

*Drosophila melanogaster* jest uznawana za organizm modelowy w badaniach mających na celu zrozumienie genetycznych i molekularnych podstaw rozwoju organizmu - od pojedynczej komórki do dojrzałej postaci wielokomórkowej. Wiąże się to z faktem, iż większość podstawowych mechanizmów kontrolujących rozwój, zostało zachowanych w trakcie ewolucji. Dlatego też wiele genów kluczowych dla rozwoju *D. melanogaster*, posiada odpowiedniki u człowieka, w tym 75% genów odpowiedzialnych za choroby. Warto podkreślić, że dotychczasowe badania prowadzone na *D. melanogaster* przyczyniły się do kluczowych osiągnięć w biologii i medycynie. Dobrym przykładem jest wyjaśnienie mechanizmu molekularnego kontroli rytmu dobowego, uhonorowane Nagrodą Nobla (2017). Badania podstawowych mechanizmów zaangażowanych w regulację rozwoju *D. melanogaster* z pewnością przyczynią się do kolejnych odkryć, co podkreśla znaczenie projektu dla rozwoju nauki i medycyny.

Rozwój owadów kontrolowany jest przez skoordynowane działanie dwóch hormonów: 20-hydroksyekdyzonu (20E) i hormonu juwenilnego (JH). Receptor i sposób działania 20E są dobrze poznane, wiele lat trwały natomiast poszukiwania receptora JH. W 2011 roku wykazano, że jest nim białko *Methoprene tolerant* (Met). Met pośredniczy w działaniu JH, zapobiegając przedwczesnemu przeobrażeniu *D. melanogaster* w trakcie rozwoju. Pomimo istotnej zależności pomiędzy możliwością pełnienia przez białko specyficznej funkcji, a jego właściwościami molekularnymi, w literaturze brak jest doniesień o badaniach strukturalnych nad Met. Dlatego postanowiliśmy podjąć się analizy tego tematu. Dla większości badanych gatunków owadów, delecja genu *met* jest śmiertelna. Co ciekawe, u *D. melanogaster* występuje białko homologiczne, *Germ cell-expressed* (Gce), zapewniające przeżywalność mutantów pozbawionych Met. Jak wykazano, funkcje Met i Gce nie są tożsame, a białka wykazują specyficzność tkankową. Fakt ten wydał nam się na tyle interesujący, że postanowiliśmy włączyć Gce do planu naszych badań.

Analizy bioinformatyczne przyporządkowują Met i Gce do rodziny czynników transkrypcyjnych bHLH-PAS (*ang. basic helix-loop-helix/Per-Arnt-Sim*), charakteryzujących się występowaniem trzech wysoce zachowanych w toku ewolucji domen, bHLH, PAS-A i PAS-B. Podobieństwo struktury pierwszorzędowej Met i Gce ogranicza się do tych domen, natomiast ich długie fragmenty C-końcowe (MetC, GceC) wykazują znaczące różnice. Fakt ten wydał się nam szczególnie istotny, gdyż C-końcowym fragmentom czynników bHLH-PAS przypisuje się kluczową rolę w regulacji aktywności tych białek oraz ich kompleksów. Warto podkreślić, że w literaturze brak jest informacji dotyczących struktury białek bHLH-PAS (poza naszą publikacją dotyczącą MetC [Kolonko *et al.*, Plos One 2016]), a tym bardziej zależności pomiędzy ich strukturą a funkcją. Dlatego też, postanowiliśmy skupić się na analizie molekularnych właściwości C-końcowych fragmentów Met i Gce.

Wyniki analiz *in silico* wskazują, iż MetC i GceC posiadają najprawdopodobniej cechy inherentnie nieuporządkowanych regionów (IDR, *ang. intrinsically disordered regions*). W ostatnim czasie białka inherentnie nieuporządkowane (IDPs, *ang. intrinsically disordered proteins*) i IDRs, jako pozbawione stabilnej struktury trzeciorzędowej, ale jednocześnie w pełni funkcjonalne, budzą ogromne zainteresowanie naukowców. Labilność i zdolność do przyjmowania wielu odmiennych stanów konformacyjnych, pozwala IDPs i IDRs na pełnienie roli niezwykle czułych elementów w procesie rozpoznawania molekularnego oraz na oddziaływanie z różnorodnymi partnerami białkowymi.

Główna hipoteza badawcza projektu opiera się na założeniu, że różnice strukturalne, występujące pomiędzy C-końcowymi fragmentami białek Met i Gce, są kluczowe dla zróżnicowania ich funkcji i lokalizacji komórkowej w czasie dojrzewania *D. melanogaster*. Celem naszych badań jest analiza strukturalna fragmentów MetC i GceC, oraz porównanie uzyskanych wyników. Ponadto zamierzamy zbadać zdolność obu białek do oddziaływania z potencjalnymi partnerami (receptorem jądrowym FTZ-F1 i białkiem regulatorowym 14-3-3). Interakcje te, prawdopodobnie w znacznym stopniu wpływają na strukturę MetC i GceC, definiując ich lokalizację komórkową i aktywność.

Planowane badania przyczynią się do lepszego zrozumienia molekularnych uwarunkowań aktywności C-końcowych fragmentów Met i Gce. Poznanie charakterystyki obu regionów (MetC i GceC) jako IDR i ich porównanie, pozwoli na zdefiniowanie różnic, które mogą indywidualizować specyficzne funkcje tych pokrewnych czynników transkrypcji. Wyniki badań w znacznym stopniu wzbogacą wiedzę w zakresie zależności struktura-funkcja a także działania i regulacji białek IDR.

Potwierdzenie hipotezy badawczej, wymaga realizacji kolejnych etapów. Pierwszym z nich jest otrzymanie homogenych preparatów MetC i GceC. Kolejne badania mają na celu opisanie właściwości strukturalnych na podstawie analiz hydrodynamicznych (SEC, AUC), analiz nieuporządkowania (CD) i modelowania struktury (SAXS, NMR). Wyniki uzyskane dla obu białek zostaną porównane, a wszystkie podobieństwa i różnice dogłębnie przeanalizowane. Kolejny etap badań obejmuje analizę molekularnych uwarunkowań interakcji MetC i GceC z potencjalnymi partnerami białkowymi: FTZ-F1 i 14-3-3 (SEC, AUC, NMR). Uzyskane wyniki umożliwią powiązanie różnic w strukturze i zdolności do oddziaływania, z różnicą w funkcji białek Met i Gce.