KOSMOS
PROBLEMY NAUK BIOLOGICZNYCH

Tom 71 2022
Numer 3 (336)
Strony 225-242

Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika

MARTA KOLONKO-ADAMSKA, MAREK ORŁOWSKI, BEATA GREB-MARKIEWICZ

Laboratorium Biochemii i Biologii Molekularnej
Katedra Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Wydział Chemiczny
Politechnika Wrocławska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław
E-mail: beata.greb-markiewicz@pwr.edu.pl
marek.orlowski@pwr.edu.pl

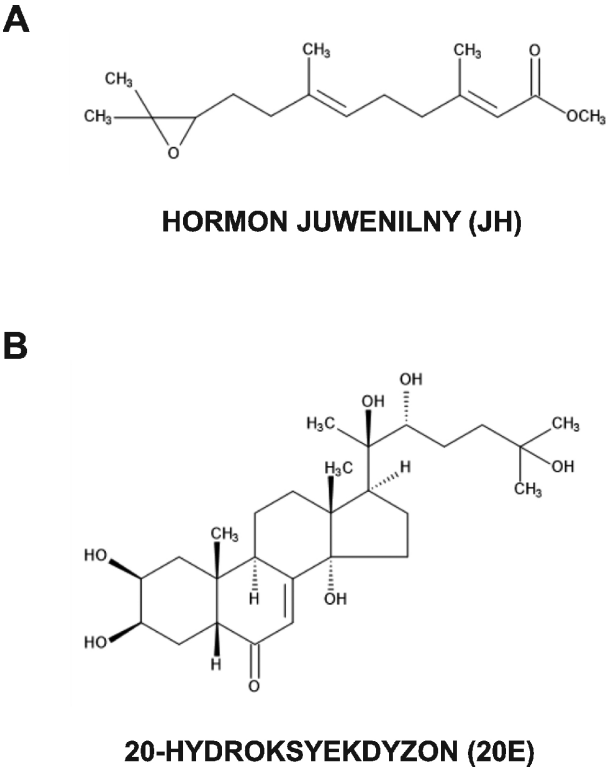
ROLA KLUCZOWYCH HORMONÓW I ICH RECEPTORÓW W ROZWOJU OWADÓW NA PRZYKŁADZIE *Drosophila melanogaster* I *Aedes aegypti*

WPROWADZENIE

Organizmy wielokomórkowe wymagają zorganizowanej komunikacji między poszczególnymi komórkami, aby właściwie zorganizować plan budowy całego organizmu i utrzymać jego prawidłowe funkcjonowanie w ciągu całego życia. Wzrost komórek organizmów eukariotycznych, ich różnicowanie się, organizacja w odpowiednie tkanki i organy, specyficzne odpowiedzi na zmiany środowiska zewnętrznego oraz inne ważne funkcje, często decydujące o życiu lub śmierci całego organizmu, są koordynowane i modulowane przez cząsteczki sygnałowe. Znacząca część informacji umożliwiającej funkcjonowanie organizmu, zakodowana jest w specyficzny sposób w genach. W regulacji ekspresji genów biorą udział czynniki transkrypcyjne, które odbierają sygnał i przekazują go dalej poprzez aktywację transkrypcji odpowiednich genów. Bardzo często, szczególnie podczas rozwoju organizmu, cząsteczkami sygnałowymi są hormony, dlatego rozumienie mechanizmów sygnalizacji hormonalnej i zależnej od niej ekspresji informacji genetycznej jest bardzo ważne. Warto zauważyć, że bez żmudnych eksperymentów naukowych przeprowadzonych na organizmach takich jak *Drosophila melanogaster* czy *Aedes aegypti* nie byłoby możliwe poznanie i zrozumienie kontroli hormonalnej u człowieka. *Drosophila melanogaster* jest dość powszechnie wykorzystywanym organizmem modelowym ze względu na łatwość hodowli, dostępność dobrze opracowanych metodologii i brak przeciwwskazań etycznych. Szczególnie korzystne jest wykorzystywanie tego organizmu w badaniach mających na celu wyjaśnienie molekularnych i genetycznych podstaw przekazywania sygnałów w organizmach wielokomórkowych, w tym sposobu, w jaki geny wpływają na rozwój zarodka od pojedynczej komórki do dojrzałego organizmu (JENNINGS 2011). Ze względu na wysoki stopień złożoności hormonalnych szlaków przekazywania sygnałów u kręgowców, *D. melanogaster*, u której dwa główne hormony: 20-hydroksyekdyzon (20E) i hormon juwenilny (JH) (Ryc. 1A) regulują rozwój, reprodukcję i większość istotnych procesów biologicznych, jest bardzo dobrym organizmem modelowym do prowadzenia badań wstępnych (DUBROVSKY 2005, GRUNTENKO i współaut. 2010).

Obecny w hemolimfie *D. melanogaster* 20E jest związkiem steroidowym (Ryc. 1B). Co istotne, inne związki steroidowe o podobnej budowie występują także u innych zwierząt i człowieka pełniąc rolę hormonów. U owadów pod kontrolą 20E znajduje się wiele biochemicznych i fizjologicznych procesów związanych z linieniem, wzrostem, morfogenezą czy metamorfozą (BECKSTEAD i współaut. 2005). Z uwagi na to, że 20E nie działa na organizm człowieka, związki te mogą znaleźć zastosowanie w terapiach genowych i agrochemii, m.in. do kontroli populacji owadów. Z tego powodu poznanie molekularnych podstaw działania funkcjonalnego receptora 20E może przyczynić się do zaprojektowania czynników transkrypcyjnych wiążących specyficzne sekwencje DNA i zdolnych do modulowania

Słowa kluczowe: EcR/Usp, Gce, 20-hydroksyekdyzon, hormon juwenilny, Met



Ryc. 1. Główne hormony owadów: (A) hormon juwenilny III (JH) i (B) 20-hydroksyekdyzon (20E) (MORGAN i WILSON 1999)

ekspresji genów będących pod kontrolą 20E oraz innych ekdysteroidów (PALLI i współaut. 2005). Kontrola populacji owadów, w szczególności komarów, które są wektorami takich chorób jak malaria (RAGHAVENDRA i współaut. 2011), gorączka Zika czy denga (GUZMAN i współaut. 2010), może przyczynić się do stworzenia nowych, innowacyjnych i skutecznych strategii ich zwalczania.

JH jest związkiem seskwiterpenowym (pochodną kwasu dodekadienowego) i jest wydzielany przez ciała przyległe (łac. *corpora allata*), związane z układem nerwowym. Co istotne, jego występowanie jest cechą charakterystyczną owadów (DUBROVSKY 2005). Podczas rozwoju JH odpowiada za blokowanie przedwczesnej metamorfozy. Natomiast u postaci dorosłej owada, JH reguluje diapauzę, produkcję feromonów i wpływa na zachowanie owadów, szczególnie w okresie godowym. Dodatkowo, jest też odpowiedzialny m.in. za zdolność uczenia się, rozwój pamięci i odporność (FLATT i współaut. 2005). W ciągu ostatnich 20 lat zidentyfikowano kilka czynników biorących udział w regulacji biosyntezy JH: insulinę, ekdysteroidy, aminy biogenne, miRNAs, Dpp (ang. decapentaplegic), ETH (ang. ecdysis--triggering hormone) i SP (ang. sex peptide) (ZHANG i współaut. 2022).

20E I JH W KONTROLI ROZWOJU OWADÓW

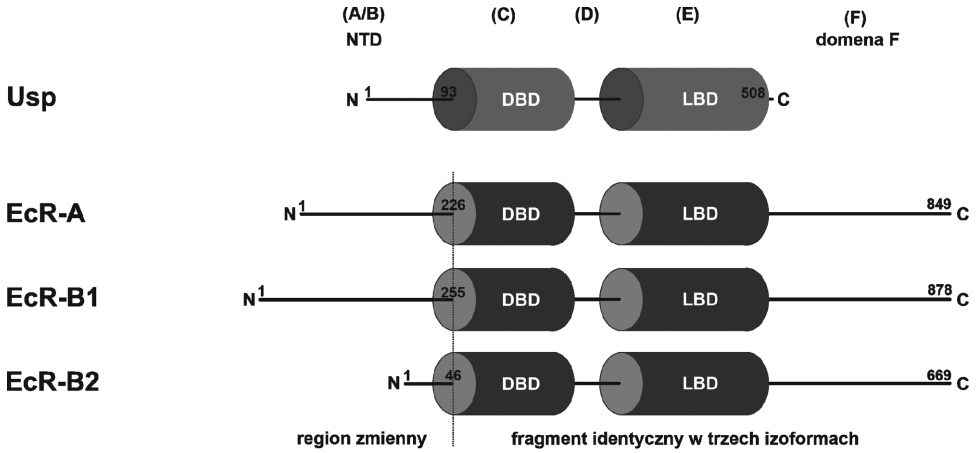
Precyzyjne oddziaływanie i równowaga pomiędzy szlakami przekazywania sygnału 20E i JH wyznaczają poszczególne etapy rozwoju *D. melanogaster*. Obecność wysokiego stężenia JH pomiędzy linieniami zapewnia morfostazę (tzw. *status quo*), czyli wzrost i podział komórek bez ich różnicowania, co powoduje pozostanie w stadium larwalnym owada (RIDDIFORD 2012). JH działa poprzez hamowanie transkrypcji genów indukowanych obecnością 20E. Z drugiej strony, spadek stężenia JH umożliwia działanie 20E i przejście do kolejnych etapów linienia, czyli stadiów larwalnych (DUBROVSKY 2005). Podczas ostatniego stadium larwalnego następuje znaczny spadek stężenia JH w hemolimfie i zachodzi zależne od 20E przejście do etapu poczwarki i metamorfozy. Działania anty-metamorficzne JH, prowadzące do przedłużenia stadiów larwalnych aż do momentu osiągnięcia odpowiednich rozmiarów ciała owada, zaobserwowano m. in. u *Bombyx mori*. Brak JH powoduje śmiertelność owadów, które przedwcześnie uległy przepoczwarzeniu (RIDDIFORD 2008), natomiast obecność dodatkowo wprowadzonego JH, podczas badań na *Tribolium castaneum*, powodowała opóźnienie metamorfozy poprzez wystąpienie dodatkowych stadiów larwalnych (KOZLOVA i THUMMEL 2000, BAKER i współaut. 2003).

Sposób działania 20E został dość dobrze poznany i opisany. 20E jest hormonem regulującym linienie, metamorfozę, reprodukcję i wiele innych procesów rozwojowych u owadów i innych stawonogów (PALLI i współaut. 2005). Odpowiada on zarówno za apoptozę tkanek larwalnych (JIANG i współaut. 2000), jak i za wykształcenie i różnicowanie tkanek owada dorosłego. Receptorem 20E jest heterodimer receptorów jądrowych, EcR (ang. ecdysone Receptor) i Usp (ang. ultraspiracle protein) (YAO i współaut. 1993), kontrolujący transkrypcję genów tzw. wczesnej odpowiedzi. Kodowane przez te geny białka nie tylko przekazują odebrany sygnał hormonalny, ale dodatkowo go wzmacniają, prowadząc do ekspresji genów późnej odpowiedzi, w tym białek efektorowych, które inicjują linienie i metamorfozę. Hamowanie ekspresji białek fazy wczesnej następuje w wyniku sprzężenia zwrotnego (RIDDIFORD 2008). Jednym z genów pełniących istotną rolę, szczególnie w zakresie łączenia sygnałów szlaków 20E i JH, jest *broad* (*br*), którego ekspresja jest bezpośrednio indukowana przez wiązanie 20E do dimeru EcR/Usp (ABDOU i współaut. 2011). Odpowiedź komórkowa na 20E jest specyficzna, a także zależna od stadium rozwojowego. Nagły wzrost stężenia (impuls) 20E pojawia się w różnym czasie i reguluje pro-

liferację komórek, różnicowanie i ich śmierć w sposób kontrolowany czasowo i przestrzennie (TRUMAN i RIDDIFORD 2002). Na przykład, impuls 20E pod koniec stadium larwalnego sygnalizuje powstawanie poczwarki i histolizę jelita środkowego larwy, natomiast drugi impuls 12 godzin później inicjuje wywrócenie głowy i histolizę gruczołów ślinowych larw. Te wydarzenia są kontrolowane przez komórki progenitorowe, dające początek dorosłym tkankom (RIDDIFORD 1993, THUMMEL 1996, BAEHRECKE 2002). W przypadku nieobecności 20E, następuje zatrzymanie rozwoju owada w stadium larwalnym i jego śmierć (BIALECKI i współaut. 2002).

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA BIAŁEK EcR I Usp TWORZĄCYCH FUNKCJONALNY RECEPTOR EKDYSTEROIDOWY U *D. melanogaster* ORAZ ICH ODDZIAŁYWANIE Z DNA

Obecnie znane są trzy izoformy białka EcR u *D. melanogaster*: EcR-A, B1 i B2 (YAO i współaut. 1993) (Ryc. 2). Izoformy te wykazują bardzo wysoką homologię w domenie wiążącej DNA i domenie wiążącej ligand, ale różnią się sekwencją aminokwasową na końcach N. Ich dystrybucja zależy od etapu rozwoju i rodzaju tkanek. Oznacza to, że domeny końców N są odpowiedzialne za tkankowo-specyficzną odpowiedź na 20E i ich działanie jest różne w zależności od etapów rozwoju owada (TALBOT i współaut. 1993, BENDER i współaut. 1997, DAVIS i współaut. 2005). Przykładowo, dwie izoformy (EcR-A i EcR-B1) ulegają ekspresji w różnych stadiach rozwojowych larwy i tkankach dorosłego osobnika, wykazując specyficzność tkankową zależną od 20E (TALBOT i współaut. 1993, BENDER i współaut. 1997). Poziom syntezy poszczególnych izoform EcR jest w odmienny sposób regulowany w zależności od przeznaczenia w procesie rozwoju struktur tkanek larwalnych lub osobnika dorosłego (TRUMAN i współaut. 1994). Izoforma EcR-B1 ulega ekspresji głównie w tkankach przeznaczonych do programowanej śmierci, podczas gdy izoforma EcR-A ulega ekspresji w tkankach różnicujących się w odpowiedzi na 20E (TALBOT i współaut. 1993, YAO i współaut. 1993). Sugeruje się, że różne funkcje izoform receptora są regulowane oddzielnie, np. poprzez interakcję z komodulatorami transkrypcji lub modyfikacje potranskrypcyjne (BRAUN i współaut. 2009). W larwalnych gruczołach ślinowych i jelicie środkowym 20E kontroluje ekspresję kilku czynników transkrypcyjnych, które z kolei regulują kilka wtórnych genów odpowiedzi (JIANG i współaut. 1997). Pokazano, że aktywny heterodimer EcR/Usp i indukowane 20E czynniki transkrypcyjne takie jak: FTZ-F1, BR-C, E74, E75 i E93, odgrywają ważną rolę w śmierci komórek w gruczole ślinowym i w jelicie środkowym larwy (JIANG i współaut. 2000, CAKOUROS i współaut. 2002). Ponadto, 20E indukuje ekspresję niezbędnej dla śmierci określonych komórek kaspazy DRONC (HAWKINS i współaut. 2000, MEIER i współaut. 2000, QUINN i współaut. 2000, DORSTYN i współaut. 2002, CAKOUROS i współaut 2004).



Ryc. 2. Schemat ogólnej budowy białka Usp i izoform EcR u *D. melanogaster*.
Oba receptory wykazują charakterystyczną dla przedstawicieli nadrodziny NRs budowę. Wyróżnia się pięć regionów (A/B, C, D, E i F), które tworzą określone funkcjonalne domeny. Usp i EcR zbudowane są z domeny końca N (NTD), domeny wiążącej DNA (DBD), regionu zawiasowego D, domeny wiążącej ligand (LBD) oraz w przypadku wszystkich trzech izoform EcR długiego regionu F. Region F (zwany często domeną) występuje tylko u niektórych przedstawicieli nadrodziny NRs. Domeny NTD, podobnie jak domeny F, różnią się długością i składem aminokwasowym. Poza sekwencjami NTDs, wszystkie trzy izoformy EcR posiadają identyczny skład aminokwasowy. Przedstawione schematycznie regiony nie zostały szczegółowo wyskalowane (ORO i współaut. 1990, TALBOT i współaut. 1993, YAO i współaut. 1993).

Każda z izoform EcR jest zdolna do tworzenia heterodimeru z białkiem Usp, homologiem receptora kwasu 9-*cis*-retinowego (RXR) kręgowców (ORO i współaut. 1990). Chociaż EcR może samodzielnie wiązać 20E, wiązanie to jest silnie stymulowane w obecności Usp (CHRISTOPHERSON i współaut. 1992, YAO i współaut. 1993). Wiązanie ligandu stabilizuje heterodimer EcR/Usp i zwiększa jego powinowactwo do elementów odpowiedzi na 20E (ang. ecdysone response elements, EcREs), które zwykle zlokalizowane są w regionach promotorowych odpowiednich genów będących pod kontrolą 20E (HENRICH 2005, PALLI I współaut. 2005). Najbardziej znanymi naturalnymi EcREs są elementy stanowiące niedoskonałe palindromy z odstępnikiem o długości 1 pary zasad (RIDDIHOUGH i PELHAM 1987, CHERBAS i współaut. 1991, ANTONIEWSKI i współaut. 1994). Jednak EcR/Usp może wiązać się też do elementów zorganizowanych w formie bezpośrednich powtórzeń (PAOLO D'AVINO i współaut. 1995, ANTONIEWSKI i współaut. 1996). Najlepiej do tej pory scharakteryzowanym jest pseudopalindromowy element z promotora genu białka szoku cieplnego 27 (hsp27pal), który składa się z dwóch heptamerycznych sekwencji pół-miejsc oddzielonych jedną centralną parą zasad (RIDDIHOUGH i PELHAM 1987, OŻYHAR i współaut. 1991). W przeciwieństwie do elementów palindromowych kręgowców, palindromowe EcRE są zwykle bardzo zdegenerowane, dlatego mogą być rozważane jako elementy wysoce asymetryczne (NIEDZIELA-MAJKA i współaut. 2000). Wiązanie wszystkich trzech izoform EcR do hsp27pal jest znacząco wzmacniane obecnością hormonu (BRAUN i współaut. 2009). Przeprowadzone analizy oddziaływań oczyszczonych domen wiążących DNA (ang. DNA-binding domain, DBD) białek EcR i Usp u *D. melanogaster* (NIEDZIELA-MAJKA i współaut. 2000) z hsp27pal pokazały, że rekombinowane DBD wykazywały różne preferencje w stosunku do półmiejsc hsp27pal. Półmiejsce 5'-końcowe wykazywało wyraźnie wyższe powinowactwo do obu DBD niż półmiejsce 3'-końcowe (NIEDZIELA-MAJKA i współaut. 2000). Uzyskane rezultaty dostarczyły dowodów, że UspDBD może funkcjonować jako specyficzna „kotwica", która preferencyjnie wiąże 5'-końcowy fragment hsp27pal i w konsekwencji lokalizuje heterokompleks EcR/Usp w zdefiniowanej orientacji na hsp27pal. Zgodnie z zaproponowanym modelem, heterokompleks EcR/Usp wykazuje „polarność" w stosunku do półmiejsc hsp27pal: UspDBD zajmuje półmiejsce 5'-końcowe, a EcRDBD 3'-końcowe (5'-UspDBD/EcRDBD-3') (NIEDZIELA-MAJKA i współaut. 2000). Badania biochemiczne i biofizyczne ujawniły, że w oddziaływaniach UspDBD/EcRDBD z hsp27pal kluczową rolę odgrywa C-końcowe wydłużenie EcRDBD (NIEDZIELA-MAJKA i współaut. 2000, ORŁOWSKI i współaut. 2004), co potwierdziła analiza struktury krystalicznej kompleksu UspDBD/EcRDBD/hsp27pal (JAKÓB i współaut. 2007, ORŁOWSKI i współaut. 2015). Co więcej, izolowany EcRDBD przejawia częściową charakterystykę białek o wewnętrznie nieuporządkowanej strukturze (ang. intrinsically disordered proteins, IDPs) i charakteryzuje się wysoką plastycznością (ORŁOWSKI i współaut. 2004, SZAMBORSKA-GBUR i współaut. 2014). Niższa stabilność EcRDBD niż UspDBD została wyjaśniona w licznych badaniach *in vitro* i *in vivo* (SZAMBORSKA-GBUR i współaut. 2014), które wykazały, że najprawdopodobniej za mniejszą stabilność domeny odpowiedzialne są niezachowane w toku ewolucji reszty aminokwasowe w drugiej helisie DBD, będącej częścią hydrofobowego rdzenia EcRDBD. Z kolei w przypadku Usp pokazano, że rekombinowane białko pełnej długości tworzy homodimery i homotetramery w nieobecności DNA (RYMARCZYK i współaut. 2003). Pokazano również, że pozbawione domeny N białko Usp wykazuje osłabiony potencjał oligomeryzacyjny (RYMARCZYK i współaut. 2003). Eksperymenty przejściowej nadekspresji EcR i Usp w ludzkich komórkach HEK293 ujawniły, że oba białka mogą ulegać specyficznej sumoilacji (BIELSKA i współaut. 2012, SELIGA i współaut. 2013), natomiast w komórkach owadzich obecność EcR wzmacnia reakcję sumoilacji Usp, wpływając na jego poziom w komórkach *D. melanogaster* (WANG i współaut. 2014).

BUDOWA I STRUKTURA BIAŁEK EcR I Usp U *D. melanogaster*

EcR oraz Usp u *D. melanogaster* posiadają podobną budowę do większości poznanych przedstawicieli rodziny NRs. Zbudowane są one z domeny końca N (ang. N-terminal domain, NTD), domeny wiążącej DNA (DBD), regionu zawiasowego (ang. hinge region), domeny wiążącej ligand (ang. ligand binding domain, LBD) oraz dodatkowego regionu (domeny) F (Ryc. 2) (ARANDA i PASCUAL 2001, WIĘCH i współaut. 2021). Wysoce zmienna pod względem długości i sekwencji domena NTD jest odpowiedzialna za transaktywację niezależną od liganda (AF-1). Scharakteryzowane dotychczas NTDs u *D. melanogaster* (EcRB1-NTD i EcRA-NTD) wykazują cechy charakterystyczne dla białek o wewnętrznie nieuporządkowanej strukturze (ang. intrinsically disordered proteins, IDPs) (NOCULA-ŁUGOWSKA i współaut. 2009). Taka właściwość jest korzystna dla ich między- i wewnątrzcząsteczkowych interakcji, ponieważ NTD mogą przechodzić ze stanu nieuporządkowania w stan uporządkowany na skutek wiązania modulatorów transkrypcji (ko-

aktywatorów/korepresorów), oddziaływania z DNA lub potranslacyjnych modyfikacji (UVERSKY 2002, SIMONS i współaut. 2014). Za domeną NTD znajduje się wysoce zachowana w toku ewolucji domena DBD. Nieuporządkowany strukturalnie i elastyczny region zawiasowy służy jako łącznik między DBD, a ewolucyjnie zachowaną domeną LBD, która odpowiada nie tylko za wiązanie cząsteczki liganda i zależną od liganda aktywację transkrypcji (AF-2), ale także pośredniczy w homo- lub heterodimeryzacji z innymi członkami NRs. Niektóre NRs posiadają dodatkową, hiperzmienną (pod względem długości i sekwencji), C-końcową domenę F (PATEL i SKAFAR 2015, WIĘCH i współaut. 2021).

Do tej pory przeprowadzono pięć analiz struktury EcRDBD i UspDBD u *D. melanogaster* przy wykorzystaniu badań biochemicznych, biofizycznych i krystalograficznych (DEVARAKONDA i współaut. 2003, ORŁOWSKI i współaut. 2004, DOBRYSZYCKI i współaut. 2006, JAKÓB i współaut. 2007, SZAMBORSKA-GBUR i współaut. 2014). Dwie struktury krystaliczne opisują szczegółowe oddziaływania heterodimeru UspDBD/EcRDBD z DNA, jedna z wyidealizowanym sztucznym elementem IR-1 (DEVARAKONDA i współaut. 2003), a druga z naturalnym elementem hsp27pal (JAKÓB i współaut. 2007). Co ciekawe, w obu strukturach zaobserwowano istotne różnice. Chociaż ogólna struktura całych kompleksów jest podobna, to w przypadku struktury UspDBD/EcRDBD/hsp27 zauważono pozycje jedenastu dodatkowych reszt aminokwasowych, z czego kilka zaangażowanych bezpośrednio w oddziaływania z hsp27pal. Niezwykłą cechą kompleksu UspDBD/EcRDBD na hsp27 jest widoczna dodatkowa helisa w CTE EcRDBD, której pozycja w stosunku do białka i DNA jest unikatowa w całej nadrodzinie NRs (JAKÓB i współaut. 2007, ORŁOWSKI i współaut. 2015). Struktura UspDBD/EcRDBD/hsp27pal dodatkowo potwierdziła wcześniejsze badania biochemiczne i biofizyczne, które ujawniły znaczenie kluczowych reszt i segmentów z UspDBD i EcRDBD, zaangażowanych w specyficzne rozpoznawanie naturalnego hsp27pal (NIEDZIELA-MAJKA i współaut. 2000, GRAD i współaut. 2001, ORŁOWSKI i współaut. 2004). Przeprowadzone analizy wiązania się obu domen do hsp27pal przy wykorzystaniu technik fluorescencyjnych pokazały, że UspDBD i heterodimer UspDBD/EcRDBD indukują zgięcie elementu hsp27pal (DOBRYSZYCKI i współaut. 2006). Co więcej, wiązanie hsp27pal wywołuje zmiany konformacyjne w obu domenach DBD (PAKUŁA i współaut. 2012).

Dotychczas opisano wiele struktur krystalograficznych dla domen LBD heterodimerów EcR/Usp pochodzących z wielu organizmów, takich jak np. ćmy *Heliothis virescens* (BILLAS i współaut. 2003), mączlik *Bemisia tabaci*, (CARMICHAEL i współaut. 2005) czy chrząszcz *Tribolium castaneum* (IWEMA i współaut. 2007), w kompleksie z ekdysteroidem Ponasteronem A (analog 20E). Opisano również strukturę heterodimeru UspLBD/EcRLBD w kompleksie z 20E z *H. virescens* (BROWNING i współaut. 2007). Ogólna architektura heterodimerów jest bardzo podobna, a każda podjednostka LBD wykazuje, zgodnie z przewidywaniami, fałdowanie LBD charakterystyczne dla kanonicznego receptora jądrowego (szczegóły w (BILLAS i MORAS 2005). Struktura krystaliczna heterodimeru UspLBD/EcRLBD w kompleksie z Ponasteronem A oraz niesteroidowym agonistą (związkiem używanym w agrochemii pestycydów) ujawniła, że EcRLBD wykazuje zadziwiającą plastyczność (BILLAS i współaut. 2003). Cecha ta pozwala jej na dostosowanie kształtu kieszeni wiążącej ligand do struktury dwóch odmiennych związków, co oznacza, że EcRLBD posiada wysoce dynamiczną strukturę (HILL i współaut. 2013), stabilizowaną wiązaniem liganda, co pokazano dla heterodimeru UspLBD/EcRLBD, którego ekspresję przeprowadzono w drożdżach (GREB-MARKIEWICZ i współaut. 2005). Plastyczność zaobserwowana również dla EcRDBD u *D. melanogaster* (ORŁOWSKI i współaut. 2004) pozwala na stwierdzenie, że cały EcR potrafi zmieniać i dostosowywać swoją strukturę do określonych sekwencji DNA i różnych ligandów.

Struktura pełnej długości EcR i Usp u *D. melanogaster*, z DNA lub bez, nie jest jeszcze poznana. Jednak znana jest architektura heterodimeru EcR/Usp z *H. virescence* pozbawionego domen NTD z hsp27pal (MALETTA i współaut. 2014), uzyskana dzięki zastosowaniu mikroskopii krioelektronowej. Ujawniona struktura pokazała, że ogólna architektura heterodimeru związanego z DNA jest asymetryczna, pomimo quasi-symetrycznego charakteru elementu hsp27pal, co dokładnie odpowiada polarności heretodimeru UspDBD/EcRDBD u *D. melanogaster* na hsp27pal (NIEDZIELA-MAJKA i współaut. 2000). Jedyna do tej pory struktura Usp pełnej długości (bez DNA) została opisana dla Usp z *Helicoverpa armigera*, wykazując, że NTD Usp stabilizuje dimery Usp poprzez strukturę podobną do wyglądu skorpiona (ang. scorpion-like) (WYCISK i współaut. 2018).

LOKALIZACJA BIAŁEK EcR I Usp U *D. melanogaster*

Zdolność do lokalizacji i translokacji białek pomiędzy przedziałami komórkowymi ma zasadnicze znaczenie dla większości funkcji komórki. Pierwszy etap importu do jądra

komórkowego następuje, gdy system transportu rozróżnia swój ładunek (cargo) od innych białek. Białka przeznaczone do transportu z cytoplazmy do jądra często zawierają specyficzne ukierunkowanie sekwencji reszt aminokwasowych, znane „sygnałem lokalizacji jądrowej" (ang. nuclear localization signal, NLS), natomiast te, które mają zostać przetransportowane z jądra do cytoplazmy posiadają „bilet" w postaci odpowiedniej sekwencji reszt aminokwasowych tworzących „sygnał eksportu z jądra" (ang. nuclear export signal, NES) (LANGE i współaut. 2007). Transfer białek jest wysoce dynamicznym procesem, a ich chwilowa lokalizacja wynika z różnicy w sile oddziaływania poszczególnych sygnałów NLS i NES (KUMAR i współaut. 2006). Typowy NLS stanowią sekwencje bogate w zasadowe reszty aminokwasowe np. klasyczny NLS (ang. classical NLS), obejmujący sekwencję PKKKRRVE pochodzącą z dużego antygenu T SV40 (PKKKRKVE) (KALDERON i współaut. 1984) czy klasyczny dwuczęściowy sygnał nukleoplazminy (KRPATKKAGQAKKKK) (DINGWALL i współaut. 1987). Należy podkreślić, że wiele białek posiada inne NLSy, które są pochodnymi tych klasycznych i są od nich bardziej złożone, co często utrudnia ich identyfikację.

Sygnały NES wykazują większą różnorodność sekwencji, wśród których dominują szczególnie sekwencje bogate w reszty hydrofobowe (zwłaszcza reszty leucylowe) (SOROKIN i współaut. 2007). Zmiany w otoczeniu białka, oddziaływanie z partnerami, czy w przypadku różnego rodzaju receptorów wiązanie liganda, powodują zmiany strukturalne wpływające na prezentowanie lub ukrywanie poszczególnych sygnałów, co wpływa na lokalizację białka w danym momencie (KUMAR i współaut. 2006). Eksperymenty przeprowadzone na trzech liniach komórek ssaczych (COS-7, CHO-K1 i HeLa), w których nie ma endogennej ekspresji elementów funkcjonalnego receptora ekdysteroidowego u *D. melanogaster*, wykorzystując Usp w fuzji z przyłączonym na końcu N białkiem żółtej fluorescencji (ang. yellow fluorescent protein, YFP) (YFP-Usp) pokazały, że YFP-Usp promuje jądrową lokalizację receptora EcRB1, który posiadał przyłączone do końca N białko sinoniebieskiej fluorescencji (ang. cyan fluorescent protein, CFP) (CFP-EcRB1) (NIEVA i współaut. 2005). Uzyskane wyniki zasugerowały, że oba receptory posiadają aktywne sygnały NLS. Aby zbadać, które fragmenty trzech izoform EcR (EcRB1, EcRB2 i EcRA) oraz białka Usp są odpowiedzialne za ich wewnątrzkomórkową dystrybucję, przygotowano szereg mutantów delecyjnych obu receptorów. Ponownie wykorzystano te same linie komórek ssaczych. Udowodniono, że oba receptory wykazują zróżnicowaną dystrybucję sygnałów lokalizacji jądrowej i eksportu jądrowego (GWÓŹDŹ i współaut. 2007). W szczególności Usp wykazało wyłącznie lokalizację jądrową we wszystkich analizowanych typach komórek i zawiera najwyraźniej tylko jeden NLS w obrębie domeny wiążącej DNA, natomiast wszystkie trzy izoformy EcR posiadają mozaikę elementów warunkujących ich transport do jądra i z jądra do cytoplazmy (GWÓŹDŹ i współaut. 2007). Zidentyfikowano dwa aktywne sygnały NES w LBD i aktywność NLS w DBD wszystkich trzech izoform oraz przypuszczalną aktywność NLS w domenie NTD izoform EcRB1 i EcRA (GWÓŹDŹ i współaut. 2007). Analizując wpływ hormonu na wewnątrzkomórkową dystrybucję EcR udowodniono, że dodanie do komórek Muristeronu A (analog 20E) zwiększa jądrową lokalizację EcR (CRONAUER i współaut. 2007, NIEVA i współaut. 2007). Eksperymenty przeprowadzone na komórkach CHO-K1 pokazały, że w przypadku oddzielnej ekspresji Usp i EcR przy braku hormonu nie oddziałują z DNA, natomiast indukowany przez hormon wzrost translokacji EcR do jądra jest spowodowany zwiększonym wiązaniem się do DNA (CRONAUER i współaut. 2007). Dodatkowo uzyskane wyniki ujawniły, że EcR i Usp mogą wnikać do jądra komórkowego niezależnie, ale ko-transport obu receptorów za pośrednictwem dimeryzacji przez ich domeny wiążące ligand jest możliwy nawet przy braku hormonu (CRONAUER i współaut. 2007). Wykorzystując metodę komplementacji fluorescencji (ang. bimolecular fluorescence complementation, BiFC) (HU i współaut. 2002) oraz trzy ssacze linie komórkowe wykazano, że oddziaływania pomiędzy EcR i Usp ograniczają się głównie do jądra komórkowego, a kiedy ulegają ekspresji oddzielnie mogą tworzyć kompleksy niezależnie od partnera dimeryzacyjnego (DUTKO-GWÓŹDŹ i współaut. 2008). Wysoki stopień plastyczności strukturalnej umożliwia EcR tworzenie kompleksów nie tylko z Usp, ale także z innymi NR. W szczególności, EcR jest w stanie wchodzić w interakcje z receptorem DHR38 (ZOGLOWEK i współaut. 2012). Eksperymenty *in vitro* wykazały, że pełnej długości DHR38 może również tworzyć stabilne kompleksy z Usp, a tym samym konkurować z EcR w tworzeniu heterodimerów z Usp na hsp27pal (SUTHERLAND i współaut. 1995). Trzy niezależne metody: EMSA, odcisk stopy z wykorzystaniem DNAzy I i pomiary anizotropii fluorescencji, pozwoliły zaobserwować oddziaływania pomiędzy EcRDBD i DHR38DBD na hsp27pal (ZOGLOWEK i współaut. 2012). Wykorzystując trzy ssacze linie komórkowe oraz ekspresjonowane oba receptory EcR i DHR38 pełnej długości i ich fragmenty z przyłączonymi do końców N białkami YFP lub CFP pokazano, że EcR oddziałuje z DHR38 również poprzez

region zawiasowy EcR (ZOGLOWEK i współaut. 2012).

Met I Gce U *D. melanogaster* JAKO RECEPTORY HORMONU JUWENILNEGO

Mechanizm działania JH wciąż nie został do końca wyjaśniony. Co więcej, poszukiwania fizjologicznego receptora JH trwały wiele lat i dopiero dzięki analizie mutantów *D. melanogaster*, opornych na działanie analogu JH stosowanego jako insektycyd – metoprenu, wykazano, że jest nim białko Met (ang. methoprene tolerant) (WILSON i FABIAN 1986). W przypadku mutantów pozbawionych genu *met*, rozwój owadów przebiegał normalnie, występowała jedynie zmniejszona płodność (ASHOK i współaut. 1998, BERNARDO i DUBROVSKY 2012). U szczepów dzikich następowało zablokowanie prawidłowego formowania się tkanek owada. Homologi białka Met zostały zidentyfikowane we wszystkich zsekwencjonowanych genomach owadów ulegających przeobrażeniu zupełnemu, co potwierdziło istotną rolę pełnioną przez to białko w organizmie owada (GODLEWSKI i współaut. 2006). Met wykazuje właściwości charakterystyczne dla receptorów hormonów: wysokie powinowactwo do JH, ekspresję w komórkach docelowych JH oraz transkrypcję zależną od obecności JH (GODLEWSKI i współaut. 2006) i pośredniczy w działaniu hormonu, zapobiegając przedwczesnemu przeobrażeniu owada w czasie dojrzewania. Potwierdzają to badania przeprowadzone z wykorzystaniem *Tribolium castaneum*, gdzie Met aktywuje ekspresję anty-metamorficznego białka Krüppel homolog 1 (Kr-h1), a wyciszenie genu *Kr-h1* skutkuje przedwczesną metamorfozą (MINAKUCHI i współaut. 2009, KAYUKAWA i współaut. 2012).

BIAŁKO Gce JAKO HOMOLOG BIAŁKA Met

Początkowo po odkryciu białka Met pojawiły się wątpliwości, czy może ono pełnić rolę receptora JH, skoro mutanty *D. melanogaster* pozbawione funkcjonalnego genu *met* wykazywały pełną żywotność (WILSON i FABIAN 1986). Jednak późniejsze odkrycie białka Gce (ang. germ cell-expressed), będącego paralogiem Met i wykazującego częściowo tożsame funkcje z Met, pozwoliło na wyjaśnienie tej niezgodności (MOORE i współaut. 2000). Okazało się, że Gce wykazuje wysokie powinowactwo do JH i jest w stanie przynajmniej częściowo pełnić funkcje Met w czasie rozwoju owada. Z tego powodu dopiero wyciszenie/wyłączenie obu genów skutkuje śmiercią (BAUMANN i współaut. 2010a, b). Co istotne, w przeciwieństwie do *Drosophila*, u większości gatunków owadów występuje tylko jeden paralog, który w wyniku analizy filogenetycznej zaklasyfikowano jako bliższy Gce. Przebieg ewolucji obu genów w obrębie rodzaju *Drosophila* sugeruje, że białko Met pojawiło się jako produkt duplikacji genu przodka podobnego do Gce we wczesnej ewolucji wywilżnowatych (WANG i współaut. 2007). Obecnie oba paralogi *Drosophila*: Met i Gce, posiadają status receptorów JH (JINDRA i współaut. 2015).

Stwierdzone różnice funkcjonalne pomiędzy Met i Gce są interesujące: białka wykazują odmienną specyficzność tkankową ekspresji, działają w innych stadiach rozwoju i pełnią różne funkcje u osobników dorosłych. Gce warunkuje prawidłowy rozwój owada pozbawionego Met w stadium poczwarki, nie jest jednak w stanie zastąpić funkcji Met w obrębie oczu czy genitaliów (BAUMANN i współaut. 2010b). Jak pokazano, właśnie Gce jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania układu trawiennego i, w przeciwieństwie do Met, także do indukcji ekspresji receptora jądrowego E75A, pełniącego istotną rolę podczas rozwoju larwalnego i metamorfozy (DUBROVSKY i współaut. 2011). Co więcej, Gce wiąże JH z wyższym powinowactwem niż Met (CHARLES i współaut. 2011). Z kolei poziom ekspresji Met u *Drosophila* jest wyższy niż poziom ekspresji Gce. O zróżnicowaniu funkcji obu białek może też świadczyć fakt, że w przeciwieństwie do Gce, nadekspresja Met jest letalna (ABDOU i współaut. 2011).

MECHANIZM DZIAŁANIA Met I Gce

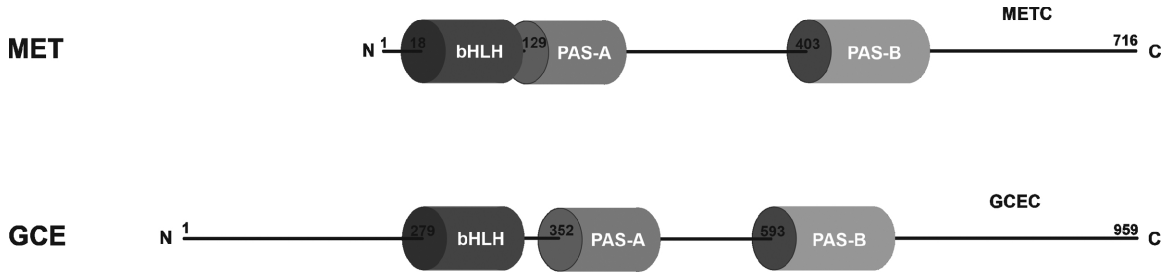
Białka Met i Gce są zdolne do tworzenia heterodimerów, a w przypadku Met – również homodimerów Met-Met (GODLEWSKI i współaut. 2006). Co ważne, zdolność Met do tworzenia homodimerów sugeruje, że Met należy do drugiej grupy czynników transkrypcyjnych bHLH-PAS. Do tej pory nie przeprowadzono żadnych badań potwierdzających zdolność Gce do tworzenia homodimerów. Wysokie stężenie JH w czasie rozwoju larwalnego prowadzi do dysocjacji dimerów. Uwolnione monomery Met i/lub Gce wiążą JH i aktywnie wpływają na transkrypcję genów zaangażowanych w rozwój larwalny (GODLEWSKI i współaut. 2006). Za wiązanie JH odpowiedzialna jest domena PAS-B, a samo oddziaływanie zapoczątkowuje zmiany konformacyjne w białku. Prezentacja NLS skutkuje translokacją Met do jądra, a ekspozycja kasety NR (ang. nuclear receptor box, nr-box), umożliwia oddziaływanie z koaktywatorami receptorów hormonów steroidowych z rodziny p160, jak np. białkiem Taiman u *Drosophila*, FISC (ang. Ftz-F1-interacting steroid receptor coactivator) u *A. aegypti*, czy SRC (ang. steroid receptor coactivator) u *Tribo-*

lium castaneum (ASHOK i współaut. 1998, BAI i współaut. 2000, LI i współaut. 2014, ZHANG i współaut. 2011). Żadne z wymienionych białek nie jest w stanie samodzielnie wiązać się do sekwencji promotorowej JHRE (ang. JH response element), występującej w genach kontrolowanych przez JH (LI i współaut. 2014). Taką zdolność posiadają dopiero po dimeryzacji z Met lub Gce – wiązanie do JHRE poprzedza ekspresję białek wczesnej odpowiedzi, jak wczesna trypsyna u *A. aegypti* (aktywowana przez JH-Met-Taiman/FISC), czy Kr-h1 u *Tribolium* (aktywowany przez JH-Met-SRC) (ZHANG i współaut. 2011). Co więcej, Kr-h1 aktywnie hamuje ekspresję białka br, a tym samym zapobiega przedwczesnemu różnicowaniu w czasie rozwoju owada (LIU i współaut. 2009), łącząc szlaki przekazywania sygnałów inicjowane przez 20E i JH. Przy obniżającym się stężeniu JH, Met i Gce ponownie dimeryzują, przez co hamowana jest aktywność białek, a tym samym ekspresja genów znajdujących się pod kontrolą JH. Jednocześnie, dzięki aktywności 20E, następuje przejście do kolejnego stadium rozwoju (GODLEWSKI i współaut. 2006). Udowodniono, że zarówno Met, jak i Gce są w stanie indukować zależną od kaspazy zaprogramowaną śmierć komórki (ang. programmed cell-death, PCD), jednak obecność JH tłumiła tę aktywność. Co ważne, PCD jest procesem niezbędnym do przebudowy ciała tłuszczowego zaangażowanego w metamorfozę larwalno-poczwarkową *Drosophila* (LIU i współaut. 2009). Tworzenie homodimerów Met/Met i heterodimerów Met/Gce można również znieść przez dodanie JH (GODLEWSKI i współaut. 2006), DUBROVSKY i współaut. (2011) pokazali, że Met i Gce mają zdolność do oddziaływania z sierocym receptorem jądrowym FTZ-F1, należącym do nadrodziny NR. Aktywacja genu *E75A*, tj. genu docelowego JH, wymaga obecności Gce, ale nie Met (DUBROVSKY i współaut. 2011). Świadczy to o poważnych różnicach funkcjonalnych obu białek i dowodzi, że Gce nie jest tylko substytutem Met, co otwiera możliwość do analizy skomplikowanych fizjologicznych funkcji specyficznych dla każdego z białek.

BUDOWA I STRUKTURA BIAŁEK Met I Gce U *D. melanogaster*

Na podstawie porównania sekwencji Met/Gce z sekwencjami białek zdeponowanych w bazach danych (ASHOK i współaut. 1998), przyporządkowano receptory JH do rodziny czynników transkrypcyjnych bHLH-PAS (ang. basic Helix-Loop-Helix/Per-ARNT-SIM), kontrolujących procesy rozwojowe i fizjologiczne u ssaków i owadów (CREWS 1998). Co ciekawe, w przeciwieństwie do innych przedstawicieli tej rodziny, do chwili obecnej nie udało się zidentyfikować homologów Met/Gce u kręgowców.

Białka bHLH-PAS wykazują wysoce zachowaną strukturę trzeciorzędową, szczególnie w N-końcowym regionie, obejmującym domeny bHLH i PAS (Ryc. 3). Pierwsza z nich charakteryzuje się obecnością dwóch -helis, oddzielonych krótką pętlą (motyw helisa-pętla-helisa, ang. helix-loop-helix). W domenie występuje region zasadowy, odpowiedzialny za oddziaływanie z DNA, poprzedzający drugi region odpowiedzialny za oddziaływanie z innymi białkami (LI i współaut. 2006). Dimery białek bHLH, w tym należące do podrodziny bHLH-PAS, rozpoznają heksamerowy konsensusowy motyw CANNTG znany jako kaseta E (ang. E-box). Środkowe nukleotydy zależą od konkretnego białka i zwykle są to GC lub CG (ANTONSSON i współaut. 1995). Domena PAS, obecna w środkowej części łańcucha białkowego, zawiera dwa strukturalnie zachowane motywy: PAS-A i PAS-B, często połączone z pojedynczym motywem PAC (ang. PAS-associated C-terminal) (PONTING i współaut. 1997, CREWS 1998). Każdy motyw PAS zbudowany jest z pięciu antyrównoległych harmonijek , otoczonych krótkimi helisami (CARD i współaut. 2005), a pomiędzy nimi wyróżniany jest łącznik o wysoce zmiennej sekwencji (KEWLEY i współaut. 2004). Region PAS-A odpowiada za selektywność wyboru partnera dimeryzacji



Ryc. 3. Schemat ogólnej budowy Met i Gce u *D. melanogaster*.
bHLH – domena wiążąca DNA, PAS-A – domena odpowiedzialna za specyficzność wiązania DNA i oddziaływanie z partnerami, PAS-B – domena wiążąca ligand (JH). Przedstawione schematycznie regiony nie zostały szczegółowo wyskalowane (ASHOK i współaut. 1998, KOLONKO i współaut. 2020).

i specyficzność aktywacji odpowiednich genów. Region PAS-B odpowiada za odbieranie endo- i egzogennych sygnałów, co wpływa na aktywność białka. C-końcowe regiony białek bHLH-PAS wykazują znaczną zmienność sekwencji aminokwasowej (Kewley i współaut. 2004) i obejmują krótkie motywy aktywujące lub hamujące transkrypcję (ang. transcription activation/repression domains, TAD/RPD) (Wu i Rastinejad 2017, Partch i Gardner 2010). Uważa się, że właśnie te regiony białek bHLH-PAS odpowiadają za specyficzną regulację funkcji białek poprzez oddziaływanie z różnymi ich partnerami (Kewley i współaut. 2004).

Wykazano, że Met i Gce należą do grupy białek zawierających tzw. regiony inherentnie nieuporządkowane (ang. intrinsically disordered regions IDRs), szczególnie dotyczy to długich C-końcowych fragmentów białek (Kolonko i współaut. 2016, 2020), które odpowiadają za aktywację transkrypcji czy odziaływanie z partnerami (Dubrovsky i współaut. 2011, Bernardo i Dubrovsky 2012). Zarówno regiony, jak i białka inherentnie nieuporządkowane budzą obecnie duże zainteresowanie wśród naukowców. Choć są pozbawione stabilnej struktury trzeciorzędowej, są w pełni funkcjonalne (Li i współaut. 1999) i powszechnie występują u organizmów eukariotycznych. Od białek globularnych odróżnia je przede wszystkim skład aminokwasowy (znacznie wzbogacony w reszty hydrofilowe i obdarzone ładunkiem, przy obniżonej zawartości reszt hydrofobowych i Cys (Theillet i współaut. 2013), co bezpośrednio przekłada się na rozluźnioną, labilną strukturę. Zwiększone odpychanie się ładunków w IDR zmniejsza „sztywność" białek, tym samym promując zaburzenia strukturalne (Uversky 2002). Uważa się, że labilność struktury pozwala IDPs/IDRs pełnić rolę niezwykle czułych elementów w procesie rozpoznawania molekularnego (Tompa 2011). Dzięki możliwości przyjmowania odmiennych stanów konformacyjnych, IDPs oddziałują z różnorodnymi partnerami i występują w węzłach szlaków przekazywania sygnałów. Co więcej, IDRs są zdolne do oddziaływania z wieloma różnymi partnerami jednocześnie, umożliwiając interakcje jeden do wielu, co promuje powstawanie kompleksów wielopodjednostkowych (Macossay-Castillo i współaut. 2019). IDR odgrywają kluczową rolę w wielu komórkowych szlakach przekazywania sygnałów i sieci interakcji białek (Wright i Dyson 2015), kontrolując szeroki zakres procesów biologicznych i rozwój różnych chorób (Zbinden i współaut. 2020, Wu i współaut. 2020).

Poza wprowadzaniem elastyczności strukturalnej, IDRs wykazują znacznie większą podatność na modyfikacje potranslacyjne (ang. post translational modifications, PTM), które modulują właściwości biofizyczne i funkcje biochemiczne białek, umożliwiając szybkie „dostrajanie" ich funkcji do stanu komórki (Leutert i współaut. 2021). PTMs są wysoce zależne od kontekstu i mogą bezpośrednio wpływać na rekrutację lub wykluczenie określonych cząsteczek poprzez szybką zmianę wartościowości i powinowactwa białka do partnerów oddziaływania (Venne i współaut. 2014).

LOKALIZACJA BIAŁEK Met I Gce

W przypadku czynników transkrypcyjnych, których aktywność jest zależna od wiązania liganda, szczególnie istotna wydaje się być zdolności do translokacji wewnątrzkomórkowe, pomiędzy cytoplazmą a jądrem (Kallio i współaut. 1998, Lee i Hannink 2003). Met i Gce zawierają kilka opisanych sygnałów NLS i NES (Greb-Markiewicz i współaut. 2011, 2015). Z tego powodu wydaje się, że regulacja ich lokalizacji jest procesem złożonym i bardzo dynamicznym, podobnie jak w przypadku lokalizacji czynników transkrypcyjnych kierowanych hormonem. Receptor progesteronu (ang. progesterone receptor, PR) występuje w dwóch izoformach: PR-A i PR-B. Co ciekawe, izoforma PR-B, występująca zarówno w cytoplazmie jak i jądrze, jest silniejszym aktywatorem transkrypcji, niż występująca jedynie w jądrze izoforma PR-A, co doprowadziło do zaproponowania dodatkowej nie-genomowej funkcji dla tego receptora (Boonyaratanakornkit i współaut. 2007). Wydaje się, że podobnie mogłoby być w przypadku Met i Gce. Podobieństwa pomiędzy sygnałami lokalizacji obu białek ograniczają się do NLS występującego w obrębie domeny PAS-B indukowanego przez wiązanie JH, oraz sygnałów NES położonych w domenie PAS-B i obszarze C-końcowym. W przeciwieństwie do Met posiadającego w domenie PAS-A dominujący NLS, skutkujący głównie jądrową lokalizacją Met niezależnie od obecności JH, Gce, nieposiadający tego sygnału przy braku JH obecne jest w obrębie całej komórki. Z kolei Gce w regionie C-końcowym, oprócz NES obecnego w obu białkach, posiada dodatkowy NLS. Co ciekawe, aktywność tego sygnału jest niezbędna do aktywacji zależnego od liganda NLS w domenie PAS-B, skutkującej translokacją Gce do jądra. Szczegółowe analizy sygnałów mogą sugerować, że wewnątrzkomórkowa lokalizacja Gce jest regulowana w bardziej złożony sposób, niż ma to miejsce w przypadku Met (Greb-Markiewicz i współaut. 2011, 2015).

ODDZIAŁYWANIE POMIĘDZY BIAŁKAMI Met/Gce A EcR/Usp I INNYMI ELEMENTAMI KOMPLEKSU

Istotnym etapem w zrozumieniu funkcjonowania regulacji hormonalnej u *Drosophila* była obserwacja, że regulacja odpowiedzi na JH może być modyfikowana przez 20E. To wskazało na bardziej złożone, niż wcześniej zakładano, wzajemne oddziaływanie między JH i 20E może być (BECKSTEAD i współaut. 2007). Obecnie jasne jest, że Met wchodzi w skład kompleksu białkowego, koordynującego przenikanie się szlaków sygnalizacyjnych JH i 20E (BAUMANN i współaut. 2010a, b; GUO i współaut. 2012; LIU i współaut. 2013). Met bezpośrednio oddziałuje z białkami zaangażowanymi w transdukcję sygnałów ekdysteroidowych (EcR i Usp), ale także z ich kofaktorami: 39kDa białkiem wiążącym FK506 (FKBP39) (THEOPOLD i współaut. 1995), białkiem kalponinopodobnym Chd64 (Chd64) (BITRA i PALLI 2009, LIU i współaut. 2013), koaktywatorem receptora steroidowego (SRC) (LI i współaut. 2011, ZHANG i współaut. 2011) i CYCLE (SHIN i współaut. 2012).

Przy wysokim stężeniu JH, charakterystycznym dla stadium larwalnego, dochodzi do silnej ekspresji białek FKBP39 i Chd64. Białka te oddziałują z EcR, Usp i Met, tworząc kompleks transkrypcyjny wiążący się do sekwencji promotora odpowiedzi na JH (JHRE) i zapewniający indukcję ekspresji genów zapewniających utrzymanie *statusu quo* (LI i współaut. 2007). Co więcej, FKBP39 i Chd64, wiążąc EcR i Usp, zmniejszają ich dostępność w komórce, zapobiegając ekspresji białek znajdujących się pod kontrolą promotora odpowiedzi na ekdyzon (ang. ecdysone-response elements, EcRE). Stężenie 20E wzrasta, przy jednoczesnym spadku JH, w czasie linienia i metamorfozy. Ekspresja białek FKBP39 i Chd64 jest wyciszona, a dzięki temu dostępność EcR i Usp jest wysoka. Wówczas EcR oddziałuje z Usp i tworzy wielo-podjednostkowy kompleks z Met, FKBP39 i Chd64, który wiążąc się do EcRE aktywuje transkrypcję genów kontrolujących metamorfozę (LI i współaut. 2007).

Immunofilina FKBP39 jest wielofunkcyjnym białkiem regulatorowym. Białka wiążące FK506 (FKBPs) stanowią specyficzną klasę immunofilin, które oddziałują z wieloma znaczącymi immunosupresantami (HARIKISHORE i YOON 2015). FKBP są białkami wysoce zachowanymi w toku ewolucji u eukariontów. Będąc izomerazami, FKBP funkcjonują jako komórkowe białka opiekuńcze i regulatory różnych procesów cytoplazmatycznych i nukleoplazmatycznych we wszystkich grupach taksonomicznych organizmów żywych (KANG i współaut. 2008, HANES 2015). Niektóre FKBPs są również modulatorami chromatyny i czaperoninami histonów (TONG i JIANG 2015). FKBP23 u *D. melanogaster* jest zlokalizowane w jądrze komórkowym, w szczególności w jąderku (EDLICH-MUTH i współaut. 2015, KOZIOWSKA i współaut. 2017, ORŁOWSKI i współaut. 2018). FKBP39 jest również zdolne do formowania kondensatów LLPS (ang. liquid-liquid phase separation) (TARCZEWSKA i współaut. 2020). W przypadku białka Chd64 pokazano, że posiada ono globularną strukturę otoczoną regionami IDR przy jego końcach N i C (KOZIOWSKA i współaut. 2014). Molekularne podstawy oddziaływań pomiędzy Met, EcR, Usp, FKBP39 i Chd64 nie są jeszcze w pełni poznane.

BIAŁKA EcR, Usp I Met U KOMARA EGIPSKIEGO (*Aedes aegypti*)

Jak wcześniej wspomniano, receptory jądrowe oraz inne czynniki transkrypcyjne zaangażowane w sygnalizację 20E i JH u *D. melanogaster* spełniają rolę ważnych modeli do dokładniejszego poznania mechanizmu modulacji transkrypcji genów u kręgowców (PALLI i współaut. 2005). Komary *A. aegypti,* będące także organizmami modelowymi w badaniu szlaków sygnalizacji hormonalnej, są jednocześnie głównymi nosicielami najbardziej niszczycielskich chorób człowieka na świecie: dengi, malarii, chikungunya, gorączki Zika i żółtej febry (MARCHETTE i współaut. 1969, BARRETT i HIGGS 2007, GUZMAN i współaut. 2010, TSETSARKIN i współaut. 2016). Hormon 20E działa u komarów również poprzez funkcjonalny receptor utworzony z EcR (CHO i współaut. 1995) i Usp (KAPITSKAYA i współaut. 1996).

Uważa się, że sygnalizacja z udziałem 20E jest obiecującym celem dla chemicznej kontroli komarów (EKOKA i współaut. 2021). Dokładne poznanie funkcji wiązania jonów przez EcR/Usp w procesie modulowania ekspresji genów kluczowych w trakcie rozmnażania się komarów może przyczynić się do opracowania bezpiecznych dla środowiska narzędzi znacząco zmniejszających populację komarów, co może pomóc w ograniczeniu rozprzestrzeniania się chorób.

Funkcjonalny heterodimer EcR/Usp (WANG i współaut. 1998) kontroluje m.in. rozmnażanie się komarów. Krew jest niezbędnym źródłem składników odżywczych warunkujących prawidłowe formowanie się jaj w procesie witelogenezy u tych komarów (RAIKHEL i DHADIALLA 1992, ATTARDO i współaut. 2005). U samic komarów hematofagicznych witelogeneza wywołana pokarmem z krwi jest kontrolowana przez 20E i EcR (RAIKHEL i współaut. 2002, ATTARDO i współaut. 2005). U samicy komara *A. aegypti*

gen witellogeniny (*Vg*), główny prekursor białka żółtka (ang. yolk protein precursor, YPP), jest aktywowany na poziomie transkrypcji przez funkcjonalny receptor ekdysteroidowy (MARTÍN i współaut. 2001). Ścisła kontrola ekspresji genu *Vg* u komarów, powiązana z dostępnością pokarmu z krwi, stanowi doskonały model do wyjaśnienia regulacji hormonalnej pojedynczego genu w kontekście złożonych procesów fizjologicznych organizmu przygotowującego się do rozrodu (MARTÍN i współaut. 2001). Zwierzęta żywiące się krwią, takie jak komary, oprócz tego, że są wektorami wielu poważnych chorób, krótko opisanych powyżej, stanowią unikatowe modele do badań transkrypcji genów, takich jak *Vg*, *E74*, *E75* i *broad* (HANSEN i współaut. 2014, ROY i współaut. 2015).

Metabolizm węglowodanów odgrywa ważną rolę we wspieraniu intensywnych zmian w fizjologii rozmnażania się samic komarów *A. aegypti*, gdzie 20E i JH pełnią kluczowe role kontrolne, m.in. w fazie tuż po spożyciu posiłku z krwi (HOU i współaut. 2015). Ponadto pokazano, że oba hormony oraz ich receptory EcR i Met (ZOU i współaut. 2013), odgrywają kluczową rolę w regulacji metabolizmu tłuszczów u komarów (X. WANG i współaut. 2017). Co więcej, naukowcy powiązali aktywność receptora HNF4 z kontrolą katabolizmu triacyloglicerolu, gdzie aktywność genu *HNF4* jest wyciszana przez kompleks JH/Met, natomiast aktywacja zachodzi przez 20E/EcR i szlak TOR (ang. target of rapamycin, TOR), co podkreśla ważną pośredniczącą rolę HNF4 w sygnalizacji hormonalnej i żywieniowej w regulacji metabolizmu lipidów u samic *A. aegypti* (X. WANG i współaut. 2017). JH, poprzez stymulację Met, aktywuje ekspresję genów kodujących regulator syntezy rybosomów 1 (RRS1) i sześciu białek rybosomalnych (dwóch białek dużej podjednostki rybosomu, dwóch białek małej podjednostki rybosomu oraz dwóch białek mitochondrialnych). Z kolei RRS1 pośredniczy w przekazywaniu sygnału JH, aby wzmocnić nie tylko biogenezę rybosomów, ale również witelogenezę (J. L. WANG i współaut. 2017). Pokazano również, że JH jest niezbędny do produkcji białek żółtka przez ciało tłuszczowe. Pomimo postępu, molekularne mechanizmy promujące rozmnażanie komarów, nie są jeszcze w pełni poznane (J. L. WANG i współaut. 2017).

U *A. aegypti* zidentyfikowano dwie izoformy Usp i dwie izoformy EcR (CHO i współaut. 1995, KAPITSKAYA i współaut. 1996, WANG i współaut. 1998). W przypadku Usp wykazano, że domena NTD jest wewnętrznie nieuporządkowana strukturalnie i wykazuje zdolność do homodimeryzacji (PIEPRZYK i współaut. 2014). Izoformy EcR i Usp u *A. aegypti* mają budowę bardzo podobną do innych NR oraz do receptorów u *D. melanogaster* (Ryc. 2). EcR z *A. aegypti* posiada jedną z najdłuższych domen F u znanych członków NR (WIĘCH i współaut. 2019). Zmienna pod względem długości i sekwencji domena F, zwana również regionem F, nie występuje u wszystkich przedstawicieli nadrodziny NR (AAGAARD i współaut. 2011, WIĘCH i współaut. 2021) i jest jednym z najmniej dotychczas zbadanych fragmentów receptorów jądrowych pod względem pełnionych funkcji w kontekście całych receptorów. Ostatnio pokazano, że domena F receptora EcR u *A.aegypti* (AaFEcR) wykazuje cechy białek o wewnętrznie nieuporządkowanej strukturze (ang. intrinsically disordered proteins, IDPs) i jest zdolna do tworzenia kompleksów z jonami Zn^{2+} i Cu^{2+} (WIĘCH i współaut. 2019). Interesujące jest, że wiązanie jonów Cu^{2+} przez AaFEcR może indukować w domenie formowanie się unikatowej struktury helikalnej typu PPII (ROWIŃSKA-ŻYREK i współaut. 2019), czego do tej pory nie pokazano dla innych członków nadrodziny NR. Spekuluje się, że wiązanie jonów przez AaFEcR może mieć kluczowe znaczenie w modulowaniu ekspresji genów przez EcR/Usp (WIĘCH i współaut. 2019). Jednak pełna molekularna funkcja wiązania Zn^{2+} i Cu^{2+} przez EcR pozostaje nieznana.

DOMENA F RECEPTORA EcR U *A. aegypti* TWORZY BEZBŁONOWE KONDENSATY KROPELKOWE

Separacja faz ciecz-ciecz (LLPS) jest mechanizmem, w którym komórki specyficznie organizują swoje wnętrze, oddzielają, a następnie segregują procesy biochemiczne (HYMAN i współaut. 2014, MITREA i KRIWACKI 2016, SHIN i BRANGWYNNE 2017, ITAKURA i współaut. 2018). Niektóre czynniki transkrypcyjne, które posiadają regiony o wewnętrznie nieuporządkowanej strukturze (IDRs), mogą podlegać spontanicznej LLPS, koncentrując maszynerię transkrypcyjną w specyficznych kondensatach, umożliwiając przez to wydajną transkrypcję (BOIJA i współaut. 2018). Ostatnio pokazano, że AaFEcR jest zdolna do formowania kondensatów wyłącznie w obecności jonów Zn^{2+} i Cu^{2+} (WIĘCH i współaut. 2021), jednak rola indukowanej jonami LLPS przez AaFEcR w procesie transkrypcji pozostaje do wyjaśnienia. Spekuluje się tylko, że EcR u *A. aegypti* może używać swojej domeny F z wyindukowaną przez Cu^{2+} strukturą helisy typu PPII jako platformy dla wielu interakcji z białkami modulującymi ekspresję genów, będących pod kontrolą specyficznych ligandów (WIĘCH i współaut. 2021).

PODSUMOWANIE

Przepis na funkcjonowanie organizmu zakodowany jest w odpowiedni sposób w genach. W modulowanie ekspresji genów zaanga-

żowane są wyspecjalizowane białka zwane czynnikami transkrypcji, które odbierają i przekazują sygnał, często poprzez aktywację transkrypcji odpowiednich zestawów genów. Bardzo często cząsteczkami sygnałowymi są hormony, dlatego rozumienie mechanizmów sygnalizacji hormonalnej i zależnej od niej ekspresji informacji genetycznej jest niezmiernie ważne z punktu widzenia żywego organizmu. Musimy być świadomi, że bez żmudnych i czasochłonnych eksperymentów naukowych, przeprowadzonych na organizmach takich jak *D. melanogaster* czy *A. aegypti*, nie byłoby możliwe poznanie i zrozumienie mechanizmów sygnalizacji hormonalnej u człowieka. Było to i nadal jest możliwe z uwagi na szereg podobieństw pomiędzy elementami szlaków sygnalizacji u owadów i u człowieka. *D. melanogaster* jest dość powszechnie wykorzystywanym organizmem modelowym ze względu na łatwość hodowli, dostępność dobrze opracowanych metodologii i brak przeciwwskazań etycznych. Komary *A. aegypti*, oprócz tego, że są wektorami wielu wyniszczających ludzkich chorób, takich jak denga, malaria i gorączka Zika, stanowią unikatowe modele do badań transkrypcji genów, ponieważ ich etapy morfologicznych i fizjologicznych przemian oraz reprodukcji, w tym transkrypcja określonych genów, przebiegają w stosunkowo krótkim czasie. Ponadto, szczegółowe poznanie sygnalizacji z udziałem JH i 20E, pełnej struktury przestrzennej ich receptorów oraz partnerów tych receptorów, w procesie modulowania ekspresji kluczowych genów kontrolujących reprodukcję komarów, może przyczynić się do opracowania bezpiecznych dla środowiska narzędzi, znacząco zmniejszających populację komarów, co może pomóc w ograniczeniu rozprzestrzeniania się chorób.

Streszczenie

Informacja o budowie i funkcjonowaniu organizmów żywych zapisana jest w genach. W regulację ekspresji genów zaangażowane są specyficzne czynniki transkrypcyjne, które odpowiedzialne są za odbieranie sygnałów płynących z zewnątrz komórki i przekazywanie ich poprzez aktywację transkrypcji odpowiednich zestawów genów. Podczas rozwoju organizmu cząsteczkami sygnałowymi są m.in. hormony, dlatego rozumienie mechanizmów sygnalizacji hormonalnej i zależnej od niej ekspresji informacji genetycznej jest bardzo ważne. Organizmy modelowe stanowią doskonałe źródło wiedzy, która pozwala zrozumieć wiele procesów fizjologicznych zachodzących w organizmie człowieka. Warto podkreślić, że bez żmudnych eksperymentów naukowych przeprowadzanych na organizmach takich jak *Drosophila melanogaster* czy *Aedes aegypti*, nie byłoby możliwe poznanie i zrozumienie sygnalizacji hormonalnej u człowieka. Dogłębne badania szlaku przekazywania sygnałów pochodzących od 20-hydroksyekdyzonu (20E) i hormonu juwenilnego (JH) w obu organizmach pozwalają zrozumieć molekularne i genetyczne podstawy przekazywania sygnałów w organizmach wielokomórkowych, w tym sposobu, w jaki cząsteczki sygnałowe kierują rozwojem zarodka od pojedynczej komórki do dojrzałego organizmu.

LITERATURA

AAGAARD M. M., RASMUS S., MANDRUP S., 2011. *Molecular basis for gene-specific transactivation by nuclear receptors.* Biochim. Biophys. Acta 1812, 824-835.

ABDOU M. A., HE Q., WEN D., ZYAAN O., WANG J., XU J., BAUMANN A. A. i współaut., 2011. *Drosophila Met and Gce are partially redundant in transducing juvenile hormone action.* Insect Biochem. Mol. Biol. 41, 938-945.

ANTONIEWSKI C., LAVAL M., DAHAN A., LEPESANT J. A., 1994. *The ecdysone response enhancer of the Fbp1 gene of Drosophila melanogaster is a direct target for the EcR/Usp nuclear receptor.* Mol. Cell. Biol. 14, 4465-4474.

ANTONIEWSKI C., MUGAT B., DELBAC F., LEPESANT J. A., 1996. *Direct repeats bind the EcR/Usp receptor and mediate ecdysteroid responses in Drosophila melanogaster.* Mol. Cell. Biol. 16, 2977-2986.

ANTONSSON C., ARULAMPALAM V., WHITELAW, M. L., PETTERSSON S., POELLINGER L., 1995. *Constitutive function of the basic helix-loop-helix/PAS factor arnt. Regulation of target promoters via the E box motif.* J. Biol. Chem. 270, 13968-13972.

ARANDA A., PASCUAL A., 2001. *Nuclear hormone receptors and gene expression.* Physiol. Rev. 81, 1269-1304.

ASHOK M., TURNER C., WILSON T. G., 1998. *Insect juvenile hormone resistance gene homology with the BHLH-PAS family of transcriptional regulators.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 2761-2766.

ATTARDO G. M., HANSEN I. A., RAIKHEL A. S. 2005. *Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: implications for anautogeny.* Insect Biochem. Mol. Biol. 35, 661-675.

BAEHRECKE E. H., 2002. *How death shapes life during development.* Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 3, 779-787.

BAI J., UEHARA Y., MONTELL D. J., 2000. *Regulation of invasive cell behavior by taiman, a Drosophila protein related to AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast cancer.* Cell 103, 1047-1058.

BAKER K. D, SHEWCHUK L. M, KOZLOVA T., MAKISHIMA M., HASSELL A., WISELY B., CARAVELLA J. A. i współaut., 2003. *The Drosophila orphan nuclear receptor DHR38 mediates an atypical ecdysteroid signaling pathway.* Cell 113, 731-742.

BARRETT A. D.T., HIGGS S., 2007. *Yellow fever: a disease that has yet to be conquered.* Ann. Rev. Entomol. 52, 209-229.

BAUMANN A., BARRY J., WANG S., FUJIWARA Y., WILSON T. G., 2010a. *Paralogous genes involved in juvenile hormone action in Drosophila melanogaster.* Genetics 185, 1327-1336.

BAUMANN A., FUJIWARA Y., WILSON T. G., 2010b. *Evolutionary divergence of the paralogs methoprene tolerant (Met) and germ cell expressed (Gce) within the genus Drosophila.* J. Insect Physiol. 56, 1445-555.

BECKSTEAD R. B., LAM G., THUMMEL C. S., 2005. *The genomic response to 20-hydroxyecdysone at the onset of Drosophila metamorphosis.* Genome Biol. 6, R99.

Beckstead R. B., Lam G., Thummel C. S., 2007. *Specific transcriptional responses to juvenile hormone and ecdysone in Drosophila.* Insect Biochem. Mol. Biol. 37, 570-578.

Bender M., Imam F. B., Talbot W. S., Ganetzky B., Hogness D. S., 1997. *Drosophila ecdysone receptor mutations reveal functional differences among receptor isoforms.* Cell 91, 777-788.

Bernardo T. J., Dubrovsky E. B., 2012. *The Drosophila juvenile hormone receptor candidates methoprene-tolerant (MET) and germ cell-expressed (GCE) utilize a conserved LIXXL motif to bind the FTZ-F1 nuclear receptor.* J. Biol. Chem. 287, 7821-7833.

Bialecki M., Shilton A., Fichtenberg C., Segraves W. A., ThummeL C. S., 2002. *Loss of the ecdysteroid-inducible E75A orphan nuclear receptor uncouples molting from metamorphosis in Drosophila.* Develop. Cell 3, 209-220.

Bielska K., Seliga J., Wieczorek W., Kedracka-Krok S., Niedenthal R., Ożyhar A., 2012. *Alternative sumoylation sites in the Drosophila nuclear receptor Usp.* J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 132, 227-238.

Billas I. M. L., Moras D., 2005. *Ligand-binding pocket of the ecdysone receptor.* Vitam. Horm. 73, 101-129.

Billas I. M. L., Iwema T., Garnier J. M., Mitschler A., Rochel N., Moras D., 2003. *Structural adaptability in the ligand-binding pocket of the ecdysone hormone receptor.* Nature 426, 91-96.

Bitra K., Palli S. R., 2009. *Interaction of proteins involved in ecdysone and juvenile hormone signal transduction.* Arch. Insect Biochem. Physiol. 70, 90-105.

Boija A. Klein I. A., Sabari B. R., Dall'Agnese A., Coffey E. L., Zamudio, Charles H., Li Ch. H. i współaut., 2018. *Transcription factors activate genes through the phase-separation capacity of their activation domains.* Cell 175, 1842-1855.

Boonyaratanakornkit V., McGowan E., Sherman L., Mancini M. A., Cheskis B. J., Edwards D. P., 2007. *The role of extranuclear signaling actions of progesterone receptor in mediating progesterone regulation of gene expression and the cell cycle.* Mol. Endocrinol. 21, 359-375.

Braun S., Azoitei A., Spindler-Barth M., 2009. *DNA-binding properties of Drosophila ecdysone receptor isoforms and their modification by the heterodimerization partner ultraspiracle.* Arch. Insect Biochem. Physiol. 72, 172-191.

Browning Ch., Martin E., Loch C., Wurtz J. M., Moras D., Stote R. H., Dejaegere A. P., Billas I. M. L., 2007. *Critical role of desolvation in the binding of 20-hydroxyecdysone to the ecdysone receptor.* J. Biol. Chem. 282, 32924-32934.

Cakouros D., Daish T., Martin D., Baehrecke E. H., Kumar S., 2002. *Ecdysone-induced expression of the caspase DRONC during hormone-dependent programmed cell death in Drosophila is regulated by broad-complex.* J. Cell Biol. 157, 985-995.

Cakouros D., Daish T. J., Kumar S., 2004. *Ecdysone receptor directly binds the promoter of the Drosophila caspase dronc, regulating its expression in specific tissues.* J. Cell Biol. 165, 631-640.

Card P. B., Erbel P. J. A., Gardner K. H., 2005. *Structural basis of ARNT PAS-B dimerization: use of a common beta-sheet interface for hetero- and homodimerization.* J. Mol. Biol. 353, 664-677.

Carmichael J. A., Lawrence M. C., Graham L. D., Pilling P. A., Epa V. Ch., Noyce L., Lovrecz G. i współaut., 2005. *The X-ray structure of a hemipteran ecdysone receptor ligand-binding domain: comparison with a lepidopteran ecdysone receptor ligand-binding domain and implications for insecticide design.* J. Biol. Chem. 280, 22258-22269.

Charles J. P., Iwema T., Epa V. Ch., Takaki K., Rynes J., Jindra M., 2011. *Ligand-binding properties of a juvenile hormone receptor, methoprene--tolerant.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108, 21128-21133.

Cherbas L., Lee K., Cherbas P., 1991. *Identification of ecdysone response elements by analysis of the Drosophila Eip28/29 gene.* Genes Develop. 5, 120-131.

Cho W. L., Kapitskaya M. Z., Raikhel A. S., 1995. *Mosquito ecdysteroid receptor: analysis of the cDNA and expression during vitellogenesis.* Insect Biochem. Mol. Biol. 25, 19-27.

Christopherson K. S., Mark M. R., Bajaj V., Godowski P. J., 1992. *Ecdysteroid-dependent regulation of genes in mammalian cells by a Drosophila ecdysone receptor and chimeric transactivators.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6314-6318.

Crews S. T., 1998. *Control of cell lineage-specific development and transcription by BHLH- PAS proteins.* Genes Develop. 12, 607-620.

Cronauer M. V., Braun S., Tremmel Ch., Kröncke K. D., Spindler-Barth M., 2007. *Nuclear localization and DNA binding of ecdysone receptor and ultraspiracle.* Arch. Insect Biochem. Physiol. 65, 125-133.

Davis M. B., Carney G. E., Robertson A. E., Bender M., 2005. *Phenotypic analysis of EcR-A mutants suggests that EcR isoforms have unique functions during Drosophila development.* Devel. Biol. 282, 385-396.

Devarakonda S., Harp J. M., Kim Y., Ożyhar A., Rastinejad F., 2003. *Structure of the heterodimeric ecdysone receptor DNA-binding complex.* EMBO J. 22, 5827-5840.

Dingwall C., Dilworth S. M., Black S. J., Kearsey S. E., Cox L. S., Laskey R. A., 1987. *Nucleoplasmin cDNA sequence reveals polyglutamic acid tracts and a cluster of sequences homologous to putative nuclear localization signals.* EMBO J. 6, 69-74.

Dobryszycki P., Grad I., Krusiński T., Michaluk P., Sawicka D., Kowalska A., Orłowski M. i współaut., 2006. *The DNA-binding domain of the ultraspiracle drives deformation of the response element whereas the DNA-binding domain of the ecdysone receptor is responsible for a slight additional change of the preformed structure.* Biochemistry 45, 668-675.

Dorstyn L., Read S., Cakouros D., Huh J. R., Hay B. A., Kumar S., 2002. *The role of cytochrome c in caspase activation in Drosophila melanogaster cells.* J. Cell Biol. 156, 1089-1098.

Dubrovsky E. B., 2005. *Hormonal cross talk in insect development.* Trends Endocrinol. Metab. 16, 6-11.

Dubrovsky E. B., Dubrovskaya V. A., Bernardo T., Otte V., Difilippo R., Bryan H., 2011. *The Drosophila FTZ-F1 nuclear receptor mediates juvenile hormone activation of E75A gene expression through an intracellular pathway.* J. Biol. Chem. 286, 33689-33700.

Dutko-Gwóźdź J., Gwóźdź T., Orłowski M., Greb-Markiewicz B., Duś D., Dobrucki J., Ożyhar A., 2008. *The variety of complexes formed by EcR and Usp nuclear receptors in the nuclei of living cells.* Mol. Cell. Endocrinol. 294, 45-51.

EDLICH-MUTH CH., ARTERO J. B., CALLOW P., PRZEWLOKA M. R., WATSON A. A., ZHANG W., GLOVER D. M. i współaut., 2015. *The pentameric nucleoplasmin Fold is present in Drosophila FKBP39 and a large number of chromatin-related proteins.* J. Mol. Biol. 427, 1949-1963.

EKOKA E., MAHARAJ S., NARDINI L., DAHAN-MOSS Y., KOEKEMOER L. L., 2021. *20-Hydroxyecdysone (20E) signaling as a promising target for the chemical control of malaria vectors.* Parasit. Vectors 14, 86.

FLATT T., TU M. P., TATAR M., 2005. *Hormonal pleiotropy and the juvenile hormone regulation of Drosophila development and life history.* BioEssays 27, 999-1010.

GODLEWSKI J., WANG S., WILSON T. G., 2006. *Interaction of BHLH-PAS proteins involved in juvenile hormone reception in Drosophila.* Biochem. Biophys. Res. Comm. 342, 1305-1311.

GRAD I., NIEDZIELA-MAJKA A., KOCHMAN M., OŻYHAR A., 2001. *Analysis of usp DNA binding domain targeting reveals critical determinants of the ecdysone receptor complex interaction with the response element.* Eur. J. Biochem. 268, 3751-3758.

GREB-MARKIEWICZ B., FAUTH T., SPINDLER-BARTH M., 2005. *Ligand binding is without effect on complex formation of the ligand binding domain of the ecdysone receptor (EcR).* Arch. Insect Biochem. Physiol. 59, 1-11.

GREB-MARKIEWICZ B., ORŁOWSKI M., DOBRUCKI J., OŻYHAR A., 2011. *Sequences that direct subcellular traffic of the Drosophila methoprene-tolerant protein (MET) are located predominantly in the PAS domains.* Mol. Cell. Endocrinol. 345, 16-26.

GREB-MARKIEWICZ B., SADOWSKA D., SURGUT N., GODLEWSKI J., ZARĘBSKI M., OŻYHAR A., 2015. *Mapping of the sequences directing localization of the Drosophila germ cell-expressed protein (GCE).* PLoS One 10, e0133307.

GRUNTENKO N. E., WEN D., KARPOVA E. K., ADONYEVA N. V., LIU Y., HE Q., FADDEEVA N. V., FOMIN A. S., LI S., RAUSCHENBACH I. Y., 2010. *Altered juvenile hormone metabolism, reproduction and stress response in Drosophila adults with genetic ablation of the corpus allatum cells.* Insect Biochem. Mol. Biol. 40, 891-897.

GUO E., HE Q., LIU S., TIAN L., SHENG Z., PENG Q, GUAN J. i współaut., 2012. *MET Is required for the maximal action of 20-hydroxyecdysone during Bombyx metamorphosis.* PLoS One 7, e53256.

GUZMAN M. G., HALSTEAD S. B., ARTSOB H., BUCHY P., FARRAR J., NATHAN M. B., PELEGRINO J. L., SIMMONS C., YOKSAN S., PEELING R. W., 2010. *Dengue?: a continuing global threat.* Nat. Rev. Microbiol. 8, S7-S16.

GWÓŹDŹ T., DUTKO-GWÓŹDŹ J., NIEVA C., BETAŃSKA K., ORŁOWSKI M., KOWALSKA A., DOBRUCKI J., SPINDLER-BARTH M., SPINDLER K. D., OŻYHAR A., 2007. *EcR and Usp, components of the ecdysteroid nuclear receptor complex, exhibit differential distribution of molecular determinants directing subcellular trafficking.* Cell. Signal. 19, 490-503.

HANES S. D., 2015. *Prolyl isomerases in gene transcription.* Biochim. Biophys. Acta 1850, 2017-2034.

HANSEN I. A., ATTARDO G. M., RODRIGUEZ S. D., DRAKE L. L., 2014. *Four-way regulation of mosquito yolk protein precursor genes by juvenile hormone-, ecdysone-, nutrient-, and insulin-like peptide signaling pathways.* Front. Physiol. 5, 103.

HARIKISHORE A., YOON H. S., 2015. *Immunophilins: structures, mechanisms and ligands.* Curr. Mo. Pharmacol. 9, 37-47.

HAWKINS CH. J., YOO S. J., PETERSON E. P., WANG S. L., VERNOOY S. Y., HAY B. A., 2000. *The Drosophila caspase DRONC cleaves following glutamate or aspartate and is regulated by DIAP1, HID, and GRIM.* J. Biol. Chem. 275, 27084-27093.

HENRICH V. C., 2005. *The ecdysteroid receptor.* Compr. Mol. Insect Sci. 3-6, 243-285.

HILL R. J., BILLAS I. M. L., BONNETON F., GRAHAM L. D., LAWRENCE M. C., 2013. *Ecdysone receptors: from the ashburner model to structural biology.* Ann. Rev. Entomol. 58, 251-271.

HOU Y., WANG X. L, SAHA T. T., ROY S., ZHAO B., RAIKHEL A. S., ZOU Z., 2015. *Temporal coordination of carbohydrate metabolism during mosquito reproduction.* PLoS Genet. 11, e1005309.

HU CH. D., CHINENOV Y., KERPPOLA T. K., 2002. *Visualization of interactions among BZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation.* Mol. Cell 9, 789-798.

HYMAN A. A., WEBER CH. A., JÜLICHER F., 2014. *Liquid-liquid phase separation in biology.* Ann. Rev. Cell Develop. Biol. 30, 39-58.

ITAKURA A. K., FUTIA R. A., JAROSZ D. F., 2018. *It pays to be in phase.* Biochemistry 57, 2520-2529.

IWEMA T., BILLAS I. M. L., BECK Y., BONNETON F., NIERENGARTEN H., CHAUMOT A., RICHARDS G., LAUDET V, MORAS, D., 2007. *Structural and functional characterization of a novel type of ligand--independent RXR-usp receptor.* EMBO J. 26, 3770-3782.

JAKÓB M., KOŁODZIEJCZYK R., ORŁOWSKI M., KRZYWDA S., KOWALSKA A., DUTKO-GWÓŹDŹ J., GWÓŹDŹ T., KOCHMAN M., JASKÓLSKI M., OŻYHAR A., 2007. *Novel DNA-binding element within the C-terminal extension of the nuclear receptor DNA-binding domain.* Nucl. Acids Res. 35, 2705-2718.

JENNINGS B. H., 2011. *Drosophila – a versatile model in biology and medicine.* Mat. Today 14, 190-195.

JIANG CH., BAEHRECKE E. H., THUMMEL C. S., 1997. *Steroid regulated programmed cell death during Drosophila metamorphosis.* Development 124, 4673-4683.

JIANG CH., LAMBLIN A. F. J., STELLER H., THUMMEL C. S., 2000. *A steroid-triggered transcriptional hierarchy controls salivary gland cell death during Drosophila metamorphosis.* Mol. Cell 5, 445-455.

JINDRA M., UHLIROVA M., CHARLES J. P., SMYKAL V., HILL R. J., 2015. *Genetic evidence for function of the BHLH-PAS protein Gce/Met as a juvenile hormone receptor.* PLoS Genet. 11, e1005394.

KALDERON D., RICHARDSON W. D., MARKHAM A. F., SMITH A. E., 1984. *Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen.* Nature 311, 33-38.

KALLIO P. J., OKAMOTO K., O'BRIEN S., CARRERO P., MAKINO Y., TANAKA H., POELLINGER L., 1998. *Signal transduction in hypoxic cells?: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/P300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 á.* EMBO J. 17, 6573-6586.

KANG C. B., HONG Y., DHE-PAGANON S., YOON H. S., 2008. *FKBP Family proteins: immunophilins with versatile biological functions.* NeuroSignals 16, 318-325.

Kapitskaya M., Wang S., Cress D. E., Dhadialla T. S., Raikhel A. S., 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.

Kayukawa T., Minakuchi Ch., Namiki T., Togawa T., Yoshiyama M., Kamimura M., Mita K. i współaut., 2012. *Transcriptional regulation of juvenile hormone-mediated induction of Krüppel homolog 1, a repressor of insect metamorphosis.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109, 11729-11734.

Kewley R. J., Whitelaw M. L., Chapman-Smith A., 2004. *The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators.* Int. J. Biochem. Cell Biol. 36, 189-204.

Kolonko M., Ożga K., Hołubowicz R., Taube M., Kozak M., Ożyhar M., Beata Greb-Markiewicz, B., 2016. *Intrinsic disorder of the C-terminal domain of Drosophila methoprene-tolerant protein.* PLoS One 11, e0162950.

Kolonko M., Bystranowska D., Taube M., Kozak M., Bostock M., Popowicz G., Ożyhar A., Greb-Markiewicz B., 2020. *The intrinsically disordered region of GCE protein adopts a more fixed structure by interacting with the LBD of the nuclear receptor FTZ-F1.* Cell Comm. Signal. 18, 1-22.

Kozlova T., Thummel C. S., 2000. *Steroid regulation of postembryonic development and reproduction in Drosophila.* Trends Endocrinol. Metabol. 11, 276-280.

Kozłowska M., Tarczewska A., Jakób M., Szpotkowski K., Wojtas M., Rymarczyk G., Ożyhar A., 2014. *Calponin-like Chd64 is partly disordered.* PLoS One 9, e96809.

Kozłowska M., Tarczewska A., Jakób M., Bystranowska D., Taube M., Kozak M., Czarnocki-Cieciura M., Dziembowski A., Orłowski M. i współaut., 2017. *Nucleoplasmin-like domain of FKBP39 from Drosophila melanogaster forms a tetramer with partly disordered tentacle-like C-terminal segments.* Sci. Rep. 7, 40405.

Kumar S., Saradhi M., Chaturvedi N. K., Tyagi R.K., 2006. *Intracellular localization and nucleocytoplasmic trafficking of steroid receptors: an overview.* Mol. Cell. Endocrinol. 246, 147-156.

Lange A., Mills R. E., Lange Ch. J., Stewart M., Devine S. E., Corbett A. H., 2007. *Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin á.* J. Biol. Chem. 282, 5101-5105.

Lee S. H., Hannink M., 2003. *Molecular mechanisms that regulate transcription factor localization suggest new targets for drug development.* Adv. Drug Deliv. Rev. 55, 717-731.

Leutert M., Entwisle S. W., Villén J., 2021. *Decoding post-translational modification crosstalk with proteomics.* Mol. Cell. Proteom. 20, 100129.

Li M., Mead E. A., Zhu J., 2011. *Heterodimer of two bHLH-PAS proteins mediates juvenile hormone-induced gene expression.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108, 638-643.

Li M., Liu P., Wiley J. D., Ojani R., Bevan D. R., Li J., Zhu J., 2014. *A steroid receptor coactivator acts as the DNA-binding partner of the methoprene-tolerant protein in regulating juvenile hormone response genes.* Mol. Cell. Endocrinol. 394, 47-58.

Li X., Romero P., Rani M., Dunker A. K., Obradovic Z., 1999. *Predicting protein disorder for N-, C-, and internal regions. Genome informatics.* Workshop on Genome Informatics 10, 30-40.

Li X., Duan X., Jiang H., Sun Y., Tang Y., Yuan Z., Guo J. I współaut., 2006. *Genome-wide analysis of basic/helix-loop-helix transcription factor family in Rice and Arabidopsis.* Plant Physiol. 141, 1167-1184.

Li Y., Zhang Z., Robinson G. E., Palli S. R., 2007. *Identification and characterization of a juvenile hormone response element and its binding proteins.* J. Biol. Chem. 282, 37605-37617.

Liu W., Zhang F. X., Cai M. J., Zhao W. L., Li X. R., Wang J. X., Zhao X. F., 2013. *The hormone-dependent function of Hsp90 in thecrosstalk between 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone signaling pathways in insects is determined by differential phosphorylation and protein interactions.* Biochim. Biophys. Acta 1830, 5184-5192.

Liu Y., Sheng Z., Liu H., Wen D., He Q., Wang S, Shao W. i współaut., 2009. *Juvenile hormone counteracts the bHLH-PAS transcription factors MET and GCE to prevent caspase-dependent programmed cell death in Drosophila.* Development 136, 2015-2025.

Macossay-Castillo M., Marvelli G., Guharoy M., Jain A., Kihara D., Tompa P., Wodak S. J., 2019. *The balancing Act of intrinsically disordered proteins: enabling functional diversity while minimizing promiscuity.* J. Mol. Biol. 431, 1650.

Maletta M., Orlov I., Roblin P., Beck Y., Moras D., Billas I. M. L., Klaholz B. P., 2014. *The palindromic DNA-bound Usp/EcR nuclear receptor adopts an asymmetric organization with allosteric domain positioning.* Nat. Commun. 5, 4139.

Marchette N. J., Garcia R., Rudnick A., 1969. *Isolation of Zika virus from Aedes aegypti mosquitoes in Malaysia.* Am. J. Trop. Med. Hyg. 18, 411-4115.

Martín D., Wang S. F., Raikhel A. S., 2001. *The vitellogenin gene of the mosquito Aedes aegypti is a direct target of ecdysteroid receptor.* Mol. Cell. Endocrinol. 173, 75-86.

Meier P., Silke J., Leevers S. J., Evan G. I., 2000. *The Drosophila caspase DRONC is regulated by DIAP1.* EMBO J. 19, 598-611.

Minakuchi Ch., Namiki T., Shinoda T., 2009. *Krüppel homolog 1, an early juvenile hormone-response gene downstream of methoprene-tolerant, mediates its anti-metamorphic action in the red flour beetle tribolium castaneum.* Develop. Biol. 325, 341-350.

Mitrea D. M., Kriwacki R. W., 2016. *Phase separation in biology; functional organization of a higher order.* Cell Comm. Signal. 14, 1.

Moore A. W., Barbel S., Jan L. Y., Jan Y. N., 2000. *A genomewide survey of basic helix-loop-helix factors in Drosophila.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 10436-10441.

Morgan E. D.,Wilson I. D., 1999. *Insect hormones and insect chemical ecology.* Comprehensive Natural Products Chemistry, 263-375.

Niedziela-Majka A., Kochman M., Ożyhar A., 2000. *Polarity of the ecdysone receptor complex interaction with the palindromic response element from the Hsp27 gene promoter.* Eur. J. Biochem. 267, 507-519.

Nieva C., Gwóźdź T., Dutko-Gwóźdź J., Wiedenmann W., Spindler-Barth M., Wieczorek E., Dobrucki J. i współaut., 2005. *Ultraspiracle promotes the nuclear localization of ecdysteroid receptor in mammalian cells.* Biol. Chem. 386, 463-470.

Nieva C., Spindler-Barth M., Azoitei A., Spindler K. D., 2007. *Influence of hormone on intracellular*

localization of the Drosophila melanogaster ecdysteroid receptor (EcR). Cell. Signal. 19, 2582-2587.

NOCULA-ŁUGOWSKA M., RYMARCZYK G., LISOWSKI M., OŻYHAR A., 2009. *Isoform-specific variation in the intrinsic disorder of the ecdysteroid receptor N-terminal domain.* Proteins 76, 291-308.

ORŁOWSKI M., SZYSZKA M., KOWALSKA A., GRAD I., ZOGLOWEK A., RYMARCZYK G., DOBRYSZYCKI P., KROWARSCH D., RASTINEJAD F., KOCHMAN M., OŻYHAR A., 2004. *Plasticity of the ecdysone receptor DNA binding domain.* Mol. Endocrinol. 18, 2166-2184.

ORŁOWSKI M., DOBRYSZYCKI P., ZOGLOWEK A., PIEPRZYK J., BIELSKA K., GREB-MARKIEWICZ B., KOZŁOWSKA M., TARCZEWSKA A., OŻYHAR A., 2015. *Structural analyses of ordered and disordered regions in ecdysteroid receptor.* [W:] *Nuclear Receptors: From Structure to the Clinic.* MCEWAN I. J., KUMAT R. (red.). Springer, 93-117.

ORŁOWSKI M., POPŁAWSKA K., PIEPRZYK J., SZCZYGIEŁ-SOMMER A., WIĘCH A., ZARĘBSKI M., TARCZEWSKA A., DOBRUCKI J., OŻYHAR A., 2018. *Molecular Determinants of Drosophila Immunophilin FKBP39 Nuclear Localization.* Biological Chemistry 399(5):467-484.

ORO A. E., MCKEOW M., EVANS R. M., 1990. *Relationship between the product of the Drosophila ultraspiracle locus and the vertebrate retinoid X receptor.* Nature 347, 298-301.

OŻYHAR A., STRANGMANN-DIEKMANN M., KILTZ H. H., PONGS O., 1991. *Characterization of a specific ecdysteroid receptor-DNA complex reveals common properties for invertebrate and vertebrate hormone-receptor/DNA interactions.* Eur. J. Biochem. 200, 329-335.

PAKUŁA S., ORŁOWSKI M., RYMARCZYK G., KRUSIŃSKI T., JAKÓB M., ZOGLOWEK A., OŻYHAR A., DOBRYSZYCKI P., 2012. *Conformational changes in the DNA-binding domains of the ecdysteroid receptor during the formation of a complex with the Hsp27 response element.* J. Biomol. Struct. Dynam. 30, 379-393.

PALLI S. R., HORMANN R. E., SCHLATTNER U., LEZZI M., 2005. *Ecdysteroid receptors and their applications in agriculture and medicine.* Vitam. Horm. 73, 59-100.

PAOLO D'AVINO P., 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.

PARTCH C. L., GARDNER K. H., 2010. *Coactivator recruitment: a new role for PAS domains in transcriptional regulation by the BHLH-PAS family.* J. Cell. Physiol. 223, 553-557.

PATEL S. R., SKAFAR D.F., 2015. *Modulation of nuclear receptor activity by the F domain.* Mol. Cell. Endocrinology 418, 298-305.

PIEPRZYK J., ZBELA A., JAKÓB M., OŻYHAR A., ORŁOWSKI M., 2014. *Homodimerization propensity of the intrinsically disordered N-terminal domain of ultraspiracle from Aedes aegypti.* Biochim. Biophys. Acta 1844, 1153-1166.

PONTING C. P., ARAVIND L., GIBSON T. J., ROB A, STILLMAN T. J., YOUNG M. W., WEITZ C. J., 1997. *PAS: a multifunctional domain family comes to light.* Curr. Biol. 7, R674-R677.

QUINN L. M., DORSTYN L., MILLS K., COLUSSI P. A., CHEN P., COOMBE M., ABRAMS J., KUMAR S., RICHARDSON H., 2000. *An essential role for the caspase dronc in developmentally programmed cell death in Drosophila.* J. Biol. Chem. 275, 40416-40424.

RAGHAVENDRA K., BARIK T. K., REDDY B. P. N., SHARMA P, DASH A. P., 2011. *Malaria vector control: from past to future.* Parasitol. Res. 108, 757-779.

RAIKHEL A. S., DHADIALLA T. S., 1992. *Accumulation of Yolk proteins in insect oocytes.* Ann. Rev. Entomol. 37, 217-251.

RAIKHEL A. S., KOKOZA V. A., ZHU J., MARTIN D., WANG S. F., LI CH., SUN G., AHMED A., DITTMER N., ATTARDO G., 2002. *Molecular biology of Mosquito vitellogenesis: from basic studies to genetic engineering of antipathogen immunity.* Insect Biochem. Mol. Biol. 32, 1275-1286.

RIDDIFORD L. M., 1993. *Hormone receptors and the regulation of insect metamorphosis.* Receptor 3, 203-209.

RIDDIFORD L. M., 2008. *Juvenile hormone action: a 2007 perspective.* J. Insect Physiol. 54, 895-901.

RIDDIFORD L. M., 2012. *How does juvenile hormone control insect metamorphosis and reproduction?* Gen. Comp. Endocrinol. 179, 477-484.

RIDDIHOUGH G., PELHAM H. R. B., 1987. *An ecdysone response element in the Drosophila Hsp27 promoter.* EMBO J. 6, 3729-3734.

ROWIŃSKA-ŻYREK M., WIĘCH A., WATŁY J., WIECZOREK R., WITKOWSKA D., OŻYHAR A., ORŁOWSKI M., 2019. *Copper(II)-binding induces a unique polyproline type II helical structure within the ion-binding segment in the intrinsically disordered F-domain of ecdysteroid receptor from Aedes aegypti.* Inorganic Chem. 58, 11782-11792.

ROY S., SAHA T. T., JOHNSON L., ZHAO B., HA J., WHITE K. P., GIRKE T., ZOU Z., RAIKHEL A. S., 2015. *Regulation of gene expression patterns in mosquito reproduction.* PLoS Genet. 11, 1-23.

RYMARCZYK G., GRAD I., RUSEK A., OSWIĘCIMSKA-RUSIN K., NIEDZIELA-MAJKA A., KOCHMAN M., OŻYHAR A., 2003. *Purification of Drosophila melanogaster ultraspiracle protein and analysis of its A/B region-dependent dimerization behavior in vitro.* Biol. Chem. 384, 59-69.

SELIGA J., BIELSKA K., WIECZOREK E., ORŁOWSKI M., NIEDENTHAL R., OŻYHAR A., 2013. *Multidomain sumoylation of the ecdysone receptor (EcR) from Drosophila melanogaster.* J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 138, 162-173.

SHIN S. W., ZOU Z., SAHA T. T., RAIKHEL A. S., 2012. *bHLH-PAS heterodimer of methoprene-tolerant and cycle mediates circadian expression of juvenile hormone-induced mosquito genes.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109, 16576-16581.

SHIN Y., BRANGWYNNE C. P., 2017. *Liquid phase condensation in cell physiology and disease.* Science 357, eaaf4382.

SIMONS S. S., EDWARDS D. P., KUMAR R., 2014. *Minireview: dynamic structures of nuclear hormone receptors: new promises and challenges.* Mol. Endocrinol. 28, 173-182.

SOROKIN A. V., KIM E. R., OVCHINNIKOV L. P., 2007. *Nucleocytoplasmic transport of proteins.* Biochemistry (Mosc.) 72, 1439-1457.

SUTHERLAND J. D., KOZLOVA T., TZERTZINIS G., KAFATOS, F. C., 1995. *Drosophila hormone receptor 38: a second partner for Drosophila Usp suggests an unexpected role for nuclear receptors of the nerve growth factor- induced protein B type.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 7966-7970.

SZAMBORSKA-GBUR A., RYMARCZYK G., ORŁOWSKI M., KUZYNOWSKI T., JAKÓB M., DZIEDZIC-LETKA A., GÓRECKI A., DOBRYSZYCKI P., OŻYHAR A., 2014. *The molecular basis of conformational instability of the ecdysone receptor DNA binding domain*

studied by in silico and in vitro experiments. PLoS One 9, e86052.

Talbot W. S., Swyryd E. A., Hogness D. S., 1993. *Drosophila tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms.* Cell 73, 1323-1337.

Tarczewska A., Wycisk K., Orłowski M., Waligórska A., Dobrucki J., Drewniak-Świtalska M., Berlicki Ł., Ożyhar A., 2020. *Nuclear immunophilin FKBP39 from Drosophila melanogaster drives spontaneous liquid-liquid phase separation.* Int. J. Biol. Macromol. 163, 108-119.

Theillet F. X., Kalmar L., Tompa P., Han K. H.., Selenko P., Dunker A. K., Daughdrill G. W., Uversky V. N., 2013. *The alphabet of intrinsic disorder.* Intrinsically Disord. Proteins 1, e24360.

Theopold U., Dal Zotto L., Hultmark D., 1995. *FKBP39, a Drosophila member of a family of proteins that bind the immunosuppressive drug FK506.* Gene 156, 247-251.

Thummel C. S., 1996. *Flies on steroids – Drosophila metamorphosis and the mechanisms of steroid hormone action.* Trends Genet. 12, 306-310.

Tompa P., 2011. *Unstructural biology coming of age.* Curr. Opin. Struct. Biol. 21, 419-425.

Tong M., Jang Y., 2015. *FK506-binding proteins and their diverse functions.* Curr. Mol. Pharmacol. 9, 48-65.

Truman J. W., Riddiford L. M., 2002. *Endocrine insights into the evolution of metamorphosis in insects.* Ann. Rev. Entomol. 47, 467-500.

Truman J. W., Talbot W. S., Fahrbach S. E., Hogness D. S., 1994. *Ecdysone receptor expression in the CNS correlates with stage-specific responses to ecdysteroids during Drosophila and manduca development.* Development 120, 219-234.

Tsetsarkin K. A., Kenney H., Chen R., Liu G., Manukyan H., Whitehead S. S., Laassri M., Chumakov K., Pletnev A. G., 2016. *A full-length infectious cDNA clone of zika virus from the 2015 epidemic in Brazil as a genetic platform for studies of virus-host interactions and vaccine development.* MBio 7, e01114-16.

Uversky V. N., 2002. *What does it mean to be natively unfolded ?* Eur. J. Biochem. 269, 2-12.

Venne A. S., Kollipara L., Zahedi R. P., 2014. *The next level of complexity: crosstalk of posttranslational modifications.* Proteomics 14, 513-524.

Wang J., Wang S., Li S., 2014. *Sumoylation modulates 20-hydroxyecdysone signaling by maintaining usp protein levels in Drosophila.* Insect Biochem. Mol. Biol. 54, 80-88.

Wang J. L., Saha T. T., Zhang Y., Zhang Ch., Raikhel A. S., 2017. *Juvenile hormone and its receptor methoprene-tolerant promote ribosomal biogenesis and vitellogenesis in the Aedes aegypti mosquito.* J. Biol. Chem. 292, 10306-10315.

Wang S. F., Miura K., Miksicek R. J., Segraves W. A., Raikhel A. S., 1998. *DNA binding and transactivation characteristics of the mosquito ecdysone receptor-ultraspiracle complex.* J. Biol. Chem. 273, 27531-27540.

Wang S., Baumann A., Wilson T. G., 2007. *Drosophila melanogaster methoprene-tolerant (Met) gene homologs from three mosquito species: members of PAS transcriptional factor family.* J. Insect Physiol. 53, 246-253.

Wang X., Hou Y., Saha T. T., Pei G., Raikhel A. S., Zou Z., 2017. *Hormone and receptor interplay in the regulation of mosquito lipid metabolism.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA114, E2709-E2718.

Więch A., Rowińska-Żyrek M., Wątły J., Czarnota A., Hołubowicz R., Szewczuk Z., Ożyhar A., Orłowski, M., 2019. *The intrinsically disordered C-terminal F domain of the ecdysteroid receptor from Aedes aegypti exhibits metal ion-binding ability.* J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 186, 42-55.

Więch A., Tarczewska A., Ożyhar A., Orłowski M., 2021. *Metal ions induce liquid condensate formation by the f domain of Aedes aegypti ecdysteroid receptor.* Cells 10, 571.

Wilson T. G., Fabian J., 1986. *A Drosophila melanogaster mutant resistant to a chemical analog of juvenile hormone.* Develop. Biol. 118, 190-201.

Wright P. E., Dyson H. J., 2015. *Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation.* Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 16, 18-29.

Wu D. Rastinejad F., 2017. *Structural characterization of mammalian BHLH-PAS transcription factors.* Curr. Opin. Struct. Biol. 43, 1-9.

Wu X. Cai Q., Feng Z., Zhang M., 2020. *Liquid-liquid phase separation in neuronal development and synaptic signaling.* Develop. Cell 55, 18-29.

Wycisk K., Tarczewska A., Kaus-Drobek M., Dadlez M., Hołubowicz R., Pietras P, Dziembowski A., Taube M., Kozak M., Orłowski M., Ożyhar A., 2018. *Intrinsically disordered N-terminal domain of the Helicoverpa armigera ultraspiracle stabilizes the dimeric form via a scorpion-like structure.* J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 183, 167-183.

Yao T. P., Forman B. M., Jiang Z., Cherbas L., Don Chen J., Mckeown M., Cherbas P., Evans R. M., 1993. *Functional ecdysone receptor is the product of EcR and ultraspiracle genes.* Nature 366, 476-479.

Zbinden A., Pérez-Berlanga M., De Rossi P., Polymenidou M., 2020. *Phase separation and neurodegenerative diseases: a disturbance in the force.* Develop. Cell 55, 45-68.

Zhang X., Li S., Liu S., 2022. *Juvenile hormone studies in Drosophila melanogaster.* Front. Physiol. 12, 2101.

Zhang Z., Xu J., Sheng Z., Sui Y., Palli S. R., 2011. *Steroid receptor Co-activator is required for juvenile hormone signal transduction through a bHLH-PAS transcription factor, methoprene tolerant.* J. Biol. Chem. 286, 8437-8447.

Zoglowek A., Orłowski M., Pakuła S., Dutko-Gwóźdź J., Pajdzik D., Gwóźdź T., Rymarczyk G., Wieczorek E., Dobrucki J., Dobryszycki P., Ożyhar A., 2012. *The composite nature of the interaction between nuclear receptors EcR and DHR38.* Biol. Chem. 393, 457-471.

Zou Z., Saha T. T., Roy S., Shin S. W., Backman T. W. H., Girke T., White K. P., Raikhel A. S., 2013. *Juvenile hormone and its receptor, methoprene-tolerant, control the dynamics of mosquito gene expression.* Proc. Natil. Acad. Sci. USA 110, E2173-E2181.

KOSMOS Vol. 71, 3, 225-242, 2022

MARTA KOLONKO-ADAMSKA, MAREK ORŁOWSKI, BEATA GREB-MARKIEWICZ

Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Department of Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Wrocław University of Science and Technology, 27 Wybrzeże Wyspiańskiego Str., 50-370 Wrocław, E-mail: beata.greb-markiewicz@pwr.edu.pl, marek.orlowski@pwr.edu.pl

ROLE OF KEY HORMONES AND THEIR RECEPTORS IN INSECTS DEVELOPMENT, ON THE EXAMPLE OF *Drosophila melanogaster* AND *Aedes aegypti*

Summary

Information about the body structure and activities of a living organism is stored in genes. Specific transcription factors are involved in the regulation of gene expression. They are responsible for receiving signals from outside the cell and transmitting them further by activating the transcription of appropriate sets of genes. Particularly during the development of the organism, hormones are the key signalling molecules, therefore it is very important to understand the mechanisms of hormone signalling and the expression of genetic information dependent on it. Model organisms are an excellent source of knowledge that allows us to understand many physiological processes occurring in the human body. It is worth noting that without painstaking scientific experiments carried out on organisms such as *Drosophila melanogaster* or *Aedes aegypti*, it would not be possible to learn and understand human hormone signalling. In-depth studies of the 20-hydroxyecdysone (20E) and juvenile hormone (JH) signalling pathways in both organisms help us to understand the molecular and genetic basis of signalling in multicellular organisms and to answer a question how signalling molecules guide the development of an embryo from a single cell to a mature organism.

Key words: EcR/Usp, Gce, 20-hydroxyecdyson, juvenile hormon, Met