert an dieser Stelle ein Thr (I323T), was aufgrund des Computermodells der EcR-LBD (Wurtz et al. 2000) die Liganden-Bindung beeinflussen sollte. In der EcR-LBD aus *Drosophila* hat der Austausch Ile⁴⁶³ \rightarrow Thr⁴⁶³ auf dieser Position (dEcR-LBD^{I463T}) keinen Einfluss auf die Hormon-Bindung und zeigt, dass die Vorhersagen nicht für alle EcR's gelten müssen. Helix 10 der RXR-LBD spielt bei Dimerisierungs-Prozessen eine zentrale Rolle (Bourguet et al. 1995). Dies konnte auch für andere nukleäre Rezeptoren (ER und PPAR) bestätigt werden. Über hydrophobe Reste (hauptächlich Leu) treten die Monomere in Kontakt. Dabei können H7, H9 und die Schleife zwischen H7-H8 die Ausbildung des Dimers stabilisieren (Moras & Gronemeyer 1998). Durch Austausch von Ala⁶¹² bzw. Leu⁶¹⁵ in Helix 10 der dEcR-LBD wird die Fähigkeit zur Dimerisierungs-abhängigen Liganden-Bindung deutlich reduziert, während in Abwesenheit von USP die Hormon-Bindung im Bereich des Wildtyps bzw. leicht erhöht ist. Offensichtlich sind diese AR-Reste besonders wichtig für die Dimerisierung. Diese Beobachtung wird von Gorla-Bajszczak et al. (1999) bestätigt: Im PPAR führt die Mutation L433R (entspricht der Position von dEcR-LBD^{L615}) in Helix 10 dazu, dass die Heterodimerisierung mit RXR nicht mehr möglich ist. Sie konnten weiterhin zeigen, dass auch andere Leu-Positionen in Helix 9 bzw. der Schleife zwischen H7 und H8 für die Dimerisierung von Bedeutung sind.

Mutationen von Ile⁶¹⁷ und Thr⁶¹⁹ beeinflussen die Dimerisierungs-abhängige Liganden-Bindung nicht wesentlich und zeigen, dass diese AS-Reste für den Kontakt mit USP nicht essentiell sind. Durch Austausch von Ile⁶¹⁷ mit Arg bzw. Glu ist die Hormon-Bindung in Abwesenheit von USP deutlich reduziert. Dass bedeutet, dass Helix 10 die Liganden-Bindung beeinflussen kann, obwohl ein direkter Kontakt nicht möglich ist.

IV.3.1 Einfluss von USP (LBD-Mutationen) auf die Dimerisierungs-abhängige Ligandenbindung der EcR-LBD aus *Drosophila*

Vögtli et al. (1999) haben berichtet, dass cUSP-1 und cUSP-2, die sich nur in der A/B-Domäne unterscheiden, die Ponasteron A-Bindung von cEcR unterschiedlich beeinflussen. Das zeigt, dass die A/B-Domäne von USP auf die Hormonbindung des EcR einen allosterischen Effekt ausübt. Durch Zugabe von dUSP-LBD des Wildtyps kann die Hormon-Bindung der dEcR-LBD um den Faktor 10 erhöht werden. Das bedeutet, dass auch die LBD von USP via Heterodimerisierung die Liganden-bindende Tasche des EcR modifiziert. Mit Mutationen der USP-LBD sollte im Weiteren aufgeklärt werden, welche Sequenzen bzw. Aminosäuren für diese Effekte wichtig sind.

Durch Deletion der Helix 12 in der Mutation dUSP-LBD^{Δ489-508} wurde die Dimerisierungs-abhängige Ligandenbindung der dEcR-LBD eliminiert. Dafür sind im Wesentlichen zwei Mechanismen denkbar. (i) Ohne H12 ist die Dimerisierung mit EcR *per se* nicht mehr möglich. (ii) USP^{ΔH12} modifiziert intermolekular die LBD des EcR, sodass die Fähigkeit des Heterodimers zur Hormonbindung deutlich reduziert ist. Beides liesse sich dadurch erklären, dass Veränderungen der AS-Sequenz intramolekular die räumliche Struktur der USP-LBD beeinflussen, sodass die Konformation des Heterodimers und damit die Liganden-bindende Tasche des dEcR allosterisch modifiziert sein kann. Für diese Vermutung sprechen einige Beobachtungen. Z.B führt die Mutation dUSP-LBD^{L489R} innerhalb der Helix 12 zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Hormonbindung, obwohl ein direkter Kontakt zur Liganden-bindenden Tasche des EcR nicht möglich ist (Billas et al. 2000). Interessant ist nun, dass die entsprechende H12-Mutation (F318A) im RXR bewirkt, dass dieser Rezeptor auch ohne Ligand in eine Pseudo-holo-Form übergeht und dadurch allosterische Effekte auf das RXR-RAR-Heterodimer ausüben kann (Vivat et al. 1997). Umgekehrt ist bekannt, dass RAR in der apo-Form durch Heterodimerisierung die Ligandenbindung des RXR verhindert (Moras & Gronemeyer 1998). Das bedeutet, dass beide Heterodimer-Partner einen Einfluss auf die Liganden-Bindung ausüben. Die Tatsache, dass USP aus *Bombyx mori* trotz fehlender Helix 12 dennoch mit EcR bzw. RXR einen funktionellen Komplex ausbilden kann (Suhr et al. 1998), zeigt, dass die Helix 12 von USP keine Dimerisierungs-Stelle darstellt.

Aufgrund der Sequenz könnte die Ausbildung einer stabilisierenden Salzbrücke zwischen Lys (H4) und Glu (H12) möglich sein. Ein Austausch vom hochkonservierten $Glu^{492} \rightarrow Lys^{492}$ hat auf die Liganden-Bindung der dEcR-LBD nach Dimerisierung mit USP keinen Einfluss und lässt vermuten, dass diese Salzbrücke nicht existiert. In Helix 12 befinden sich zwei weitere, dUSP-spezifische Glu, die noch nicht untersucht wurden, sodass nicht ausgeschlossen werden kann, dass eine potentielle Salzbrücke noch nicht erfasst wurde.

Auch Mutationen in Rezeptor-Abschnitten, die die Liganden-bindende Tasche des USP ausbilden, wurden untersucht. L281Y (Helix 3) und C329A (Schleife H5-Faltblatt) führen zu einer deutlichen Abnahme der Dimerisierungs-abhängigen Hormon-Bindung der EcR-LBD, die mit der Röntgen-Kristallstruktur der USP-LBD aus *Heliothis virescens* erklärt werden könnte (Billas et al. 2000). Leu²⁸¹ ist eine AS der Helix 3, deren Position durch eine ungewöhnlich starre H1-H3-Schleife bestimmt wird. Daraus resultiert eine für nukleäre Rezeptoren einzigartige, USP-spezifische Konformation der Helix 3. Offensichtlich wurde mit L281Y eine entscheidende AS ausgetauscht, sodass die Konformation der USP-LBD verändert wurde.

Aufgrund des Struktur-Modells der USP-LBD (Billas et al. 2000) sollte die Schleife H5ß-Faltblatt, in der mit dUSP-LBD^{C329A} eine AS verändert wurde, den Heterodimerisierungs-Partner "umschliessen" und in direktem Kontakt stehen mit Schleife H8-H9 der EcR-LBD. Offensichtlich kann eine Mutation in dieser Position die Wechelwirkung zwischen EcR und USP beeinflussen. Dies steht im Einklang mit Gelverzögerungs-Experimenten, in denen die Liganden-abhängige Dimerisierung der dEcR-LBD mit dUSP-Mutationen untersucht wurde (Przibilla, pers. Mitteilung).

Durch die Mutation I323A (Helix 5) wird die Dimerisierungs-abhängige Ligandenbindung des EcR leicht reduziert, obwohl diese Mutation als Gal4-DBD-dUSP-LBD^{I323A}, koexprimiert mit Gal4-AD-dEcR-LBD-Wildtyp in *S. cerevisiae*, im ,two hybrid'-System nach Hormonzugabe eine deutliche Zunahme der Gal4-spezifischen Transaktivierung im Vergleich zur Kontrolle mit USP-Wildtyp zeigte (Henrich, pers. Mitteilung). Allerdings können Faktoren der Hefe (Coregulatoren) mit nukleären Rezeptoren interagieren (Gèhin et al. 1999) und so die Transaktivierung beeinflussen. Zusammenfassend kann man festhalten, dass USP kein "passiver" Komplexpartner für EcR ist, sondern durch intermolekulare Wechselwirkungen die Konformation des funktionellen Ecdysteroid-Rezeptors beeinflusst und damit entscheidend an der Regulation Ecdysteroid-vermittelter Prozesse beteiligt ist. Dennoch bleibt eine Frage, die eng mit der hormonellen Regulation der Häutungsprozesse bei Insekten verknüpft ist, offen: Ist USP der lang gesuchte Rezeptor für Juvenilhormon oder ein Orphan ohne Ligand? Die Tatsache, dass für RXR, dem Vertebraten-Homolog von USP, mit 9-cis-Retinsäure der Ligand bekannt ist und Juvenilhormone aufgrund ihrer chemischen Natur der Retinsäure sehr ähnlich sind, lässt JH als einen potentiellen Liganden für USP möglich erscheinen. Es wird vorgeschlagen, dass neben 20-OH-Ecdyson auch JH das dynamische Gleichgewicht (EcR + USP \leftarrow EcR/USP) der Rezeptoren beeinflussen kann (Lezzi et al. 1999). Dass Ecdysteroide durch Bindung den Heterodimer-Komplex stabilisieren, ist schon länger bekannt (Yao et al. 1993). Von Jones & Sharp (1997) wird postuliert, dass Juvenilhormon durch Bindung an USP die Homodimerisierung begünstigt und dadurch ,Ultraspiracle' dem Gleichgewicht mit EcR entzogen wird. Allerdings wurde mit 0,5 µM eine Dissoziations-Konstante angegeben, die im Vergleich zu typischen Hormon-Affinitäten unphysiologisch hoch erscheint.

Mit gereinigten Rezeptoren aus *Chironomus* konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass in Gegenwart von 5 mM Methopren (JH-Analog) die spezifische Ponasteron A-Bindung des Heterodimers um 70% reduziert werden konnte. Ob dieser Effekt durch Bindung des Methoprens an USP und daraus resultierender Begünstigung der Homodimerisierung hervorgegangen ist, bleibt allerdings noch fraglich. Man beachte, dass (i) die hohe Konzentration ausserhalb einer physiologischen Relevanz lag und (ii) durch den stark hydrophoben Charakter von Methopren ein unspezifisches "Kleben" denkbar ist. Für eine unspezifische Bindung spricht auch die Röntgen-Kristallstruktur von HvUSP-LBD, aus der eine in Form und Grösse für nukleäre Rezeptoren ungewöhnliche Konformation der Liganden-bindenden Tasche hervorgeht, die eine holo-(Agonistgebundene)-Form des USP ausschliesst (Billas et al. 2000). Letztlich kommt diese Arbeitsgruppe zu dem Schluss, dass auch in Gegenwart von Juvenilhormon-Analogen die LBD keine holo-Form ausbilden kann und führen damit USP seiner ursprünglichen Natur als Rezeptor ohne (bekannten) Liganden zurück - ein Orphan!

IV.4 Modulation der hormonellen Signaltransduktion

Viele Faktoren, die die hormonelle Signaltransduktion modulieren können, sind vorgestellt und in Abb. 45 zusammengefasst worden. Für einige Faktoren konnte zusätzlich gezeigt werden, dass sie Zusammenhang mit Mechanismen zur Ausbildung einer Hormon-Resistenz im stehen können.



Abb. 45: Faktoren, die auf Rezeptor-vermittelte Wirkungen von Steroiden/Ecdysteroiden Einfluss nehmen und damit die hormonelle Signaltransduktion modulieren können. Faktoren, für die ein direkter Zusammenhang mit Hormon-Resistenz nachgewiesen werden konnte, sind hervorgehoben. [1] (Swevers et al. 1996), [2] (Peters et al. 1999, vorliegende Arbeit), [3] (Weiss et al. 1999), [4] (Kayser et al. 1997, Williams et al. 1997, Sundaram et al. 1998)

Zum weiteren Verständnis der hormonellen Wirkung von Ecdysteroiden kann es hilfreich sein, (i) auf molekularer Ebene weitere Comodulatoren (Aktivatoren, Repressoren) der Invertebraten nachzuweisen,

(ii) die Wechselwirkungen mit rekombinant hergestellten Rezeptoren und Comodulatoren zu studieren,

(iii) die intramolekularen bzw. intermolekularen Wechselwirkungen (allosterische Effekte) der Rezeptor-Domänen zu untersuchen, und

(iiii) die Kristallstruktur der Liganden-bindenden Tasche des EcR aufzuklären und daraus ein Modell zu entwickeln, das es erlaubt, in Kombination mit Untersuchungen der Rezeptorfunktionen genauere Aussagen über Struktur-Aktivitäts-Beziehungen treffen zu können und die gerichtete Synthese neuer Insektizide ermöglicht (,directed drug design')

Die kommerzielle Anwendung von Ecdysteroiden, die durch Erkenntnisse in der Insekten-Physiologie möglich wurde, beschränkt sich bisher weitestgehend auf den Einsatz als Insekten-Wachstums-Regulatoren in der Schädlings-Bekämpfung. Mittlerweile wird die Rezeptor-vermittelte Wirkung der Ecdysteroide auch in Expressions-Systemen von Säugerzellen genutzt. In Zukunft könnten Ecdysteroide dank ihrer äusserst geringen Toxizität (LD₅₀ für Mäuse > 9 g/kg) auch in der Gentherapie zum Einsatz kommen und durch gezielte Applikation die Expression therapeutischer Gene regulieren ("Genschalter").

V Zusammenfassung

Während der Insekten-Entwicklung werden Larven-Stadien und deren Häutungsprozesse als auch die Metamorphose zum adulten Tier im Wesentlichen durch Ecdysteroide reguliert. Bei der hormonellen Signaltransduktion spielt der Ecdysteroidrezeptor (EcR/USP), der als Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor durch Bindung an DNA die Expression Hormon-abhängiger Gene moduliert, eine zentrale Rolle. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Ecdysteroidrezeptor, der auch als ,Zielprotein' Arthropoden-spezifischer Insektizide von Interesse ist, näher charakterisiert:

(1) Hormon-resistente Subklone der epithelialen Zellinie von *Chironomus tentans* haben sowohl morphologisch als auch physiologisch die für den Wildtyp charakteristische Ansprechbarkeit auf 20-OH-Ecdyson bzw. RH-5992 (Insektizid) verloren. In allen untersuchten Zellen wird RH-5992 langsamer abgebaut als im Wildtyp. Damit kann erhöhter RH-5992-Metabolismus als Ursache erworbener Insektizid-Resistenz ausgeschlossen werden. Mit Western-Blots wurde nachgewiesen, dass in keinem Fall die Expressions-Raten der Phosphoproteine EcR und USP im Vergleich zum Wildtyp signifikant abweichend waren. Im Gegensatz dazu konnten auf Ebene der posttranslationellen Modifikation Unterschiede festgestellt werden, da in drei Zellklonen das Phosphorylierungs-Muster von USP deutlich abweicht. Ponasteron A-Bindungstests ergaben, dass die Subklone bezüglich der Liganden-Bindung in 5 Klassen eingeteilt werden können:

- Hormonbindung entspricht dem Wildtyp
- Ligandenbindung mit Dissoziations-Konstanten (K_D) wie Wildtyp, aber deutlich reduzierte Anzahl an Bindestellen
- Selektiver Verlust einer Bindestelle und Abnahme der Anzahl gebundender Hormon-Moleküle
- Veränderte Liganden-Spezifität mit reduzierter Anzahl an Bindestellen
- Verlust der spezifischen Hormonbindung

Experimente zur Rekonstitution der Liganden-Bindung mit bakteriell exprimiertem cEcR und cUSP ergaben, dass in Zellextrakten resistenter *Chironomus*-Klone nur durch Zugabe von gereinigtem EcR die hochaffine Ponasteron A-Bindung des Wildtyps wiederhergestellt werden konnte. Damit wurde gezeigt, dass die Hormon-Resistenz auf Rezeptordefekte des EcR zurück zu führen ist. So konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals beschrieben werden, wie gegen ein Ecdysteroid-Agonist aus der Klasse der Insekten-Wachstumsregulatoren ,target site resistance' erworben werden kann.

(2) Die Heterodimerisierungs-Partner EcR und USP aus *Chironomus tentans* wurden als GST-Fusionsproteine in Bakterien exprimiert und über Affinitäts-Chromatographie gereinigt. [³H]-Ponasteron A-Bindungstests ergaben, dass mit gereinigtem cEcR/cUSP im Vergleich zu *Chironomus*-Zellextrakten identische Ergebnisse erhalten wurden, da sowohl die für den Wildtyp charakteristischen zwei hochaffinen Hormon-Bindestellen als auch die Liganden-Spezifitäten für 20E und RH-5992 ermittelt werden konnten. USP

ist für die Liganden-Bindung des cEcR essentiell. Durch Zugabe von Retikulozyten-Lysat (als Quelle für Cofaktoren und Hitzeschockproteine) konnte die Hormon-Bindung nicht verbessert werden. Durch Verzicht auf Detergenz während der Herstellung rekombinanter Proteine war die Ausbeute an Rezeptoren sehr niedrig, aber die Funktionalität der Rezeptor-Proteine blieb mit ca. 50% erhalten. In Gelverzögerungs-Experimenten konnte gezeigt werden, dass auch zur DNA-Bindung gereinigter Rezeptoren keine weiteren Hilfsproteine erforderlich sind. Während die Spezifität der DNA-Bindung den *Chironomus*-Zellextrakten entspricht, ist das Ausmass der DNA-Bindung deutlich geringer. Die Abspaltung der Glutathion-S-Transferase mit Thrombin ergab, dass GST die DNA-Bindungseigenschaften der Rezeptoren verändert.

Mit der vorliegenden Arbeit kann zum ersten Mal ein Protokoll vorgelegt werden, das es erlaubt, EcR und USP als vollständige Rezeptor-Moleküle bakteriell zu exprimieren und so zu reinigen, dass die Rezeptorfunktionen erhalten bleiben.

(3) Die LBD's von EcR und USP aus Drosophila (Wildtyp und Mutationen) wurden als Gal4-Fusionsproteine in Hefen exprimiert und die Ecdysteroid-Bindung der dEcR-LBD in Abwesenheit und Gegenwart von dUSP-LBD untersucht. Zur Hormon-Bindung des EcR aus Drosophila ist USP nicht essentiell. Durch Zugabe von USP kann die Liganden-Bindung um den Faktor 10 gesteigert werden. Mutationen der LBD sollten Aufschluss darüber geben, welcher Rezeptorabschnitt erforderlich ist, um eine dem Gesamtmolekül vergleichbare Hormon-Bindung zu erhalten bzw. wie durch Austausch von AS die Funktion verändert wird. Zur Liganden-Bindung und Dimerisierung der dEcR-LBD ist neben der vollständigen E-Domäne (inkl. Helix 12) auch der C-terminale Anteil der D-Domäne notwendig. Mutationen von AS, die eine Salzbrücke (H4-H12) bilden können, führten zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Liganden-Bindung des EcR, die durch Gegenwart von USP erhöht wurde. Das zeigt, dass die Ligandenbindende Tasche des EcR durch Dimerisierung mit USP allosterisch modifiziert werden kann. Mit Mutationen in Helix 10 konnte bestätigt werden, dass dieser Bereich für die Liganden-abhängige Dimerisierung wichtig ist. Dabei kann eine AS für beide untersuchten Rezeptorfunktionen wichtig sein. Besonders Mutationen von AS, die aufgrund von 3-dimensionalen Strukturmodellen mit dem Liganden in direkten Kontakt treten sollten, führten zu deutlich reduzierter Hormon-Bindung.

Helix 12 der dUSP-LBD ist für die Dimerisierungs-abhängige Ligandenbindung der dEcR-LBD essentiell. Mit Mutationen in Helix 3 und 5 wurde gezeigt, dass die Liganden-bindende Tasche von dUSP die Hormonbindung des EcR beeinflussen kann.

VI Literaturverzeichnis

- Ahrens H, Schuh TJ, Rainish BL, Furlow JD, Gorski J, Mueller GC (1992) Overproduction of full-length and truncated human estrogen receptors in *Escherichia coli*. *Receptor* **2**, 77-92
- **Alland L**, Muhle R, Hou H, Potes J, Chin L, Schreiber-Agus N, DePinho RA (1997) Role of N-CoR and histone deacetylase in SIN3-mediated transcriptional repression. *Nature* **387**, 49-55

Apriletti JW, Ribeiro RC, Wagner RL, Feng W, Webb P, Kushner PJ, West BL, Nilsson S, Scanlan TS, Fletterick RJ, Baxter JD (1998) Molecular and structural biology of thyroid hormone receptors. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. Suppl.* **25**, 2-11

Arbeitman MN, Hogness DS (2000) Molecular Chaperones Activates the *Drosophila* Ecdysone Receptor, an RXR Heterodimer. *Cell* **101**, 67-77

Ashburner M, Chihara C, Meltzer P, Richards G (1974) Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **38**, 655-662

Ball EH, Shepard LB, Gill GN (1995)

Purification and Properties of Thyroid Hormone Receptor $\beta 1$ Expressed in *Escherichia* coli as a Fusion Protein. Protein Expr. Purif. 6, 33-38

Barker GC, Chitwood DJ, Rees HH (1990) Ecdysteroids in helminths and annelids. *Invert. Reprod. Dev.* **18**, 1-11

Baumeister R, Ludwig M, Spindler-Barth M (1992) Hormonal regulation of dopadecarboxylase activity and chitin synthesis in an epithelial cell line from *Chironomus tentans*. *Naturwissenschaften* **79**, 185-187

Bender M, Imam FB, Talbot WS, Ganetzky B, Hogness DS (1997) *Drosophila* ecdysone receptor mutations reveal functional differences among receptor isoformes. *Cell* **91**, 777-788

Billas IML, Moulinier L, Rochel N, Moras D (2000) Crystal Structure of the Ligand Binding Domain of the Ultraspiracle Protein USP, the Ortholog of RXRs in insects. *JBC Papers in Press*, veröffentlicht am 26 Okt. 2000 als Manuskript M008926200

Blum H, Beier H, Gross HJ (1987)

Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99

Blumberg B, Evans RM (1998)

Orphan nuclear receptors – new ligands and new possibilities. *Genes Dev.* **12**, 3149-3155

Bourguet W, Ruff M, Chambon P, Gronemeyer H (1995)

Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-α. *Nature* **375**, 377-382

Bradford MM (1976)

A rapid and sensitiv method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.***72**, 248-254

Brzozowski AM, Pike ACW, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engstrom O, Ohman L, Greene GL, Gustafsson JA, Carlquist M (1997) Molecular basis of agonism and antagonism of the estrogen receptor. *Nature* **389**, 753-757

Buszczak M, Segraves WA (1998)

Drosophila metamorphosis: The only way is USP? Curr. Biol. 8, 879-882

Butenand A, Karlson P (1954)

Über die Isolierung eines Metamorphose-Hormons der Insekten in kristalliner Form Z. Naturforsch. 9, 389-391

Caspers P, Stieger M, Burn P (1994)

Overproduction of bacterial chaperones improves the solubility of recombinant protein tyrosine kinases in *Escherichia coli*. *Cell*. *Mol*. *Biol*. **40**, 635-644

Champlin DT, Truman JW (1998)

Ecdysteroid control of cell proliferation during optic lobe neurogenesis in the moth *Manduca sexta*. *Development* **125**, 269-277

Chen JD, Evans RM (1995)

A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* **377**, 454-457

Chen ZP, Shemshedini L, Durand B, Noy N, Chambon P, Gronemeyer H (1994) Pure and Functionally Homogeneous Recombinant Retinoid X Receptor. *J. Biol. Chem.* **269**, 25770-25776

Cheng YC, Prusoff WH (1973)

Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3099-3108

Cheskis B, Freedman LP (1996)

Modulation of Nuclear Receptor Interactions by Ligands: Kinetic Analysis Using Surface Plasmon Resonance. *Biochemistry* **35**, 3309-3318

Cheskis B, Karathanasis S, Lyttle CR (1997) Estrogen Receptor Ligands Modulate Its Interaction with DNA. J. Biol. Chem. 272, 11384-11391

Chung AC, Durica DS, Clifton SW, Roe BA, Hopkins PM (1998) Cloning of crustacean ecdysteroid receptor and retinoid-X receptor gene homologs and elevation of retinoid-X receptor mRNA by retinoic acid. *Mol. Cell. Endocrinol.* **139**, 209-227

Clever U, Karlson P (1960)

Induktion von Puff-Veränderungen in den Speicheldrüsenchromosomen von *Chironomus tentans* durch Ecdyson. *Exp. Cell. Res.* **20**, 623-626

D'Avino PP, Crispi S, Cherbas L, Cherbas P, Furia M (1995) The moulting hormone ecdysone is able to recognize target elements composed of direct repeats. *Mol. Cell. Endocrinol.* **113**, 1-9

Dela Cruz F, Mak P (1997)

Drosophila Ecdysone Receptor Functions as a Constitutive Activator in Yeast. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 62, 353-359

Dhadialla TS, Tzertzinis G (1997)

Characterization and Partial Cloning of Ecdysteroid Receptor From a Cotton Boll Weevil Embryonic Cell Line. Arch. Insect Biochem. Physiol. **35**, 45-57

Dhadialla TS, Carlson GR, Le DP (1998)

New Insecticides With Ecdysteroid And Juvenile Hormone Activity. Annu. Rev. Entomol. 43, 545-569

Dinan L (1985)

Ecdysteroid réceptors in a tumorous blood cell line of *Drosophila melanogaster*. Arch. Insect Biochem. Physiol. **2**, 295-317

Dinan L, Spindler KD (1986)

The use of mercurial agents in the study of the mode of action of ecdysteroids. *Insect Biochem.* **16**, 135-141

Dinan L, Whiting P, Girault JP, Lafont R, Dhadialla TS, Cress DE, Mugat B, Antoniewski C, Lespant JA (1997) Cucurbitacins are insect steroid hormone antagonists acting at the ecdysteroid receptor. *Biochem. J.* **327**, 643-650

Doesburg P, Kuil CW, Berrevoets CA, Steketee K, Faber PW, Mulder E, Brinkmann AO, Trapman J (1997) Functional *in Vivo* Interaction between the Amino-Terminal, Transactivation Domain

and the Ligand Binding Domain of the Androgen Receptor. *Biochemistry* **36**, 1052-1064

Dressel U, Thormeyer D, Altincicek B, Paululat A, Eggert M, Schneider S, Tenbaum AP, Renkawitz R, Baniahmad A (1999) Alien, a Highly Conserved Protein with Characteristics of a Corepressor for Members of the Nuclear hormone Receptor Superfamily. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 3383-3394

Egea PF, Klaholz BP, Moras D (2000) Ligand-protein interactions in nuclear receptors of hormones. *FEBS Lett.* **476**, 62-67

Elbrecht A, Chen Y, Jurgens T, Hensens OD, Zink DL, Beck HAT, Balick MJ, Borris R (1995)

8-Ò-Acétylharpagide is a Nonsteroidal Ecdysteroid Agonist. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **26**, 519-523

Elke C, Vögtli M, Rauch P, Spindler-Barth M, Lezzi M (1997) Expression of EcR and USP in *Escherichia coli*: Purification and functional studies. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **35**, 59-69

Elke C, Rauch P, Spindler-Barth M, Spindler KD (1999) DNA-binding properties of the ecdysteroid receptor complex (EcR/USP) of the epithelial cell line from *Chironomus tentans*. Arch. Insect Biochem. Physiol. **41**, 124-133

Elke C, Spindler KD (im Druck)

DNA-binding specificity of nuclear hormone receptors can be altered by N-terminal GST-fusion tags and antibodies against regions N-terminal to the zinc finger. *Insect Biochem. Molec. Biol.*

Evans RM (1988)

The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. Science 240, 889-895

Farkas R, Slama K (1999)

Effect of bisacylhydrazine ecdysteroid mimics (RH-5849 and RH-5992) on chromosomal puffing, imaginal disc proliferation and pupariation in larvae of *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **29**, 1015-1027

Feldlaufer MF (1989)

Diversity of molting hormones in insects. In: Koolman J (ed.), Ecdysone; from chemistry to mode of action, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 308-311

Feyereisen R (1995)

Molecular biology of insecticide resistance. Toxicol. Lett. 82/83, 83-90

Feyereisen R (1998)

Juvenile hormone resistance: no PASaran. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 2725-2726

ffrench-Constant RH (1999)

Target site mediated insecticide resistance: what questions remain ? *Insect Biochem. Molec. Biol.* **29**, 397-403

Fisk GJ, Thummel CS (1998)

The DHR78 Nuclear Receptor Is Required for Ecdysteroid Signaling during the Onset of *Drosophila* Metamorphosis. *Cell* **93**, 543-555

Forman BM, Goode E, Chen J, Oro AE, Bradley DJ, Perlmann T, Noonan DJ, Burka LT, McMorris T, Lamph WW, Evans RM, Weinberger C (1995) Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell* **81**, 687-696

Frangioni JV, Neel BG (1993)

Solubilization and Purification of Enzymatically Active Glutathione S-Transferase (pGEX) Fusion Proteins. *Anal. Biochem.* **210**, 179-187

Freedman LP (1992)

Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. Endocr. Rev. 13, 129-145

Fretz A, Spindler KD (1999)

Hormonal Regulation of Actin and Tubulin in an Epithelial Cell line From *Chironomus tentans. Arch. Insect Biochem. Physiol.* **41**, 71-78

Gèhin M, Vivat V, Wurtz JM, Losson R, Chambon P, Moras D, Gronemeyer H (1999) Structural basis for engineering of retinoic acid receptor isotype-selective agonists and antagonists. *Chem. Biol.* **6**, 519-529

Georghiou GP, Lagunes-Tejeda A (1991)

The Occurence of Resistance to Pesticides in Arthropodes. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome

Gilbert LI, Song Q, Rybczynski (1997)

Control of ecdysteroidogenesis: activation and inhibition of prothoracic gland activity. *Invert. Neurosci.* **3**, 205-216

Glass CK, Rose DW, Rosenfeld MG (1997) Nuclear receptor coactivators. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 222-232

Gorla-Bajszczak A, Juge-Aubry C, Pernin A, Burger AG, Meier CA (1999) Conserved amino acids in the ligand-binding and τ_i domains of the peroxisome proliferator-activated receptor α are necessary for heterodimerization with RXR. *Mol. Cell. Endocrinol.* **147**, 37-47 Graumann K, Jungbauer A (2000)

Quantitative assessment of complex formation of nuclear-receptor accessory proteins. *Biochem. J.* **345**, 627-636

Grebe M (1997)

Charakterisierung Ecdysteroid-resistenter Subklone der epithelialen Zellinie von *Chironomus tentans*. Diplomarbeit, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Grebe M, Rauch P, Spindler-Barth M (2000)

Charactérization of subclones of the epithelial cell line from *Chironomus tentans* resistent to the insecticide RH 5992, a non-steroidal moulting hormone agonist. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **30**, 591-600

Grenier S, Grenier AM (1993)

Fenoxycarb, a fairly new insecticide growth regulator: a review of its effects on insects. *Ann. Appl. Biol.* **122**, 369-403

Guan KL, Dixon JE (1991)

Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: An improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione-S-transferase. *Anal. Biochem.* **192**, 262-267

Guo X, Harmon MA, Laudet V, Mangelsdorf DJ, Palmer MJ (1997) Isolation of a functional ecdysteroid receptor homologue from the ixodid tick *Amblyomma americanum. Insect Biochem. Molec. Biol.* **27**, 945-962

Guo X, Harmon MA, Jin X, Laudet V, Mangelsdorf DJ, Palmer MJ (1998) Isolation of two retinoid X receptor homologues from the ixodid tick, *Amblyomma americanum. Mol. Cell. Endocrinol.* **139**, 45-60

Guthre C, Fink GR (1991)

Guide to yeast genetics and molecular biology. In: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego **194**, 1-932

Hakes DJ, Dixon JE (1992)

New vectors for high level expression of recombinant proteins in bacteria. *Anal. Biochem.* **202**, 293-298

Halling BP, Yuhas DA, Eldridge RR, Gilbey SN, Deutsch VA, Herron JD (1999) Expression and Purification of the Hormone Binding Domain of the *Drosophila* Ecdysone and Ultraspiracle Receptors. *Protein Expr. Purif.* 17, 373-386

Hammock BD, Soderlund DM (1986)

Chemical strategies for resistance management. In: Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management, Committee on Strategies for the Management of Pesticide Resistant Pest Populations, National Academy Press, Washington, DC, 111-129

Hanahan D (1985)

Techniques for transformation of *E. coli*. In: Glover DM. (ed.), DNA cloning 1, Oxford, IRL, 109-135

Harper JW, Adami GR, Wie N, Keyomarsi K, Elledge SJ (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-depending kinases. *Cell* **75**, 805-816
Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG (1997)

A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* **387**, 733-736

Hellal-Levy C, Fagart J, Souque A, Wurtz JM, Moras D, Rafestin-Oblin ME (2000) Crucial role of the H11-H12 loop in stabilizing the active conformation of the human mineralocorticoid receptor. *Mol. Endocrinol.***14**, 1210-1221

Heller J, Mattioda H, Klein E, Sagenmuller A (1992) Field evaluation of RH 5992 on lepidopterous pests in Europe. *Brighton Crop Prot. Conf. Pests Dis.* **1**, 59-65

Henrich VC, Sliter TJ, Lubahn DB, MacIntyre A, Gilbert LI (1990) A steroid/thyroid hormone receptor superfamily member in *Drosophila melanogaster* that shares extensive sequence similarity with a mammalian homologue. *Nucl. Acids Res.* **18**, 4143-4148

Henrich VC, Brown NE (1995)

Insect nuclear receptors: A developmental and comparative perspective. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **25**, 881-897

Henrich VC, Rybczynski R, Gilbert LI (1999)

Peptide hormones, steroid hormones, and puffs: mechanisms and models in insect development. *Vitamins Hormones* **55**, 73-125

Hill RJ, Segraves WA, Choi D, Underwood PA, Macavoy E (1993) The reaction with polytene chromosomes of antibodies raised against *Drosophila* E75A protein. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **23**, 99-104

Hodin J, Riddiford LM (1998)

The ecdysone receptor and ultraspiracle regulate the timing and progression of ovarian morphogenesis during *Drosophila* metamorphosis. *Dev. Genes Evol.* **208**, 304-317

Hiruma K, Riddiford LM (2000)

20-hydroxyecdysone-inducible transcription factors, ßftz-f1 and grf, are regulators for Dopa decarboxylase gene espression in *Manduca sexta*. Abstract Book, 14th Ecdysone Workshop, July 24-27, 2000, Rapperswil, Schweiz

Hollenberg SM, Evans RM (1988)

Multiple and cooperative trans-activation domains of the glucocorticoid receptor. *Cell* **55**, 899-906

Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Carelli G, Oro A, Lebo R, Thompson E, Evans RM (1985) Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA.

Nature **318**, 635-641

Horlein AJ, Naar AM, Heinzel T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Soderstrom M, Glass CK, Rosenfeld MG (1995) Ligand-independant repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* **377**, 397-404

Hsieh JC, Nakajima S, Galligan MA, Jurutka PW, Haussler CA, Whitfield GK, Haussler MR (1995)
 Receptor mediated genomic action of the 1,25(OH)₂D₃ hormone: Expression of the human vitamin D receptor in *E. coli. J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 53, 983-994

Hsu ACT (1991)

1,2-Diacyl-1-alkyl-hydrazines; a novel class of insect growth regulators. In: Baker DR, Fenyes JG, Moberg WK (eds.); Synthesis and Chemistry of Agrochemicals II, ACS Symp. Ser., Washington, DC, Am. Chem. Soc. **443**, 478-490,

Huber R, Hoppe W (1965)

Die Kristall- und Molekülstrukturanalyse des Insektenverpuppungshormons Ecdyson mit der automatisierten Faltmolekülmethode. *Chem. Ber.* **98**, 2403-2424

Imhof MO, Rusconi S, Lezzi M (1993)

Cloning of a *Chironomus tentans* cDNA encoding a protein (cEcRH) homologous to the *Drosophila melanogaster* ecdysteroid receptor. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 23, 115-124

Jalaguir S, Mesnier D, Leger JJ, Auzou G (1996)

Putative Steroid Binding Domain of the Human Mineralocorticoid Receptor, Expressed in *E. coli* in the Presence of Heat Shock Proteins Shows Typical Native Receptor Characteristics. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **57**, 43-50

Jindra M, Malone F, Hiruma K, Riddiford LM (1996)

Developmental profiles and ecdysteroid regulation of the mRNA's for two ecdysone receptor isoforms in the epidermis and wings of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Dev. Biol.* **180**, 258-272

Jindra M, Huang JY, Malone F, Asahina A, Riddiford LM (1997) Identification and mRNA developmental profiles of two ultraspiracle isoforms in the epidermis and wings of *Manduca sexta*. *Insect Mol. Biol.* **6**, 41-53

Johansson L, Bavner A, Thomsen JS, Färnegardh M, Gustafsson JA, Treuter E (2000) The Orphan Nuclear Receptor SHP Utilizes Conserved LXXLL-Related Motifs for Interaction with Ligand-Activated Estrogen Receptors. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1124-1133

Jones G, Sharp PA (1997)

Ultraspiracle: An invertebrate nuclear receptor for juvenile hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 13499-13503

Jones G, Jones D (2000)

Considerations on the structural evidence of a ligand-binding function of ultraspiracle, an insect homolog of vertebrate RXR. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **30**, 671-679

Kamimura M, Tomita S, Kiuchi M, Fujiwara H (1997)

Tissue-specific and state-specific expression of two silkworm ecdysone receptor isoforms – Ecdysteroid-dependant transcription in cultured anteroir silk glands. *Eur. J. Biochem.* 248, 786-793

Kapitskaya M, Wang S, Cress DE, Dhadialla TS, Raikhel AS (1996) The mosquito *ultraspiracle* homologue, a partner of ecdysteroid receptor heterodimer: cloning and characterization of isoforms expressed during vitellogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* **121**, 119-132

Karim FD, Thummel CS (1992)

Temporal coordination of regulatory gene expression by the steroid hormone ecdysone. *EMBO J.* **11**, 4083-4093

Karlson P (1963)

New concepts of the mode of action of hormones. Perspect. Biol. Med. 6, 203-214

Karlson R, Michaelsson A, Mattsson L (1991)

Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system. *J. Immunol. Methods* **145**, 229-240

Kayser H, Winkler T, Spindler-Barth M (1997) 26-Hydroxylation of ecdysteroids is catalyzed by Cytochrome P450. Relation to ecdysteroid resistance in an insect cell line. *Eur. J. Biochem.* **248**, 707-716

Keightley MC (1998)

Steroid receptor isoforms: exception or rule? Mol. Cell. Endocrinol. 137, 1-5

Khoury Christianson AM, King DL, Hatzivassiliou E, Casas JE, Hallenbeck PL, Niko-dem VM, Mitsialis SA, Kafatos FC (1992) DNA binding and heterodimerization of the *Drosophila* transcription factor chorion factor 1/ultraspiracle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 11503-11507

Kliewer SA, Moore JT, Wade L, Staudinger JL, Watson MA, Jones SA, McKee DD, Oliver BB, Wilson TM, Zetterström RH, Perlmann T, Lehmann JM (1998) An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell* **92**, 73-82

Koelle MR, Talbot WS, Segraves WA, Bender MT, Cherbas P, Hogness DS (1991) The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell* **67**, 59-77

Krust A, Kastner P, Petkovich M, Zelent A, Chambon P (1989) A third retinoic acid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 5310-5314

Kuiper GGJM, Brinkmann AO (1994)

Steroid Hormone Receptor Phosphorylation – is There a Physiological Role? *Mol. Cell. Endocrinol.* **100**, 103-107

Kumar R, Baskakov IV, Srinivasan G, Bolen DW, Lee JC, Thompson EB (1999) Interdomain Signaling in a Two-domain Fragment of the Human Glucocorticoid Receptor. J. Biol. Chem. 274, 24737-24741

Laemmli UK (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685

Lafont R, Horn DHS (1989)

Phytoecdysteroids:structures and occurrence. In: Koolman J (ed.); Ecdysone, from chemistry to mode of action

Lam G, Hall BL, Bender M, Thummel CS (1999) DHR3 Is Required for the Prepupal-Pupal Transition and Differentiation of Adult Structures during Drosophila Metamorphosis. Dev. Biol. 212, 204-216

Lammerding-Köppel M, Spindler-Barth M, Steiner E, Lezzi M, Drews U, Spindler KD (1998)

Immunohistochemical localization of ecdysteroid receptor and ultraspiracle in the epithelial cell line from *Chironomus tentans* (Insecta, Diptera). *Tissue and Cell* **30**, 187-194

Lan Q, Hiruma K, Hu X, Jindra M, Riddiford LM (1999)

Activation of a Delayed-Early Gene Encoding MHR3 by the Ecdysone Receptor Heterodimer EcR-B1-USP-1 but Not by EcR-B1-USP-2. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4897-4906 Laudet V, Adelmant G (1995) Lonesome orphans. *Curr. Biol.* 5, 124-127

- Le DP, Thirugnanam M, Lidert Z, Carlson GR, Ryan JB (1996) RH-2485: a new selective insecticide for caterpillar control. *Brigthon Crop Prot. Conf. Pests Dis.* 2, 481-486
- Lee BH, Hibino T, Jo J, Viale AM, Tabake T (1997) Isolation and characterization of dnaK genomic locus in a halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica. Plant Mol. Biol.* **35**, 763-775
- Leo C, Chen JD (2000) The SRC family of nuclear receptor coactivators. *Gene* **245**, 1-11
- Leo C, Li H, Chen JD (2000)

Differential Mechanisms of Nuclear Receptor Regulation by Receptor associated Coactivator 3. J. Biol. Chem. 275, 5976-5982

Letz M, Bringmann P, Mann M, Mueller-Fahrnow A, Reipert D, Scholz P, Wurtz JM, Egner U (1999) Investigation of the binding interactions of progesterone using muteins of the human progesterone receptor ligand binding domain designed on the basis of a threedimensional protein model. *Biochim. Biophys. Acta* **1429**, 391-400

Lezzi M, Bergman T, Mouillet JF, Henrich VC (1999) The ecdysone Receptor Puzzle. Arch. Insect Biochem. Physiol. 41, 99-106

Li C, Schwabe JWR, Banayo E, Evans RM (1997) Coexpression of nuclear receptor partners increases their solubility and biological activities. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 2278-2283

Li L, Elledge SJ, Peterson CA, Bales ES, Legerski RJ (1994) Specific association between the human DNA repair proteins XPA and ERCC1, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 5012-5016

Lier S, Dressel U, Bodderas E, Schlitt T, Baniahmad A, Paululat A (2000) Functional analysis of *Drosophila* Alien, a corepressor of nuclear hormone receptor. Abstract Book, 14th Ecdysone Workshop, July 24-27, 2000, Rapperswil, Schweiz

Löfas S, Johnsson BJ (1990)

A Novel Hydrogel Matrix on Gold Surfaces in Surface Plasmon Resonance Sensors for Fast and Efficient Covalent Immobilization of Ligands. J. Chem. Soc. Chem. Commun. **121**, 1526-1528

Mader S, Chambon P, White JH (1993) Defining a minimal estrogen receptor DNA binding domain. *Nucl. Acids Res.* 21, 1125-1132

Mangelsdorf DJ, Evans RM (1995) The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* **83**, 841-850

Mangelsdorf DJ, Thummel CS, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**, 835-839

Mao H, Kaufman WR (1998)

DNA binding properties of the ecdysteroid receptor in the salivary gland of the female ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. Insect Biochem. Molec. Biol. **28**, 947-957

McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW (1999)

Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocrinol. Rev.* 20, 321-344

Mikitani K (1996)

A New Nonsteroidal Chemical Class of Ligand for the Ecdysteroid Receptor 3, 5-ditert-butyl-4-hydroxy-N-isobutyl-benzamide Shows Apparent Insect Molting Hormone Activities at Molecular and Cellular Levels. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 227, 427-432

Milburn MV, Chaifson P, Lambert M, Cobb J, Wisely GB (1997)

Ligand binding and activation of PPARs – crystal structures of PPARγ. EMBO Workshop on ,Structure and Function of Nuclear Receptors', 2-5 Mai, Erice, Italien

Miyamoto J, Hirano M, Takimoto Y, Hatakoshi M (1993) Insect growth regulators for pest control, with emphasis on juvenile hormone analogs: present and future prospects. In: Duke SO, Menn JJ, Plimmer JR (eds.); Pest control with Enhanced Environmental Savety, ACS Symp. Ser., Washington, DC, Am. Chem. Soc. **524**, 144-168

Moras D, Gronemeyer H (1998)

The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 384-391

Mouillet JF, Delbecque JP, Quennedey B, Delachambre J (1997)
Cloning of two putative ecdysteroid receptor isoforms from *Tenebrio molitor* and their developmental expression in the epidermis during metamorphosis. *Eur. J. Biochem.* 248, 856-863

Myszka DG (1997)

Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors. *Curr. Opin. Biotech.* **8**, 50-57

Nagy L, Kao HY, Love JD, Li C, Banayo E, Gooch JT, Krishna V, Chatterjee K, Evans RM, Schwabe JWR (1999) Mechanisms of corepressor binding and release from nuclear hormone receptors. *Genes Dev.* 13, 3209-3216

Nemoto T, Ohara-Nemoto Y, Denis M, Gustafsson JA (1990) The transformed glucocorticoid receptor has a lower steroid-binding affinity than the nontransformed receptor. *Biochemistry* **29**, 1880-1886

Nemoto T, Ohara-Nemoto Y, Ota M (1994) Association of the 90-kDa heat shock protein does dot affect the ligand-binding ability of androgen receptor. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 42, 803-812

Nemoto T, Ohara-Nemoto Y, Shimazaki S, Ota M (1994) Dimerization Characteritics of the DNA- and Steroid-binding Domains of the Androgen Rezeptor. J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 50, 225-233

Nichols M, Rientjes JMJ, Stewart AF (1998) Different positioning of the ligand-binding domain helix 12 and the F domain of the estrogen receptor accounts for functional differences between agonists and antagonists. *EMBO J.* **17**, 765-733

Niedziela-Majka A, Rymarczyk G, Kochman M, Ozyhar A (1998) Pure, bacterially expressed DNA-binding domains of the functional ecdysteroid receptor capable of interacting synergistically with the *hsp27* 20-hydroxyecdysone response element. GST-induced dimerization of DNA-binding domains alters characteristics of their interaction with DNA. *Protein Expr. Purif.* **14**, 208-221

Niedziela-Majka A, Kochman M, Ozyhar A (2000) Polarity of the ecdysone receptor complex interaction with the palindromic response element from the *hsp27* gene promotor. *Eur. J. Biochem.* **267**, 507-519

Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokawa R, Rosenfeld MG, Willson TM, Glass CK, Milburn MV (1998) Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature* **395**, 137-143

Norris JD, Fan D, Stallcup MR, McDonnell DP (1998) Enhancement of estrogen receptor transcriptional activity by the coactivator GRIP-1 highlights the role of activation function 2 in determining estrogen receptor pharmacology. *J. Biol. Chem.* **273**, 6679-6688

Oro AE, McKeown M, Evans RM (1990) Relationship between the product of the *Drosophila ultraspiracle* locus and the vertebrate retinoid X receptor. *Nature* **347**, 298-301

Parvari R, Pecht I, Soreo H (1983)

A microfluorometric assay for cholinesterases, suitable for multiple kinetic determinations of picomoles of released thiocholin. *Analyt. Biochem.* **133**, 450-456

Pazin MJ, Kadonaga JT (1997) What's up and down with histone deacetylation and transcription? *Cell* **89**, 325-328

Perea SC, Ladd TR, Dhadialla TS, Krell PJ, Sohi SS, Retnakaran A, Palli SR (1999) Studies on two ecdysone receptor isoforms of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *Mol. Cell. Endocrinol*. **152**, 73-84

Peters I, Weidemann W, Romalo G, Knorr D, Schweikert HU, Spindler KD (1999) An androgen receptor mutation in the direct vicinity of the proposed C-terminal α helix of the ligand binding domain containing the AF-2 transcriptional activating function core is associated with complete androgen insensitivity. *Mol. Cell. Endocrinol.* **148**, 47-53

Pool MR, Lopez-Huertas E, Baker A (1998) Characterization of intermediates in the process of plant peroxisomal protein import. *EMBO J.* **17**, 6854-6862

Power RF, Conneely OM, O'Malley BW (1992) New insights into activation of the steroid hormone receptor superfamily. *Trends Pharmacol. Sci.* **13**, 318-323

Pratt WB, Toft DO (1997) Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocrinol. Rev.* **18**, 306-360

Proudfoot AE, Goffin L, Payton MA, Wells TN, Bernard AR (1996) In vivo and in vitro folding of a recombinant metalloenzyme, phosphomannose isomerase. *Biochem. J.* **318**, 437-442

Pszczólkowski MA, Kuszczak B (1996)

Effect of an ecdysone agonist, RH 5849, on wandering behavior in *Spodoptera littoralis. Comp. Biochem. Physiol.* **113**, 359-367

Quack S, Fretz A, Spindler-Barth M, Spindler KD (1995)

Receptor affinities and biological responses of nonsteroidal ecdysteroid agonists on the epithelial cell line from *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). Eur. J. *Entomol.* **92**, 341-347

Rauch P, Grebe M, Elke C, Spindler KD, Spindler-Barth M (1998) Ecdysteroid receptor and ultraspiracle from *Chironomus tentans* (insecta) are phosphoproteins and are regulated differently by molting hormone. Insect Biochem. Molec. Biol. 28, 265-275

Rauch P (1999)

Untersuchungen zur Phosphorylierung des Ecdysteroidrezeptors und Hormon-Rezeptor-Interaktionen bei verschiedenen Subklonen der epithelialen Zellinie von Chironomus tentans. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Rees HH (1989)

Zooecdysteroids: structures and occurrence. In: Koolman J (ed.), Ecdysone; from chemistry to mode of action

Refetoff S, Weiss RE (1997)

Resistance to thyroid hormone. In: Thakker TV (ed.), Resistance to Thyroid Hormone, Chapman & Hill, London, UK, 85-122

Renaud JP, Rochel N, Ruff M, Vivat V, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D (1995) Crystal structure of the RAR-y ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. Nature 378, 681-689

Retnakaran A, Hiruma K, Palli SR, Riddiford LM (1995) Molecular analysis of the mode of action of RH-5992, a lepidopteran-specific, nonsteroidal ecdysteroid agonist. Insect Biochem. Molec. Biol. 25, 109-117

Retnakaran A, Sundaram M, Smagghe G, Ishaaya I, Feng QL, Primavera M, Tomkins WL, Krell PJ, Palli SR, Gelbic I, Arif B (2000) Effects of RH-5992 on larval, pupal and adult stages as well as its putative resistance mechanism in selected forest Lepidoptera. Abstract Book, 14th Ecdysone Workshop,

July 24-27, 2000, Rapperswil, Schweiz

Riddiford LM (1996)

Molecular aspects of juvenile hormone action in insect metamorphosis. In: Gilbert LI, Tata J, Atkinson BG (eds.), Metamorphosis: Post-embryonic Reprogramming of Gene Expression in Amphibian and Insect Cells, Academic Press, San Diago, CA, 3 223-251

Roehrborn CG, Zoppi S, Gruber JA, Wilson C, McPhaul MJ (1992) Expression and characterization of full length and partial human androgen receptor fusion proteins. Implications for the production and applications of soluble steroid receptors in Escherichia coli. Mol. Cell. Endocrinol. 84, 1-14

Rufingier C, Pasteur N, Lagnel J, Martin C, Navajas M (1999) Mechanisms of insecticides resistance in the aphid *Nasonovia ribisnigri* (Mosley) (Homoptera: Aphididae) from France. Insect Biochem. Molec. Biol. 29, 385-391

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989)

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA

Sauphanor B, Bouvier JC (1995)

Cross-resistance between benzoylureas and benzoylhydrazines in the codling moth *Cydia pomonella. Pestic. Sci.* **45**, 369-375

Scatchard G (1949)

The attraction of proteins for small molecules and ions . Ann. NY Acad. Sci. 51, 660-672

Scott JG (1999)

Cytochrom P450 and insecticide resistance. Insect Biochem. Molec. Biol. 29, 757-777

Sechser B, Reber B, Wesiak H (1994)

Selectivity of diofenolan (CGA 59 205) and its potential for integrated scale control. Brighton Crop Prot. Conf. Pests Dis. 3, 1193-1198

Sherman MY, Goldberg AL (1992)

Involvment of the chaperonin dnaK in the rapid degradation of a mutant protein in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **11**, 71-77

Sladek FM, Ruse MD, Nepomuceno L, Huang SM, Stallcup MR (1999) Modulation of transcriptional activation and coactivator interaction by splicing variation in the F domain of nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4alpha1. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6509-6522

Slama K (1995)

Hormonal status of RH-5849 and RH-5992 synthetic ecdysone agonists (ecdysoids) examined on several standard bioassays for ecdysteroids. *Eur. J. Entomol.* **92**, 317-323

Sláma K, Koudela K, Tenora J, Mathová A (1996) Insect hormones in vertebrates: anabolic effects of 20-hydroxyecdysone in Japanese quail. *Experientia* **52**, 702-706

Smagghe G, Degheele D (1992)

Effects of RH 5849, the first nonsteroidal ecdysteroid agonist, on larvae of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **21**, 119-128

Smagghe G, Degheele D (1993)

Metabolism, pharmacokinetics, and toxicity of the first nonsteroidal ecdysteroid agonist RH 5849 to *Spodoptera exempta* (Walker), *Spodoptera exigua* (Hübner), and *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Pest. Biochem. Physiol.* **46**, 149-160

Smagghe G, Degheele D (1995)

Selectivity of nonsteroidal ecdysteroid agonists RH 5849 and RH 5992 to nymphs and adults of pretatory soldier bugs, *Podisus nigrispinus* and *P. maculiventris* (Hemiptera: Pentatomidae). *J. Econ. Entomol.* **88**, 40-45

Small GJ, Hemingway J (2000)

Differential glycosylation produces heterogeneity in elevated esterases associated with insecticide resistance in the brown planthopper *Nilaparvata lugens* Stal. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **30**, 443-453

Smith DB, Johnson KS (1988)

Single stép purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31-40

Song Q, Alnemri ES, Litwack G, Gilbert LI (1997)

An Immunophilin is a Component of the Insect Ecdysone Receptor (EcR) Complex. Insect Biochem. Molec. Biol. 27, 973-982

Song Q, Gilbert LI (1998)

Alterations in the ultraspiracle (USP) content and phosphorylation state accompany feedback regulation of ecdysone synthesis in the insect prothoracic gland. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **28**, 849-860

Spindler KD, Dinan L, Londershausen M (1984)

On the mode of action of ecdysteroids in crustaceans. In: Hofmann J, Porchet M (eds.), Biosynthesis, Metabolism and Mode of Action of Invertebrate Hormones, Springer Verlag Berlin, 255-264

Spindler KD (1991)

Roles of morphogenetic hormones in the metamorphosis of arthropodes other than insects. *Morphogenetic Hormones of Arthropodes, Rutgers Press* **3**, 131-149

Spindler KD, Spindler-Barth M (1991)

Ecdysteroid production and metabolism by an epithelial cell line from *Chironomus tentans*. *Naturwissenschaften* **78**, 78-79

Spindler KD, Przibilla S, Spindler-Barth M (im Druck) Moulting hormones of arthropodes: Molecular mechanisms. *Zoology*

Spindler KD, Schweikert HU, Weidemann W (1998) The human androgen receptor: mutations and diseases. *Curr. Trends Steroid Hormone Res.* **1**, 83-91

Spindler-Barth M, Schmidt H, Drews U, Spindler KD (1988) Increase in activity of acetylcholinesterase by 20-OH-ecdysone in a *Chironomus tentans* cell line. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **197**, 366-369

Spindler-Barth M, Turberg A, Spindler KD (1991)

On the action of RH 5849, a nonsteroidal ecdysteroid agonist, on a cell line from *Chironomus tentans. Arch. Insect Biochem. Physiol.* **16**, 11-18

Spindler-Barth M, Junger E, Spindler KD (1992)

Vesicle formation and ecdysteroid-induced cellular differentiation in the epithelial cell line from *Chironomus tentans*. *Tissue and Cell* **24**, 919-934

Spindler-Barth M, Quack S, Rauch P, Spindler KD (1997)

Biological effects of muristerone A and turkesterone on the epithelial cell line from *Chironomus tentans* (Insecta, Chironomidae) and correlation with binding affinity to the ecdysteroid receptor. *Eur. J. Entomol.* **94**, 161-169

Spindler-Barth M, Spindler KD (1998a)

Ecdysteroid resistant subclones of the epithelial cell line from *Chironomus tentans* (insecta, diptera). I. Selection and characterization of resistant clones. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal* **36**, 116-122

Spindler-Barth M, Spindler KD (1998b)

Morphogenetic actions and mode of action of ecdysteroids in a dipteran cell line. *Curr. Topics Steroid Res.* **1**, 73-81

Spindler-Barth M, Spindler KD (im Druck)

Hormonal regulation of larval moulting and metamorphosis – Molecular aspects. In: Dorn (ed.), Progress in developmental endocrinology, Wiley-Liss, New York

Staal GB (1975)

Insect growth regulators with juvenile hormone activity. Annu. Rev. Entomol. 20, 417-460

Stevens B, O'Conner JD (1982)

The acquisition of resistance to ecdysteroids in cultured *Drosophila* cells. *Dev. Biol.* **94**, 176-182

Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW (1990)
Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185, 60-89

Sundaram M, Palli SR, Krell PJ, Sohi SS, Dhadialla TS, Retnakaran A (1998) Basis for selective action of a synthetic molting hormone agonist, RH-5992 on lepidopteran insects. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 28, 693-704

Suhr ST, Gil EB, Senut MC, Gage FH (1998)

High level transactivation by modified *Bombyx* ecdysone receptor in mammalian cells without exogenous retinoid X receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 7999-8004

Sutherland JD, Kozlova T, Tzertzinis G, Kafatos FC (1995) Drosophila hormone receptor 38: a second partner for Drosophila USP suggest an unexpected role for nuclear receptors of the nerve growth factor-induced protein B type. Proc. Natl. Acad. Sci. 92, 7966-7970

Swamy N, Mohr SC, Xu W, Ray R (1999)

Vitamin D Receptor Interacts with DnaK/Heat Shock Protein 70: Identification of DnaK Interaction Site on Vitamin D Receptor. Arch. Biochem. Biophys. 363, 219-226

Swevers L, Cherbas L, Cherbas P, Iatrou K (1996) Bombyx EcR (BmEcR) and Bombyx USP (BmCF1) combine to form a functional ecdysone receptor. Insect Biochem. Molec. Biol. 26, 217-221

Swevers L, Iatrou K (1999)

The ecdysone agonist tefubenozide (RH-5992) blocks the progression into the ecdysteroid-induced regulatory cascade and arrests silkmoth oogenesis at mid-vitellogenesis. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **29**, 955-963

Talbot SW, Swyryd EA, Hogness DS (1993) *Drosophila* tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms. *Cell* **73**, 1323-1337

Tanenbaum DM, Wang Y, Williams SP, Sigler PB (1998) Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 5998-6003

Tasset D, Tora L, Fromental C, Scheer E, Chambon P (1990) Distinct classes of transcriptional activation domains function by different mechanisms. *Cell* **62**, 1177-1187

Tenbaum S, Baniahmad (1997) Nuclear Receptors: Structure, Function and Involvment in Disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**, 1325-1341

Thomas HE, Stunnenberg HG, Stewart AF (1993) Heterodimerization of the *Drosophila* ecdysone receptor with retinoid X receptor and *ultraspiracle*. *Nature* **362**, 471-474

Thomas JG, Ayling A, Baneyx F (1997) Molecular chaperones, folding catalytes, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*: To fold or to refold. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **66**, 197-238 **Thomas BA**, Hinton AC, Moskowitz H, Severson TF, Hammock BD (2000) Isolation of juvenile hormone esterase and its partial cDNA clone from the beetle, *Tenebrio molitor. Insect Biochem. Molec. Biol.* **30**, 529-540

Thormeyer D, Tenbaum SP, Renkawitz R, Baniahmad A (1999) EcR interacts with corepressors and harbours an autonomous silencing domain functional in both *Drosophila* and vertebrate cells. *J. Steroid Biochem. Biol.* **68**, 163-169

Thummel CS (1995)

From embryogenesis to metamorphosis: the regulation and function of *Drosophila* nuclear receptor superfamily members. *Cell* **83**, 871-877

Torchia J, Glass CK, Rosenfeld KG (1998)

Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional response. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 373-383

Tsai MJ, O'Malley (1994)

Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 451-486

Tsai CC, Kao HY, Yao TP, McKeown M, Evans RM (1999) SMRTER, a *Drosophila* nuclear receptor coregulator, reveals that EcR-mediated repression is critical for development. *Mol. Cell* **4**, 175-186

Turberg A, Spindler-Barth M, Lutz B, Lezzi M, Spindler KD (1988) Presence of an ecdysteroid-specific binding protein ("receptor") in epithelial tissue culture cells of *Chironomus tentans. J. Insect Physiol.* **8**, 797-803

Turberg A, Spindler KD (1992)

Properties of nuclear and cytosolic ecdysteroid receptors from an epithelial cell line from *Chironomus tentans. J. Insect Physiol.* **38**, 82-91

Umesono K, Evans RM (1989)

Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 57, 1139-1146

Vivat V, Zechel C, Wurtz JM, Bourguet W, Kagechika H, Umemiya H, Shudo K, Moras D, Gronemeyer H, Chambon P (1997) A mutation mimicking ligand-induced conformational change yields a constitutive RXR that senses allosteric effects in heterodimers. *EMBO J.* **16**, 5697-5709

Vögtli M, Elke C, Imhof MO, Lezzi M (1998) High level transactivation by the ecdysone receptor complex at the core recognition motif. *Nucleic Acids Res.* **26**, 2407-2414

Vögtli M, Imhof MO, Brown NE, Rauch P, Spindler-Barth M, Lezzi M, Henrich VC (1999)

Functional characterization of two *Ultraspiracle* forms (CtUSP-1 and CtUSP-2) from *Chironomus tentans. Insect Biochem. Molec. Biol.* **29**, 931-942

Wagner RL, Apriletti JW, McGrath ME, West BL, Baxter JD, Fletterick RJ (1995) A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature* **378**, 690-697

Wang SF, Ayer S, Segraves WA, Williams DR, Raikhel AS (2000) Molecular Determinants of Differential Ligand Sensitivities of Insect Ecdysteroid Receptors. *Mol. Cell. Biol.* 20, 3870-3879

Watkinson IA, Clarke BS (1973)

The insect moulting hormone system as a possible site for insecticidal action. *PANS* **14**, 488-506

Wegmann IS, Quack S, Spindler KD, Dorsch Häsler K, Vögtli M, Lezzi M (1995) Immunological studies on the developmental and chromosomal distribution of ecdysteroid receptor protein in *Chironomus tentans. Arch. Insect Biochem. Physiol.* **30**, 95-114

Weigel NL (1996)

Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochem. J.* **319**, 657-667

Weiss RE, Xu J, Ning G, Pohlenz J, O'Malley BW, Refetoff S (1999) Mice deficient in the steroid receptor co-activator 1 (SRC-1) are resistant to thyroid hormone. *EMBO J.* 18, 1900-1904

Williams CM (1967)

The juvenile hormone II. Its role in the endocrine control of molting, pupation, and adult development in the cecropia silkworm. *Biol. Bull. Woods Hole* **121**, 572-585

Williams DR, Chen JH, Fisher MJ, Rees HH (1996)

Ecdysteroid inactivation in response to elevated levels of 20-hydroxyecdysone or an agonist, RH 5849 in the tobacco hornworm, *Manduca sexta. Biochem. Soc. Trans.* 24, 438-438

Williams DR, Chen JH, Fisher MJ, Rees HH (1997)

Induction of enzymes involved in molting hormone (ecdysteroid) inactivation by ecdysteroids and an agonist, 1,2-dibenzoyl-1-tert-butylhydrazine (RH 5849). *J. Biol. Chem.* **272**, 8427-8432

Williamson MS, Martinez-Torres D, Hick CA, Devonshire AL (1996) Identifications of mutations in the housefly *para*-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides. *Mol. Gen. Genet.* **252**, 51-60

Wing KD, Slawecki RA, Carlson GR (1988)

RH 5849, a nonsteroidal ecdysone agonist: effects on larval lepidoptera. *Science* **241**,470-472

Wing KD, Aller HE (1990)

Ecdysteroid agonists as novel insect growth regulators. In: Casida JT (ed.), Pesticides and alternatives: Innovative chemical and biological approaches to pest control. Elsevier Amsterdam 251-257.

Wittliff JL, Wenz LL, Dong J, Nawaz Z, Butt TR (1990)

Expression and characterization of an active human estrogen receptor as a ubiquitin fusion protein from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **265**, 22016-22022

Wolffe AP (1997)

Transcriptional control. Sinful repression. Nature 387, 17-17

Wurtz JM, Bourguet W, Renaud JP, Vivat V, Chambon P, Moras D, Gronemeyer H (1996)

A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nature Struct. Biol.* **3**, 87-94

Wurtz JM, Egner U, Henrich N, Moras D, Mueller-Fahrnow A (1998) Three-Dimensional Models of Estrogen Receptor Ligand Binding Domain Complexes,

Based on Related Crystal Structures and Mutational and Structure-Activity Relationship Data. J. Med. Chem. 41, 1803-1814

Wurtz JM, Guillot B, Fagart J, Moras D, Schindler M (2000) A new model for 20-hydroxyecdysone and dibenzoylhydrazine binding: a homology modeling and docking approach. *Protein Sci.* **9**, 1073-1084

Wyss C (1982)

Čhironomus tentans epithelial cell lines sensitive to ecdysteroids, juvenile hormone, insulin and heat shock. *Exp. Cell Res.* **139**, 309-319

Yao TP, Forman BM, Jiang Z, Cherbas L, Chen JD, McKeown M, Cherbas P, Evans RM (1993)

Functional ecdysone receptor is the product of EcR and *ultraspiracle* genes. *Nature* **366**, 476-479

Yu SJ (1996)

Insect glutathione S-transferases. Zool. Stud. 35, 9-19

Yund MA (1979)

Specific Binding of 20-Hydroxyecdysone to nuclei of imaginal discs of *Drosophila* melanogaster. Mol. Cell. Endocrinol. 14, 19-35

Zanaria E, Muscatelli F, Bardoni B, Strom TM, Guioli S, Guo W, Lalli E, Moser C, Walker AP, McCabe ERB, Meitinger T, Monaco AP, Sassone-Corsi P, Camerino G (1994)

An unusual member of the nuclear receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature* **372**, 635-641

Zelhof AC, Yao TP, Evans RM, Mc Keown M (1995)

Identification and characterization of a *Drosophila* nuclear receptor with the ability to inhibit the ecdysone response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 10477-10481

Zöllner A (2000)

Charakterisierung von resistenten Subklonen der epithelialen Zell-Linie von *Chironomus tentans* (Insecta, Diptera). Staatsexamensarbeit, Universität Ulm



Abb. 46: Strukturformeln einiger Ecdysteroide (Häutungshormone) bzw. nicht-steroidaler Ecdysteroid-Agonisten (Insektizide).

Danksagung

Frau Prof. Dr. Spindler-Barth danke ich für die Vergabe des Themas, für die engagierte Betreuung und für die stetige Bereitschaft zu ausgiebigen und hilfreichen Diskussionen, für die sie sich immer sofort zur Verfügung gestellt hat.

Herrn Prof. Dr. Ernst danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Ich möchte mich bei allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Hormon- und Entwicklungsphysiologie bzw. des Instituts für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere für gute Zusammenarbeit und für ihre Hilfsbereitschaft bedanken, wann immer es nötig war.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Spindler und allen weiteren Mitarbeitern der Abteilung Allgemeine Zoologie und Endokrinologie der Universität Ulm für ihre Hilfsbereitschaft während meiner dortigen Laboraufenthalte.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Lezzi, der mir verschiedene Plasmide zur Transformation von Bakterien und Hefen zur Verfügung gestellt hat, ohne die ein Grossteil dieser Arbeit nicht hätte verwirklicht werden können.

Frau Prof. Dr. Kahl danke ich für ihr Engagement als Sprecherin des Graduiertenkollegs "Toxikologie und Umwelthygiene".

Ein spezieller Dank gilt auch Herrn Dipl. Biol. Peter Ehrhardt, eine feste Instanz beim Besuch der Mensa.

In alter Tradition auch einen Dank an meine Korrekturleserin Uschi Grebe.

Auch meine Eltern, bei denen ich oft Unterstützung fand, sollen an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben.

Zum Abschluss möchte ich mich bei meinen Kindern Mera und Lucas bedanken. Weniger für ihre "wissenschaftliche Unterstützung", sondern vielmehr dafür, dass sie sich zu Menschen entwickeln, wie man sie sich als Vater anders nicht wünschen kann. Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Diese Arbeit wurde weder in dieser noch in ähnlicher Form bei einer anderen Institution vorgelegt.

Ulm, den

Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name:	Marco Grebe
Anschrift:	Johannisstr. 9 89321 Neu-Ulm
Geburtsdatum und -Ort:	06.04.1966 in Hilden
Familienstand:	verheiratet seit 1992
Kinder:	Lucas Paul, geb. Januar 1996 Mera Paulina, geb. Juni 1997
Schulbildung:	
8/72 - 8/76	Wilhelm-Hüls-Grundschule in Hilden
8/76 - 11/78	Städt. Helmholtz-Gymnasium in Hilden
11/78 - 6/85	Städt. Gymnasium in Dormagen Abschluss: Hochschulreife (Abitur)
Wehrersatzdienst:	
10/85 - 6/87	Zivildienst in den gemeinnützigen Behinderten- werkstätten in Neuss
Berufsbildung/Studium:	
8/87 - 6/90	Berufsausbildung zum Kfz-Mechaniker bei VAG Kilian in Neuss (Gesellenabschluss)
ab 10/90	Studium des Maschinenbaus an der Fachhochschule in Düsseldorf (anschl. Studienfachwechsel)
10/91 – 4/96	Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf
5/96 – 5/97	Diplomarbeit in Rahmen des Sonderforschungsbereichs 351 (Aufklärung molekularer Ursachen von Hormonresistenz, Teilprojekt A5) mit dem Thema "Charakterisierung Ecdyste- roid-resistenter Subklone der epithelialen Zellinie von <i>Chiro- nomus tentans</i> " an der HHU in Düsseldorf
seit 5/97	Doktorarbeit mit dem Thema "Der Ecdysteroidrezeptor als Target für arthropodenspezifische Insektizide" gefördert durch ein Stipendium im Rahmen des Graduiertenkollegs "Toxikologie und Umwelthygiene" im Institut für Entwick-
	lungs- und Molekularbiologie der Tiere der Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf