



# Ref(2)P reglerar NF- $\kappa$ B-aktivitet i tarmen och behövs för bananflugans immunförsvar

*Fakulteten för naturvetenskaper och teknik  
Magisterprogram i biovetenskaper, huvudämne cellbiologi  
CB00BR56 Pro gradu-avhandling 30 sp*

Anna Dahlström, 1802054  
anna.dahlstrom@abo.fi

Handledare: Docent Annika Meinander, PhD

Bihandledare: Aravind Kumar Mohan

Åbo Akademi

November 2023

# Åbo Akademi

Fakulteten för naturvetenskaper och teknik

Anna Dahlström, 1802054

Pro gradu-avhandling 2023

## Ref(2)P reglerar NF- $\kappa$ B-aktivitet i tarmen och behövs för bananflugans immunförsvar

*Nyckelord:* antimikrobiella peptider, immunförsvar, Kenny, *Drosophila*, Imd-signaleringsräcka, NF- $\kappa$ B, Ref(2)P

---

*Drosophila melanogaster* eller bananflugans Ref(2)P deltar i regleringen av cellulära signaleringsräckor och autofagocytos genom att transportera ubikvitinerat material till autofagosomer för nedbrytning. I mitt pro gradu-projekt har jag undersökt om Ref(2)P deltar i regleringen av Imd-signaleringsräckan som är en av två NF- $\kappa$ B signaleringsräckor i bananflugan. Jag har kunnat visa att Ref(2)P behövs för en effektiv NF- $\kappa$ B-aktivering i tarmens epitel hos bananflugan efter infektion med gramnegativa bakterier eftersom uttrycket av antimikrobiella peptider som är NF- $\kappa$ B-målgener minskade hos Ref(2)P-flugmutanter. Därtill behövs Ref(2)P för att bananflugan skall överleva orala infektioner orsakade av gramnegativa bakterier. Kenny är bananflugans I- $\kappa$ B kinas gamma och är viktig för regleringen av Imd-signaleringsräckan. Nivåerna av Kenny har visats regleras av autofagi. Därför studerade jag om Ref(2)P reglerar Imd-signaleringsräckan och påverkar stabiliteten av Kenny. I det här pro gradu-projektet visades att Ref(2)P och Kenny kan samverka både i *Drosophila* S2-celler och i bananflugan. Däremot minskade Ref(2)P:s och Kennys samverkan efter gramnegativ bakterieinfektion eftersom Ref(2)P inte kunde binda till Kenny. Därmed föreslår jag att Kenny är ett målprotein för Ref(2)P och att Ref(2)P samverkar med Kenny för att bryta ned Kenny genom autofagi under normala förhållanden och att en minskad samverkan leder till ansamling av Kenny som främjar NF- $\kappa$ B-aktivitet under bakterieinfektion. Under denna studie undersökte jag även om förlust av Ref(2)P leder till minskad förmåga att aktivera inflammation. Jag kunde se att förlust av Ref(2)P påverkade bananflugans överlevnadsförmåga och därmed föreslås att Ref(2)P behövs för bananflugans immunförsvar.

## **Tackord**

Jag skulle vilja tacka min handledare Annika Meinander för att ha gett mig möjligheten att genomföra mitt pro gradu-projekt i hennes laboratorium och för givande handledning. Jag vill även tacka min praktiska handledare Aravind Kumar Mohan för all hjälp med utförandet av experiment och intressanta diskussioner kring detta projekt. Jag vill även rikta ett stort tack till alla medlemmar i Meinanders laboratoriegrupp för alla goda råd och en trevlig atmosfär att arbeta i.

## Innehållsförteckning

1. Inledning .....	5
2.1 Bananflugan som modellorganism.....	8
2.1.1 Bananflugans matspjälkningssystem .....	8
2.1.2 UAS-Gal4-systemet möjliggör vävnadsspecifikt genuttryck i bananflugan.....	11
2.2. Bananflugans immunförsvar .....	13
2.2.1 Vävnadsspecifikt immunförsvar i bananflugan .....	14
2.2.2 Fettkroppen producerar antimikrobiella peptider för att bekämpa infektion ....	15
2.2.3 Imd-signaleringsräckan .....	15
2.2.4 Kenny är en viktig reglerare av Imd-signaleringsräckan .....	18
2.2.5 Antimikrobiella peptider produceras som svar på infektion .....	19
2.3 Ubikvitinering reglerar Imd-signaleringsräckan .....	21
2.4 Autofagi-förmedlad lysosomal nedbrytning .....	23
2.5 Ref(2)P fungerar som en selektiv receptor för autofagi i bananflugan .....	24
2.5.1 p62 och Ref(2)P .....	24
2.5.2 Ref(2)P och Kenny samverkar via LIR-motiv .....	26
2.5.3 p62 i NF- $\kappa$ B-signaleringsväg .....	27
3. Målsättningar .....	28
4. Material och metoder .....	30
4.1 Bakterieodling .....	30
4.2 Uppfödning av flugor och bananflugans diet.....	30
4.4 Undersökning av samverkan mellan Ref(2)P och Kenny i S2-celler .....	32
4.4.1 Odling av S2-celler .....	32
4.4.2 Transfektion av S2-celler .....	32
4.5 Immunoprecipitering.....	34
4.5.1 Utvinna protein från fluglysat och lysat från flugtarmar .....	34
4.5.2 Immunoprecipitering av lysat från S2-celler.....	35
4.6.1 Behandling av antikroppsklädda agaroskolor .....	35
4.6.2 Inkubering och tvätt .....	36
4.6.3 Deubikvitinering av fluglysat.....	36
4.7 SDS-PAGE och transfer.....	37
4.8 Western blot analys .....	38
4.9 Bakterieinducering i flugor inför kvantitativ PCR-experiment .....	39

4.10 mRNA extrahering inför kvantitativ PCR-experiment .....	40
4.11 cDNA syntes inför kvantitativ PCR-experiment .....	41
4.12 Kvantitativ PCR .....	41
5. Resultat.....	43
5.1 Ref(2)P-proteinnivåerna ökar i bananflugan efter gramnegativ bakterieinfektion .....	43
5.1.1 Ref(2)P-proteinnivåerna ökar i vildtypsflugor efter <i>Ecc15</i> -bakterieinfektion..	43
5.1.2 Karakterisering av Ref(2)P-flugmutanter .....	44
5.1.3 Ref(2)P-nivåerna varierar i tarmen och fettkroppen hos Imd-signaleringsflugmutanter.....	45
5.2 Ref(2)P samverkar med Kenny i S2-celler .....	46
5.3 Ref(2)P samverkar med Kenny i bananflugan och deras samverkan minskar efter bakterieinfektion .....	48
5.4 Ref(2)P behövs för att överleva <i>Ecc15</i> -bakterieinfektion i bananflugan.....	50
5.5 Ref(2)P:s PB1-och UBA-domän behövs för att bekämpa <i>Ecc15</i> -bakterieinfektion i bananflugan.....	51
6. Diskussion.....	55
6.1 Avsaknad av domänstruktur i Ref(2)P-proteiner kan orsaka proteininstabilitet..	55
6.2 Ref(2)P-domänerna behövs för att reglera Relish aktivitet.....	56
6.3 Ref(2)P:s roll som selektiv receptor för autofagi i bananflugan .....	58
6.4 Ref(2)P-Kenny samverkan är inte K63- eller M1-ubikvitinberoende .....	60
7 Avslutning .....	63
8. Appendix .....	66
Buffertar och kemikalier .....	66
9. Litteraturlista .....	68

## LISTA ÖVER FÖRKORTNINGAR

Förkortning	Engelskt ursprung	Svensk motsvarighet
AMP	Antimicrobial peptide	Antimikrobiell peptid
AMSH	Associated molecule with the SH3 domain of STAM	Associerad molekyl SH3-innehållande domän av STAM
aPKC	Atypical protein kinase C	Atypiskt proteinkinase C
DED	Death Effector Domain	Dödseffektordomän
Diap2	<i>Drosophila</i> Inhibitor of Apoptosis 2	<i>Drosophila</i> inhibitor av apoptos 2
Dif	Dorsal-related immunity factor	Dorsal-relaterad immunfaktor
Dredd	Death-related Ced3/Nedd2-like caspase	Dödsrelaterat Ced-3/Nedd2-lik kaspas
dTAK	<i>Drosophila</i> TGF- $\beta$ -activated kinase	<i>Drosophila</i> TGF- $\beta$ aktiverande kinas-1
<i>Ecc15</i>	<i>Erwinia carotovora carotovora 15</i>	<i>Erwinia carotovora carotovora 15</i>
ECL	Enhanced chemiluminescence by luminol	Förstärkt kemiluminiscens genom luminol
Fadd	Fas-associated Death Domain protein	Fas-associerat protein dödsdomän
FBS	Fetal Bovine Serum	Fetalt kalvserum
GABARAP	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein	Gammaaminosmörtsyreceptor associerat protein
Gal4		Jästtranskription aktivator protein 4
GFP	Green fluorescent protein	Grönt fluorescerande protein
IKK	I $\kappa$ B kinase	I-KappaB-kinase (I $\kappa$ B)
Imd	Immunodeficiency	Immunbrist
Ird5	Immune response deficient	Immunresponsnedsatt 5
LIR	LC3-interacting region	LC3-samverkande region
MAP1LC3	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B	Mikrotubuli associerat protein 1A/1B ljuskedja 3B
<i>M. luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
MT	Metallotionein	Metallotionein
NEMO	NF- $\kappa$ B essential modulator	NF- $\kappa$ B-essentiell modulerare
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor $\kappa$ -light-chain enhancer of activated B cells	Nuklär factor kappa-lättkedjeförstärkare av aktiverande B-celler
NOD2	Nucleotide-binding oligomerization domain-2	Nukleotidbindande oligomeriseringsdomän innehållande protein-2

<b>Förkortning</b>	<b>Engelskt ursprung</b>	<b>Svensk motsvarighet</b>
OD	Optical density	Optisk täthet
OTULIN	Ovarian tumour DUB with linear linkage specificity	
PB1	Phox and Bem1p-1	Phox och Bem1p-1
PGRP	Peptidoglycan-recognition protein	Peptidoglykanigenkännande protein
q-PCR	Quantitative real-time polymerase chain reaction	Kvantitativ polymeraskedjereaktion
Ref(2)P	Refractory (2) to sigma P	Okänslig (2) för sigma P
RO-vatten	Reverse osmosis	Vatten renat genom omvänt osmos
S2-celler	Schneider2-cells	Schneider2-celler
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate	Natriumdodecylsulfat
SQSTM1/p62	Sequestosome-1	Sekvestom-1
Tab2	TAK1 binding protein 2	Tak1-associerat bindningsprotein 2
Tak1	Transforming growth factor- $\beta$ activated kinase 1	Transformerande tillväxtfaktor $\beta$ aktiverat kinas 1
TNF	Tumour necrosis factor	Tumörnekrosfaktor
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6	TNF receptor associerad faktor-6
UAS	Upstream activating sequence	Uppströmsaktiverande sekvens
UBA	Ubiquitin-associated domain	Ubikvitinbinande domän
ZZ	Zink finger domain	ZZ-typens zinkfinger

## 1. Inledning

Immunförsvaret fungerar som kroppens försvar mot sjukdomar och infektioner. Vårt immunförsvar är sammansatt av molekyler, celler och vävnader och deras uppgift är att upptäcka ämnen som skiljer sig från friska vävnader för att motverka skada i cellen. Detta immunförsvar fungerar som respons mot skadliga mikroorganismer eller molekyler som sammankopplas med fara. Om dessa patogener lyckas tränga sig in, aktiveras immunceller och det leder till en immunrespons hos organismen. Det medfödda immunförsvaret kallas även för det ospecifika immunförsvaret och är en viktig del av kroppens immunförsvar och arbetar tillsammans med det adaptiva immunförsvaret. Tillsammans skapar de ett effektivt försvarssystem för att skydda kroppen mot infektioner och sjukdomar. Det medfödda immunförsvaret är kroppens första försvarslinje mot bakterier och främmande ämnen och aktiveras genast som svar mot en infektion. Till skillnad från det medfödda immunförsvaret aktiveras det adaptiva immunförsvaret långsammare eftersom det adaptiva immunförsvaret kan identifiera bakterier och aktivera en specifik immunrespons hos organismen. Dessutom förmår det adaptiva immunförsvaret att memorera och anpassa sig efter sjukdomar och patogener organismen tidigare utsatts för. Om immunförsvaret inte fungerar korrekt kan det leda till olika sjukdomar, såsom autoimmuna sjukdomar eller immunbristsjukdomar. Kännetecknande för autoimmuna sjukdomar är att kroppens immunförsvar börjar attackera kroppens friska celler och immunbristsjukdomar uppstår då immunförsvaret inte är tillräckligt effektivt för att skydda kroppen mot infektioner (Hoffmann & Reichhart 2002; Hoffmann, 2003; Nicholson, 2016; Jang et al., 2022).

Det medfödda immunförsvaret har studerats i olika arter av organismer eftersom det inte alltid är möjligt både av etiska och praktiska skäl att utföra denna typ av forskning i däggdjur. Bananflugan har använts som modellorganism för att studera det medfödda immunförsvaret sedan år 1996 då Toll-signaleringsräckan upptäcktes reglera genuttrycket av den antimikrobiella peptiden Drosomycin (Hoffmann & Reichhart, 2002; Kenmoku et al., 2017). Bananflugan saknar ett adaptivt immunförsvar men har i stället ett effektivt medfött immunförsvar. Det medfödda immunförsvaret aktiveras när mikroorganismer lyckas tränga sig genom bananflugans kroppshåla och vid



kontakt med inre epitel. Detta orsakar en vävnadsspecifik aktivering och en immunrespons som snabbt kan ta död på bakterier. Nukleär faktor-kappa B (NF- $\kappa$ B) är en viktig transkriptionsfaktor och kan aktivera det medfödda immunförsvaret i bananflugan. NF- $\kappa$ B är en transkriptionsfaktorfamilj, vars uppgift är att kontrollera flera fysiologiska processer i cellen, bland annat celldelning, överlevnad, motverka apoptos och delta i aktiveringen av inflammatoriska responser vid infektion. En felaktivering av NF- $\kappa$ B kan orsaka kronisk inflammation och cancer (Liu et al., 2017). Det medfödda immunförsvaret mot patogener hos bananflugan utgörs huvudsakligen av två välstuderade NF- $\kappa$ B-signaleringsräckor; Immunbrist (eng. immunodeficiency pathway, Imd) - och Toll-signaleringsräckan. Båda NF- $\kappa$ B-signaleringsräckorna kännetecknas av aktivering av transkriptionsfaktorn NF- $\kappa$ B som reglerar produktionen och utsöndringen av antimikrobiella peptider (Dionne, 2014). Antimikrobiella peptider har en viktig funktion i det medfödda immunförsvaret med svampdödande eller antibakteriell aktivitet (Hanson et al., 2019b). Bananflugans immunsignaleringsräckor är väl bevarade genom evolutionens gång och deras funktionsprinciper kan därför ge oss en bättre förståelse av hur människans medfödda immunförsvaret fungerar (Nehme et al., 2007; Ugur et al., 2016).

Det är viktigt att celler kan återvinna cellulärt material. För att upprätthålla en cellulär balans behöver celler kunna samla in och bryta ner skadligt material, samt transportera det till lysosomen för nedbrytning. Detta sker genom en process som kallas autofagi. Autofagi deltar i olika cellulära processer och reglerar bland annat, cellulär tillväxt, differentiering och aktivering av det medfödda immunförsvaret (Nezis, 2012; Liu et al., 2016; Rahman et al., 2022). Selektiv autofagi deltar även i regleringen av NF- $\kappa$ B-signaleringsräckans proteinmängd. För att förhindra att det uppstår fel i immunförsvaret behöver I-KappaB-kinas (IKK)-proteinet Kenny och dess ubikvitineringsnoga regleras (Tusco et al., 2017; Aalto et al., 2019). Okänslig (2) för sigma P (eng. Refractory (2) to sigma P, Ref(2)P) har visats kunna binda till skadade proteiner och transportera dem till autofagosomen för nedbrytning (Wurzer et al., 2015; Tusco et al., 2017). Min hypotes för min pro gradu-avhandling var att Ref(2)P binder till nyckelregleraren Kenny för att förhindra att NF- $\kappa$ B signaleringsräckan aktiveras under normala förhållanden. Därmed var målsättningarna för mitt pro gradu-projekt att undersöka huruvida det autofagireglerande proteinet Ref(2)P förmår att reglera vilka proteiner som bryts ned under både normala förhållanden och vid

inflammation i bananflugan. Dessutom undersöktes om Ref(2)P är kopplat till tarmens immunförsvar. Målsättningarna för detta projekt uppnåddes genom att identifiera att Ref(2)P behövs för att reglera NF- $\kappa$ B-aktivitet i bananflugans tarm. Detta projekt kan bidra till en bättre förståelse hur immunsignalering regleras i bananflugans tarm, rollen för selektiv autofagi och nya funktioner för kaspasförmedlad reglering i bananflugan.

## 2. Litteraturöversikt

### 2.1 Bananflugan som modellorganism

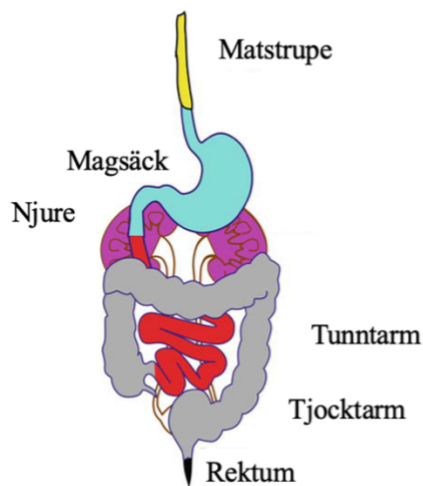
*Drosophila melanogaster*, eller bananflugan, har sedan början av 1900-talet använts som modellorganism inom biologisk forskning (Jennings, 2011). Historiskt sätt har bananflugan hjälpt oss att förstå kromosomernas funktion och delar av immunförsvaret (Morgan et al., 1915; Hoffmann & Reichhart 2002; Hoffmann, 2003). Upptäckter i bananflugan har tilldelats Nobelpris i fysiologi och medicin fem gånger. För att nämna några exempel: Thomas Morgans tilldelades Nobelpris år 1933 för sin upptäckt att arvsanlagen i bananflugan är lokaliserade i kromosomerna, Hermann Muller tilldelades Nobelpris år 1946 för sin upptäckt att röntgenstrålning framkallar mutationer och dessa kan gå i arv i bananflugan och Jules Hoffmann tilldelades Nobelpris år 2011 för sina upptäckter om det medfödda immunförsvaret (All Nobel Prized in Phsysiology or Medicin, 2023). Bananflugan har en kort generationstid och trots sin lilla storlek har den en relativt komplex anatomi och ett väletablerat genetiskt system vars genom är fördelat på fyra kromosomer (Jennings, 2011; Ugur et al., 2016; Yamaguchi & Tosida, 2018). Dessutom kräver bananflugan inte mycket utrymme och kan producera en riklig avkomma. En annan fördel är att bananflugan delar ett stort antal besläktade gener med människan. Det har visats att cirka 65 % av de gener som kodar för mänskliga sjukdomar har en funktionell homolog i bananflugan. Bananflugan är även en relativt enkel modell att utnyttja för att studera grundläggande biologiska processer såsom molekylära och cellulära mekanismer av mänskliga sjukdomar. Det gör det möjligt att studera genetiska interaktioner och specifika genuttryck i vävnader hos bananflugan. Bananflugans genom är dessutom relativt enkelt att manipulera och genetiska variationer kan induceras genom att skapa mutationer i flugans genom (Apidianakis & Rahme, 2011; Ugur et al., 2016). Därför är bananflugan en lämplig modellorganism att använda för att förstå samverkan mellan bakterier och immunförsvaret i människans tarm.

#### 2.1.1 Bananflugans matspjälkningsystem

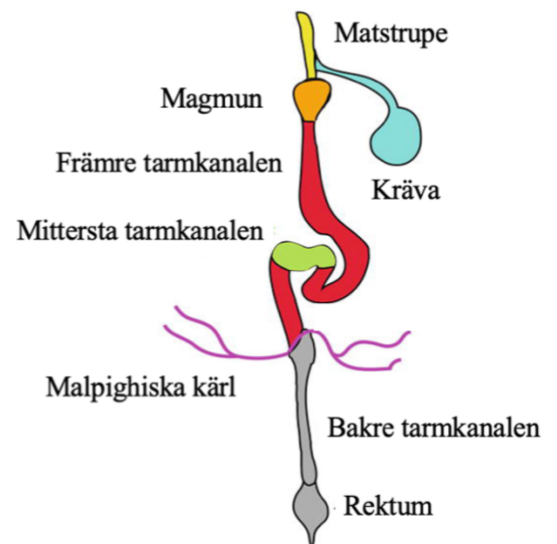
Bananflugan har ett liknande matspjälkningsystem som människan (figur 1). Matstrupens uppgift hos däggdjur är att föra vidare den konsumerade maten till magsäcken, där maten lagras. Magsäckens främsta uppgift är att bryta ned födan innan

den avancerar till tunntarmen. Matspjälkningen fortsätter och näringsupptaget sker i tunntarmen medan absorptionen av elektrolyter, näringsämnen och vatten sker i tjocktarmen som slutligen mynnar ut i rektum (Thompson & Malagelda, 1981; Apidianakis & Rahme, 2011). I bananflugan sker nedbrytningen av födan och näringsupptaget främst i den främre delen av den mittersta tarmkanalen. Den mittersta tarmkanalen kantas av epitelceller (figur 2). Tarmkanalen innehåller ett stort antal symbiotiska bakterier som är viktiga under matspjälkningen och för näringsupptaget i bananflugan. Efter att maten passerat den mittersta tarmkanalen, absorberas ytterligare elektrolyter, näringsämnen och vatten genom den bakre tarmkanalen och ändtarmen innan avfallsprodukter utsöndras genom rektum. Mellan den mittersta- och bakre tarmkanalen i bananflugan finns Malpighiska kärl. De Malpighiska kärlen påminner till funktionen om däggdjurs njurar. De Malpighiska kärlens främsta funktion är att absorbera lösta ämnen och vatten från hemolymfan för att frigöra dem i tarmen i form av fasta kväveföreningar (Apidianakis & Rahme, 2011; Musselman & Kühnlein, 2018).

### A) Människans tarm



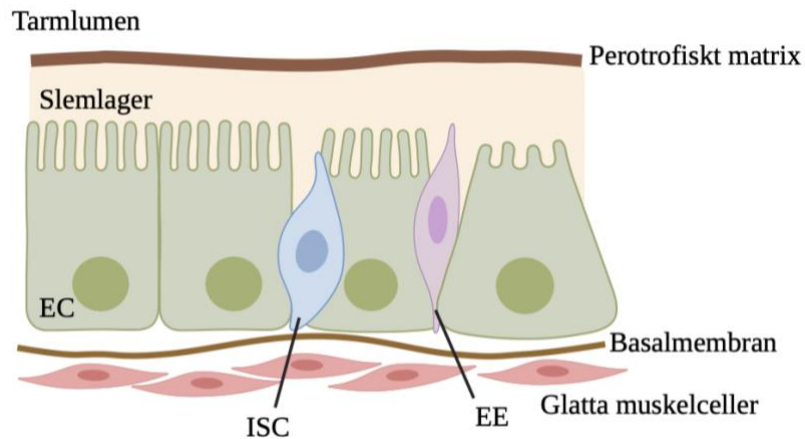
### B) Bananflugans tarm



**Figur 1. Likheter mellan människans och bananflugans tarm.** (A) Uppbyggnaden av människans tarmsystem. Figuren presenterar de olika delarna av människans tarmsystem. Människans tarmsystem består av matstrupen, magsäcken, njurarna och tarmkanalen som är indelad i tunntarm, tjocktarm och rektum. (B) Bananflugans tarmsystem består av en matstrupe, en kräva och en magmun. Tarmen är indelad i främre-, mittersta- och bakre tarmkanalen och rektum (figuren modifierad från Apidianakis & Rahme, 2011).

Tarmen är ett viktigt organ och fungerar som en barriär mellan organismens inre epitel och dess levnadsmiljö. Dessutom deltar tarmen i regleringen av bananflugans

ämnesomsättning. Bananflugans och människans tarm har liknande struktur och funktion, både på cellulär och molekylär nivå (figur 1) (Nehme et al., 2007; Shin et al., 2022). Tarmepitelet i bananflugan är sammansatt av olika celltyper med specialiserade funktioner (figur 2). En skillnad mellan människans och bananflugans tarm är att bananflugans mittersta- och bakre tarmkanal saknar kryptor. I stället för kryptor har tarmen en rörlignande struktur som omges av ett monolager av epitelceller. Detta monolager består av fyra celltyper: tarmstamceller och enteroblastor som vidare kan differentiera till absorberande enterocyter eller sekretoriska enteroendokrina stamceller. Vid normala förhållanden förnyas epitel-skiktet i tarmen för att upprätthålla vävnadshomeostas genom naturlig apoptos (Takeishi et al., 2013). Tarmstamcellernas främsta funktion är att konstant differentiera och utvecklas till nya specialiserade celler, såsom absorberande enterocyter och enteroendokrina stamceller. Notch-signaleringsräckan styr tarmstamcellerna genom att reglera differentieringen av enteroblastor och enteroendokrina stamceller. En stark Notch-signalering styr differentieringen av enteroblasterna till absorberande enterocyter medan vid en svag Notch-signalering differentieras enteroblasterna till enteroendokrina stamceller (Zeng et al., 2010; Kuriishi et al., 2013). Absorberande enterocyter hjälper till att absorbera näringsämnen i tarmen medan huvudfunktionen för de enteroendokrina stamcellernas är att frisätta hormoner för att förbättra tarmens funktion och rörlighet (Sadaqat et al., 2022). Studier kring bananflugans tarm har bidragit till en bättre förståelse kring tarmens fysiologi, utnyttjandet av näringsämnen och interaktioner mellan tarmmikrober och värdorganismen (Apidianakis & Rahme, 2011). Störningar i tarmens epitelhomeostas är ofta associerat med inflammatoriska sjukdomar och cancer (Shin et al., 2022). Därför är det viktigt att förstå mekanismerna bakom proliferation, differentiering och hur förnyelse av tarmens epitel regleras.



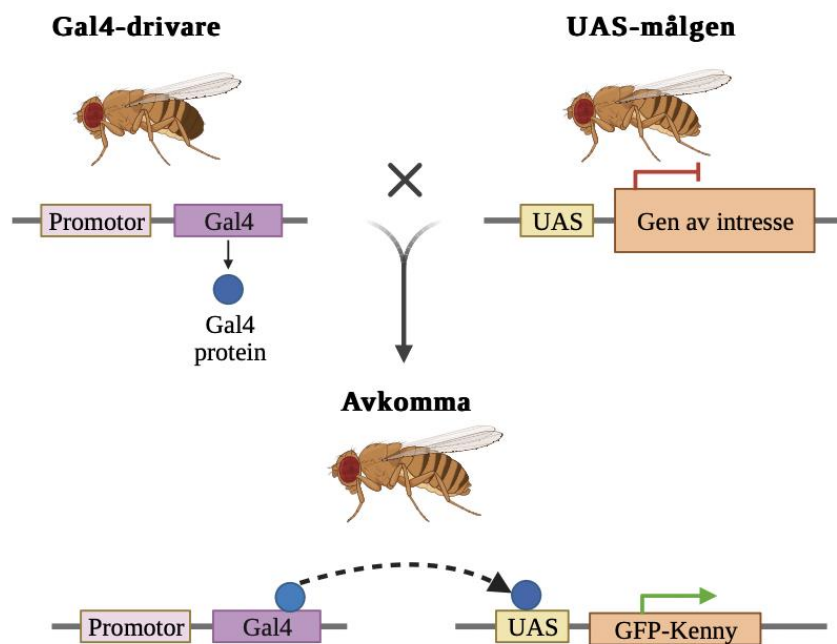
**Figur 2. Tarmepitelet i bananflugans mittersta tarmkanal.** Figuren visar de olika celltyperna representerade i bananflugans mittersta tarmkanal. I figuren presenteras bananflugans perotrofiskt matrix, slemlager, absorberande enterocyter (EC) med mikrovilli, stamceller, intestinala stamceller (ISC), sekretoriska senteroendokrinaceller (EE) och under basalmembranet finns glatta muskelceller. Figuren är skapad i Biorender.com

### 2.1.2 UAS-Gal4-systemet möjliggör vävnadsspecifikt genuttryck i bananflugan

UAS-Gal4-systemet är en metod som kan utnyttjas i bananflugan för att reglera uttrycket av en specifik gen i en specifik vävnad. Det är ett användbart system för att studera effekten av specifika genuttryck utan att samtidigt påverka andra cellulära processer i bananflugan (Liu & Lehmann 2008). UAS-Gal4-systemet gör det även möjligt att studera interaktioner mellan två eller flera proteiner (Busson & Pret, 2007). År 1988 upptäckte Kakidani och Ptashne att Gal4-proteinet kan binda till UAS-kopplade gensekvenser och aktivera ett specifikt genuttryck i bananflugan (Kakidani & Ptashne 1988). Några år senare började metoden utnyttjas för att studera genuttryck i bananflugan (Duffy, 2002). UAS-Gal4-systemet består av två delar, en Gal4-gen som kodar för jäst transkriptions-aktivator proteinet Galaktos (Gal4) och en uppströmsaktiverande sekvens (UAS, från engelskans Upstream Activation Sequence). UAS-regionen fungerar som en förstärkare som Gal4-proteinet kan binda till för att aktivera gentranskription (Brad & Perrimon, 1993). Gal4 är ett protein från jäst och består av en DNA-bindande domän och en aktiverande domän. Trots att Gal4 är ett jästprotein har man kunnat visa att det kan aktivera transkription i olika organismer, både i bananflugan och i mänskliga celler. Detta tyder på att likande

mekanismer för genuttryck har bevarats över evolutionens gång (Busson & Pret, 2007; Yamaguchi & Yoshida, 2018).

Det är möjligt att skapa UAS-Gal4-fluglinjer som uttrycker Gal4 i hela organismen eller i vävnader och organ såsom i nerver eller i tarmen. För att utnyttja UAS-Gal4-systemet på detta sätt behövs en känd promotor som kan reglera uttrycket av Gal4, en så kallad Gal4-drivare. Då bananflugor som bär på UAS-promotorn och korsas med en Gal4-drivare kan uttrycket av gener drivas i hela flugan eller i specifika vävnader. Gal4-transkriptionsfaktorn kan därmed aktivera transkriptionen av målgenerna genom att binda till den cis-reglerande enheten vid UAS-regionen som finns kopplad bredvid genen av intresse (figur 3). När drivargenen är aktiv uttrycks Gal4-proteinet i cellerna och gentranskription aktiveras. En synlig markör, till exempel, grönt fluorescerande protein (GFP), kan användas som markör för att avgöra om cellerna uttrycker Gal4-protein (Duffy, 2002; Yamaguchi & Yoshida, 2018).



**Figur 3. UAS-Gal4-systemet reglerar vävnadsspecifikt genuttryck i bananflugan.** Jästtranskriptionsfaktorn Gal4 har förmågan att aktivera UAS-förstärkare och används för att kontrollera uttrycket av målgener. UAS aktiveras när Gal4 binder till UAS-regionen. Med hjälp av UAS-Gal4-systemet kan genaktiviteten i specifika utvecklingsstadium, celler och vävnader regleras. I den här studien användes bananflugor som överuttrycker Kenny. Kenny var kopplat till grönt fluorescerande protein (GFP) (Yamaguchi & Yoshida, 2018). Figuren är skapad med programvaran Biorender.com.

## 2.2. Bananflugans immunförsvar

I likhet med människan har bananflugan utvecklat ett välfungerande immunsystem. Immunförsvaret i bananflugan är sammansatt av olika vävnadstyper inklusive tarmen, fettkroppen och hemocyter (Buchon et al., 2014). Bananflugan kan naturligt infekteras via födan av till exempel bakterier, svamp och virus. Hans Boman med flera (1972) upptäckte ett inducerbart antibakteriellt immunförsvar hos bananflugan. Denna upptäckt har resulterat i att bananflugan börjat utnyttjas för att studera infektionssjukdomar (Hoffmann & Reichhart, 2002). Till skillnad från människan har bananflugan endast ett medfött immunförsvar och saknar det adaptiva immunförsvaret. Eftersom bananflugan saknar ett adaptivt immunförsvar kan den inte producera antikroppar och minnesceller för att försvara sig mot skadliga mikroorganismer eller molekyler (Jang et al., 2022). Bananflugans respons mot infektioner som orsakats av mikroorganismer är en process i flera steg, och resulterar slutligen i transkription och utsöndring av specifika gener (DiAngelo et al., 2009; Dionne 2014). Den fysiska barriären utgörs av epitelet och representerar den första försvarslinjen mot mikroorganismer. Det medfödda immunförsvaret aktiveras när mikroorganismer lyckas tränga genom bananflugans kroppshåla och samverka med epitelet. I början av 1990-talet upptäcktes transkriptionsfaktorn NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B har en viktig funktion vid regleringen av bananflugans immunförsvar (Hetru & Hoffmann, 2009). Bananflugans genom kodar för tre NF- $\kappa$ B-transkriptionsfaktorer, Dorsal-relaterad immunfaktor (Dif), Dorsal och Relish. Både Dif och Dorsal är homologer till däggdjurens Rel A och B samt c-Rel medan Relish är homolog till däggdjurens p100 och p105. Bananflugans tre NF- $\kappa$ B-gener reglerar, bland annat uttrycket av antimikrobiella peptider och proteiner (Hoffmann, 2003).

Olika patogener kan framkalla en reaktion och aktivera två NF- $\kappa$ B immunsigaleringsräckor, Imd- och Toll-sigaleringsräckan i bananflugan (Leclerc & Reichhart, 2004; DiAngelo et al., 2009; Tanji et al., 2010; Dionne 2014). Gemensamt för båda NF- $\kappa$ B-sigaleringsräckorna är att de kan reglera uttrycket av gener genom att peptidoglykanigenkännande proteiner (PGRP) kan urskilja olika strukturer hos bakteriella peptidoglykan. Dessa PGRP:s är väl bevarade från insekter till däggdjur och antas vara den huvudsakliga regleraren för en nedströms aktivering av sigaleringsräckor och proteolytiska kaskader (Vaz et al., 2019). I bananflugan har det



hittills identifierats två olika PGRP-receptorer: PGRP-LC och PGRP-LE som aktiverar Imd-signaleringsräckan. Imd-signaleringsräckan aktiveras när diaminopimelisyra (DAP)-peptidolglykaner från gramnegativa bakterier binder till PGRP-receptorer, vilket främjar aktiveringen av Imd-signaleringsräckan. Till skillnad från Imd-signaleringsräckan aktiveras Toll-signaleringsräckan som respons mot grampositiva bakterie- och svampinfektioner. Både Imd- och Toll-signaleringsräckan aktiverar transkriptionen av olika målgener, vilket kan tyda på att signaleringsräckorna är oberoende av varandra (Buchon et al., 2009a; Fukuyama et al., 2013; Myllymäki et al., 2014; Vaz 2019).

### 2.2.1 Vävnadsspecifikt immunförsvar i bananflugan

Tack vare metoder och tekniker som har utvecklats är bananflugans tarm en relativt simpel modell att använda för att studera lokala immunresponser (Nehme et al., 2007). I likhet med människan har bananflugan en naturlig bakterieflora i tarmen. Tarmen exponeras konstant för patogener och för att upprätthålla homeostas behöver tarmepitelet konstant förnyas. I tarmen finns det ett peritrofiskt membran som hjälper till att binda mikrober för att förhindra dem från att komma i kontakt med den mittersta- och bakre tarmkanalen (figur 2). Enterocyterna ansvarar för utsöndringen av antimikrobiella peptider i bananflugans tarm (Apidianakis & Rahme, 2011). Studier har visat att det sker förändringar i genuttryck i tarmen som svar på infektion. Bananflugans tarmimmunförsvar består förutom av produktion av antimikrobiella peptider även av tre andra komponenter: produktion av reaktiva syreradikaler (ROS), en fysikalisk barriär såsom det peritrofiska matrixet och förnyelse av epitelceller i tarmen. Dessa fyra komponenter behövs för att upprätthålla tarmhomeostasen och i kombination med bananflugans tarmlumen bidrar de till en fientlig miljö för mikrober (Buchon et al., 2009a; Buchon et al., 2009b; Bonnay et al., 2013). Genetiska analyser har visat att tarmimmunförsvaret i bananflugan främst regleras av utsöndring av antimikrobiella peptider som kontrolleras av Imd-signaleringsräckan och av en snabb frisättning av ROS med hjälp av nikotinamidebubdunukleotidfosfat (NADPH)-oxidasenzymet dubbeloxidas (Duox) (Buchon et al., 2009a). ROS och antimikrobiella peptider anses vara komplementära och antimikrobiella peptider behövs för att kontrollera ROS-resistenta bakterier (Kim & Lee 2014). Flugor med reducerad Duox-aktivitet har visats vara känsligare för tarminfektioner, vilket tyder på att produktionen

av ROS är viktigt för att upprätthålla tarmhomeostas (Ha et al., 2005; Buchon et al., 2014).

### 2.2.2 Fettkroppen producerar antimikrobiella peptider för att bekämpa infektion

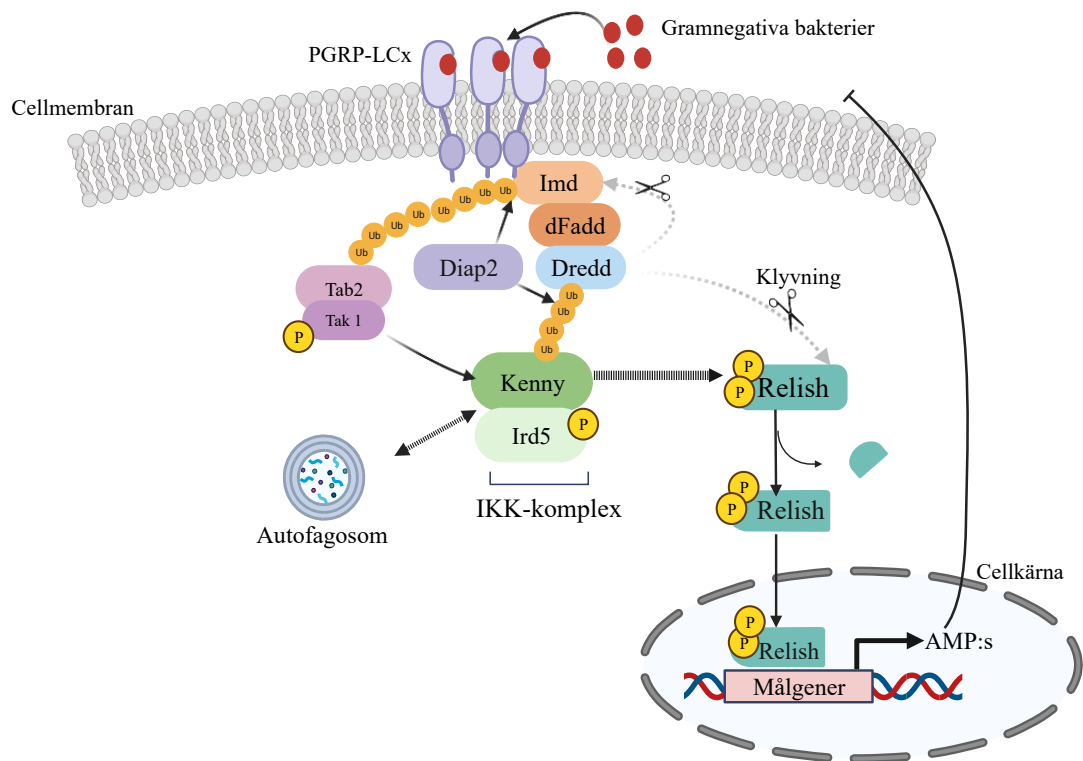
För att bekämpa patogener som lyckats tränga sig igenom epitelytan och invadera kroppen, har bananflugan ett organ som kan bekämpa infektioner, nämligen fettkroppen. Om patogener inte bekämpas av epitelceller leder det till en så kallad systematisk immunrespons, som drivs av hemocyter i fettkroppen (Lemaitre & Hoffmann 2007). Fettkroppen är ett organ med flera funktioner och har en central roll vid regleringen av bananflugans ämnesomsättning och fungerar som primär lagring av fett (Musselman et al., 2013; Musselman & Kühnlein, 2018). Som svar på infektion samverkar fettkroppen med patogener och justerar metaboliska processer genom att, bland annat, reglera nettoenergilansen i bananflugan (Lemaitre & Hoffmann 2007; DiAngelo et al., 2009; Martínez et al., 2020).

Det humoral immunförsvaret i bananflugan regleras även av fettkroppen och baserar sig på att PGRP:s känner igen mikrober och aktiverar en av bananflugans två immunsignaleringsräckor, Toll- eller Imd-signaleringsräckan som resulterar i produktion och utsöndring av antimikrobiella peptider genom hemolymfan (DiAngelo et al., 2009). Hos däggdjur regleras denna process i två olika celltyper av adipocyter och makrofager (Vaibhvi et al., 2022).

### 2.2.3 Imd-signaleringsräckan

För att upprätthålla cellulär homeostas måste Imd-signaleringsräckan vara noggrant reglerad i olika vävnader. Bananflugans Imd-signaleringsräcka delar likheter med däggdjurens tumörnekrosfaktorreceptor (TNFR) -signaleringsräckan och nukleotidbindande oligomeriseringsdomäninnehållande protein 2 (NOD2) -signaleringsräckan. NF- $\kappa$ B behövs för regleringen av det medfödda immunförsvaret hos både däggdjur och insekter. I bananflugan ansvarar Imd-signaleringsräckan för aktiveringen av NF- $\kappa$ B-transkriptionsfaktorn Relish. Imd-signaleringsräckan kan

endast aktiveras av DAP-peptidoglykan som är beroende av PGRP:s, vars uppgift är att känna igen gramnegativa bakterier (Gosh et al., 1998; Kaneko & Silverman, 2005; Fukuyama et al., 2013). När DAP-peptidoglykan från gramnegativa bakterier binder till PGRP-LC eller PGRP-LE receptorer vid cellmembranet leder det till en nedströmsaktivering av ett signaleringskomplex. Detta signaleringskomplex består av dödsdomäninnehållande protein (Imd), Fas-associerat protein med dödsdomän (FADD) och kaspas-8 homologen dödsrelaterat Ced-3/Nedd2-lik kaspas (Dredd) (Hu & Yang, 2000; Georgel et al., 2001; Fukuyama et al., 2013). Dredd är ett kaspasprotein och har åtminstone två viktiga funktioner i Imd-signaleringsräckan, att klyva Imd-proteinet och klyva transkriptionsfaktorn Relish (Paquette et al., 2014; Kim et al., 2014). Dredd aktiveras då E3 ligaset *Drosophila* inhiberare av apoptos 2 (Diap2) tillsätter K63-ubikvitinkedjor på Dredd, vilket aktiverar Dredds katalytiska förmåga (Meinander et al., 2012). När Dredd aktiveras klyver Dredd en 30 aminosyror lång sekvens vid den N-terminala delen av Imd-proteinet, och Diap2 binder sedan till den C-terminala delen av Dredd (Kim et al., 2014). Detta stimulerar en Diap2-medierad Lysin-63 (K63) -kopplad ubikvitinering av Imd, Dredd och I-KappaB-kinas (IKK)-komplexet (figur 4). Ubikvitinkedjorna på Imd och Dredd antas även erbjuda ett bindningsställe för TGF- $\beta$ -aktiverat kinas 1/TAK1-förknippat bindningsprotein 2 (Tak1/Tab2) -komplexet (Silverman et al., 2000; Paquette et al., 2010; Kleino & Silverman 2019). Efter att Tab2/Tak1-komplexet rekryterats antas det fosforylera och aktivera IKK-komplexet (Silverman et al., 2000). IKK-komplexet är uppbyggt av två proteiner, Ird5 (eng. immune response deficient 5) och Kenny där båda proteinerna fungerar som bananflugans homologer till däggdjurens IKK $\beta$  och IKK $\gamma$ . Tak1 antas fosforylera Ird5 och aktiverar dess kinasaktivitet. Därefter kan Ird5 fosforylera Relish vid Relish N-terminala ända. Relish klyvs sedan genom proteolytisk klyvning som utförs av Dredd. Den inhiberande C-terminala delen av Relish behöver klyvas bort för att Relish skall kunna translokera till cellkärnan. Den klyvda C-terminala delen av Relish stannar i cytoplasman där den bryts ned (Stöven et al., 2000; Ertürk-Hasdemir et al., 2009). När Relish translokerat till cellkärnan aktiveras målgener för Imd-signaleringsräckan, vilket resulterar i transkriptionen av antimikrobiella peptider, såsom Diptericin och uttryck av cytokiner (figur 4) (Fukuyama et al., 2013; Tsapras et al., 2021; Jang et al., 2022).



**Figur 4. Imd-signaleringsräckan aktiveras som svar på gramnegativ bakterieinfektion genom att gramnegativa bakterier binder till transmembranproteinet PGRP-LCx. Detta leder till aktivering av ett signaleringskomplex som består av ett dödsdomänprotein, dFADD och kaspaset Dredd. Dredd måste aktiveras för att klyva Relish, och det sker genom att Diap2, ett E3 ligas som tillsätter ubikvitinkedjor till Dredd och Dredds katalytiska förmåga aktiveras. Kluvet Relish kan förflyttas till cellkärnan och aktivera immungener, såsom antimikrobiella peptider (AMP:s). Figuren är skapad med programvaran Biorender.com.**

Hos människan kan en överdriven NF- $\kappa$ B-aktivering leda till en ökad risk för olika sjukdomar, såsom autoimmuna-, och inflammatoriska sjukdomar och cancer (Pikarsky et al., 2004; Xia et al., 2014). För att upprätthålla vävnadshomeostas och främja organismers överlevnad måste NF- $\kappa$ B-signaleringsräckorna regleras noga. Ett exempel är regleringen av däggdjurens och bananflugans IKK-komplex. IKK-komplexet bryts ned under normala förhållanden i autofagosmen för att förhindra NF- $\kappa$ B-aktivering (Tusco et al., 2017). Nyligen har Metionin 1 (M1) -kopplad ubikvitinering visats vara en viktig uppreglerare av NF- $\kappa$ B-signalering i bananflugan och behövs för att inducera stressassocierad inflammation och förhindra infektion orsakade av patogener (Aalto et al., 2022). Kaspaser och apoptosinhiberare (IAP) är två typer av proteiner som kan uppreglera både inflammation och hämma apoptos i bananflugan. IAP-proteiner är viktiga för ubikvitinering av proteiner genom att de kan rikta substrat för proteosomal nedbrytning samt att stabilisera och rekrytera proteiner till proteinkomplex. *Drosophila* IAP-proteinet, Diap2 är ett av bananflugans fyra IAP-proteiner. Diap2 antas vara en nyckelreglerare av NF- $\kappa$ B-aktivitet och behövs för både

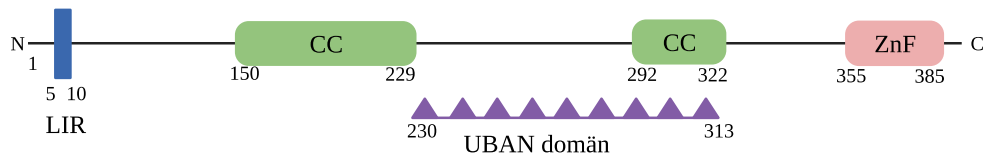
en lokal immunaktivering i tarmens epitelceller och för ett systemiskt immunförsvar i fettkroppens celler. Det finns även flera nedreglerare som är involverade i att förhindra en överdriven aktivering av Imd-signaleringsräckan (Heteru & Hoffmann 2009; Li et al., 2020). En av dem är *Drosophila* interleukin-1 $\beta$ -konverterande enzym (eng. *Drosophila* interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme, DrICE), och är ett effektorkaspas som samverkar med Diap2. Under normala förhållanden bildar DrICE och Diap2 ett komplex för att undvika NF- $\kappa$ B-förmedlande inflammationsresponser i bananflugan (Leulier et al., 2006; Dumétier et al., 2020; Kietz et al., 2022). Detta komplex styrs sedan till proteasomen för nedbrytning (Kietz et al., 2022).

#### 2.2.4 Kenny är en viktig reglerare av Imd-signaleringsräckan

Kenny tillhör bananflugans IKK-komplex och är en viktig komponent i Imd-signaleringsräckan. Kennys främsta uppgift är att fungera som ställning för kinaskomplexet för att reglera aktiveringen av Relish i flugan (Silverman et al., 2000). Kenny har visats delta i cellulära processer såsom nedbrytning av IKK-komplexet och behövs för ett antibakteriellt immunförsvar (Valanne et al., 2011; Tusco et al., 2017; Jacomin & Nezis 2019). IKK-komplexet bidrar till Relish-aktivering genom att fosforylera Relish på flera ställen (figur 4).

Kenny innehåller en lätt kedja-3-samverkande region (LIR, från eng. LC3 interacting region), två coiled coil-domäner (CC), en ubiquitinbindande domän och en zinkfingerdomän (figur 5). En LIR-domän finns vid den N-terminala ändan av Kenny. Denna LIR-domän behövs för att Kenny skall kunna samverka med andra proteiner med LC3-domäner (Tusco et al., 2017; Jacomin & Nezis 2019). LIR-domänens främsta uppgift är att fungera som en signaleringssekvens för autofagosomal nedbrytning. Kenny har visats vara ett LC3-samverkande protein och behövs för att selektivt bryta ned IKK-komplexet för att förhindra en konstant aktivering av Imd-signaleringsräckan (Tusco et al., 2017; Jacomin & Nezis 2019). Tidigare studier har visat att Kenny huvudsakligen bryts ned genom autofagi och under normala förhållanden samverkar Kenny med LC3 på ett LIR-beroende sätt (Tusco et al., 2017). Denna samverkan är viktig för att transportera Kenny tillsammans med hela IKK-komplexet, inklusive Ird5 till autofagosomer som transporterar dem vidare till lysosomen för nedbrytning. När autofagi inhiberas kan Kenny ansamlas och börja

aggregera. Det leder till att Relish kan aktiveras och det resulterar i en ökning av antimikrobiella peptider, vilket främjar inflammation och kan skada tarmepitelet hos bananflugan (Tusco et al., 2017; Jacomin & Nezis 2019).



**Figur 5. Kennys domänstruktur.** Kenny innehåller en LC3-interagerande region (LIR), två coiled coil (CC) domäner, en ubiquitinbindande i ABIN-och NEMO (UBAN)-domän och ett zinkfingermotiv (ZnF). Figuren är skapad i Biorender.com och inspirerad av Tusco et al., 2017.

Människans IKK-komplex består av en reglerande underenhet NEMO och en katalytisk underenhet som består av nukleär faktor kappa-B-underenhet alfa-inhibitor (IKK $\alpha$ ) och nukleär faktor kappa-B-underenhet beta inhibitor (IKK $\beta$ ). Människans NEMO motsvarar bananflugans Kenny (Henning et al., 2021). IKK-komplexet är viktigt för att reglera NF- $\kappa$ B-aktivitet och aktivera genuttrycket hos både människan och bananflugan. Dessutom har IKK-komplexet visats aktiveras av M1-och K63-ubikvitinkedjor (Aalto et al., 2019; Herhaus et al., 2019). NEMO främjar IKK aktivering genom att binda till polyubikvitinkedjor som svar på tidig NF- $\kappa$ B-aktivering (Tokunaga et al., 2009; Ko et al., 2022). Liknande upptäckter har även gjorts i bananflugan. Aalto med flera (2019) visade nyligen att Diap2 inte bara inducerade K63-ubikvitinering av Kenny utan även ökade M1-ubikvitinering av Kenny när Imd-signaleringsräckan är aktiverad. Detta antyder även på att både K63-länkad och M1-länkad ubikvitinering är viktig för regleringen av NF- $\kappa$ B-signaleringsräckan hos både däggdjur och bananflugan (Aalto et al., 2019).

### 2.2.5 Antimikrobiella peptider produceras som svar på infektion

Antimikrobiella peptider är viktiga för att upprätthålla en god hälsa såväl hos bananflugan som människan (Boman et al., 1972; Buchon et al., 2014; Marra et al., 2021). För en fungerande immunrespons i bananflugan, behöver antimikrobiella peptider produceras. Antimikrobiella peptider har en viktig funktion i det medfödda immunförsvaret med svampdödande eller antibakteriell aktivitet genom att förstöra

cellmembranet hos invaderande mikrober och patogener (Hanson et al., 2019a; Hanson et al., 2019b; Marra et al., 2021). Immunsystemet producerar antimikrobiella peptider som regleras av bananflugans båda NF- $\kappa$ B-signaleringsräckor, Imd- och Toll-signaleringsräckan (Hanson et al., 2019b). Antimikrobiella peptider har även visat sig behövas för en nedströmsaktivering av Imd-signaleringsräckan för att motstå infektioner orsakade av gramnegativa bakterier. Nedreglering av antimikrobiella peptider har associerats med rubbningar i tarmhomeostasen i bananflugan (Hanson et al., 2022).

Antimikrobiella peptider måste vara tillräckligt effektiva för att döda skadliga patogener utan att skada friska vävnader eller komponenter som tillhör värdorganismen. Felreglering av produktionen av antimikrobiella peptider kan därmed vara ett hot mot hälsan. Nivåerna av antimikrobiella peptider har visats variera med åldern. Vid normalt åldrande ökar nivåerna av antimikrobiella peptider, vilket kan öka risken för utvecklingen av kroniska inflammatoriska sjukdomar som senare leder till celldöd (Hanson et al., 2019b). I bananflugan har det observerats sju klasser av antimikrobiella peptider och dessa indelas i tre grupper enligt deras mikrobiella huvudmål. Några av dessa klasser är till exempel Attacin, Diptericin och Drosocin (Leclerc & Reichhart, 2004; Hanson et al., 2019b; Marra et al., 2021). Tidigare studier har även visat att antimikrobiella peptider kan fungera ensamma och rikta sig mot specifika mikrober för att effektivt bekämpa infektioner orsakade av specifika bakterier genom att aktivera transkriptionen av en specifik antimikrobiell peptid (Hanson et al., 2019a; Hanson et al., 2019b). Vid bakterieinfektioner kan transkriptionen av flera olika klasser av antimikrobiella peptider aktiveras. För att bekämpa specifika bakterieinfektioner har transkriptionen av flera antimikrobiella peptider visat fungera mindre effektivt (Hanson et al., 2019b). Därför är det viktigt att förstå hur antimikrobiella peptider fungerar och förstå mot vilka typer av mikrober de är mest effektiva mot för att i framtiden kunna utveckla nya läkemedel och få bättre förståelse av hur man skall behandla sjukdomar orsakade av insekter (Hanson et al., 2019a).

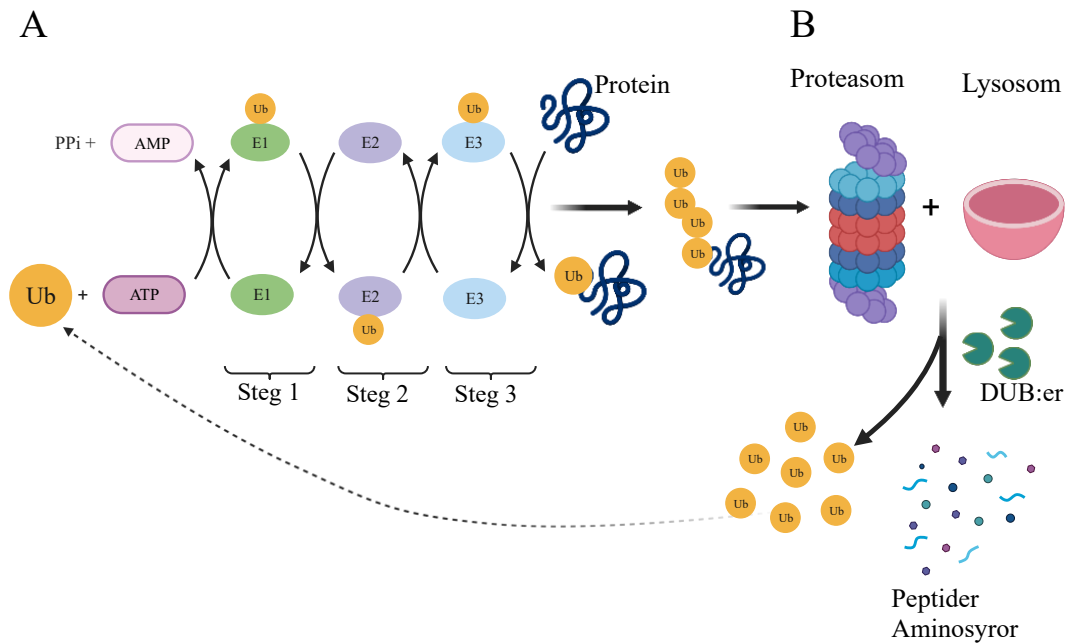
## 2.3 Ubikvitinering reglerar Imd-signaleringsräckan

Ubikvitin är viktigt i Imd-signaleringen och deltar i regleringen av det medfödda immunförsvaret hos bananflugan. Ubikvitinering är en viktig post-translationell modifiering som reglerar aktiviteten hos proteiner och bindningen av ubikvitinmolekyler till proteiner för transport till lysosomen och proteasomen för nedbrytning. Ubikvitin är ett 76 aminosyror stort protein och reglerar många olika cellulära processer genom att tillsätta ubikvitinmolekyler till målproteiner via kovalenta bindningar. Bildningen av ubikvitinkedjor sker genom en enzymatisk process i tre steg (Li et al., 2016; Cockram et al., 2021; Damgaard 2021). Denna process involverar tre enzymgrupper, ubikvitin-aktiverande enzym (E1), ubikvitinkonjugerande enzym (E2) och ubikvitinligas (E3) (figur 6). Ubikvitineringen startar med att E1 aktiveras med hjälp av energi i form av adenosintrifosfat (ATP) för att sedan binda till den C-terminala delen av ubikvitinmolekylen. E1 innehåller en E2-bindande domän. Aktiverat E1-komplex binder till E2 för att E2 skall kunna katalysera överföringen av ubikvitin från E1-komplexet till E2 med hjälp av en transesterifieringsreaktion. E1 måste först lösgöras från E2 för att E3-ligaset skall kunna binda till E2. E3 binder både till substratet och E2 tillsammans med ubikvitinmolekylen, vilket möjliggör överföring av ubikvitinmolekyler till substratet (figur 6). E3 ubikvitinligaserna reglerar flera funktioner i cellen, bland annat cellcykeln, transport av cykliner för nedbrytning, igenkänning av substrat för ubikvitinering och transport till proteasomen för nedbrytning (figur 6). Ubikvitinmolekylerna är bundna till varandra och formar en ubikvitinkedja som tillsätts på målproteiner. Ubikvitin har sju olika lysinrester (K6, K11, K25, K29, K33, K48 och K63) och en N-terminal metioninrest (M1), som kan utnyttjas för att bilda ubikvitinkedjor (Komander, 2009; Hu & Sun, 2016; French et al., 2021). Ubikvitin kan binda till målproteiner som en monomer eller bilda en polyubikvitinkedja. Ubikvitinkedjor varierar i storlek och struktur (Li & Ye, 2008). När en ubikvitinmolekyl eller ubikvitinkedja är bunden till ett målprotein kan andra signalproteiner som innehåller ubikvitinbindande domäner (UBD) samverka med ubikvitinmolekylen eller ubikvitinkedjan (Hurley et al., 2006). Ubikvitinkedjan avlägsnas med hjälp av deubikvitinaser (DUB:er) varefter ubikvitinmolekylerna kan sedan återanvändas (Swatek & Komander 2016). Enstaka ubikvitinmolekyler och ubikvitinkedjor kan länkas samman och känns igen av



specifika UBD-domäner. Ubikvitin fungerar som ett byggelement som proteiner med UBD-domäner kan binda till via icke-kovalenta bindningar för att driva signaleringen vidare eller för att stabilisera ett komplex. Fram tills idag har det identifierats 20 UBD-domäner som till strukturen är olika och kan binda till olika ubikvitinmolekyler och ubikvitinkedjor. Specifika ubikvitinmolekyler samverkar med UBD-domäner och denna samverkan är viktig vid regleringen av cellulära processer, såsom reglering av proteinstabilitet, och respons mot DNA-skador (Dikic et al., 2009). På proteasomen finns det specifika UBD-domäner som autofagimaskineriet kan binda till. Det leder till ubikvitinering och nedbrytning av proteiner med märkta ubikvitinkedjor (Dittmar & Winklofer 2020).

De vanligaste ubikvitinkedjorna som reglerar NF- $\kappa$ B signaleringskaskaderna är K63-, K48-, och M1-ubikvitinkedjor. K63- och M1-polyubikvitinkedjor har även visats ha en viktig funktion i Imd-signaleringsräckan då E3-ligaset kan bilda polyubikvitinkedjor på signaleringsproteiner som tillhör signaleringsräckan. K63-ubikvitinkedjor som har tillsatts av Diap2 har visat sig kunna aktivera Dredds katalytiska förmåga medan Diap2 har visat sig kunna tillsätta K63-ubikvitinkedjor till både Imd-proteinet och Dredd (Paquette et al., 2010, Meinander et al., 2012). Dredds aktivitet regleras av ubikvitinering och om Dredd inte är aktiverat sker ingen klyvning av Relish. Vid bakteriell infektion har det visats att M1-ubikvitinering krävs för aktivering av NF- $\kappa$ B i tarmen och en förhöjd M1-ubikvitinkedjebildning under normala förhållanden kan driva kronisk tarminflammation i bananflugan (Aalto et al., 2019).



**Figur 6. Översikt av ubiquitin-proteasomsystemet.** (A) Ubikvitiering är en trestegs enzymatisk kaskad som involverar ubiquitin-aktiverande enzym (E1), ubiquitinkonjugerande enzym (E2) och ubiquitinligas (E3) för att kunna fästa ubiquitinmolekyler (ub) till målproteiner. (B) Det ubiquitinerade målproteinets känns igen av 26S-proteasomen och lysosomen där nedbrytningen av peptider och aminosyror sker. Deubikvitinaser (DUB:er) avlägsnar polyubikvitinkedjor från proteiner för att upprätthålla en intracellulär balans av ubiquitinnivåer. Figuren är skapad i Biorender.com.

## 2.4 Autofagi-förmedlad lysosomal nedbrytning

Ubikvitinering leder till både proteasomal nedbrytning och lysosomal nedbrytning via autofagi. Autofagi är en evolutionärt välbevarad biologisk process där celler bryter ned cytoplasmiskt material, organeller eller proteiner och invaderande bakterier och virus (Nezis, 2012; Liu et al., 2016; Rahman et al., 2022). Vid optimala fysiologiska förhållanden finns det en balans mellan produktionen av nya cellulära komponenter eller proteiner och eliminering av överflödiga och skadade komponenter (Liu et al., 2016). Autofagi är en katabolisk process där ett isoleringsmembran samlar in onödigt cellulärt material för att bilda autofagosomer som smälter samman med lysosomen för att sedan bryta ned innehållet i autofagosomen (Barlett et al., 2011; Jain et al., 2015).

Autofagi aktiveras när ett isoleringsmembran, en fagofor, bildas i cytoplasman och en autofagosom bildas i cellen. Därefter kan autofagosomen smälta samman med lysosomen för att bilda en autolysosom. I autolysosomen bryts det sekvenserade materialet ned med hjälp av lysosomala hydrolaser. Nedbrytningen av cytoplasmiskt

material är en selektiv process och sker med hjälp av specifika receptorproteiner. Selektiva autofagireceptorer innehåller vanligtvis korta LIR-regioner som binder till bärarproteiner som är i direkt samverkan med proteiner som tillhör LC3-proteinfamiljen. Detta möjliggör autofagireglerad nedbrytning av autofagosomerna (Nezis, 2012; Jain et al., 2015; Liu et al., 2016). Hos däggdjur har det identifierats två familjer av LC3-proteiner; mikrotubuli associerat protein 1A/1B ljuskedja 3B (MAP1LC3) eller LC3 och gammaaminosmörtsyra-receptor associerat protein (GABARAP) som samverkar med proteiner som innehåller ett LIR-motiv. LIR-motiven behövs för att de skall kunna samverka med de autofagosomala membranproteiner som tillhör LC3-proteinfamiljen. I bananflugan har det identifierats två olika LC3-proteiner, LC3a och LC3b. Studier i flugor har visat att endast hanar kan uttrycka LC3b och därför antas LC3b vara viktigt för hanars fertilitet (Rahman et al., 2022). Hos däggdjur har man identifierat sex proteiner, p62, NBR1, NDP62, Nix, optineurin och STbd och kännetecknas som receptorer för selektiv autofagi. Gemensamt för dessa proteiner är att de innehåller en LIR-domän, vilket är viktigt för att samverka med autofagosomalt membranprotein LC3. Utöver en LIR-domän har många autofagireceptorer även en ubikvitinbindande domän (UBD). I bananflugan har Ref(2)P identifierats som en receptor för autofagi. Ref(2)P är homolog till människans Sekvestom-1 protein (SQSTM1) eller mera känd som p62 (Nezis et al., 2012; Rahman et al., 2022; Tsapras et al., 2022).

## 2.5 Ref(2)P fungerar som en selektiv receptor för autofagi i bananflugan

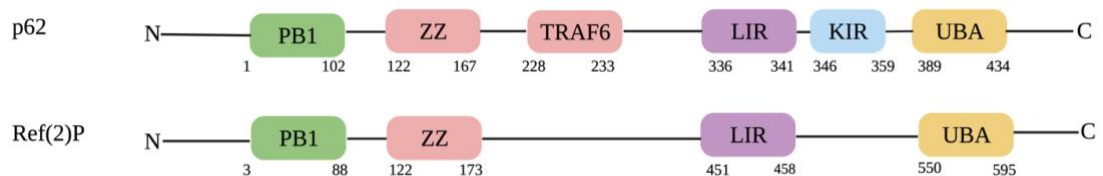
### 2.5.1 p62 och Ref(2)P

Däggdjurens p62 är ett multifunktionellt protein involverat i flera signaltransduktionsvägar och kan bland annat markera ubikvitinerade proteiner för autofagosomal nedbrytning (Nezis et al., 2008). Utöver ubikvitinering regleras p62 också av post-translationella mekanismer såsom fosforylering, acetylering och proteolytiska processer (Lamark et al., 2009; Henning et al., 2021). p62 är ett 440 aminosyror stort protein och består av en PB1-domän, en ZZ-domän, en TNF-receptor-associerad faktor 6-bindningsdomän (TRAF6), en LIR-domän, en Kelch-liknande ECH-associerat protein 1-domän (Keap1) och en UBA-domän (Ciuffa et al., 2015). Via p62:s UBA-domän kan ubikvitinkedjor binda till LC3 via LIR-domänen vid p62:s C-terminala del, vilket resulterar i autofagosomal nedbrytning. Därtill innehåller p62

en lång IDR- region (eng. intrinsically disordered region) (figur 7). IDR-regionen möjliggör bindning till olika integrerande proteiner såsom LC3 och Keap1 (Berkamp et al., 2020; Henning et al., 2021). p62 antas vara ett viktigt autofagi-reglerade protein som främjar samspel mellan olika signaleringsräckor och cellulära processer, såsom aktiveringen av NF- $\kappa$ B och aktiveringen av mitogenaktiverande proteinkinaser (MAP-kinaser). Detta antyder även att p62 kan delta i regleringen av viktiga biologiska processer såsom oxidativ stress, inflammation och tumörutveckling. Ett flertal studier har visat att autofagi kan minska tumörutveckling genom att nedreglera p62-proteinnivåer (Su et al., 2015; Henning et al., 2021). Mutationer i p62-proteiner eller fellokalisering av p62-proteiner antas även delta i regleringen av åldrande, metaboliska-och neurogenerativa sjukdomar (Henning et al., 2021). Studier kring förlust av p62 har visats orsaka störningar hos protein-proteininteraktioner eller fellokalisering av proteiner. Endast ett fåtal studier har gjorts för att undersöka p62 funktion i specifika vävnader. Mycket tyder på att låga nivåer av p62 leder till ökad fosforylering medan förlust av p62 främjar tumörutveckling (Kumar et al., 2022).

Ref(2)P är en homolog till p62 och är ett 599 aminosyror stort protein som identifierades i samband med en screening där man undersökte olika modifierare av sigmavirus (Carré-Mloukka et al., 2007; Nezis et al., 2008; Jang et al., 2015). Sigmaviruset är kanske det mest studerade viruset av *Drosophila melanogaster*-virus och finns utbrett hos naturliga populationer av bananflugan. Virusforskning i bananflugan ledde till upptäckt av Ref(2)P-generna som anses vara viktiga för att förhindra virusförökning i cellerna. Ref(2)P finns beläget fritt i cytoplasman och i autofagosomer (Dezelee et al., 1989; Lemaitre & Hoffmann, 2007; Piracs et al., 2012; Nagy et al., 2014). Ref(2)P fungerar även som en selektiv autofagireceptor genom att Ref(2)P känner igen och binder till skadade eller onödiga proteiner och organeller för att sedan transportera dem till lysosomen för nedbrytning. Detta hjälper till att upprätthålla cellens funktioner genom att transportera bort avfall för att upprätthålla en intracellulär balans i cellen. Ref(2)P-domänerna består av en proteinbindande domän (PB1), en zinkfingerdomän (ZZ), en LIR domän och en ubikvitinbindande domän (UBA) (Barlett et al., 2011). PB1-domänen finns vid den N-terminala delen av Ref(2)P, vid aminosyror 3–88, medan ZZ fingerdomänen finns mellan aminosyror 122–173, LIR-domänen finns mellan aminosyror 451–458 och UBA-domänen finns vid C-terminus mellan aminosyror 550–595 (figur 7) (Carré-

Mloukka et al., 2007; Nezis et al., 2008; Nezis, 2012). PB1-domänen är viktiga för självligomerisering och bindning till andra proteinkinaser C (PKC)-domäner. LIR-domänen behövs för att samverka med proteiner som tillhör LC3-proteinfamiljen. Denna samverkan är viktig för att selektivt bryta ner Ref(2)P via autofagi. Ref(2)P:s LIR-domän agerar även som ett adapterprotein för transport av ubiquitinerade molekyler till autofagosomen för nedbrytning (Pircs et al., 2012). Ref(2)P kan samverka med proteiner fästa med ubiquitin eller polyubikvitinkedjor via LIR-domänen (Nilangekar et al., 2019). Studier har visat att både PB1-och UBA-domänerna behövs för att bilda proteinaggregat och en minskad autofagiaktivitet leder till ansamling av Ref(2)P-aggregat, vilket antyder att Ref(2)P fungera som en markör för autofagiaktivitet (Nezis et al., 2008; Bartlett et al., 2011; Nilangekar et al., 2019).



**Figur 7. Domänstrukturen för däggjurens p62 och bananflugans Ref(2)P.** p62 och Ref(2)P har liknande domänstruktur och innehåller en protein bindande domän (PB1), en zinkfinger domän (ZZ), en LIR domän, en ubiquitinbindande domän (UBA). p62 har dessutom en TNF-receptor-associerad faktor 6-bindningsdomän (TRAF6) och en Keap-interagerande region (KIR). Figuren skapad i Biorender.com.

### 2.5.2 Ref(2)P och Kenny samverkar via LIR-motiv

År 2022 visade Rahman med flera att både Ref(2)P och Kenny samverkar med LC3FAT via LIR-motiv. Både Ref(2)P och Kenny ackumulerades i flugor med mutationer i LC3-proteinet, vilket tyder på att LIR-motivet är viktigt för autofagireglerad nedbrytning av Ref(2)P och Kenny (Nezis et al., 2008; Rahman et al., 2022). Dessutom rekryterar ackumulerad Kenny, som bildar cytoplasmiska aggregat, Ref(2) till sig. Detta observerades i autofagi-inhiberade flugvävnader, såsom i hjärnan, fettkroppen och tarmen hos bananflugan (Tusco et al., 2017). Tidigare resultat antyder att Ref(2)P behövs för NF- $\kappa$ B-aktivering men om Ref(2)P kan binda till ubiquitinerade proteiner som tillhör NF- $\kappa$ B-signaleringsräckan är utforskat (Liu et al., 2016; Rahman et al., 2022)

### 2.5.3 p62 i NF- $\kappa$ B-signalering

Under normala förhållanden hålls p62 inaktiverat i cellen för att förhindra att UBA-domänen skall binda till ubikvitinmolekyler. Autolysosomer bryter ned p62 för att förhindra att p62 ackumuleras i cellen (Zhang et al., 2016; Islam et al., 2018). Människans transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B består av fem medlemmar som fungerar som homo-och heterodimera komplex. NF- $\kappa$ B är viktigt och behövs för att upprätthålla epitelhomeostas i tarmen. Under normala förhållanden hålls NF- $\kappa$ B inaktiverat i cytoplasman bundet till I $\kappa$ B-proteiner som markerar och blockerar kärnlokaliseringssignaler. När NF- $\kappa$ B aktiveras binder de till specifika DNA-sekvenser på målgener som innehåller  $\kappa$ B-element. Dessa reglerar transkriptionen av gener som reglerar anti-apoptotiska reaktioner i cellen, inflammatoriska processer och tumörutveckling (Zhong et al., 2016). Även hos däggdjur har IKK-komplexet en väsentlig roll i aktiveringen av NF- $\kappa$ B (Ghosh & Karin, 2002). Däggdjurens IKK-komplex består av två kinaser IKK $\alpha$  och IKK $\beta$  samt en reglerande subenhet IKK $\gamma$  (NEMO). Ubikvitinering av NEMO antas vara viktig för NF- $\kappa$ B-aktivering och p62 har visats reglera olika signaleringsräckor och ubikvitinering antas även p62 kunna reglera aktiveringen av NF- $\kappa$ B främst för att främja inflammation och tumörutveckling (Duran et al., 2014; Zotti et al., 2014). Detta upptäcktes då Zotti med flera undersökte potentiella proteiner som kan sammankopplas med IKK-komplexet och behövs för att reglera NF- $\kappa$ B-aktivitet. De visade att p62 kan reglera ubikvitineringen av NEMO genom att p62 samverkar och behövs för TRAF6-förmelad ubikvitinering av NEMO (Zotti et al., 2014). Dessutom har andra studier visat att p62 kan fungera som en viktig ubikvitinmodulerare via dess UBA-domän och binda till ubikvitinerade substrat som p62 antas ansamlas och transporteras dem till autofagosomer (Wooten et al., 2005; Islam et al., 2018). Senare har p62:s UBA-domän uppvisat en preferens för K63-ubikvitinerade proteiner, vilket stöder antaganden om att p62 kan reglera ubikvitineringen av NEMO och ger oss bättre förståelse av hur olika molekylära mekanismer reglerar NF- $\kappa$ B-aktiveringen i celler.

### 3. Målsättningar

Den huvudsakliga målsättningen för denna avhandling var att undersöka ifall Ref(2)P deltar i regleringen av Imd-signaleringsräckan genom samverkan mellan Ref(2)P och Imd-signaleringskomponenten Kenny. NF- $\kappa$ B-aktivering genom Imd-signaleringsräckan behövs för att reglera transkriptionen av antimikrobiella peptider och krävs för att flugor skall överleva tarminfektioner orsakade av gramnegativa bakterier. Således är min hypotes att Ref(2)P behövs för en effektiv NF- $\kappa$ B-aktivering och påverkar stabiliteten av Kenny i tarmen hos bananflugan.

Den första målsättningen var att studera om Ref(2)P-nivåerna påverkas av gramnegativ bakterieinfektion. Detta undersöktes genom att mata flugor med gramnegativa bakterier och utföra Western blot analyser på material isolerat från infekterade bananflugor.

Den andra målsättningen var att undersöka om Ref(2)P påverkar immunförsvaret i tarmen. Detta undersöktes genom att utföra överlevnadsanalyser på Ref(2)P-flugmutanter infekterade med gramnegativa bakterier. Dessutom undersöktes Ref(2)P-flugmutanternas förmåga att aktivera NF- $\kappa$ B med hjälp av kvantitativa PCR-analyser på material isolerat från tarmen på infekterade bananflugor.

Den tredje målsättningen var att undersöka om Ref(2)P samverkar med Imd-signaleringsförmedlaren Kenny. Detta undersöktes genom att transfektera Kenny i S2-celler och överuttrycka Kenny i bananflugan. Dessutom undersökte jag både om Ref(2)P-Kenny samverkan påverkas av Diap2 i S2-celler och om Ref(2)P påverkar stabiliteten av Kenny *in vivo* efter gramnegativ bakterieinfektion. Därefter utfördes immunoprecipiteringsexperiment och Western blot analyser på material isolerat från S2-celler och hela bananflugor.

Den fjärde målsättningen för avhandlingen var att undersöka ifall Ref(2)P och Kenny samverkan är beroende av ubikvitinerade signaleringsmolekyler i bananflugan. Detta undersöktes genom att utföra immunoprecipiteringsexperiment för Kenny från material isolerat från bananflugor. Dessutom behandlades immunoprecipiteringsproverna med deubikvitinerade enzymer för att klyva

ubikvitinkedjor i immunoprecipiteringsproverna och Western blot analyser gjordes för att detektera Ref(2)P-proteinnivåer.



## 4. Material och metoder

### 4.1 Bakterieodling

I denna studie användes den gramnegativa bakteriestammen *Erwinia carotovora carotovora* (*Ecc15*) för att infektera fluglinjer. Bakteriestammen *Ecc15* kan infektera bananflugan och starta en immunrespons utan att bakterien är en mänsklig patogen (Leclerc & Reichhart 2004). Bakteriestammen odlades i autoklaverat LB-medium (20g LB-Broth [Sigma-Aldrich] i 1 liter destillerat vatten) genom att en steril ögla doppades i en koncentrerad *Ecc15*-glycerolstocklösning. Bakterieodlingen inkuberades sedan i 29 °C i cirka 16 timmar för att låta bakterierna proliferera. Därefter skördades bakterierna genom centrifugering vid 4000 rpm, 10 °C i 20 minuter varefter supernatanten avlägsnades. Bakteriepelleten löstes upp i LB-medium och den optiska densiteten (OD) justerades. Bakterierna förvarades i kylskåp tills de användes för experiment.

### 4.2 Uppfödning av flugor och bananflugans diet

Bananflugan har en relativt regelbunden dygnsrytm. Bananflugorna föds upp i plasttuber med lock som förvarades i 25° C inkubatorer med en 12 timmar ljusmörkerperiod. Flugorna matades med Nutri-fly Bloomington Formulation (Dutscher Scientific, Essex, Storbritannien) och maten böts ut var tredje vecka. Flugmaten tillreddes genom att blanda en påse Nutri-fly BF som bestod av 17 g jäst, 10 sojamjöl, 73 g majs mjöl, 46 g malt extrakt, 6 g agar och 80 ml majssirap som blandades ut i 1 liter vatten som renats via osmos (RO-vatten) tillsammans med konserveringsmedel, 10 % Tegosept/Nipagin (Apex, USA) och 99 % propansyra (Sigma-Aldrich, USA).

Tabell 1. Fluglinjer som användes för orala infektionsexperiment och för kvantitativa PCR experiment.

Fluglinje	Förkortning	Beskrivning	Ursprung
Canton <sup>S</sup>	CS	Vildtyp	Gåva av Prof. H. Jacobs
w <sup>1118</sup> ; Glazed/CurlyO	Glazed	Markörlinje	Bloomington <i>Drosophila</i> stock center
w <sup>1118</sup> ; Ref(2)P <sup>Od2</sup>	Ref(2)P <sup>Od2</sup>	Deletion av PB1 i Ref(2)P	Gåva av E. Baehrecke
w <sup>1118</sup> ; Ref(2)P <sup>Od3</sup>	Ref(2)P <sup>Od3</sup>	Deletion av UBA i Ref(2)P	Gåva av E. Baehrecke
w <sup>1118</sup> ; Key <sup>4</sup> /CyO	Key <sup>4</sup>	Nonsensmutation som avbryter Kenny genen	Gåva av Prof. P. Meier (Rutschmann et al., 2000)
w <sup>1118</sup> ; UbiGal4;UAS-GFP-Kenny	UAS-GFP-Kenny	GFP-Kenny transgen, driven av UbiGal4	Bloomington <i>Drosophila</i> stock center
w <sup>1118</sup> ; Diap2 <sup>7c</sup>	Diap2 <sup>7c</sup>	Deletion av Diap2-genen	Gåva av Prof. F. Leulier (Leulier et al 2006)

### 4.3 Överlevnadsexperiment

För att studera bananflugans överlevnadsförmåga vid bakterieinfektion användes en kontrollfluga Glazed och flugor med mutationer i Ref(2)P-proteiner. Bananflugornas överlevnad studerades genom att infektera flugorna med den gramnegativa bakteriestammen *Ecc15*. Ett Whatmanpapper placerades på botten av en plasttub och för att infektera flugorna tillsattes en bakterie-sukroslösning på Whatmanpappret. Bakterie-sukroslösningen bestod till 50 procent av *Ecc15*-bakteriesuspension med den optiska densiteten  $0,1 \pm 0,02$  och till 50 procent av en femprocentig sukroslösning. För varje fluglinje användes 10 hanar och 10 honor i varje experiment, det vill säga 20 flugor valdes ut. Flugorna placerades i plasttuben och de fick fritt äta av bakterie-sukroslösningen. Efter 24 timmar räknades antalet överlevande flugor. De överlevande flugorna placerades i en ny tub med ny bakterie-sukroslösning av samma koncentration som hade tillsatts på ett nytt Whatmanpapper. Samma process upprepades efter varje 24 timmar tills det hade gått 72 timmar. Procenten och medeltalet av antalet överlevande flugor räknades ut med Excel. Grafer gjordes utgående från resultaten med programvaran Graphpad Prism genom att använda en två-vägs ANOVA-analys med förtroendeintervallet 95 %.

## 4.4 Undersökning av samverkan mellan Ref(2)P och Kenny i S2-celler

### 4.4.1 Odling av S2-celler

Schneider-2-celler (S2-celler) är en makrofag-liknande cellinje och härstammar från primära kulturer av 20–24 timmar gamla *Drosophila*-embryon (Ivey-Hoyle, 1991; Lee et al., 2013). S2-cellerna odlades i rumstemperatur i 75 kvadratcentimeters cellodlingsflaskor där S2-cellerna kunde växa både i suspension och bilda ett löst monolager. Cellodlingsmediet som användes var Schneiders insektmedium (Sigma-Aldrich, USA). Till cellodlingsmediet tillsattes 10 % fetalt kalvserum (FBS) [Biowest, Frankrike], 2 mM 1 % L-glutamin (Gibco, USA) och 100 U penicillin och 0,1 mg/ml streptomycin (Gibco, USA). Kulturen av S2-celler upprätthölls i steril miljö. S2-cellerna användes som uttryckningssystem för att undersöka proteininteraktioner i *Drosophila*-celler.

### 4.4.2 Transfektion av S2-celler

Målet med transfektionen var att uttrycka protein i S2-celler för att studera ifall Imd-signaleringsförmedlaren Kenny kan samverka med Ref(2)P. För att uttrycka proteiner i S2-cellerna användes plasmider. För att reglera plasmidernas genuttryck användes pMT-plasmider som innehöll promotorn metalloprotein (MT), en DNA-förstärkare som aktiverades vid tillsats av koppar (Olsen et al., 1992). Transfektionen utfördes i 10 centimeters cellodlingsplattor och för att ha tillräckligt med celler uppskattades cellernas konfluensgrad till cirka 100 % i en 75 kvadratcentimeters cellodlingsflaska. Transfektionen utfördes i steril miljö och ett Effectene-kit (Quiagen, Nederländerna) användes. Effectene-kittet är en icke-liposomal transfektionsreagens och innehåller en buffert, en förstärkare och en effectene-buffert. För att uppnå bättre transfektionseffektivitet användes Effectene-kittet tillsammans med en specifik DNA-förstärkare och en optimerad buffert. Koppersulfat ( $\text{CuSO}_4$ ) tillsattes för att aktivera MT-promotorn som reglerar proteinsyntesen under specifika förhållanden. Därtill studerades även om Ref(2)P-Kenny interaktionen kan påverkas av Diap2. Därför användes plasmider som kodar för två Imd-signaleringsförmedlare, Kenny och vildtyps Diap2 samt en muterad form av Diap2 (Diap2-F496A) som saknar E3-ligasaktivitet. S2-cellerna transfekterades totalt med 1  $\mu\text{g}$  DNA per prov (tabell 2). Det förbereddes även ett kontrollprov som enbart innehöll 1  $\mu\text{g}$  mock DNA, det vill säga

ett prov med en tom plasmid. Kontrollprovet användes för att utesluta att de transfekterade proteinerna ospecifikt bundit till agaroskulorna.

För att starta transfektionen överfördes 15 ml konfluenta S2-celler i suspension till ett provrör, varefter cellerna centrifugerades 5 minuter i 1000 rpm. Supernatanten avlägsnades och cellpelleten löstes försiktigt upp i en lämplig mängd Schneiders insektmedium, 1 ml per prov. S2-cellerna kultiverades i 10 cm cellskålar varav 9 ml av Schneiders insektmedium tillsattes och 1 ml celler pipeterades till varje cellodlingsplatta. 1 µg plasmid användes och uträknades på basen av plasmidernas koncentration och tillsattes i 500 µl DNA-kondenseringsbuffert. Därefter tillsattes 20 µl effectene buffert och 16 µl förstärkare till varje plasmid-och transfektionsbuffertlösning, och proven blandades genom suspension och inkuberades sedan i 10 minuter i rumstemperatur. Transfektionslösningen tillsattes sedan droppvis till varje enskild cellodlingsplatta, varefter cellodlingsplattan blandades om försiktigt och ordentligt. Cellodlingsplattorna inkuberades i cirka 16 timmar vid rumstemperatur.

Följande morgon ersattes cellodlingsmediet med färskt cellodlingsmedium. Det gjordes genom att suga upp och överföra cellodlingsmediet med de transfekterade cellerna från varje enskild cellodlingsplatta till ett eget provrör. För att ta tillvara de transfekterade S2-cellerna centrifugerades provrören 4 minuter i 1000 rpm. Cellpelleten som bildades togs tillvara, supernatanten avlägsnades och S2-cellerna löstes upp i 10 ml färskt odlingsmedium, varefter S2-cellerna tillsattes tillbaka till rätt odlingsplatta. 7 timmar senare tillsattes 500 µM CuSO<sub>4</sub> för att inducera transfektionen. 16 timmar efter att transkriptionen hade inducerats skördades S2-cellerna genom att centrifugera cellerna 5 minuter vid 1000 rpm för att samla cellerna till en pellet. Supernatanten avlägsnades och S2-cellerna tvättades med 1 ml 1x kall fosfatbuffrad saltlösning (PBS, Merdicagi AB, Sverige) och centrifugerades sedan med snabbspinn och PBS: en avlägsnades.

Tabell 2: Plasmider som användes i detta forskningsprojekt.

Konstruktets namn	Beskrivning	Ursprung
Mock	pMT-V5-His	Gåva av Prof. P. Meier
Kenny-V5	pMT-V5-Kenny-V5	Gåva av Prof. P. Meier
Diap2	pAc5-DIAP2	Gåva av Prof. P. Meier
Diap2-F496A-mutant	pAc5-Diap2-F496A	Gåva av Prof. P. Meier

## 4.5 Immunoprecipitering

### 4.5.1 Utvinna protein från fluglysät och lysat från flugtarmar

Fluglysät tillreddes också för att studera hur Ref(2)P-nivåerna regleras i flugan, flugans tarm och flugans fettkropp efter bakterieinfektion, med den gramnegativa bakteriestammen, *Ecc15*. För varje experiment valdes totalt 20 flugor per fluglinje, varav lika mängd hanar och honor. Flugorna matades med bakteriestammen *Ecc15* i 16 timmar innan flugorna sövdes ned med koldioxid och avlivades genom att sätta flugorna i frysen i cirka 15 minuter. Flugorna förvarades på is innan flugtarmarna disskekerades och fettkroppen togs tillvara. Tarmarna och fettkroppen förvarades i skilda eppendorfrör i kall PBS, varefter PBS-lösningen avlägsnades. Flugorna, flugtarmarna och fettkroppen homogeniserades med hjälp av en mortel i S2-lyseringsbuffert (se bilaga) tillsammans med 1 X proteasinhämmare (Thermo Scientific, minitabletter, USA) i förhållandet 1:20. För att förhindra proteolytisk nedbrytning av proteiner i fluglysaten tillsattes proteasinhämmaren i S2-lyseringsbufferten. Hela flugor avsedda för immunoprecipitering lyserades i 400 µl S2-lyseringsbuffert tillsammans med inhibitorer 1 X proteas- och fosfatasinhämmare (Pierce™, Thermo Scientific, USA), 5 mM 2-kloroacetamid (Aldrich, USA), 5 mM N-etylmaleimid (NEM) (Sigma-Aldrich, USA) och 1 mM ditiolretinol (DTT) (Sigma, USA) för att stabilisera och bromsa nedbrytningen av proteiner och enzymer i fluglysaten. Kloroacetamid och NEM fungerade som deubikvitinaser (DUB)-inhibitorer och förhindrar klyvning av ubikvitinkedjor från proteinsubstrat. Proverna förvarades på is i 15 minuter för att förhindra att nedbrytning sker innan de centrifugerades 10 minuter vid 12 000 rpm vid 4 °C. 350 µl av lysatet tillsattes i ett nytt eppendorfrör och centrifugerades sedan 5 minuter vid 12 000 rpm och 4°C. Därefter togs fluglysatet tillvara, 300 µl av

fluglysatet var avsett för immunoprecipitering och behandlades med specifika agaroskolor. 40 µl cellysatprov togs tillvara och användes som kontrollprov. Kontrollprovet blandades med 40 µl 4 x Laemmlibuffert (se bilaga) innan proven denaturerades 5 minuter vid 97 °C.

#### 4.5.2 Immunoprecipitering av lysat från S2-celler

För att undersöka interaktion mellan Kenny och Ref(2)P utfördes immunoprecipitering eftersom det är en effektiv metod att utnyttja för att isolera protein eller biomolekyler från cellysat eller vävnadslysats. De transfekterade cellerna lyserades i S2-lyserings buffert (se bilaga) tillsammans med 1 X proteas-och fosfatasinhibitor, 5 mM 2-kloroacetamid, 5 mM NEM och 1 mM DTT. S2-cellerna lyserades och inkuberades på is 10 minuter innan proven renades genom centrifugering, 10 minuter vid 12 000 rpm vid 4 °C. 800 µl av supernatanten tillsattes i ett provrör avsett för immunoprecipitering och 100 µl supernatant användes för tillredning av cellysatet. Till obehandlade cellysat tillsattes direkt 4x Laemmlibuffert (se bilaga) och proven denaturerades i 5 minuter i 97 °C. De färdiga proverna förvarades i kylskåp i 4 °C.

#### 4.6.1 Behandling av antikroppsklädda agaroskolor

Till det tillredda cellysatet och fluglysatet tillsattes förtvättade agaroskolor kopplade med en specifik antikropp. Kenny isolerades från cellysaten genom att utföra immunoprecipitering med V5-agaroskolor (Sigma-Aldrich, USA) eftersom Kenny var kopplat till V5-epitopen. V5-agaroskulorna bestod av en agaroskärna bundet till monoklonala V5-märkta antikroppar producerade i möss. V5-agaroskulorna var förvarade i en 20 % fosfatbuffrad saltlösning. Saltlösningen renades bort innan V5-agaroskulorna tillsattes till immunoprecipiteringsproven. För immunoprecipitering i fluglysat användes GFP-märkta agaroskolor (ChromoTek, Tyskland) eftersom Kenny var GFP-märkt. För att få lämplig mängd V5-agaroskolor och GFP-agaroskolor togs cirka 20 % mera agaroskulsblandning per prov och lösningen centrifugerades 1 minut vid 1000 rpm. Därefter avlägsnades supernatanten och agaroskulorna renades en gång

med kall 1x PBS innan agaroskulorna homogeniserades i S2-lyseringsbuffert (se bilaga) så att lösningen var 50:50 agaroskolor och S2-lyseringsbuffert.

#### 4.6.2 Inkubering och tvätt

Prover avsedda för immunoprecipitering tillsattes 25 µl av förtvättade agaroskolor som hade blandats ut i S2-lyseringsbuffert (50:50) till immunoprecipiteringsproven. Lika mängd förtvättade agaroskolor användes för både celllysats och för fluglysats. Därefter inkuberades celllysatsproven med V5-märkta agaroskolor under rotation i 2 timmar i 4 °C medan fluglysaten med GFP-märkta agaroskolor inkuberades under rotation i 3 timmar i 4 °C. Under inkubation kan de epitopmärkta proteinerna binda till antikropparna på agaroskulorna. Efter immunoprecipiteringen centrifugerades proven 1 minut vid 1000 rpm och supernatanten avlägsnades. De antikroppstäckta agaroskulorna renades tre gånger i immunoprecipiteringsbuffert (se bilaga) genom att centrifugera proven 1 minut vid 1000 rpm och avlägsna supernatanten. Efter sista reningen tillsattes 30 µl 4x Laemmli (se bilaga), varefter proven inkuberades sedan 5 minuter i 97 °C. Under inkuberingen förstörs antikropparna och de bundna peptiderna frisätts. De färdiga proverna förvarades i kylskåp i 4 °C.

#### 4.6.3 Deubikvitinering av fluglysats

För att undersöka ifall Ref(2)P och Kenny samverkan i flugor är beroende av K63- eller M1-ubikvitinkedjor behandlades immunoprecipiteringsproverna med AMSH (eng. Associated molecule with the SH3 domain of STAM) eller OTULIN (eng. Ovarian tumor domain deubiquitinase with linear linkage specificity). AMSH är ett deubikvitinerande enzym och förhindrar ubikvitinberoende genom att klyva K48- och K63-ubikvitinkedjor (Komander et al., 2009; Reyes-Turcu et al., 2009; Hospenthal et al., 2015). Även OTULIN är ett deubikvitinerande enzym och förmår att klyva M1-ubikvitinkedjor (Keusekotten et al., 2013; Rivkin et al., 2013; Damgaard et al., 2016). Immunoprecipiteringen fick ske under rotation så att de märkta proteinerna kunde binda till agaroskulorna. Immunoprecipiteringsproverna inkuberades under rotation i 2 timmar i 4 °C och efter rotationen överfördes proverna till ett gemensamt provrör förutom kontrollen. Proverna centrifugerades 1 minut vid 1000 rpm och därefter

suspenderades lösningen och den fördelades jämnt i tre skilda provrör. Proverna centrifugerades 1 minut vid 1000 rpm och supernatanten avlägsnades. De GFP-märkta agaroskulorna som Kenny bundit till suspenderades i en total volym på 30 µl, DUB-buffert tillsammans med AMSH (Ubiquigent, Storbritannien) eller OTULIN (Ubiquigent, Storbritannien). DUB-bufferten bestod av 1M HEPES (Sigma-Aldrich, USA), 5M NaCl (Sigma, USA), 0,5M DTT (Sigma, USA) och MilliQ-vatten. 1,18 µg AMSH tillsattes till ett av proverna, till det andra provet tillsattes 1,67 µg OTULIN och det tredje provet fungerade som kontroll. Till kontrollprovet tillsattes endast DUB-buffert. Deubikviteringsreaktionen utfördes under en timme i 37 °C innan supernatanten avlägsnades och agaroskulorna tvättades tre gånger i immunoprecipiteringsbuffert (samma princip som i 4.7.2). Efter den sista reningen tillsattes 30 µl 4x Lammellie (se bilaga), varefter proven inkuberades 5 minuter i 97 °C. De färdiga proverna förvarades i kylskåp i 4 °C innan Western blot analyser.

#### 4.7 SDS-PAGE och transfer

SDS-PAGE (eng. sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis) är en metod som separerar proteiner enligt molekylstorlek. Proven som erhållits från immunoprecipiteringen och cellysatproven laddades på en akrylamidgel. Akrylamidkoncentrationen för akrylamidgelerna var 10 % och bestod av en undre och en övre gel (se bilaga). Den övre gelen packar samman proteinerna och hjälper dem att parallellt övergå till den undre gelen. I den undre akrylamidgelen separeras proteinerna enligt deras storlek. När elektrisk ström leds genom gelen vandrar små proteiner fortare än större proteiner eftersom de större proteinerna stöter på ett större motstånd i akrylamidgelen. En proteinstandard (Precision Plus Protein Dual Color Standard, Bio-rad, USA) med kända molekylvikter användes för att identifiera de transfekterade proteinernas proteinstorlekar. De transfekterade proteinerna identifierades med hjälp av specifika antikroppar. Antikropparna som användes finns listade i tabell 3. Efter att proteinerna hade separerats utfördes en så kallad "wet transfer". Det innebär att de separerade proteinerna överfördes från akrylamiden till ett nitrocellulosamembran (Cytavia, USA). På membranet placerades akrylamidgelen som innehöll de laddade proteinerna och placerades sedan i en överföringskammare. För att överföra proteinerna placerades akrylamidgelen mot den negativt laddade polen och membranet mot den positivt laddade polen. Överföringen skedde vid tillförelse av



elektricitet (30 V) i 2 timmar i 4 °C så att de negativt laddade proteinerna fångades upp av membranet.

#### 4.8 Western blot analys

För att förhindra ospecifik bindning av antikroppar till membranets yta blockerades membranet med fettfri mjölk (Valio, Finland). Därefter tvättades membranet tre gånger i 10 minuter i en 0,2 % PBS-tween20 (Sigma-Aldrich, USA) -lösning före membranet inkuberades med en specifik primärantikropp under omrörning i 4 °C till följande dag. Under inkubering binder den primära antikroppen till målproteinet. Efter inkubering med den primära antikroppen tvättades membranet, varefter en sekundär antikropp kopplad till en visualiseringsmolekyl, pepparotsperoxidase (HRP, eng. horse radish peroxidase) tillsattes på membranet och inkuberades en timme i rumstemperatur. Under inkuberingen binder den sekundära antikroppen till den primära antikroppen för att visualisera proteinerna (Mahmood et al., 2012). En lista över de primära och sekundära antikropparna som användes under detta projekt finns listade i tabell 3. Efter inkubationen tvättades membranet tre gånger i 10 minuter innan ECL (eng. enhanced chemilumiscence) -buffert (Cytiva, USA) som reagerar med HRP som är konjugerad till den sekundära antikroppen för att visualisera proteinerna. Signalen detekterades på röntgenfilm. Ju starkare emission desto högre proteinmängd och proteinbanden är synligare på röntgenfilmen. Western blot är en effektiv metod för att ta reda på information om massa eller närvaro av protein av intresse. Därför lämpar sig SDS-PAGE och Western blot analyser för att undersöka Kenny-Ref(2)P interaktion i S2-celler, regleringen av Ref(2)P-nivåer hos Imd-flugmutanter och ifall Ref(2)P binder till ubikvitinerade signaleringsmolekyler via K63-och M1-specifika ubikvitin bindningsdomän efter transfektion och immunoprecipitering.

Tabell 3. Primär-och sekundära antikroppar och deras koncentrationer (primära antikroppar i PBS, 1 % BSA, 0,02 % NaN<sub>3</sub> och sekundära antikroppar i mjölk).

Primär antikropp	Koncentration	Sekundär antikropp	Koncentration
V5-epitop (Serotec)	1: 2500	α-mus IgG (Abcam)	1: 5000
α-Ref(2)P (Abcam)	1: 1000	α-kanin (Santa Cruz Biotechnology)	1: 5000
α-Diap2 (gåva av Prof. P. Meier, Leulier et al., 2006)	1: 2500	α-kanin (Santa Cruz Biotechnology)	1: 5000
α-GFP (Abcam)	1: 2000	α-kanin (Santa Cruz Biotechnology)	1: 5000
α-M1 (producerat i laboratoriet)	1: 1000	α-människa (Invitrogen)	1: 5000
α-Aktin (Santa Cruz Biotechnology)	1: 2500	α-kanin (Santa Cruz Biotechnology)	1: 5000

#### 4.9 Bakterieinducering i flugor inför kvantitativ PCR-experiment

Kvantitativa PCR-analyser utfördes för att studera hur genuttrycket av den antimikrobiella peptiden Dipterucin reglerades i Ref(2)P-flugmutanter efter bakterieinfektion. För att undersöka detta svältes flugorna i två timmar och flugorna placerades i skilda tomma tuber. Totalt plockades 10 vuxna flugor varav fem var honor och fem var hanar. Därefter infekterades de olika fluglinjerna genom matning med en lösning som innehöll bakterier och sukros som pipetterades på ett Whatmanpapper. Bakteriestammen som användes var *Ecc15* och den optimala densiteten för bakteriesuspensionen var 0.3 och bestod av 50 procent bakteriesuspension och till 50 procent femprocentig sukroslösning. Flugorna fick fritt äta av lösningen som innehöll bakterier och sukros i cirka 16 timmar i rumstemperatur. Därefter dissekerades hela tarmen från flugorna. För varje fluglinje användes ett kontrollprov vars AMP-uttryck jämfördes med de infekterade flugornas AMP-uttryck.

#### 4.10 mRNA extrahering inför kvantitativ PCR-experiment

För att isolera mRNA från flugorna och tarmarna användes ett RNA-isoleringskit, RNeasy kit (Qiagen, Tyskland). Flugorna och tarmarna lyses först i lysesbuffert som innehöll  $\beta$ -merkaptoetanol (Sigma-Aldrich, USA) och RLT-buffertlösning (Qiagen, Tyskland) i förhållandet 1:100 med varierande totalvolym. Hela flugor homogeniserades i 600  $\mu$ l medan flugtarmar homogeniserades i 300  $\mu$ l RLT-lyseringsbuffert. Lysatet tillsattes sedan i en QIAshredder kolonn och centrifugerades 2 minuter vid 10 000 rpm. Lysatet som passerade kolonnen togs tillvara och därefter tillsattes 70 % etanol (VWR, USA, utspätt i RO-vatten) till lysatet för att uppnå optimala bindningsförhållanden. 600  $\mu$ l 70 % etanol tillsattes i fluglysat av hela flugor och 300  $\mu$ l 70 % etanol tillsattes i lysatet med tarmar. Lysat-etanolblandningen tillsattes sedan i en RNeasy kolonn och centrifugerades 1 minut vid 10 000 rpm så att RNA:t binder till kioldioxidmembranet. Etanolblandningen avlägsnades och 700  $\mu$ l RW1-buffert tillsattes till kolonnen och centrifugerades 1 minut 10 000 rpm. Vätskan som flödat genom kolonnen avlägsnades. Kolonnen tvättades två gånger för att avlägsna alla föroreningar genom att tillsätta 700  $\mu$ l RPE-buffert innan den sedan torkades genom centrifugering, 2 minuter vid 10 000 rpm. RNA:t som hade samlats i kolonnen eluerades i 30–45  $\mu$ l TE-buffert (0,1 mM EDTA [Sigma-Aldrich, USA], 10 mM Tris [Sigma-Aldrich, USA] med pH-värdet 8) och proven inkuberades 2 minuter i rumstemperatur innan centrifugering, 30 sekunder vid 10 000 rpm. RNA:t och TE-bufferten togs tillvara och elueringssteget upprepades en gång till men utan inkubering. Därefter mättes RNA koncentrationen vid varje prov med hjälp av NanoDrop2000<sup>TM</sup>-spektrofotometer (ThermoFischer, USA). Mätning av nukleinsyror valdes och provernas absorbans mättes vid 260 nm (A260) för att mäta provernas mRNA-koncentrationer. Som blank användes TE-buffert. Dessutom kontrollerades även provernas renhet vid A230 nm (230) och 280 nm (A280) för att kontrollera provernas renhet med A260/280- och A260/A230- förhållandet. För varje prov som innehöll mRNA, togs 1  $\mu$ g mRNA och blandades ut med x  $\mu$ l MilliQ vatten så att den totala volymen i varje prov blev 15  $\mu$ l. Därtill förbereddes även ett kontrollprov, "NAC"-prov (eng. No Amplification Control) som endast innehöll 15  $\mu$ l MilliQ-vatten. NAC-provet användes som kontroll för att testa eventuell kontamination av genomiskt DNA. RNA-proverna förvarades i -80 °C.

#### 4.11 cDNA syntes inför kvantitativ PCR-experiment

För att undersöka Diptericingenuttrycket iflugor och flugtarmar under normala förhållanden och efter bakterieinfektion utfördes kvantitativa PCR-analyser och därför behövde komplementärt DNA (cDNA) syntetiseras. För att starta syntesen av cDNA förbereddes en mastermix av iScript cDNA synteskit (Meridia Bioscience, USA). Mastermixen bestod av 1:4 omvänt transkription (RT)-reaktionsbuffert: RT enzym och 1 µg RNA. Proven inkuberades direkt 10 minuter i 25 °C för att låta RNA-polymeraset fästa sig vid promotorn för att sedan inkubera proverna 15 minuter i 42 °C för att starta elongeringsfasen och slutligen inkuberades proverna i 5 minuter i 85 °C för att inaktivera enzymet. cDNA-proven förvarades sedan i -20 °C tills de användes för kvantitativ PCR.

#### 4.12 Kvantitativ PCR

För att utföra kvantitativ PCR-reaktionen späddes samtliga cDNA-prov ut i förhållandet 1:20 i milliQ vatten och en standardkurva förbereddes. En standardkurva av cDNA användes för att mäta den totala mängden DNA i proven. Den första punkten var en utspädd blandning av samtliga cDNA prov med en totalvolym på 50 µl. Från det första standardprovet utfördes en 1:5 serieutspädning sammanlagt fyra gånger så att varje utspädning var fem gånger svagare än den föregående utspädningen. Därefter tillreddes en reaktionslösning (tabell 4). Den totala mängden reaktionsmix beräknades utgående från antalet prover. Det förbereddes alltid två reaktionslösningar per experiment, en reaktionslösning som innehöll primären för kontrollgenen och en annan reaktionslösning som innehöll primären för målgenen. Kontrollgenen användes för att kunna jämföra aktiveringen av målgenen. Kontrollgenen som användes var RP49 och målgenen som användes vid varje experiment var Diptericin (tabell 5). Av reaktionslösningen pipetterades 8 µl till brunnarna i 96-hålsplattan varefter 2 µl av standardproven, det utspädda cDNA:t och NAC-kontrollprovet tillsattes till brunnarna. Varje cDNA-prov pipeterades i triplikat i 96-hålsplattan. Plattan centrifugerades 1 minut vid 1000 rpm för att få all vätska på bottnet av brunnarna innan plattan kördes i PCR-maskin. Antalet PCR cykler per körning var 40 och reaktionsprotokollet som användes finns presenterat i tabell 6. Rådatat exporterades till en Excelfil där

effektiviteten och det relativa genuttrycket beräknades. För varje brunn på plattan räknades ett  $\Delta C_T$ -värde.  $\Delta C_T$ -värdet beräknades genom att värdet för effektiviteten upphöjdes med  $C_T$ -värdet, detta beräknades både för kontrollgenen och målgenen. Därefter räknades ett  $\Delta\Delta C_T$ -värde för att jämföra kontrollgenen med målgenen, varefter ett medelvärde för triplikaten beräknades, eventuella outliers avlägsnades. Det relativa genuttrycket beräknades sedan genom att dividera  $\Delta\Delta C_T$ -värdet för varje prov med motsvarande värde för icke-infekterade kontrollen, så att det relativa genuttrycket för kontrollen alltid var 1. Resultaten analyserades sedan med programvaran Graphpad Prism och det gjordes en envägs-ANOVA analys med förtroendeintervallet 95 % så att varje oral infekterat flugprov jämfördes med den infekterade kontrollen. Slutligen gjordes grafer av de slutliga resultaten.

Tabell 4. Reaktionslösning för kvantitativ PCR.

Reaktionsbuffert	Slutlig koncentration
SensiFAST SYBR green (Merdian Bioscience)	1X
Främre primär 10 $\mu$ M	200 mM
Bakre primär 10 $\mu$ M	200 mM
MilliQ vatten	2,6 $\mu$ l

Tabell 5: Primärer som användes för qPCR och deras sekvens.

Målgen	Sekvens i riktningen 3' $\rightarrow$ 5'	Sekvens i riktningen 5' $\rightarrow$ 3'
RP49	3'-GAC GCT TCA AGG GAC AGT AT-5'	5'-AAA CGC GGT TCT GCA TGA G-3'
Diptericin	5'-ACC-GCA GTA CCC ACT CAA TC-3'	5'-ACT TTC CAG CTC GGT TCT GA-3'

Tabell 6. Kvantitativ PCR reaktionsprotokoll, antalet cykler per körning var 40.

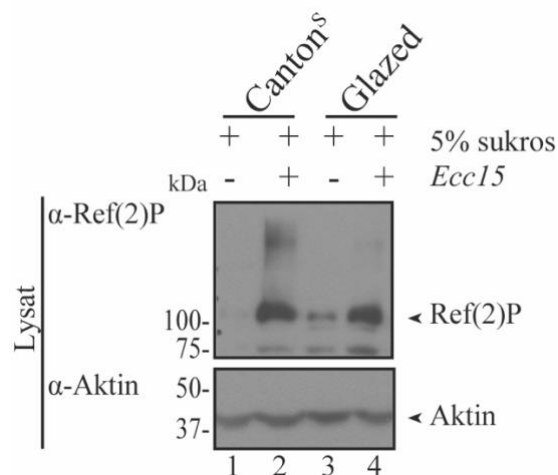
Steg	Temperatur ( $^{\circ}$ C)	Tid (min:sek)
Inledande denaturering	50	03:00
Denaturering	95	00:03
Fästning	60	00:20
Förlängning	95	00:15
Slutlig förlängning	60	01:00

## 5. Resultat

### 5.1 Ref(2)P-proteinnivåerna ökar i bananflugan efter gramnegativ bakterieinfektion

#### 5.1.1 Ref(2)P-proteinnivåerna ökar i vildtypsflugor efter *Ecc15*-bakterieinfektion

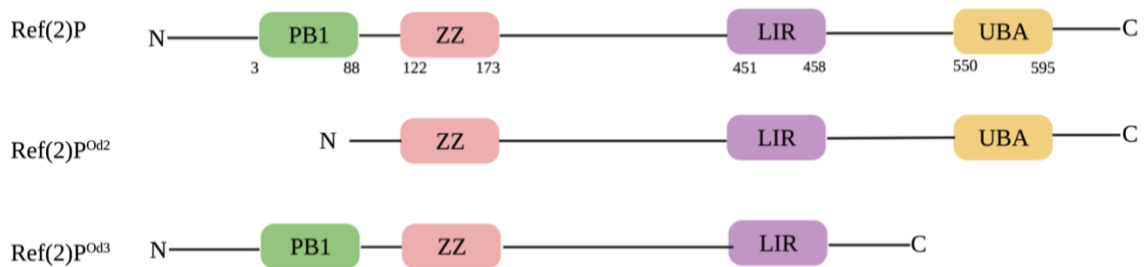
För att undersöka ifall Ref(2)P-nivåerna påverkas av bakterieinfektion tillreddes fluglysat på material isolerat från hela bananflugor. Fluglysat analyserades med Western blot för att undersöka ifall Ref(2)P kunde detekteras. Både vildtypsflugan Canton<sup>S</sup> och Glazed fungerade som kontroller för att kontrollera att båda fluglinjerna fungerar på samma sätt. De erhållna resultaten visade att Ref(2)P-nivåerna i de obehandlade lysatproverna var obetydliga i både vildtypsflugan Canton<sup>S</sup> (figur 9, brunn 1) och kontrollen Glazed (figur 9, brunn 3). Däremot observerades en tydlig ökning av Ref(2)P-nivåerna hos både Canton<sup>S</sup> och Glazed efter *Ecc15*-bakterieinfektion (figur 9, brunn 2 och 4). Därtill noterades ytterligare en tydlig smear av Ref(2)P efter *Ecc15*-bakterieinfektion hos Canton<sup>S</sup> (figur 9, brunn 2). Denna smear kan tyda på ubikvitin-associerat Ref(2)P. Motsvarande smear observerades hos kontrollflugan Glazed efter *Ecc15*-bakterieinfektion men betydligt svagare (figur 9, brunn 4). Resultaten antyder att Ref(2)P behövs för ett Imd-förmedlat immunförsvar i bananflugan.



**Figur 9. Ref(2)P-nivåerna ökar efter bakterieinfektion.** Vuxna flugor matades med 5 % socker och *Ecc15* och Western blot analyser av fluglysat gjordes från kontrollflugor med antikroppar mot Ref(2)P och Aktin (n=3).

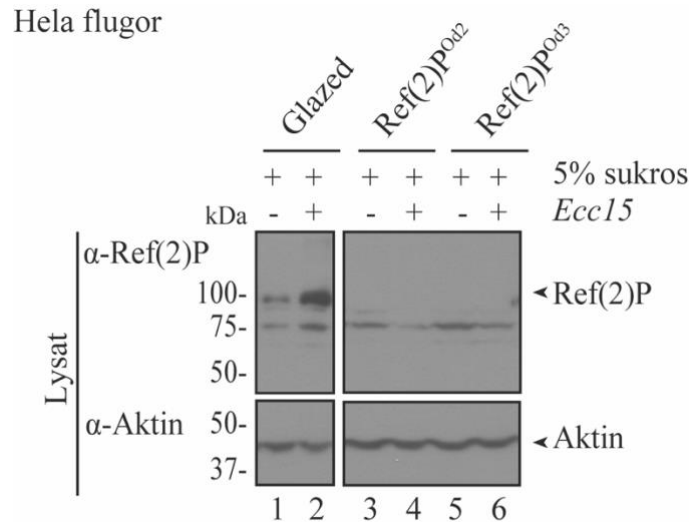
### 5.1.2 Karakterisering av Ref(2)P-flugmutanter

I den här studien användes två Ref(2)P-mutanter, Ref(2)P<sup>Od2</sup> och Ref(2)P<sup>Od3</sup> (figur 10). Ref(2)P<sup>Od2</sup>-mutanten saknar en proteinbinande domän och antas ha en molekylmassa på 85 kDa. Ref(2)P<sup>Od3</sup>-mutanten saknar en ubikvitinbindande domän och har en uppskattad molekylstorlek på 69 kDa. Både den proteinbinande domänen och den ubikvitinbinande domänen antas vara nödvändiga för Ref(2)P:s funktion. Förlust av endera domänen antas kan leda till förlorad funktionalitet (Wyers et al., 1995; Nezis et al., 2008; de Castro et al., 2013).



**Figur 10. Ref(2)P domäner och mutanter.** Ref(2)P innehåller en PB1-domän, en ZZ-domän, en LIR-domän och en UBA-domän. Ref(2)P<sup>Od2</sup>-mutanten saknar PB1-domänen medan Ref(2)P<sup>Od3</sup>-mutanten saknar UBA-domänen. Figuren är skapad i Biorender.com och inspirerad av de Castro et al., 2013.

På samma sätt som kontrollflugan Glazed matades Ref(2)P-mutanterna, Ref(2)P<sup>Od2</sup> och Ref(2)P<sup>Od3</sup> med bakteriestammen *Ecc15* och lysat tillreddes på material isolerat från hela bananflugor. Resultaten visade att det var möjligt att detektera Ref(2)P-proteiner hos kontrollflugan Glazed och att Ref(2)P-nivåerna ökade efter *Ecc15*-bakterieinfektion (figur 11, brunn 1 och 2). Det var inte möjligt att detektera Ref(2)P-mutanternas stympade proteinstorlekar på 85 kDa respektive 69 kDa, varken hos obehandlade (figur 11, brunn 3 och 5) eller behandlade prover (figur 11, brunn 4 och 6). Detta kan tyda på att Ref(2)P-proteinet hos båda Ref(2)P-mutanterna är instabilt.



**Figur 11. Ref(2)P detekterades inte hos Ref(2)P-mutanta flugor.** Vuxna flugor matades med 5 % socker och *Ecc15* och fluglysat tillreddes av hela flugor. För att detektera Ref(2)P utfördes Western blot analyser med antikropparna anti-Ref(2)P och anti-Aktin (n=3).

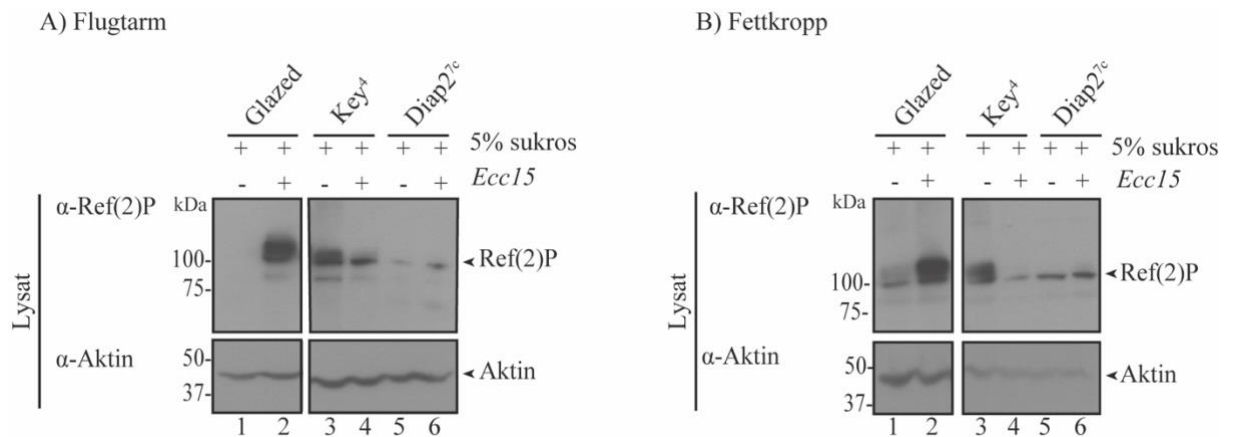
### 5.1.3 Ref(2)P-nivåerna varierar i tarmen och fettkroppen hos Imd-signaleringsflugmutanter

Projektet fortsatte med att undersöka om Ref(2)P-nivåerna reglerades olika i tarmen och i fettkroppen hos bananflugan efter *Ecc15*-bakterieinfektion och om nivåerna kan regleras av Imd-signaleringsräckan. I denna studie användes kontrollflugan Glazed och två Imd-flugmutanter, *Diap2<sup>7c</sup>* och *Key<sup>4</sup>*. *Diap2<sup>7c</sup>*- flugmutanten innehåller en gendeletion i det kritiska E3-ligaset *Diap2* medan *Key<sup>4</sup>*-flugan innehåller en nonsensmutation som avbryter *Kenny*-genen (Rutschmann et al., 2000). Tarmarna och fettkroppen från kontrollflugan och Imd-signaleringsflugmutanterna dissekerades och tarmlysat och lysat av fettkroppen tillreddes. I likhet med resultaten i hela flugor från figur 9 och 11 observerades även förhöjda Ref(2)P-nivåer i tarmen (figur 12 A, brunn 1 och 2) och i fettkroppen (figur 12 B, brunn 1 och 2) hos kontrollfluglinjen Glazed efter *Ecc15*-bakterieinfektion. I *Key<sup>4</sup>*-mutanten noterades höga Ref(2)P-nivåer i tarmen redan under normala förhållanden (figur 12 A, brunn 1 och 3) medan Ref(2)P-nivåerna minskade efter *Ecc15*-infektion (figur 12 A, brunn 2 och 4), vilket var överraskande. Den obehandlade *Key<sup>4</sup>*-mutanten hade i likhet med resultaten från tarmen (figur 12 A) anmärkningsvärt högre Ref(2)P-nivåer i fettkroppen (figur 12 B, brunn 1 och 3) redan under normala förhållanden. Vid jämförelse med *Ecc15*-bakteriematade kontrollflugor var Ref(2)P-nivåerna i fettkroppen hos *Key<sup>4</sup>*-mutanta flugorna obetydliga efter *Ecc15*- bakterieinfektion (figur 12 B, brunn 2 och 4). Detta antyder att Ref(2)P inte bryts ned i tarmen eller fettkroppen hos *Key<sup>4</sup>*-mutanta flugor,



vilket i sin tur antyder att Ref(2)P och Kenny behöver varandra för att transporteras till autofagosomen för nedbrytning.

Resultaten från Western blot analysen visade även att avsaknad av Diap2 inte påverkade Ref(2)P-nivåerna i tarmen under normala förhållanden (figur 12, brunn 1 och 5). Däremot ökade inte Ref(2)P-nivåerna efter *Ecc15*-bakterieinfektion i *Diap2<sup>7c</sup>*-mutanta bananflugor såsom hos kontrollen Glazed (figur 12, brunn 2 och 6). I likhet med resultaten från tarmen (figur 12) noterades ingen ökning av Ref(2)P-nivåer i fettkroppen hos *Diap2<sup>7c</sup>*-mutanten efter *Ecc15*-bakterieinfektion (figur 12 B, brunn 2 och 6). Detta antyder på att Diap2 behövs för att stabilisera Ref(2)P i både tarmen och fettkroppen vid bakterieinfektion. En aktinblot utfördes för att undersöka ifall proteinnivåerna var jämna i samtliga cellysat (figur 12 A och B).



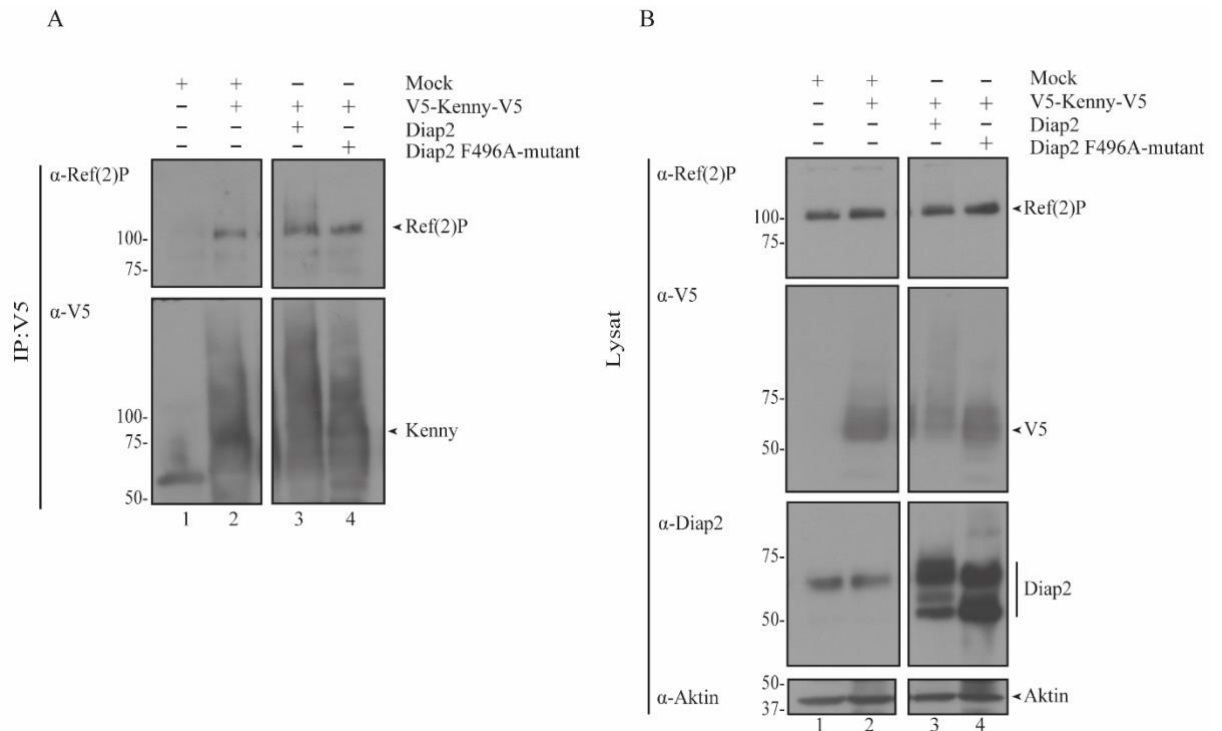
**Figur 12. Ref(2)P-nivåerna varierar i tarmen och fettkroppen hos Imd-signaleringsmutanter.** Vuxna flugor matades med 5 % socker och *Ecc15* och fluglysat tillreddes på dissekerade (A) flugtarmar (B) fettkropp. Ref(2)P analyserades efter Western blot med antikropparna anti-Ref(2)P och anti-Aktin (n=3).

## 5.2 Ref(2)P samverkar med Kenny i S2-celler

Eftersom Kenny verkar påverka Ref(2)P-stabiliteten fortsatte studien med att studera om Ref(2)P kan samverka med Kenny i *Drosophila* S2-celler. För att undersöka detta transfekterades S2-celler med plasmider som innehöll Kenny kopplat till V5. Immunoprecipitering av V5-Kenny utfördes i cellysat och Western blot användes för att detektera Ref(2)P-nivåer i immunoprecipiteringsproven och i cellysaten. Resultaten från lysatblotten i figur 13 B visade att det var möjligt att detektera Ref(2)P i samtliga cellysat och att Ref(2)P uttrycks på likande sätt i cellerna (figur 13 B, brunn 1, 2, 3 och 4). V5-Kenny kunde enbart detekteras i de prov som var transfekterade med

denna plasmid (figur 13 A och B, brunn 2, 3 och 4). Resultaten från immunoprecipiteringen visade att Kenny kan samverka med Ref(2)P i S2-celler (figur 13 A, brunn 2).

I denna studie undersöktes även ifall överuttryck av Imd-signaleringsförmedlaren Diap2 påverkar Ref(2)P-Kenny interaktionen. Detta undersöktes eftersom K63-ubikvitinkedjor är viktiga för regleringen av IMD-signaleringsräckan och Diap2 har visat kunna tillsätta K63-ubikvitinkedjor på komponenter som tillhör Imd-signaleringsräckan (Zhou et al., 2005; Paquette et al., 2010; Aalto et al., 2019). Dessutom antas Diap2 behövas för Ref(2)P-stabilisering (figur 12). För att undersöka ifall Diap2 påverkar Ref(2)P-nivåerna i S2-celler transfekterades cellerna med både vildtyps Diap2 och en muterad form av Diap2 (Diap2-F496A) som saknar E3 ligasaktivitet tillsammans med V5-Kenny. Immunoprecipitering av V5-Kenny utfördes i celllysats. Resultaten visade att Kennys och Ref(2)P:s samverkan inte påverkades varken av överuttryck av vildtyps Diap2 eller Diap2-F496A (figur 13 A, brunn 3 och 4). Däremot var det möjligt att detektera en svag smear av Ref(2)P hos S2-celler transfekterade med V5-Kenny och vildtyp Diap2 (figur 13 A, brunn 3). Detta kan antyda att Ref(2)P ubikvitinerats eller att Ref(2)P binder till ubikvitinkedjor då V5-Kenny transfekterades med vildtyps Diap2. Med denna metod var det inte möjligt att identifiera om Ref(2)P hade ubikvitinerats. Motsvarande smear observerades inte hos S2-celler transfekterade med V5-Kenny och Diap2-F496A, vilket antyder att Diap2s E3-ligasaktivitet ansvarar för denna ubikvitinering (figur 13 A, brunn 4). Ur resultaten från celllysatsblotten noterades även en förflyttning av V5-Kenny transfekterat med Diap2 (figur 13 B, brunn 3). Motsvarande förflyttning av V5-märkta proteiner noterades inte där V5-Kenny överuttrycktes tillsammans med Diap2-F496A (figur 13 B, brunn 4). Detta antyder även att Kenny kan ubikvitineras av Diap2 eller att Kenny förmår binda till ubikvitinkedjor kopplade till Diap2. En aktinblot utfördes för att undersöka ifall proteinnivåerna var jämna i samtliga celllysats (figur 13 B, brunn 1, 2, 3 och 4). Resultatet från detta experiment visar att Ref(2)P och Kenny samverkar i S2-celler och att deras samverkan inte påverkades av Diap2.



**Figur 13. Ref(2)P och Kenny samverkar och är oberoende av Diap2.** För att detektera interaktion mellan Ref(2)P och Kenny, transfekterades S2-celler och immunoprecipitering utfördes på V5-Kenny. För att undersöka om Diap2 påverkar Ref(2)P-Kenny interaktionen överuttrycktes Diap2 och katalytiskt inaktivt Diap2 F496A tillsammans med V5-Kenny i S2-celler. Western blot analyser av immunoprecipiteringen (**A**) och av celllysat (**B**) gjordes med antikropparna anti-Ref(2)P, anti-V5, anti-Diap2 och anti-Aktin ( $n \geq 3$ ).

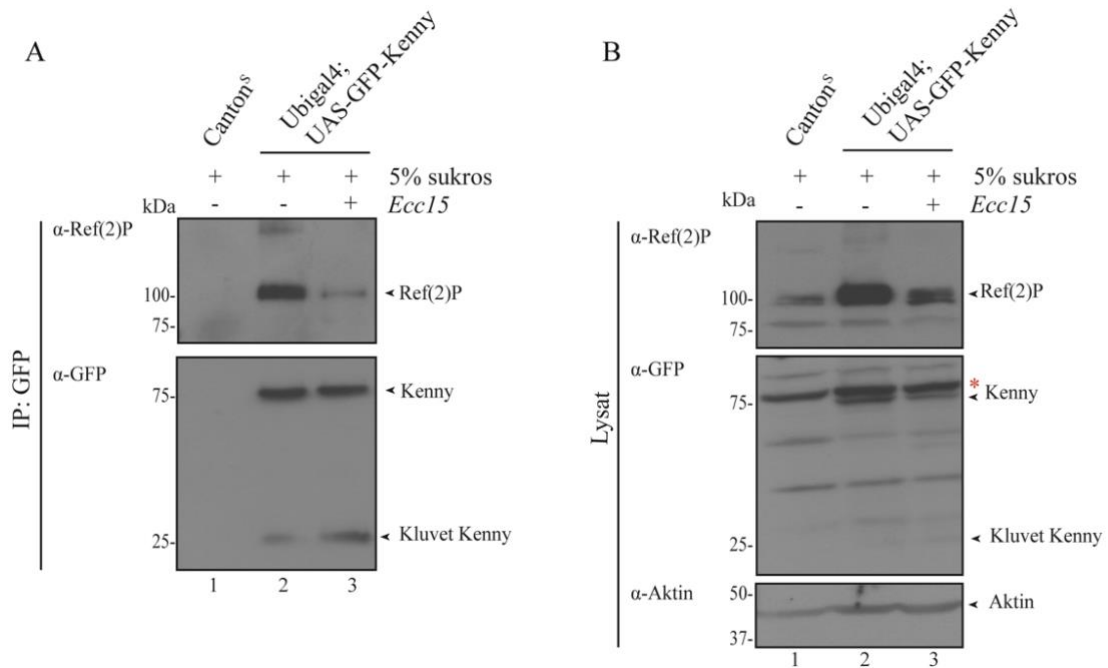
### 5.3 Ref(2)P samverkar med Kenny i bananflugan och deras samverkan minskar efter bakterieinfektion

Vi visade att Ref(2)P och Kenny samverkar i S2-celler. Därtill observerades högre Ref(2)P-nivåer i Kenny muterade flugor. Opublicerade resultat från Meinanders laboratorium har visat att Dredd kan klyva bort Kennys LIR-domän vid gramnegativ bakterieinfektion. Detta sker för att stabilisera den aktiva formen av Kenny och för att förhindra Kenny från autofagosomal nedbrytning. Därför undersöktes det ifall Ref(2)P och Kennys samverkan påverkades av *Ecc15*-bakterieinfektion. Canton<sup>S</sup> användes som vildtypskontroll och för att överuttrycka Kenny i hela bananflugor utnyttjades UAS-Gal4-systemet. Immunoprecipitering utfördes i fluglysats av hela flugor och Western blot användes för att detektera Ref(2)P-proteinnivåer i fluglysaten.

Kenny detekterades efter transgent uttryck i fluglinjen Ubigal4; UAS-GFP-Kenny (figur 14 A, brunn 2 och 3). Hos obehandlade flugor med uttryck av GFP-Kenny

noterades en tydlig interaktion mellan Ref(2)P och GFP-Kenny efter immunoprecipitering (figur 14 A, brunn 2) och som förväntat detekterades Ref(2)P enbart i flugor med uttryck av GFP-Kenny (figur 14 A brunn 2 och 3). Interaktionen mellan Ref(2)P och GFP-Kenny minskade efter *Ecc15*-bakterieinfektion trots att GFP-Kenny-nivåerna i immunoprecipiteringsproverna inte påverkades (figur 14 A brunn 3). Däremot observerades högre nivåer av klivet GFP-Kenny efter *Ecc15*-bakterieinfektion (figur 14 A, brunn 3) eftersom Dredd förmår att klyva bort Kennys LIR-domän efter *Ecc15*-bakterieinfektion.

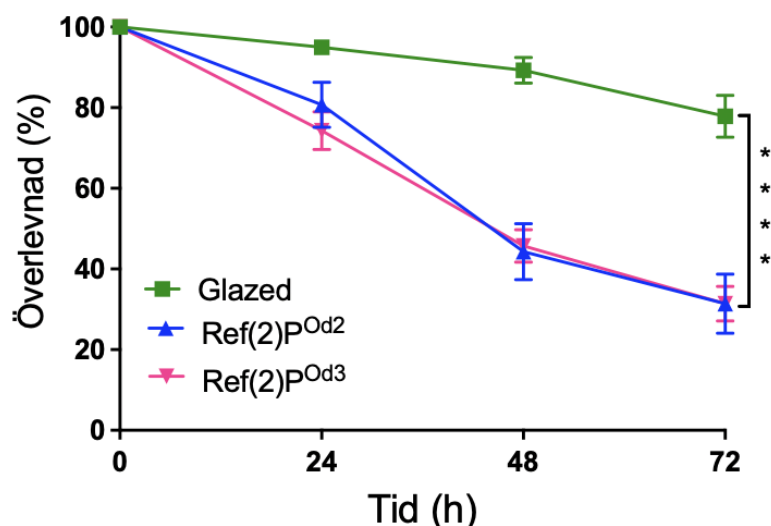
I fluglinjen med förhöjt GFP-Kenny-genuttryck observerades även höga Ref(2)P proteinnivåer i lysatproverna (figur 14 B, brunn 2). Resultaten visade även att Ref(2)P-nivåerna inte längre ökade i lysat efter *Ecc15*-bakterieinfektion då GFP-Kenny överuttrycktes i bananflugan. Istället var Ref(2)P-nivåerna en aning lägre i GFP-Kenny flugor efter *Ecc15*-bakterieinfektion (figur 14 B, brunn 3). Aktinblot utfördes för att undersöka ifall proteinnivåerna var jämna i samtliga proteinprover. Resultaten visade att Ref(2)P och GFP-Kenny samverkar under normala förhållanden. Dessutom visade resultaten att Ref(2)P-nivåerna minskade vid bakterieinfektion då GFP-Kenny överuttrycktes i bananflugan. Detta antyder att Kenny påverkar stabiliteten av Ref(2)P negativt vid bakterieinfektion.



**Figur 14. Ref(2)P samverkar med GFP-Kenny och deras samverkan minskar efter gramnegativ bakterieinfektion.** Vuxna flugor från Canton<sup>S</sup> och Ubigal4; GFP-Kenny flugor matades med 5 % socker och *Ecc15* och fluglysat på material isolerat från hela flugor tillreddes. Western blot analyser av immunoprecipiteringen (A) och av fluglysat (B) utfördes med antikropparna anti-Ref(2)P, anti-GFP och anti-Aktin (n=3).

#### 5.4 Ref(2)P behövs för att överleva *Ecc15*-bakterieinfektion i bananflugan

För att bananflugan skall överleva bakterieinfektion måste Relish aktiveras. Studier har visat att flugmutanter med mutationer i gener som tillhör Imd-signaleringsräckan har sämre förmåga att överleva gramnegativa bakterieinfektioner eftersom de inte förmår att neutralisera bakterier (Leulier et al., 2000). För att undersöka ifall Ref(2)P behövs för ett fungerande immunförsvar i bananflugan utfördes orala infektionsexperiment på Ref(2)P-mutanter med bakteriestammen *Ecc15* och fluglinjen Glazed fungerade som kontroll. Resultaten visade att kontrollen Glazed överlever bättre *Ecc15*-bakterieinfektion eftersom flugorna förmår att neutralisera bakterier (figur 15). Resultaten visade även att båda Ref(2)P-mutanterna, Ref(2)P<sup>Od2</sup> och Ref(2)P<sup>Od3</sup> är känsliga mot *Ecc15*-bakterieinfektion och har sämre överlevnad jämfört med kontrollen Glazed (figur 15). Detta tyder på att Ref(2)P behövs för ett fungerande immunförsvar i bananflugan.

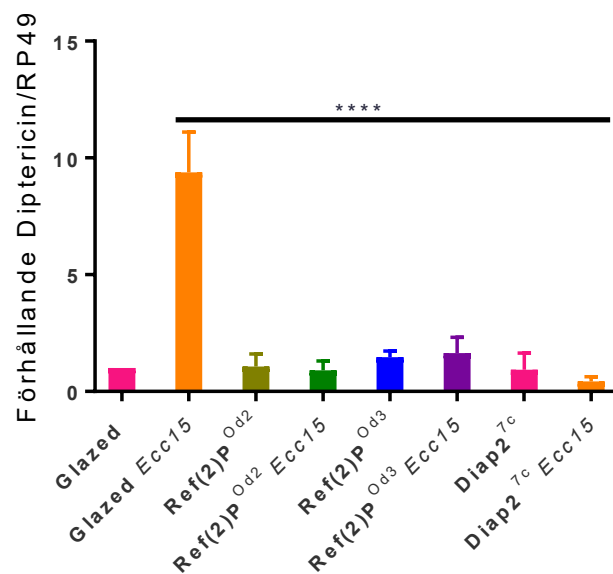


**Figur 15. Överlevnadsanalys av Ref(2)P-flugmutanter.** Ref(2)P flugmutanternas överlevnadsförmåga testades efter *Ecc15*-bakterieinfektion. Fluglinjernas överlevnadsprocent presenteras på y-axeln och tiden på x-axeln. Signifikanta skillnader kan observeras mellan kontrollen Glazed och båda Ref(2)P flugmutanterna Ref(2)P<sup>Od2</sup> och Ref(2)P<sup>Od3</sup> efter 72 timmar. Statistiska analyser gjordes med programvaran Graphpad Prism (tvåvägs-ANOVA, Bonferronitest, medelvärde ± SEM,  $p > 0,05$ ,  $n=7$ ).

### 5.5 Ref(2)P:s PB1-och UBA-domän behövs för att bekämpa *Ecc15*-bakterieinfektion i bananflugan

I bananflugan uttrycks antimikrobiella peptider bland annat i tarmen och dessa behövs för att flugan skall kunna motstå bakterieinfektioner orsakade av gramnegativa bakterier (Hanson et al., 2019a; Marra et al., 2021). Därför fortsatte studien med att undersöka Ref(2)P:s roll i aktiviteten av Relish i tarmens epitel efter gramnegativ bakterieinfektion. Kvantitativa PCR-analyser utfördes för att undersöka om Ref(2)P-mutanterna, Ref(2)P<sup>Od2</sup> och Ref(2)P<sup>Od3</sup> förmår att aktivera den Imd-specifika genen Diptericin. Flugorna matades med bakteriestammen *Ecc15* och fluglysat tillreddes på dissekerade flugtarmar. Relish-aktiviteten i tarmen mättes vid normala förhållanden och efter *Ecc15*-bakterieinfektion. Glazed fungerade som kontroll och Diap2<sup>7c</sup> användes som negativ kontroll eftersom Diap2<sup>7c</sup> inte borde kunna aktivera genuttrycket för Diptericin (Leulier et al., 2000). Resultaten visade att kontrollen Glazed förmår att aktivera genuttrycket av Diptericin och en tydlig ökning av Diptericinuttrycket noterades efter *Ecc15*-bakterieinfektion, vilket var väntat (figur 16). Fluglinjerna Ref(2)P<sup>Od2</sup>, Ref(2)P<sup>Od3</sup> och Diap2<sup>7c</sup> hade signifikant lägre Diptericinuttryck jämfört med den infekterade kontrollen Glazed (figur 16). Detta

antyder att både den proteinbindande-och ubikvitinbindande domänen behövs för att aktivera Relish i tarmen och därför har Ref(2)P-mutanterna sämre överlevnadsförmåga på grund av bristfällig transkriptionen av antimikrobiella peptiden Diptericin i tarmen efter bakterieinfektion. Hos Imd-signaleringsmutanten Diap2<sup>7c</sup> noterades ingen ökning av Diptericingenuttrycket efter *Ecc15*-bakterieinfektion (figur 16) eftersom de inte kan aktivera Relish-förmedlat uttryck av AMP-gener efter bakteriell infektion. Detta antyder även att Diap2 behövs för att aktivera Relish i tarmen.



**Figur 16. Det relativa genuttrycket av Diptericin i tarmen hos Ref(2)P-mutanta flugor före och efter *Ecc15*-bakterieinfektion.** Kvantitativ realtids-PCR utfördes för att undersöka Diptericigenuttrycket efter en 16 timmar lång oral *Ecc15*-bakterieinfektion. RP49 fungerade som uttrycksstandard. Glazed fungerade som kontroll och Diap2<sup>7c</sup> som negativ kontroll. Signifikanta skillnader observerades hos Ref(2)P-mutanterna och Diap2<sup>7c</sup>-mutanten i jämförelse med den bakteriebehandlade kontrollen Glazed. Resultatet som erhöles baseras på tre experiment och analyserades med programvaran Graphpad Prism (envägs-ANOVA, Bonferroni-test, medelvärde  $\pm$  SEM,  $p > 0,05$ ,  $n = 3$ ).

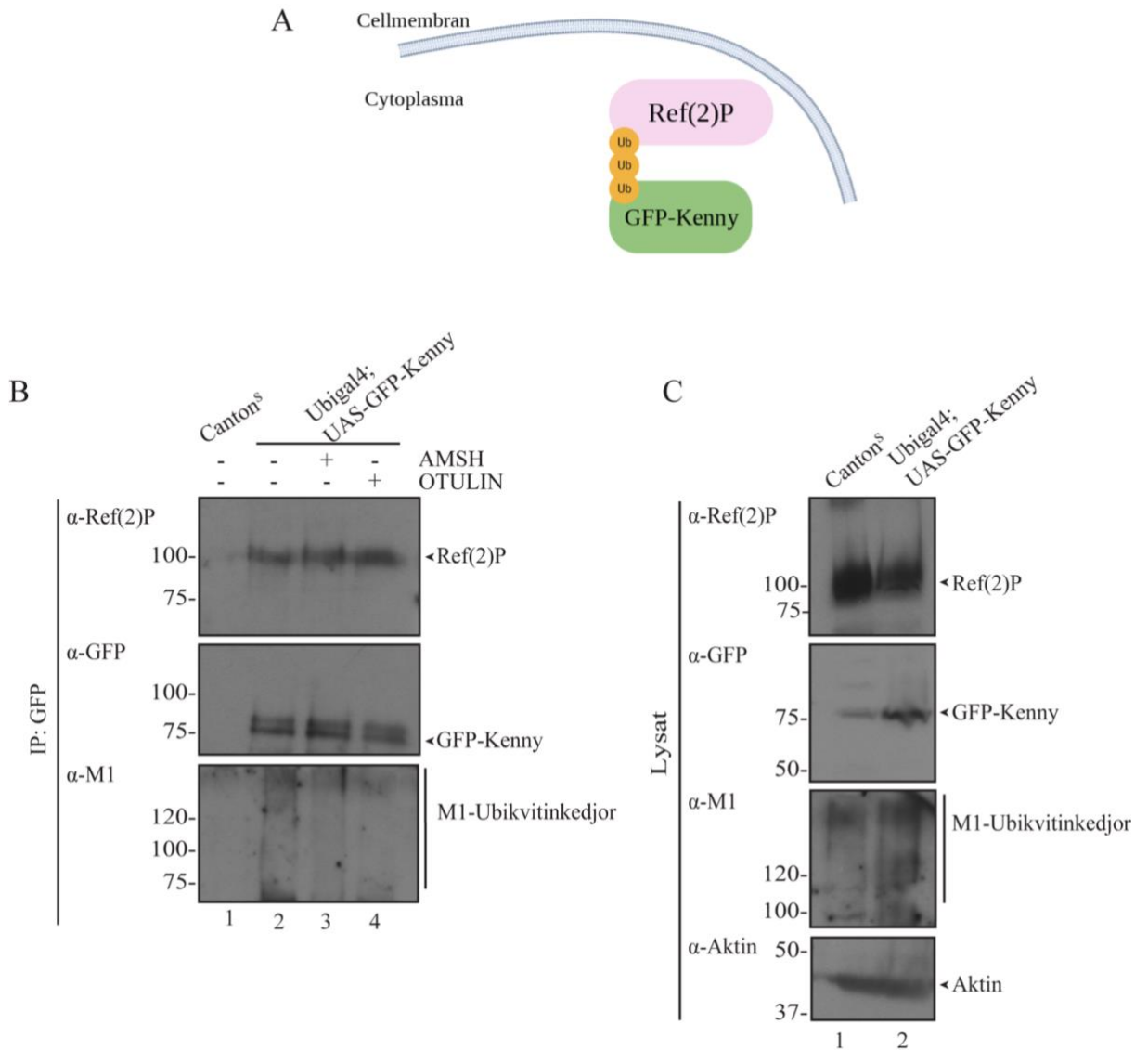
## 5.6 Ref(2)P och Kennys samverkan är inte K63-eller M1-ubikvitinberoende

Eftersom Ref(2)P-proteinet innehåller en UBA-domän var en av målsättningarna i denna studie att undersöka om Ref(2)P och Kennys samverkan är ubikvitinberoende. Detta undersöktes genom att studera ifall Ref(2)P förmår att binda till K63-och M1-specifika ubikvitinkedjor som är kopplade till GFP-Kenny (figur 17 A) (Aalto et al., 2019). Fluglysat av hela flugor tillreddes och immunoprecipitering utfördes för att

först fälla ner GFP-Kenny från fluglysaten för att därefter ytterligare behandla ett immunoprecipiteringsprov med deubikvitinaset AMSH för att bryta ned K63-ubikvitinkedjor. Det andra immunoprecipiteringsprovet behandlades med deubikvitinaset OTULIN för att bryta ned möjliga M1-ubikvitinkedjor. Western blot användes för att detektera Ref(2)P-proteinnivåer och M1-ubikvitinnivåer i immunoprecipiteringsprover och i fluglysatsat.

Resultaten visade att det inte var möjligt att detektera Ref(2)P hos vildtypsflugan Canton<sup>S</sup> (figur 17 B, brunn 1). Däremot var Ref(2)P-nivåerna var jämna då GFP-Kenny överuttrycktes i bananflugan (figur 17 B, brunn 2, 3 och 4). Aktinblot utfördes för att undersöka om proteinnivåerna var jämna i samtliga proteinprover. Resultaten visade att Ref(2)P och GFP-Kenny samverkar och att deras samverkan inte påverkades efter AMSH- eller OTULIN-behandling (figur 17 B, brunn 3 och 4). Som förväntat var det inte möjligt att observera M1-ubikvitinkedjor hos det OTULIN-behandlade immunoprecipiteringsprovet (figur 17 B, brunn 4). Däremot observerades M1-ubikvitinkedjor hos icke-OTULIN-behandlade immunoprecipiteringsprover då GFP-Kenny överuttrycktes, vilket tyder på att OTULIN-behandlingen fungerade (figur 17 B, brunn 2 och 3). Eftersom Ref(2)P och GFP-Kenny:s samverkan inte påverkades efter OTULIN-behandling kan dessa resultat antyda att Ref(2)P och Kenny inte samverkar via M1-ubikvitinkedjor. Trots att det i den här studien var det inte möjligt att detektera om AMSH-behandlingen fungerade eftersom K63-antikroppen inte fungerade, antyder resultaten att Ref(2)P-Kenny samverkan inte är beroende av K63-ubikvitinkedjor. Resultaten från fluglysaten visade att Ref(2)P-nivåerna är jämna i samtliga lysatprover (figur 17 C, brunn 1 och 2).





**Figur 17. Ref(2)P och Kenny samverkar i flugor och deras samverkan är inte beroende av K63- eller M1-ubikvitinkedjor. (A)** Hypotes: Kenny och Ref(2)P samverkar genom ubikvitinbindning, figur skapad i Biorender.com. Western blot analyser av immunoprecipiteringen **(B)** och av fluglysat **(C)** utfördes med antikropparna anti-Ref(2)P, anti-GFP, anti-M1 och anti-aktin,  $n \geq 2$ .

## 6. Diskussion

Idén till att undersöka Ref(2)P:s roll i Imd-signaleringsräckan uppkom tack vare tidigare studier i Meinanders laboratorium där de bland annat har visat att Ref(2)P behövs för ett Imd-förmedlat immunförsvar i bananflugan (Löfbacka, 2015). Dessutom har tidigare studier av bland annat, Barlett med flera (2011), Pircs med flera (2012), och Jang med flera (2015) visat att människans p62 och bananflugans Ref(2)P delar liknande funktioner genom att de reglerar olika cellulära processer, såsom autofagi, differentiering och överlevnad. Ref(2)P deltar i regleringen av autofagocytos genom att transportera ubikvitinerat material till proteasomen och autofagosomen för nedbrytning. Det har tidigare forskats relativt lite kring hurdan funktion Ref(2)P har hos bananflugans immunförsvar. Forskare antar att Ref(2)P behövs för att aktivera ubikvitinerade proteiner och därför antas Ref(2)P kunna reglera NF- $\kappa$ B-aktivitet (Tusco et al., 2017). Därför var målsättningen för denna studie att studera om Ref(2)P behövs för en effektiv NF- $\kappa$ B-aktivering i tarmen hos bananflugan vid bakterieinfektion och om Ref(2)P påverkar stabiliteten av Kenny i tarmen. Kenny tillhör IKK-komplexet och är en viktig komponent i Imd-signaleringsräckan och vid normala situationer håller autofagosomer Kenny inaktivt i cytoplasman (Tusco et al., 2017; Jacom & Nezis 2020). Det antas att både Ref(2)P och Kenny påverkas av autofagosomen vid infektion. Dessutom har människans NEMO och p62 visats samverka (Isalm et al., 2013; Zotti et al., 2014; Furthmann et al., 2023). Därför var den huvudsakliga hypotesen för denna studie att Ref(2)P behövs för en effektiv NF- $\kappa$ B-aktivering och påverkar Imd-signaleringsräckan i tarmen hos bananflugan genom att Ref(2)P samverkar med Kenny. I detta arbete undersöktes även hur avsaknad av Ref(2)P:s proteinbindande domän och ubikvitinbindande domän påverkade bananflugans immunförsvar. Målsättningarna för forskningsprojektet uppnåddes delvis och resulterade i nya upptäckter kring Ref(2)P:s roll i Imd-signaleringsräckan.

### 6.1 Avsaknad av domänstruktur i Ref(2)P-proteiner kan orsaka proteininstabilitet

Wyers med flera (1995) lyckades identifiera båda Ref(2)P<sup>Od2</sup>-och Ref(2)P<sup>Od3</sup>-mutanternas stympade proteinprodukter vars molekylstorlek antas vara 85 kDa

respektive 65 kDa. Motsvarande resultat visade även Nezis med flera år 2008. I den här studien användes en Ref(2)P-antikropp för att detektera Ref(2)P i fluglysät och i S2-celler. Det var möjligt att detektera fullstort Ref(2)P genom hela studien både i S2-celler, i vildtypsflugor och i Imd-signaleringsflugmutanter. Däremot detekterades inte Ref(2)P-proteinerna i Ref(2)P<sup>Od2</sup> och Ref(2)P<sup>Od3</sup>-mutanterna, vilket delvis var överraskande eftersom det inte heller var möjligt att notera någon skillnad mellan Ref(2)P<sup>Od2</sup> och Ref(2)P<sup>Od3</sup>-mutanterna. En möjlig förklaring är att Ref(2)P-antikroppen som användes i den här studien inte var tillräckligt specifik för att känna igen och binda till Ref(2)P:s stympade proteinprodukter. Därför detekterades endast fullstort Ref(2)P-protein. För att detektera Ref(2)P-mutanternas stympade proteinprodukter skulle man alternativt kunna pröva att optimera Ref(2)P-antikroppen. Det är dessutom möjligt att avsaknad av en domänstruktur i Ref(2)P-proteinet leder till proteininstabilitet. Detta skulle sannolikt även påverka Ref(2)P-proteinets veckning och därmed också dess stabilitet eftersom Ref(2)P-proteinerna i Ref(2)P-mutanternas antas nedbrytas snabbt *in vivo*, vilket kan vara en orsak till varför Ref(2)P-mutanterna inte detekterades under den här studien (Nezis et al., 2008). Tidigare resultat från studier av Wyers med flera (1995) antyder på att Ref(2)P-proteinerna som Ref(2)P<sup>Od2</sup>-mutanten uttrycker kan produceras i stora mängder men att Ref(2)P-proteinernas antas vara icke-funktionella. Detta skulle kunna antyda att de 82 första aminosyrorerna i Ref(2)P-proteinet är nödvändiga och behövs för proteinaktivitet.

## 6.2 Ref(2)P-domänerna behövs för att reglera Relish aktivitet

Availa med flera (2002) visade att både p62 och Ref(2)P behöver samverka med respektive aPKC via proteinbindande domän för att aktivera NF- $\kappa$ B. De visade även genom *in vitro* studier att Ref(2)P kan binda till aPKC och att Ref(2)P behövs för att aktivera Toll-signaleringsräckan i S2-celler. I samma studie påstod de även att motsvarande samverkan mellan Ref(2)P och aPKC inte påverkade Imd-signaleringsräckan och aktiveringen av NF- $\kappa$ B-faktorn Relish (Availa et al., 2002). Detta är intressant eftersom tidigare *in vivo* studier i Meinanders laboratorium har visat att Ref(2)P inte påverkade bananflugans överlevnadsförmåga efter att de aktiverade Toll-signaleringsräckan i Ref(2)P-flugmutanter efter septiskt skada med den grampositiva bakteriestammen *Micrococcus luteus* (*M. luteus*). I samma studie visade

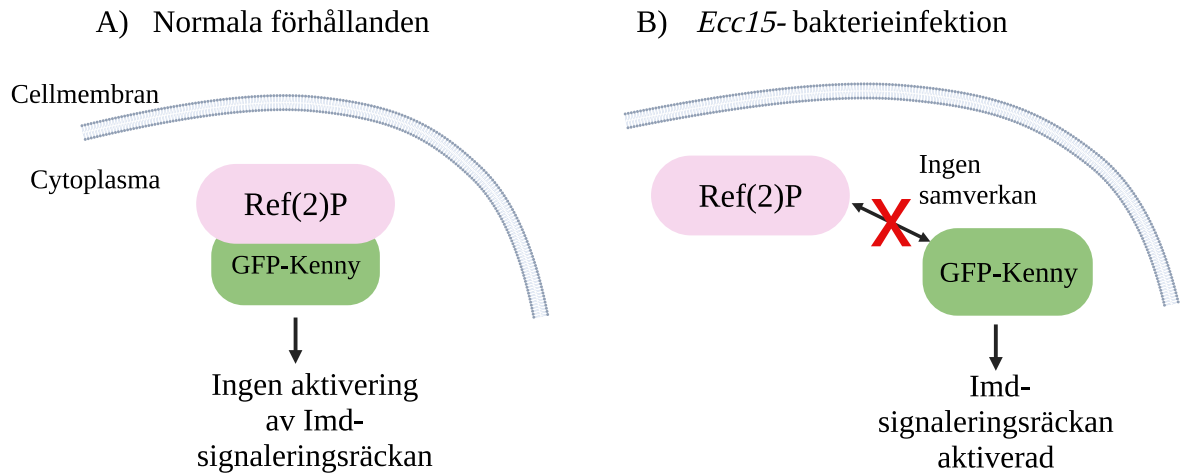
Meinanders laboratorium att Ref(2)P deltar i Imd-signaleringsräckan och att både Ref(2)P:s proteinbindande domän och ubikvitinbinande domän behövs för ett välfungerande immunförsvar i hela bananflugor. Från resultaten ur överlevnadsanalyserna kunde de inte notera några signifikanta skillnader trots att trenden i överlevnadskurvorna mellan Ref(2)P-mutanterna och kontrollflugorna var tydlig efter septisk infektion med den gramnegativa bakteriestammen *Ecc15*, vilket var överraskande (Löfbacka, 2015). Detta kan tyda på att regleringen av Ref(2)P är starkare reglerad i tarmen eftersom orala infektionsexperiment orsakar en lokal tarminflammation medan septiska infektionsexperiment orsakar en systemisk infektion och påverkar istället bananflugans septiska immunförsvar.

I den här studien har jag kunnat visa att Ref(2)P behövs för ett fungerande immunförsvar i bananflugan och att sänkta Dipterincinnivåer i Ref(2)P-mutanterna tyder på att Ref(2)P behövs för att aktivera Relish. Dessa resultat överensstämmer även med tidigare resultat från Meinanders laboratorium (Löfbacka 2015). Resultaten från de kvantitativa-PCR-analyserna i tarmen visade att aktiveringen av Diptericingenuttrycket är bristfällig hos båda Ref(2)P-mutanterna, vilket kan vara orsaken till varför Ref(2)P-mutanterna avlider vid *Ecc15*-bakterieinfektion (figur 15 och 16). Detta antyder att både Ref(2)P:s proteinbindande domän och ubikvitinbindande domän behövs för att reglera transkription av antimikrobiella peptider vid *Ecc15*-bakterieinfektion i tarmen och därför har ingendera Ref(2)P-mutant normal Relish-aktivitet. Om Relish inte aktiveras kan antimikrobiella peptider inte produceras som svar på infektion. Tidigare studier har även visat att en bristfällig produktion av antimikrobiella peptider leder till sämre överlevnad hos flugor vid bakterieinfektion, vilket skulle kunna förklara varför flugmutanter med mutationer i proteiner som tillhör Imd-signaleringsräckan och mutationer i Ref(2)P-proteiner har sämre överlevnad jämfört med vildtypsflugor. Därför skulle det vara intressant att undersöka huruvida bananflugans överlevnadsförmåga påverkades om man nedtystar Ref(2)P-proteinet med hjälp av RNA interferens (RNAi) och skapar en Ref(2)P<sup>RNAi</sup>-transgen fluga.

### 6.3 Ref(2)P:s roll som selektiv receptor för autofagi i bananflugan

Autofagi reglerar NF- $\kappa$ B-aktivitet både i däggdjursceller och i bananflugan (Meng & Cai, 2011; Ganesan et al., 2010). Det antas att Ref(2)P och Kenny kan samverka via autofagosomproteinet LC3a eftersom både Ref(2)P och Kenny innehåller en LIR-domän som binder till detta protein (Barlett et al., 2011; Jang et al., 2015). Tidigare studier har visat att Kenny bryts ned under normala förhållanden för att förhindra en konstant aktivering av Imd-signaleringsräckan (Availa et al., 2002; Goto et al., 2003). Dessutom har studier visat att Kennys LIR-domän behövs för att styra Kenny och IKK-komplexet till autofagosomen för nedbrytning, och därmed undvika en nedströms aktivering av Imd-signaleringsräckan (Ertürk-Hasdemir et al., 2009; Tusco et al., 2017). Preliminära resultat från Meinanders laboratorium visar att Kenny och kaspaset Dredd kan samverka. Vid infektion med gramnegativa bakterier leder denna samverkan till att Dredd utför en proteolytisk klyvning av Kennys LIR-domän (Hermanson, 2023). Därmed är det troligt att Dredd klyver Kenny vid bakterieinfektion för att hindra Kenny och IKK-komplexet från att brytas ner i autofagosomen. En hypotes som skulle stöda detta antagande är att Ref(2)P samverkar med Kenny under normala förhållanden genom att främja dess nedbrytning för att förhindra aktivering av Imd-signaleringsräckan (figur 18 A). Denna hypotes överensstämmer med resultaten från experimenten som visade att Ref(2)P och Kenny samverkar både i S2-celler och i bananflugan under normala förhållanden. Således är det möjligt att Ref(2)P och Kenny tillsammans transporteras till autofagosomen där de bryts ner. Dessutom korrelerar dessa resultat med tidigare observationer i Meinanders laboratorium eftersom det var möjligt att detektera både fullstort Kenny och kluvet Kenny efter *Ecc15*-bakterieinfektion. Därtill noterades en minskad Ref(2)P-Kenny samverkan efter bakterieinfektion, vilket skulle kunna orsakas av minskade nivåer av fullstort Kenny. Således är det troligt att Kenny klyvs vid bakterieinfektion för att främja aktivering av Imd-signaleringsräckan (figur 18 B), men så länge nivåerna av fullstort Kenny hålls höga verkar även Ref(2)P brytas ned. Däremot bryts Ref(2)P inte ned i Key<sup>4</sup>-mutanta flugor, vilket stöder antagandet att en samverkan mellan Ref(2)P och Kenny är nödvändig för att de skall transporteras till autofagosomen. Därför skulle det vara intressant att undersöka denna samverkan mera ingående, exempelvis genom

att undersöka hur Kenny-nivåerna påverkas i någondera av Ref(2)P-flugmutanterna under normala förhållanden samt efter bakterieinfektion.



**Figur 18. Ref(2)P binder till Kenny under normala förhållanden.** (A) Ref(2)P och Kenny samverkar för att bryta ned Kenny via autofagi under normala förhållanden. (B) Efter bakterieinfektion minskar Ref(2)P-Kenny samverkan, vilket främjar aktivering av Relish. Figuren är skapad i Biorender.com.

Med de metoder som användes i denna studie var det endast möjligt att påvisa att Ref(2)P binder till fullstort Kenny, och detta observerades i både *in vitro* och *in vivo* studier. I framtida studier kunde man undersöka ifall Ref(2)P också kan binda till olika varianter av kluvet Kenny. Ref(2)P:s förmåga att binda till andra domäner i Kenny är fortfarande outforskat. För att undersöka detta skulle man kunna skapa en fluglinje med GFP-märkt Kenny som saknar LIR-domänen samt en fluglinje med vildtyps-Kenny, vars GFP-märkning placeras i den C-terminala ändan. Samverkan med Ref(2)P kunde då studeras genom att utföra immunoprecipitering i vilket man precipiterar GFP-märkta proteiner och blottar för Ref(2)P. I dessa fluglinjer skulle det även vara möjligt att studera om Ref(2)P kan brytas ner även vid avsaknad av Kennys LIR-domän. För att skapa en flugmutant med klyvningsresistent Kenny kunde man utnyttja tekniker såsom, molekylär kloning. En flugmutant med klyvningsresistent Kenny skulle högst antagligen sakna en effektiv immunrespons eftersom Ref(2)P antagligen konstant skulle kunna binda till det klyvningsresistent Kenny och främja dess nedbrytning. Med andra ord, om Ref(2)P kan binda till klyvningsresistent Kenny skulle det stöda hypotesen om att Ref(2)P och Kenny behöver varandra för att transporteras till autofagosomen för nedbrytning.

Meinander med flera (2012) har tidigare spekulerat kring om den ubikvitinbindande domänen i däggdjurens p62 främjar aggregering och aktivering av ubikvitinerat kaspas-8. I och med att Dredd är homolog till kaspas-8 skulle det vara intressant att undersöka om Ref(2)P behövs för att aktivera Dredd genom att Ref(2)P binder till ubikvitinerat Dredd för en effektivare klyvning av Kenny för att främja aktiveringen av Imd-signaleringsräckan. Utöver detta skulle det vara intressant att undersöka ifall Ref(2)P-Kenny interaktionen förändras i mutanter med förhöjt Dredd-genuttryck eller i en Dredd-mutant med förlorad genfunktion. Detta antagande kunde studeras i bananflugan genom att använda olika Dredd-flugmutanter för att studera om Ref(2)P och Dredd behöver varandra för att transporteras till autofagosomen under normala förhållanden. En Dredd-flugmutant som har en punktmutation i allel D44 har visats sakna katalytisk aktivitet (Leulier et al., 2000). Denna Dredd-flugmutant har använts i Meinanaders laboratorium för att undersöka om Ref(2)P-nivåerna påverkas av ofunktionellt Dredd. Opublicerat data har visat att D44-flugmutanten har höga Ref(2)P-nivåer både i tarmen och i fettkroppen redan under normala förhållanden samt att Ref(2)P-nivåerna hålls oförändrade efter *Ecc15*-bakterieinfektion. Detta skulle indikera att Ref(2)P även kan binda till och reglera nivåerna av andra proteiner som tillhör Imd-signaleringsräckan under normala förhållanden. En fluglinje med förhöjt Dredd-genuttryck skulle högst antagligen ha högre Ref(2)P-nivåer för att förhindra Dredd-förmedlad aktivering av Imd-signaleringsräckan under normala förhållanden. Vid bakterieinfektion är det troligt att Ref(2)P-nivåerna minskar i flugor med förhöjt Dredd uttryck på grund av en tydlig Dredd-Kenny samverkan som främjar Relish-aktivering. För att undersöka om Ref(2)P deltar i regleringen av Dredd skulle Dredd kunna överuttryckas i bananflugor och immuoprecipiteras på samma sätt som i denna studie. Med hjälp av Western blot analyser skulle man sedan kunna undersöka ifall Ref(2)P kan detekteras både under normala förhållanden och efter bakterieinfektion.

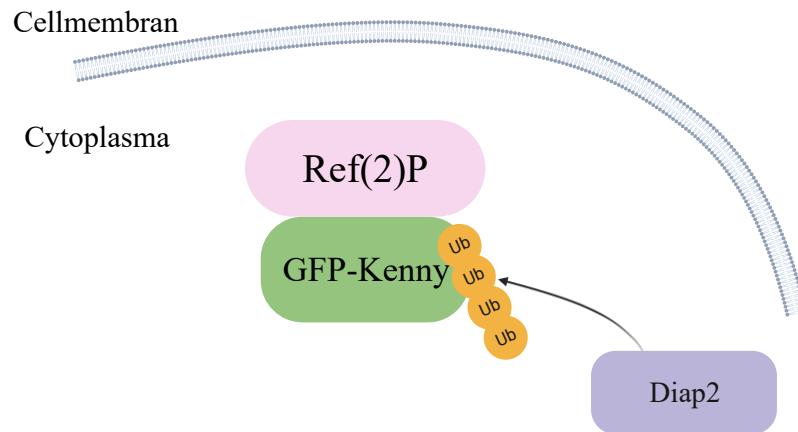
#### 6.4 Ref(2)P-Kenny samverkan är inte K63- eller M1-ubikvitinberoende

Kietz med flera (2022) visade att Diap2 är en nyckelreglerare av Imd-signaleringsräckan och att detta E3-ligas behövs för lokal immunaktivering i epitelcellerna i tarmen. I likhet med resultat från tidigare studier av Leulier med flera (2006) och Kietz med flera (2022) noterades det även i den här studien att Diap2

behövs för en lokal immunaktivering i bananflugans tarm eftersom Diap2<sup>7c</sup>-mutanta flugor hade bristfällig Relish-aktivering efter *Ecc15*-bakterieinfektion. Dessa resultat korrelerar med resultaten i denna avhandling som visade att Diap2 behövs för bananflugans lokala immunförsvar i tarmen (figur 16). Senare noterades även att Ref(2)P påverkade stabiliteten av Diap2 hos Diap2<sup>7c</sup>-mutanta flugor. Således är det möjligt att även Diap2 behövs för att stabilisera Ref(2)P i bananflugans tarm och fettkropp. För att undersöka om Diap2 behövs för att stabilisera Ref(2)P kunde man överuttrycka Diap2 i S2-celler eller i bananflugor, utföra immunoprecipiteringsexperiment och med hjälp av Wester blot analyser detektera Ref(2)P.

I den här studien undersöktes det även om Ref(2)P och Kennys samverkan påverkades av Diap2 i S2-celler. Resultaten var delvis överraskande eftersom en "smear" av Ref(2)P noterades vid överuttryck av Kenny och Diap2 i S2-cellerna trots att Ref(2)P-nivåerna hölls oförändrade. I den här studien var det inte möjligt att fastställa om smearn som noterades orsakas av att Kenny ubikvitineras av Diap2. Samtidigt skulle det betyda att Diap2 samverkar med Kenny eftersom Diap2 kan förmedla K63-förmedlad ubikvitinering av Kenny (Paquette et al., 2010; Meinander et al., 2012; Aalto et al., 2019). En möjlig teori till dessa resultat är att Ref(2)P inte ubikvitineras av Diap2 och därmed är det troligt att Diap2 inte i direkt kontakt med Ref(2)P. Detta skulle kunna förklara varför Ref(2)P-nivåerna hölls oförändrade när Kenny och Diap2 överuttrycktes i S2-celler (figur 13). Tidigare studier av Aalto med flera (2019) visade att Diap2 utför K63-ubikvitinering av Kenny, vilket skulle kunna förklara varför en smear noterades av Ref(2)P. Därmed behövs mera studier för att undersöka om Diap2 påverkar Ref(2)P-Kenny interaktionen. Inga tidigare studier, varken i S2-celler eller i bananflugan, har utförts om möjligheten att Ref(2)P skulle binda till ubikvitinerade signaleringsmolekyler. Därför skulle det vara intressant att undersöka om Diap2 påverkar Ref(2)-Kenny stabiliteten under normala förhållanden för att styra Ref(2)P och Kenny till autofagosomen (figur 19).



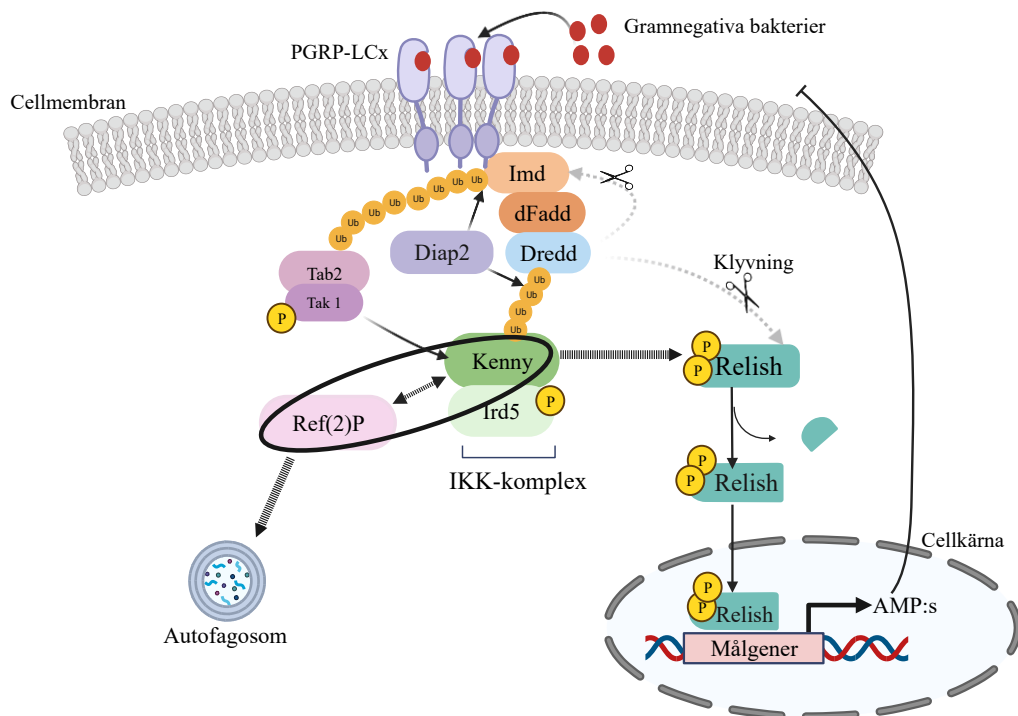


**Figur 19. Ref(2)P och Kenny samverkar inte via ubikvitinkedjor.** Hypotes: Diap2 ubikvitinerar Kenny, men inte Ref(2)P. Ubikvitineringen av Kenny behövs för att styra Ref(2)P och Kenny till autofagosomen. Figuren är skapad i Biorender.com

Resultaten i den här studien antyder att Ref(2)P och Kennys samverkan inte är beroende av K63- eller M1-ubikvitinkedjor i bananflugan eftersom Ref(2)P-Kenny interaktionen var oförändrad i AMSH- och OTULIN-behandlade fluglysar. För att säkerställa att Ref(2)P och Kenny inte samverkar via K63- eller M1-ubikvitinkedjor skulle man därtill kunna prova andra metoder. Ett exempel är att inducera M1-ubikvitinering av Kenny genom att infektera Kenny-mutanta flugor med gramnegativa bakterier (Aalto et al., 2019). Alternativt kan man studera en Kenny-UBAN-mutant, som inte kan binda till M1-ubikvitinkedjor, och sedan infektera flugorna med bakteriestammen *Ecc15* likt Aalto med flera (2019) gjort. För att studera om Kennys ubikvitinbindande domän behövs för Ref(2)P interaktion, kunde man även utföra transfektioner i S2-celler med plasmider som har mutationer i Kennys ubikvitinbindande domän. Trots att resultaten från denna studie visar att Ref(2)P och Kenny samverkar och de bryts ned under normala förhållanden är det ändå osannolikt att M1-ubikvitinkedjor påverkar Ref(2)P-Kenny interaktionen sker genom en direkt kontakt mellan dessa proteiner och inte via ubikvitinkedjor.

## 7 Avslutning

För ungefär 40 år sedan upptäckte av Boman med flera (1972) antimikrobiella peptider i bananflugan. Tack vare denna upptäckt har det fram tills idag gjorts betydande upptäckter i hur bananflugans medfödda immunförsvar regleras eftersom antimikrobiella peptider krävs för att bekämpa bakterieinfektioner (Boman et al., 1972; Buchon et al., 2014). Trots dessa upptäckter finns det ännu många obesvarade frågor kring hur bananflugans immunförsvar regleras. Inflammationssignalering är ett komplext fenomen och för att i framtiden kunna behandla inflammatoriska sjukdomar är det viktigt att förstå hur inflammationssignalering fungerar och identifiera vilka proteiner som reglerar inflammationssignalering. Fram tills idag har det studerats relativt lite kring hur Ref(2)P påverkar Imd-signaleringsräckan och om Ref(2)P kan reglera Relish-aktivitet. Detta forskningsprojekt resulterade i upptäckter kring Ref(2)P:s roll i Imd-signaleringsräckan (figur 20). Studier i bananflugan gör det möjligt att förstå hur Ref(2)P regleras och möjliga komponenter Ref(2)P kan samverka med i Imd-signaleringsräckan för att påverka Relish-aktivitet. Förutom att resultaten från detta forskningsprojekt har bidragit till ny kunskap om hur Ref(2)P reglerar Imd-signaleringsräckan i bananflugan har resultaten även öppnat upp för nya frågeställningar för fortsatta studier. Studier kring Ref(2)P:s roll i bananflugans immunförsvar är därför viktiga och kan hjälpa forskare att förstå hur p62 reglerar NF- $\kappa$ B-aktivitet i människan. Således är bananflugan en mycket lämplig modellorganism för att studera det medfödda immunförsvaret, såsom interaktioner mellan patogener och tarmassocierade mikroorganismer i tarmkanalen. Både kaspaser och IAP-proteiner har visat sig vara viktiga för immunitet och celldöd (Ribero et al., 2007). I framtiden skulle de fungera som intressanta mål för att studera ifall Ref(2)P kan reglerar både kaspaser och IAP-proteiner för att upprätthålla vävnadshomeostas och förhindra utvecklingen av inflammatoriska sjukdomar. Således, skulle det bland annat, vara intressant att definiera på vilken nivå Ref(2)P förmår reglera Imd-signaleringsräckan. Detta kan göras genom epistasanalyser för att studera ifall Ref(2)P har andra möjliga interaktioner mellan olika proteiner eftersom resultaten från denna studie enbart visade att Ref(2)P samverkar med Kenny både i S2-celler och i bananflugan under normala förhållanden (figur 20).



**Figur 20. Schematisk illustration över Imd-signaleringsräckan med Ref(2)P.** När Imd-proteinet binder till PGRP-LCx-receptorn rekryteras dFADD och Dredd. Därefter rekryteras E3-ligaset Diap2 till signaleringskomplexet och tillsätter K63-ubikvitinkedjor till både Dredd och Imd. Tillsättning av K63-ubikvitinkedjor på Dredd aktiverar Dredds katalytiska förmåga medan Diap2 fungerar som stödstruktur för IKK-komplexet och Relish. Relish rekryteras till signaleringskomplexet och fosforyleras av IKK-komplexet för att sedan klyvas av Dredd. Därefter translokeras Relish till cellkärnan för att effektivisera uttrycket av NF- $\kappa$ B-målgener. I den här pro gradu-avhandlingen visade jag att Ref(2)P deltar i regleringen av Imd-signaleringsräckan genom att samverka med Kenny. Under normala förhållanden binder Ref(2)P till Kenny för att transportera Kenny till autofagosomen för nedbrytning. Figuren är skapad i Biorender.com.

I detta forskningsprojekt fokuserade vi på att undersöka Ref(2)P:s roll vid regleringen av NF- $\kappa$ B-aktivitet i tarmen. Det är viktigt att få bättre förståelse av hur både Ref(2)P och p62 regleras i bananflugan och människan eftersom både Ref(2)P och p62 är multifunktionella proteiner och är involverade i flera olika sjukdomar, såsom inflammatoriska sjukdomar, neurogenerativa sjukdomar och tumörutveckling. Bland annat har tidigare studier av p62-genen bidragit till en förståelse kring p62 funktion i både vid åldrade och neurogenerativa sjukdomar eftersom mutationer i p62-genen har observerats hos patienter med Amyotrofisk lateralskleros (ALS) och vissa former av Parkinsons sjukdom (Hurley & Staveley 2021). I samma grad som människans p62 har äldre flugor uppvisat högre Ref(2)P-proteinnivåer i hjärnan jämfört med yngre flugor. Detta tyder på att Ref(2)P ackumuleras i hjärnan under normal åldringsprocess hos bananflugan på grund av nedsatt proteasomal funktion (Tusco et al., 2017). Dessutom har p62 visats delta i regleringen och utvecklingen av olika cancerformer,

såsom bröstcancer, prostatacancer och tarmcancer men det har gjorts relativt lite forskning kring vävnadsspecifik reglering av p62. Därför är det viktigt att fortsätta studera funktionen av både Rel(2)P och p62 för att i framtiden identifiera andra tänkbara reglerare i både flugans och människans NF- $\kappa$ B-signaleringsräckor.

## 8. Appendix

### Buffertar och kemikalier

**S2-lyserings buffert:** 50 mM Tris (Sigma-Aldrich, USA) med pH-värdet 7,5, 150 mM NaCl (Sigma, USA), 1 % Triton x-100 (Honeywell Fluka, USA), 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich, USA) med pH-värdet 8 och 10 % glycerol (Sigma-Aldrich, USA).

**LB medium:** 20g LB-Broth (Sigma-Aldrich, USA) blandades i 1 l destillerat vatten (dH<sub>2</sub>O). Lösningen autoklaverades och förvarades i +4 °C.

**1x PBS:** Kommersiella PBS tabletter (Medicago AB, Sverige) blandades i 1 liter dH<sub>2</sub>O. PBS tabletterna innehöll NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \*2H<sub>2</sub>O och LH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

**10 % APS** (ammonium persulfat): 1 g APS (Sigma-Aldrich, USA) löstes upp i 10 ml dH<sub>2</sub>O och förvarades i -20 °C.

**0,5 M DTT** (ditiotretitol, M=154,3 g/mol, Sigma, USA): 0,771 g DTT (Sigma, USA) löstes upp i 10 ml dH<sub>2</sub>O och förvarades i -20 °C.

**0,5 M EDTA** (etylendiamintetraättiksyra, M=292,2438 g/mol): 93,06 g EDTA (Sigma-Aldrich, USA) löstes upp i 300 ml dH<sub>2</sub>O och pH-värdet justerades till 8 innan resterande dH<sub>2</sub>O tillsattes så att totalvolymen var 500 ml.

**0,5mM NEM** (N-etylmaleimid, M=225,15 g/mol): 0,6256 g NEM (Sigma-Aldrich, USA) löstes upp i 10 ml 99,5 % Etanol (VWR, USA)

**Tvättbuffert för immunoprecipitering (1 l):** 10 ml 1 M Tris (Sigma-Aldrich, USA) med pH-värdet 7,5, 30 ml 5 M NaCl (Sigma, USA), 1 ml Triton x-100 (Honeywell Fluka, USA), glycerol (Sigma-Aldrich, USA) och 900 ml dH<sub>2</sub>O.

**4X Laemlli:** 0,259 M Tris (Sigma-Aldrich, USA) med pH-värdet 6,8, 0,02 % Bromfenolblå (Sigma, USA), 40 % glycerol (Sigma-Aldrich, USA), 4 % SDS (Sigma-Aldrich, USA) och 3 % beta-merkaptotanol (Sigma, USA).

**Separerande gel 10 ml:** 3,725 ml dH<sub>2</sub>O, 0,625 ml separerande buffert (30,25 g, 0,5M Tris-bas (Sigma-Aldrich, USA) i 500 ml dH<sub>2</sub>O med pH-värdet 6.8, 0,025 ml 20 % SDS (Sigma-Aldrich, USA), 0,625 ml 30 % Akrylamid (Sigma-Aldrich, USA), 0,02 ml 10 % APS (Sigma-Aldrich, USA) och 0,05 ml TEMED (Sigma-Aldrich, USA).

**Uppsamlande gel 5 ml:** 4,2 ml dH<sub>2</sub>O, 2,5 ml separerande buffert (30,25 g, 0,5M Tris-bas (Sigma-Aldrich, USA)) i 500 ml dH<sub>2</sub>O med pH-värdet 6.8, 0,05 ml 20 % SDS (Sigma-Aldrich, USA), 3,3 ml 30 % Akrylamid (Sigma-Aldrich, USA), 0,02 ml 10 % APS (Sigma-Aldrich, USA) och 0,01 ml TEMED (Sigma-Aldrich, USA).

**10x Körbuffert:** 30 g Tris-bas (Sigma-Aldrich, USA) och 144 g glycin (Sigma-Aldrich, USA) löstes upp i 1 l MQ-H<sub>2</sub>O.

**DUB-buffert:** 1 M HEPES (Sigma-Aldrich, USA), 5 M NaCl (Sigma, USA) och 0,5 M DTT (Sigma, USA) löstes upp i MQ-H<sub>2</sub>O.

**TE-buffert:** 10 mM Tris (Sigma-Aldrich, USA) med pH-värdet och 0,1 mM EDTA (Sigma-Aldrich, USA) löstes upp i dH<sub>2</sub>O.

## 9. Litteraturförteckning

Aalto, A., Martínez-Chacón, G., Kietz, C., Tsyganova, N., Kreutzer, J., Kallio, P., Broemer, M., & Meinander, A. (2022). M1-linked ubiquitination facilitates NF- $\kappa$ B activation and survival during sterile inflammation. *FEBS Journal*, 289(17), 5180–5197. <https://doi.org/10.1111/febs.16425>

Aalto, A. L., Mohan, A. K., Schwintzer, L., Kupka, S., Kietz, C., Walczak, H., Broemer, M., & Meinander, A. (2019). M1-linked ubiquitination by LUBEL is required for inflammatory responses to oral infection in *Drosophila*. *Cell Death and Differentiation*, 26(5), 860–876. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0164-x>

*All Nobel Prizes in Physiology or Medicine*. (2023). NobelPrize.Org. <https://www.nobelprize.org/prizes/lists/all-nobel-laureates-in-physiology-or-medicine>

Apidianakis, Y., & Rahme, L. G. (2011). *Drosophila melanogaster* as a model for human intestinal infection and pathology. In *DMM Disease Models and Mechanisms*. <https://doi.org/10.1242/dmm.003970>

Bartlett, B. J., Isakson, P., Lewerenz, J., Sanchez, H., Kotzebue, R. W., Cumming, R., Harris, G. L., Nezis, I. P., Schubert, D., Simonsen, A., & Finley, K. D. (2011). p62, Ref(2)P and ubiquitinated proteins are conserved markers of neuronal aging, aggregate formation and progressive autophagic defects. *Autophagy*, 7(6), 572–583. <https://doi.org/10.4161/auto.7.6.14943>

Berkamp, S., Mostafavi, S., & Sachse, C. (2021). Structure and function of p62/SQSTM1 in the emerging framework of phase separation. *FEBS Journal*, 288(24), 6927–6941. <https://doi.org/10.1111/febs.15672>

Bonnay, F., Cohen-Berros, E., Hoffmann, M., Kim, S. Y., Boulianne, G. L., Hoffmann, J. A., Matt, N., & Reichhart, J. M. (2013). Big bang gene modulates gut immune tolerance in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221910110>

Boman, H., Nilsson, I., & Rasmuson, B (1972). Inducible Antibacterial Defence System in *Drosophila*. *Nature* 237, 232-235. <https://doi.org/10.1038/237232a0>

Brand, A. H., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118(2), 401–415. <https://doi.org/10.1242/dev.118.2.401>

Buchon, N., Broderick, N. A., Poidevin, M., Pradervand, S., & Lemaitre, B. (2009a). *Drosophila* Intestinal Response to Bacterial Infection: Activation of Host Defense and Stem Cell Proliferation. *Cell Host & Microbe*, 5(2), 200–211. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.01.003>

- Buchon, N., Broderick, N. A., Chakrabarti, S., & Lemaitre, B. (2009b). Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in *Drosophila*. *Genes and Development*, *23*(19), 2333–2344. <https://doi.org/10.1101/gad.1827009>
- Buchon, N., Silverman, N., & Cherry, S. (2014). Immunity in *Drosophila melanogaster*-from microbial recognition to whole-organism physiology. *Nature reviews. Immunology*, *14*(12), 796–810. <https://doi.org/10.1038/nri3763>
- Busson, D., Pret, AM. (2007). GAL4/UAS Targeted Gene Expression for Studying *Drosophila* Hedgehog Signaling. In: Horabin, J.I. (eds) Hedgehog Signaling Protocols. *Methods Inmolecular Biology™*, vol 397. Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-516-9\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-516-9_13)
- Carré-Mlouka, A., Gaumer, S., Gay, P., Petitjean, A. M., Coulondre, C., Dru, P., Bras, F., Dezelée, S., & Contamine, D. (2007). Control of sigma virus multiplication by the ref(2)P gene of *Drosophila melanogaster*: An in vivo study of the PB1 domain of Ref(2)P. *Genetics*, *176*(1), 409–419. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.063826>
- Ciuffa, R., Lamark, T., Tarafder, A. K., Guesdon, A., Rybina, S., Hagen, W. J. H., Johansen, T., & Sachse, C. (2015). The Selective Autophagy Receptor p62 Forms a Flexible Filamentous Helical Scaffold. *Cell Reports*, *11*(5), 748–758. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.062>
- Cockram, P. E., Kist, M., Prakash, S., Chen, S. H., Wertz, I. E., & Vucic, D. (2021). Ubiquitination in the regulation of inflammatory cell death and cancer. *Cell Death and Differentiation*, *28*(2), 591–605. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-00708-5>
- Damgaard, R. B. (2021). The ubiquitin system: from cell signalling to disease biology and new therapeutic opportunities. *Cell Death and Differentiation*, *28*(2), 423–426. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-00703-w>
- Damgaard, R. B., Walker, J. A., Marco-Casanova, P., Morgan, N. v., Titheradge, H. L., Elliott, P. R., McHale, D., Maher, E. R., McKenzie, A. N. J., & Komander, D. (2016). The Deubiquitinase OTULIN Is an Essential Negative Regulator of Inflammation and Autoimmunity. *Cell*, *166*(5), 1215-1230.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.019>
- De Castro, I. P., Costa, A. C., Celardo, I., Tufi, R., Dinsdale, D., Loh, S. H. Y., & Martins, L. M. (2013). *Drosophila* Ref(2)P is required for the parkin-mediated suppression of mitochondrial dysfunction in pink1 mutants. *Cell Death and Disease*, *4*(10). <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.394>
- Dezelee, S., Bras, F., Contamine, D., Lopez-Ferber, M., Segretain, D., & Teninges, D. (1989). Molecular analysis of Ref(2)P, a *Drosophila* gene implicated in sigma rhabdovirus multiplication and necessary for male fertility. *EMBO Journal*, *8*(11), 3437–3446. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb08508.x>



- DiAngelo, J. R., Bland, M. L., Bambina, S., Cherry, S., & Birnbaum, M. J. (2009). The immune response attenuates growth and nutrient storage in *Drosophila* by reducing insulin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(49), 20853–20858. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906749106>
- Dikic, I., Wakatsuki, S., & Walters, K. J. (2009). Ubiquitin-binding domains - from structures to functions. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *10*(10), 659–671. <https://doi.org/10.1038/nrm2767>
- Dionne, M. S. (2014). Immune-metabolic interaction in *Drosophila*. *Fly*, *8*(2), 75–79. <https://doi.org/10.4161/fly.28113>
- Dittmar, G., & Winklhofer, K. F. (2020). Linear Ubiquitin Chains: Cellular Functions and Strategies for Detection and Quantification. *Frontiers in Chemistry*, *7*(January), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00915>
- Dumétier, B., Zadoroznyj, A., & Dubrez, L. (2020). IAP-Mediated Protein Ubiquitination in Regulating Cell Signaling. In *Cells* (Vol. 9, Issue 5). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/cells9051118>
- Duffy, J. B. (2002). GAL4 system in *Drosophila*: A fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis (United States)*, *34*(1–2), 1–15. <https://doi.org/10.1002/gene.10150>
- Duran, A., Amanchy, R., Linares, J. F., Joshi, J., Abu-Baker, S., Porollo, A., Hansen, M., Moscat, J., & Diaz-Meco, M. T. (2011). P62 Is a Key Regulator of Nutrient Sensing in the mTORC1 Pathway. *Molecular Cell*, *44*(1), 134–146. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.038>
- Ertürk-Hasdemir, D., Broemer, M., Leulier, F., Lane, W. S., Paquette, N., Hwang, D., Kim, C. H., Stöven, S., Meier, P., & Silverman, N. (2009). Two roles for the *Drosophila* IKK complex in the activation of Relish and the induction of antimicrobial peptide genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(24), 9779–9784. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812022106>
- French, M. E., Koehler, C. F., & Hunter, T. (2021). Emerging functions of branched ubiquitin chains. *Cell Discovery*, *7*(1). <https://doi.org/10.1038/s41421-020-00237-y>
- Fukuyama, H., Verdier, Y., Guan, Y., Makino-Okamura, C., Shilova, V., Liu, X., Maksoud, E., Matsubayashi, J., Haddad, I., Spirohn, K., Ono, K., Hetru, C., Rossier, J., Ideker, T., Boutros, M., Vinh, J., & Hoffmann, J. A. (2013). Landscape of protein-protein interactions in *Drosophila* immune deficiency signaling during bacterial challenge. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(26), 10717–10722. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304380110>

Furthmann, N., Angersbach, L., Bader, V., Blusch, A., Goel, S., Sánchez-Vicente, A., Krause, L. J., Grover, P., Trinkaus, V. A., Well, E. M. van, Jaugstetter, M., Tschulik, K., Damgaard, R. B., Saft, C., Ellrichmann, G., Gold, R., Koch, A., Englert, B., Glatzel, M., ... Winklhofer, K. F. (2023). NEMO reshapes the protein aggregate interface and promotes aggregation by co-condensation with p62. *BioRxiv*, 2023.06.05.543428. <https://doi.org/10.1101/2023.06.05.543428>

Ganesan, S., Aggarwal, K., Paquette, N., & Silverman, N. (2010). NF- $\kappa$ B/Rel Proteins and the Humoral Immune Responses of *Drosophila melanogaster* (pp. 25–60). [https://doi.org/10.1007/82\\_2010\\_107](https://doi.org/10.1007/82_2010_107)

Georgel, P., Naitza, S., Kappler, C., Ferrandon, D., Zachary, D., Swimmer, C., Kopczynski, C., Duyk, G., Reichhart, J. M., & Hoffmann, J. A. (2001). Drosophila immune deficiency (IMD) is a death domain protein that activates antibacterial defense and can promote apoptosis. *Developmental Cell*, 1(4), 503–514. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(01\)00059-4](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(01)00059-4)

Ghosh, S., & Karin, M. (2002). Review Missing Pieces in the NF- $\kappa$ B Puzzle stimulate the migration and maturation of lymphocytes. In *Cell* (Vol. 109). [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00703-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00703-1)

Gosh, S., May, M. T., & Kopp, E. B. (1998). NF- $\kappa$ B and Rel proteins: Evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual Review of Immunology* 16, 225–260. <https://10.1146/annurev.immunol.16.1.225>

Ha, E. M., Oh, C. T., Bae, Y. S., & Lee, W. J. (2005). A direct role for dual oxidase in Drosophila gut immunity. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1117311>

Hanson, M. A., Dostálová, A., Ceroni, C., Poidevin, M., Kondo, S., & Lemaître, B. (2019a). Erratum: Correction: Synergy and remarkable specificity of antimicrobial peptides in vivo using a systematic knockout approach (eLife (2019) 8 PII: e48778). *ELife*, 8, 1–24. <https://doi.org/10.7554/eLife.48778>

Hanson, M. A., Lemaitre, B., & Unckless, R. L. (2019b). Dynamic Evolution of Antimicrobial Peptides Underscores Trade-Offs Between Immunity and Ecological Fitness. *Frontiers in Immunology*, 10(november). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02620>

Hanson, M. A., & Lemaitre, B. (2022). Antimicrobial peptides do not directly contribute to aging in Drosophila but improve lifespan by preventing dysbiosis. *BioRxiv*, 2022.08.24.504952. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.08.24.504952v1%0Ahttps://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.08.24.504952v1.abstract>

Hennig, P., Fenini, G., Di Filippo, M., Karakaya, T., & Beer, H. D. (2021). The Pathways Underlying the Multiple Roles of p62 in Inflammation and Cancer. *Biomedicines*, 9(7), 707. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9070707>

- Herhaus, L., van den Bedem, H., Tang, S., Maslennikov, I., Wakatsuki, S., Dikic, I., & Rahighi, S. (2019). Molecular Recognition of M1-Linked Ubiquitin Chains by Native and Phosphorylated UBAN Domains. *Journal of Molecular Biology*, 431(17), 3146–3156. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.06.012>
- Hermanson, Elinda (2023). Genetisk analys av Dredd-förmedlad klyvning av Kenny i bananflugans tarm-Magisteravhandling.
- Hetru, C., & Hoffmann, J. A. (2009). NF-kappaB in the immune response of *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(6), 1–15. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000232>
- Hoffmann, J. A. (2003). The immune response of *Drosophila*. *Nature* 426, 33-38. <https://doi.org/10.1038/nature02021>
- Hoffmann, J., Reichhart, JM (2002). *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat Immunol* 3, 121–126. <https://doi.org/10.1038/ni0202-121>
- Hospenthal, M. K., Mevissen, T. E. T., & Komander, D. (2015). Deubiquitinase-based analysis of ubiquitin chain architecture using Ubiquitin Chain Restriction (UbiCRest). *Nature Protocols*, 10(2), 349–361. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.018>
- Hu, H., & Sun, S. C. (2016). Ubiquitin signaling in immune responses. In *Cell Research*. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.40>
- Hu, S., & Yang, X. (2000). dFADD, A novel death domain-containing adapter protein for the *Drosophila* caspase DREDD. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000341200>
- Hurley, J. H., Lee, S., & Prag, G. (2006). Ubiquitin-binding domains. *The Biochemical journal*, 399(3), 361–372. <https://doi.org/10.1042/BJ20061138>
- Hurley, E. P., & Staveley, B. E. (2021). Inhibition of Ref(2)P, the *Drosophila* homologue of the p62/SQSTM1 gene, increases lifespan and leads to a decline in motor function. *BMC Research Notes*, 14(1), 4–9. <https://doi.org/10.1186/s13104-021-05462-6>
- Islam, M. A., Sooro, M. A., & Zhang, P. (2018). Autophagic regulation of p62 is critical for cancer therapy. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19051405>
- Ivey-Hoyle, M. (1991). Recombinant gene expression in cultured *Drosophila melanogaster* cells. *Current Opinion in Biotechnology*, 2(5), 704-707. [https://doi.org/10.1016/0958-1669\(91\)90038-7](https://doi.org/10.1016/0958-1669(91)90038-7)
- Jacomin, A. C., & Nezis, I. P. (2020). Selective autophagic degradation of the IKK complex in *Drosophila* is mediated by Kenny/IKK $\gamma$  to control inflammation. *Molecular and Cellular Oncology*, 7(1), 6–9. <https://doi.org/10.1080/23723556.2019.1682309>

Jain, A., Rusten, T. E., Katheder, N., Elvenes, J., Bruun, J. A., Sjøttem, E., Lamark, T., & Johansen, T. (2015). P62/sequestosome-1, autophagy-related gene 8, and autophagy in *Drosophila* are regulated by nuclear factor erythroid 2-related factor 2(NRF2), independent of transcription factor TFEB. *Journal of Biological Chemistry*, 290(24), 14945–14962. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.656116>

Jang, H. A., Kojour, M. A. M., Patnaik, B. B., Han, Y. S., & Jo, Y. H. (2022). Current Status of Immune Deficiency Pathway in *Tenebrio molitor* Innate Immunity. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.906192>

Jennings, B. H. (2011) ‘*Drosophila*-a versatile model in biology & medicine’, *Materials Today*. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70113-4](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70113-4)

Kakidani H. & Ptashne M. (1988). GAL4 activates gene expression in mammalian cells. *Cell*, 52(2), 161–167. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90504-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90504-1)

Kaneko, T. and Silverman, N. (2005), Bacterial recognition and signalling by the *Drosophila* IMD pathway. *Cellular Microbiology*, 7: 1049-1050. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00542.x>

Kenmoku, H., Hori, A., Kuraishi, T., & Kurata, S. (2017). A novel mode of induction of the humoral innate immune response in *Drosophila* larvae. *DMM Disease Models and Mechanisms*. <https://doi.org/10.1242/dmm.027102>

Keusekotten, K., Elliott, P. R., Glockner, L., Fiil, B. K., Damgaard, R. B., Kulathu, Y., Wauer, T., Hospenthal, M. K., Gyrd-Hansen, M., Krappmann, D., Hofmann, K., & Komander, D. (2013). XOTULIN antagonizes LUBAC signaling by specifically hydrolyzing met1-linked polyubiquitin. *Cell*, 153(6), 1312. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.014>

Kietz, C., Mohan, A. K., Pollari, V., Tuominen, I. E., Ribeiro, P. S., Meier, P., & Meinander, A. (2022). Drice restrains Diap2-mediated inflammatory signalling and intestinal inflammation. *Cell Death and Differentiation*, 29(1), 28–39. <https://doi.org/10.1038/s41418-021-00832-w>

Kim, C. H., Paik, D., Rus, F., & Silverman, N. (2014). The caspase-8 homolog Dredd cleaves Imd and relish but is not inhibited by p35. *Journal of Biological Chemistry*, 289(29), 20092–20101. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.544841>

Kim, S. H., & Lee, W. J. (2014). Role of DUOX in gut inflammation: Lessons from *Drosophila* model of gut-microbiota interactions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3(JAN), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00116>

Kleino, A., & Silverman, N. (2019). Regulation of the *Drosophila* Imd pathway by signaling amyloids. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 108, 16–23. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.03.003>

Ko, M. S., Cohen, S. N., Polley, S., Mahata, S. K., Biswas, T., Huxford, T., & Ghosh, G. (2022). Regulatory subunit NEMO promotes polyubiquitin-dependent induction of NF- $\kappa$ B through a targetable second interaction with upstream activator IKK2. *The Journal of biological chemistry*, 298(5), 101864. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101864>

Komander, D. (2009). The emerging complexity of protein ubiquitination. In *Biochemical Society Transactions*. <https://doi.org/10.1042/BST0370937>

Komander, D., Clague, M. J., & Urbé, S. (2009). Breaking the chains: Structure and function of the deubiquitinases. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 10, Issue 8, pp. 550–563). <https://doi.org/10.1038/nrm2731>

Kumar, A. V., Mills, J., & Lapierre, L. R. (2022). Selective Autophagy Receptor p62/SQSTM1, a Pivotal Player in Stress and Aging. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10(February), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.793328>

Kuraishi, T., Hori, A., & Kurata, S. (2013). Host-microbe interactions in the gut of *Drosophila melanogaster*. *Frontiers in Physiology*, 4 DEC (December), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00375>

Lamark, T., Kirkin, V., Dikic, I., & Johansen, T. (2009). NBR1 and p62 as cargo receptors for selective autophagy of ubiquitinated targets. *Cell Cycle*, 8:13, 1986–1990. <https://doi.org/10.4161/cc.8.13.8892>

Lee, H., Peng, Y., & Guo, Y. (2013). Analysis of lipid droplet dynamics and functions in *Drosophila melanogaster*. In *Methods in Cell Biology* (1st ed., Vol. 116, Issue Ld). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408051-5.00004-8>

Lemaitre, B., & Hoffmann, J. (2007). The Host Defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology*, 25(1), 697–743. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615>

Leclerc, V., & Reichhart, J. M. (2004). The immune response of *Drosophila melanogaster*. *Immunological Reviews*, 198, 59–71. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0130.x>

Leulier, F., Lhocine, N., Lemaitre, B., & Meier, P. (2006). The *Drosophila* inhibitor of apoptosis protein DIAP2 functions in innate immunity and is essential to resist gram-negative bacterial infection. *Molecular and cellular biology*, 26(21), 7821–7831. <https://doi.org/10.1128/MCB.00548-06>

Leulier, F., Rodriguez, A., Khush, R. S., Abrams, J. M., & Lemaitre, B. (2000). The *Drosophila* caspase Dredd is required to resist Gram-negative bacterial infection. *EMBO Reports*. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvd073>

Li, W., & Ye, Y. (2008). Polyubiquitin chains: Functions, structures, and mechanisms. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(15), 2397–2406. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8090-6>

Li, Jie, Chai, Q. Y., & Liu, C. H. (2016). The ubiquitin system: A critical regulator of innate immunity and pathogen-host interactions. In *Cellular and Molecular Immunology*. <https://doi.org/10.1038/cmi.2016.40>

Liu, Y., & Lehmann, M. (2008.). *A Genomic Response to the Yeast Transcription Factor GAL4 in Drosophila*. <https://doi.org/10.4161/fly.6311>

Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. C. (2017). NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. In *Signal Transduction and Targeted Therapy*. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>

Liu, W. J., Ye, L., Huang, W. F., Guo, L. J., Xu, Z. G., Wu, H. L., Yang, C., & Liu, H. F. (2016). P62 Links the Autophagy Pathway and the Ubiquitin-Proteasome System Upon Ubiquitinated Protein Degradation. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 21(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s11658-016-0031-z>

Löfbacka, Mikaela (2015) Ref(2)P reglerar immunförsvaret hos *Drosophila melanogaster* efter Gramnegativ bakterieinfektion- Magisteravhandling.

Marra, A., Hanson, M. A., Kondo, S., Erkosar, B., & Lemaitre, B. (2021). *Drosophila* Antimicrobial Peptides and Lysozymes Regulate Gut Microbiota Composition and Abundance. *MBio*, 12(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.00824-21>

Martínez, B. A., Hoyle, R. G., Yeudall, S., Granade, M. E., Harris, T. E., David Castle, J., Leitinger, N., & Bland, M. L. (2020). Innate immune signaling in *Drosophila* shifts anabolic lipid metabolism from triglyceride storage to phospholipid synthesis to support immune function. In *PLoS Genetics* (Vol. 16, Issue 11). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009192>

Meinander, A., Runchel, C., Tenev, T., Chen, L., Kim, C. H., Ribeiro, P. S., Broemer, M., Leulier, F., Zvelebil, M., Silverman, N., & Meier, P. (2012). Ubiquitylation of the initiator caspase DREDD is required for innate immune signalling. *EMBO Journal*, 31(12), 2770–2783. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.121>

Meng, Q., & Cai, D. (2011). Defective hypothalamic autophagy directs the central pathogenesis of obesity via the I $\kappa$ B kinase  $\beta$  (IKK $\beta$ )/NF- $\kappa$ B pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 286(37), 32324–32332. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.254417>

Morgan, T. H., Sturtevant, A.H., & Bridges, C.B. (1915). *The Mechanism of Mendelian heredity* (pp. 1–286). <https://doi.org/10.5962/bhl.title.22551>

Musselman, L. P., Fink, J. L., Ramachandran, P. V., Patterson, B. W., Okunade, A. L., Maier, E., Brent, M. R., Turk, J., & Baranski, T. J. (2013). Role of fat body lipogenesis in protection against the effects of caloric overload in *drosophila*. *Journal of Biological Chemistry*, 288(12), 8028–8042. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.371047>

Musselman, L. P., & Kühnlein, R. P. (2018). *Drosophila* as a model to study obesity and metabolic disease. *Journal of Experimental Biology*, 121. <https://doi.org/10.1242/jeb.163881>

Myllymäki, H., Valanne, S., & Rämet, M. (2014). The *Drosophila* Imd Signaling Pathway. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303309>

Nagy, P., Hegedus, K., Piracs, K., Varga, Á. & Juhász, G. (2014). Different effects of Atg2 and Atg18 mutations on Atg8a and Atg9 trafficking during starvation in *Drosophila*. *FEBS Letters*, 588(3), 408–413. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.12.012>

Nehme, N. T., Liégeois, S., Kele, B., Giammarinaro, P., Pradel, E., Hoffmann, J. A., Ewbank, J. J., & Ferrandon, D. (2007). A model of bacterial intestinal infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Pathogens*, 3(11), 1694–1709. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030173>

Nezis, I. P. (2012). The selectivity and specificity of autophagy in *Drosophila*. *Cells*, 1(3), 248–262. <https://doi.org/10.3390/cells1030248>

Nezis, I. P., Simonsen, A., Sagona, A. P., Finley, K., Gaumer, S., Contamine, D., Rusten, T. E., Stenmark, H., & Brech, A. (2008). Ref(2)P, the *Drosophila melanogaster* homologue of mammalian p62, is required for the formation of protein aggregates in adult brain. *Journal of Cell Biology*, 180(6), 1065–1071. <https://doi.org/10.1083/jcb.200711108>

Nicholson, L. B. (2016). The immune system. *Essays in Biochemistry*, 60(3), 275–301. <https://doi.org/10.1042/EBC20160017>

Nilangekar, K., Murmu, N., Sahu, G., & Shrivastava, B. v. (2019). Generation and characterization of germline-specific autophagy and mitochondrial reactive oxygen species reporters in *Drosophila*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7(APR). <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00047>

Olsen, M. K., Rockenbach, S. K., Fischer, H. D., Hoogerheide, J. G., & Tomich, C. S. (1992). Stable production of an analog of human tissue plasminogen activator from cultured *Drosophila* cells. *Cytotechnology*, 10(2), 157–167. <https://doi.org/10.1007/BF00570892>

Paquette, N., Broemer, M., Aggarwal, K., Chen, L., Husson, M., Ertürk-Hasdemir, D., Reichhart, J. M., Meier, P., & Silverman, N. (2010). Caspase-Mediated Cleavage, IAP Binding, and Ubiquitination: Linking Three Mechanisms Crucial for *Drosophila* NF- $\kappa$ B Signaling. *Molecular Cell*, 37(2), 172–182. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.12.036>

Piracs, K., Nagy, P., Varga, A., Venkei, Z., Erdi, B., Hegedus, K., & Juhász, G. (2012). Advantages and Limitations of Different p62-Based Assays for Estimating Autophagic Activity in *Drosophila*. *PLoS ONE*, 7(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044214>

Pikarsky, E., Porat, R., Stein, I., Abramovitch, R., Amit, S., Kasem, S., Gutkovich-Pyest, W., Urieli-Shoval, S., Galun, E., Ben-Neriah, Y. (2004). NF- $\kappa$ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 431,461–466. <https://doi.org/10.1038/nature02924>

Rahman, A., Lőrincz, P., Gohel, R., Nagy, A., Csordás, G., Zhang, Y., Juhász, G., & Nezis, I. P. (2022). GMAP is an Atg8a-interacting protein that regulates Golgi turnover in *Drosophila*. *Cell Reports*, 39(9). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110903>

Reyes-Turcu, F. E., Ventii, K. H., & Wilkinson, K. D. (2009). Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. In *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 78, pp. 363–397). <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.082307.091526>

Rivkin, E., Almeida, S. M., Ceccarelli, D. F., Juang, Y. C., MacLean, T. A., Srikumar, T., Huang, H., Dunham, W. H., Fukumura, R., Xie, G., Gondo, Y., Raught, B., Gingras, A. C., Sicheri, F., & Cordes, S. P. (2013). The linear ubiquitin-specific deubiquitinase gumby regulates angiogenesis. *Nature*, 498(7454), 318–324. <https://doi.org/10.1038/nature12296>

Rutschmann, S., Jung, A., Zhou, R., Silverman, N., Hoffmann, J.A., & Ferrandon, D. (2000). Role of *Drosophila* IKK $\gamma$  in a Toll-Independent Antibacterial Immune Response. *Nature Immunology* 1(4): 342–47. <https://doi.org/10.1038/79801>

Sadaqat, Z., Kaushik, S., & Kain, P. (2022). Gut Feeding the Brain: *Drosophila* Gut an Animal Model for Medicine to Understand Mechanisms Mediating Food Preferences. <https://doi.org/10.5772/intechopen.96503>

Shin, M., Ferguson, M., Willms, R. J., Jones, L. O., Petkau, K., & Foley, E. (2022). Immune regulation of intestinal-stem-cell function in *Drosophila*. *Stem Cell Reports*, 17(4), 741–755. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2022.02.009>

Silverman, N., Zhou, R., Stöven, S., Pandey, N., Hultmark, D., & Maniatis, T. (2000). A *Drosophila* I $\kappa$ B kinase complex required for relish cleavage and antibacterial immunity. *Genes and Development*, 14(19), 2461–2471. <https://doi.org/10.1101/gad.817800>

Stöven, S., Ando, I., Kadalayil, L., Engström, Y., & Hultmark, D. (2000). Activation of the *Drosophila* NF- $\kappa$ B factor Relish by rapid endoproteolytic cleavage. *EMBO Reports*, 1(4), 347–352. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvd072>

Su, J., Liu, F., Xia, M., Xu, Y., Li, X., Kang, J., Li, Y., & Sun, L. (2015). p62 participates in the inhibition of NF- $\kappa$ B signaling and apoptosis induced by sulfasalazine in human glioma U251 cells. *Oncology Reports*, 34(1), 235–243. <https://doi.org/10.3892/or.2015.3944>

Swatek, K. N., & Komander, D. (2016). Ubiquitin modifications. *Cell Research*, 26(4), 399–422. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.39>

Takeishi, A., Kuranaga, E., Tonoki, A., Misaki, K., Yonemura, S., Kanuka, H., & Miura, M. (2013). Homeostatic Epithelial Renewal in the Gut Is Required for Dampening a Fatal Systemic Wound Response in *Drosophila*. *Cell Reports*, 3(3), 919–930. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.02.022>



Tanji, T., Yun, E. Y., & Ip, Y. T. (2010). Heterodimers of NF- $\kappa$ B transcription factors DIF and Relish regulate antimicrobial peptide genes in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(33), 14715–14720. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009473107>

Thompson, D. G., & Malagelada, J. R. (1981). Guts and their motions (gastrointestinal motility in health and disease). *Journal of clinical gastroenterology*, *3 Suppl 1*, 81–87. <https://doi.org/10.1097/00004836-198100031-00017>

Tokunaga, F., Sakata, S., Saeki, Y., Satomi, Y., Kirisako, T., Kamei, K., Nakagawa, T., Kato, M., Murata, S., Yamaoka, S., Yamamoto, M., Akira, S., Takao, T., Tanaka, K., & Iwai, K. (2009). Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF- $\kappa$ B activation. *Nature cell biology*, *11*(2), 123–132. <https://doi.org/10.1038/ncb1821>

Tsapras, P., Petridi, S., Chan, S., Geborys, M., Jacomin, A. C., Sagona, A. P., Meier, P., & Nezis, I. P. (2022). Selective autophagy controls innate immune response through a TAK1/TAB2/SH3PX1 axis. *Cell Reports*, *38*(4), 110286. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110286>

Tusco, R., Jacomin, A. C., Jain, A., Penman, B. S., Larsen, K. B., Johansen, T., & Nezis, I. P. (2017). Kenny mediates selective autophagic degradation of the IKK complex to control innate immune responses. *Nature Communications*, *8*, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01287-9>

Ugur B, Chen K, Bellen HJ (2016). *Drosophila* tools and assays for the study of human diseases. *Dis Model Mech* *9* (3): 235–244. <https://doi.org/10.1242/dmm.023762>

Vaibhvi, V., Künzel, S., & Roeder, T. (2022). Hemocytes and fat body cells, the only professional immune cell types in *Drosophila*, show strikingly different responses to systemic infections. *Frontiers in Immunology*, *13*(November), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1040510>

Valanne, S., Wang, J.-H., & Rämets, M. (2011). The *Drosophila* Toll Signaling Pathway. *The Journal of Immunology*, *186*(2), 649–656. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002302>

Vaz, F., Kounatidis, I., Covas, G., Parton, R. M., Harkiolaki, M., Davis, I., Filipe, S. R., & Ligoxygakis, P. (2019). Accessibility to Peptidoglycan Is Important for the Recognition of Gram-Positive Bacteria in *Drosophila*. *Cell reports*, *27*(8), 2480–2492.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.103>

Xia, Y., Shen, S., & Verma, I. M. (2014). NF- $\kappa$ B, an active player in human cancers. In *Cancer immunology research* (Vol. 2, Issue 9, pp. 823–830). <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0112>

Yamaguchi, M., & Yoshida, H. (2018). *Drosophila* as a Model Organism. *Advances in experimental medicine and biology*, *1076*, 1–10. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-0529-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-13-0529-0_1)

Zeng, X., Chauhan, C., & Hou, S. X. (2010). Characterization of midgut stem cell- and enteroblast-specific Gal4 lines in drosophila. *Genesis*, 48(10), 607–611. <https://doi.org/10.1002/dvg.20661>

Zhang, J., Yang, Z., & Dong, J. (2016). P62: An emerging oncotarget for osteolytic metastasis. *Journal of Bone Oncology*, 5(1), 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.jbo.2016.01.003>

Zhong, Z., & Karin, M. (2016). Abstract A066: NF-κB restricts inflammasome activation via elimination of damaged mitochondria. *Cancer Immunology Research*, 4(11\_Supplement), A066–A066. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.imm2016-a066>

Zhou, R., Silverman, N., Hong, M., Liao, D. S., Chung, Y., Chen, Z. J., & Maniatis, T. (2005). The role of ubiquitination in Drosophila innate immunity. *Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 34048–34055. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506655200>

Zotti, T., Scudiero, I., Settembre, P., Ferravante, A., Mazzone, P., D'Andrea, L., Reale, C., Vito, P., & Stilo, R. (2014). TRAF6-mediated ubiquitination of NEMO requires p62/sequestosome-1. *Molecular immunology*, 58(1), 27–31. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.10.015>

Wooten, M. W., Geetha, T., Seibenhener, M. L., Babu, J. R., Diaz-Meco, M. T., & Moscat, J. (2005). The p62 scaffold regulates nerve growth factor-induced NF-κB activation by influencing TRAF6 polyubiquitination. *Journal of Biological Chemistry*, 280(42), 35625–35629. <https://doi.org/10.1074/jbc.C500237200>

Wurzer, B., Zaffagnini, G., Fracchiolla, D., Turco, E., Abert, C., Romanov, J., & Martens, S. (2015). Oligomerization of p62 allows for selection of ubiquitinated cargo and isolation membrane during selective autophagy. *ELife*, 4(September 2015), 1–28. <https://doi.org/10.7554/eLife.08941>

Wyers, F., Petitjean, A. M., Dru, P., Gay, P., & Contamine, D. (1995). Localization of domains within the Drosophila Ref(2)P protein involved in the intracellular control of sigma rhabdovirus multiplication. *Journal of Virology*, 69(7), 4463–4470. <https://doi.org/10.1128/jvi.69.7.4463-4470.1995>