

ÅBO AKADEMI

Molekylära kopplingar mellan signalförmedlare i  
olika NF- $\kappa$ B-räckor i epitelceller i *Drosophila*s  
tarmkanal

Pro gradu-avhandling



Marc Sundén, 40672

Handledare: Annika Meinander

Praktisk handledare: Gabriela Martínez Chacón

Fakulteten för naturvetenskaper och teknik

Magisterprogram i biovetenskap, Biokemi

November 2021

## **Molekylära kopplingar mellan signalförmedlare i olika NF- $\kappa$ B-räckor i epitelceller i Drosophilas tarmkanal**

Pro gradu

**Nyckelord:** Drosophila, IMD-signaleringsräcka, Gramnegativa bakterier, Toll-signaleringsräcka, Grampositiva bakterier, NF- $\kappa$ B, Pelle, Dredd

---

Bananflugan (*Drosophila melanogaster*) är en utmärkt modellorganism för att studera cell signaleringsräckor som reglerar aktiveringen av NF- $\kappa$ B-transkriptionsfaktorer. I *Drosophila* har två NF- $\kappa$ B-immunsigaleringsräckor identifierats: IMD- (eng. immune deficiency pathway) och Toll-signaleringsräckan. IMD-signaleringsräckan aktiveras av Gramnegativa bakterier medan Toll-signaleringsräckan aktiveras av Grampositiva bakterier och svamp. Det antas dock att Toll-receptorn inte aktiveras i tarmens epitelceller. Därför har det varit vårt intresse att undersöka om det finns en molekylär koppling mellan IMD- och Toll-signaleringsräckan i *Drosophilas* tarmepitelceller.

IRAK homologen Pelle är en etablerad reglerare av Toll-signaleringsräckan och i denna studie visar vi att Pelle även är involverad vid regleringen av IMD-signaleringsräckan. Vi presenterar att flugor som saknar Pelle varken kan överleva en septisk eller oral infektion med Gramnegativa bakterier. Dessutom visar vi att flugor som saknar Pelle har en nedsatt förmåga att aktivera uttrycket av IMD-specifika genen *Diptericin* i deras tarmepitel efter en oral infektion. Dessa resultat betonar att Pelle krävs för att flugor skall kunna försvara sig mot Gramnegativa bakterier. Vid sällning för förmodade samverkande proteiner i IMD-signaleringsräckan, fann vi att Pelle kan samverka med IMD-signalförmedlaren Dredd. Dredd är ett kaspas, vars aktivering krävs för bearbetning och nukleär lokalisering av IMD-specifika NF- $\kappa$ B-transkriptionsfaktorn Relish. Intressant nog verkar överuttryck av Pelle i S2-celler även förorsaka klyvning av Dredd. Eftersom autoklyvning är en följd av Dredd-aktivering indikerar resultaten att Pelle är involverad vid aktiveringen av Dredd. Dessa resultat visar därmed att Toll-signaleringsförmedlaren Pelle behövs för en regelrätt aktivering av IMD-signaleringsräckan i *Drosophila*. Samspelet mellan Pelle och Dredd kan möjligtvis fungera som ett vägskepp, där de två NF- $\kappa$ B-signaleringsräckorna kan mötas för att komplettera den transkriptionella aktiveringen som krävs för *Drosophilas* immunsvär.

**Molecular crosstalk between signal mediators in different NF- $\kappa$ B signaling pathways in epithelial cells in *Drosophila*'s intestinal tract**

Master's thesis

**Keywords:** *Drosophila*, IMD signaling pathway, Gram-negative bacterier, Toll-signaling pathway, Gram-positive bacterier, NF- $\kappa$ B, Pelle, Dredd

---

The fruit fly (*Drosophila melanogaster*) is an excellent model organism for studies regarding signaling pathways that regulate NF- $\kappa$ B transcription factors. In *Drosophila* two NF- $\kappa$ B immune signaling pathways have been identified; the immune deficiency pathway (IMD pathway) and the Toll signaling pathway. The IMD signaling is activated by Gram-negative bacteria while the Toll signaling pathway is activated by Gram-positive bacteria and fungi. The IMD and the Toll pathways have been considered to be independent of each other. However, it is believed that the Toll receptor cannot be activated in the intestinal epithelial cells. Therefore, it has been our interest to investigate whether there is a molecular crosstalk between the IMD and Toll signaling pathways in the *Drosophila* intestinal epithelial cells.

The IRAK homologue Pelle is an established regulator of the Toll signaling pathway, and in this study, we show that Pelle also is involved in the regulation of the IMD signaling pathway. We present that Pelle deficient flies can neither survive a septic nor oral infection with Gram-negative bacteria. In addition, we show that Pelle deficient flies have a reduced ability to activate the expression of the IMD-specific gene *Diptericin* in their intestinal epithelium after a Gram-negative oral infection. These results underline that Pelle is required for flies to be able to defend themselves against Gram-negative bacteria. When screening for putative interacting proteins in the IMD pathway we found that Pelle can interact with the IMD signaling mediator Dredd. Dredd is a caspase, whose activation is required for processing and nuclear localization of the IMD-specific NF- $\kappa$ B transcription factor Relish. Interestingly, overexpression of Pelle in S2 cells, also seems to induce cleavage of Dredd. As autocleavage is a consequence of Dredd activation, this indicates that Pelle may regulate the activity of Dredd. These results indicate that the Toll signaling mediator Pelle is needed for a proper activation of the IMD signaling pathway in the *Drosophila*. The interplay between Pelle and Dredd may function as a crossroad, where the two NF- $\kappa$ B pathways can meet to complement the transcriptional activation required for *Drosophila*'s immune responses.

## Tackord

Jag vill tacka min handledare Annika Meinander för möjligheten att genomföra mitt pro gradu-projekt i hennes laboratorium, samt för hjälpen med skrivandet av pro gradu-avhandlingen. Jag vill också tacka min praktiska handledare Gabriella Martínez Chacón för att ha hjälpt mig med optimerandet av protokoll och genomförandet av experiment. Jag vill även tacka Aravind Kumar Mohan för att ha hjälpt mig med klonandet av pMT-Pelle-V5-vektorn.

# Innehållsförteckning

1 Inledning.....	1
2 Litteraturoversikt.....	4
2.1 Det medfödda immunförsvaret.....	4
2.2 Drosophilas IMD-signaleringsräcka.....	5
2.2.1 Kaspas-8 homologen Dredd.....	7
2.3 Drosophilas Toll-signaleringsräcka.....	8
2.3.1 Serin/Treonin kinaset Pelle och dess roll i Toll-signaleringskaskaden.....	10
2.4 Drosophilas tarimmunförsvaret.....	12
2.4.1 Produktionen av antibakteriella peptider i Drosophilas tarm.....	14
2.4.2 Produktionen av ROS i Drosophilas tarm.....	15
2.5 Molekylär koppling mellan IMD- och Toll-signaleringsräckan.....	17
2.5.1 NF- $\kappa$ B-heterodimeren Relish/Dif.....	18
2.5.2 Dödsdomänförmedlad koppling mellan Toll-och IMD-signaleringsräckan.....	19
2.5.3 Ubikvitinförmedlad koppling mellan IMD-och Toll-signaleringsräckan.....	21
3 Målsättning.....	24
4 Material och metoder.....	25
4.1 Fluglinjer.....	25
4.2 Septiska infektionsexperiment och statistik.....	26
4.3 Orala infektionsexperiment och statistik.....	26
4.4 Bakterieinducering i flugor inför kvantitativa PCR-experimenten.....	27
4.5 mRNA extrahering inför kvantitativa PCR experimenten.....	27
4.6 cDNA syntes inför kvantitativa PCR experimenten.....	28
4.7 Kvantitativ PCR och statistik.....	28
4.8 Kvantifiering av DNA och mRNA.....	30
4.9 Molekylär kloning av Toll-signaleringsförmedlaren Pelle.....	31
4.9.1 Amplifiering av genen som kodar Pelle.....	31
4.9.2 DNA-gelelektrofores på PCR produkter.....	32
4.9.3 Rening av DNA med NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit.....	32
4.9.4 Klyvning av plasmid och Pelle-PCR produkt.....	33
4.9.5 Ligering av de klyvda plasmiderna och PCR produkterna.....	34
4.9.6 Tranformering av ligeringslösningen.....	34
4.9.7 Plasmidrening (miniprepp) från bakteriekolonier.....	35
4.9.8 Analys av kloningen.....	36

4.10 Transfektering av plasmider och studerandet av Pelles samverkande med IMD-signaleringsförmedlare .....	36
4.10.1 Experiment i S2 celler.....	36
4.10.2 Transfektering av S2-celler.....	37
4.10.3 Utförandet av transfekteringen.....	37
4.10.4 Insamling av celler inför immunoprecipitering och SDS-PAGE.....	38
4.10.5 Immunoprecipitering med V5-agaroskolor.....	39
4.10.6 SDS-PAGE och transfer.....	40
4.10.7 Westernblotanalys.....	40
5 Resultat.....	42
5.1 Toll och Pelle behövs för överlevnad vid septisk Ecc15 infektion .....	42
5.2 Pelle krävs för oral infektion med Ecc15 .....	45
5.3 Pelle behövs för diptericingenuttryck i tarmen efter oral infektion med Ecc15.....	48
5.4 Pelle samverkar med IMD-signaleringsförmedlaren Dredd.....	50
6 Diskussion .....	54
6.1 Toll-signaleringsförmedlaren Pelle krävs för en fullständig IMD-signaleringsaktivering .....	54
6.2 Pelle påverkar IMD-signaleringsräckans fullbordande genom att reglera Dredds aktivering.....	55
6.2.1 Hur bidrar Pelle till aktiveringen av Dredd?.....	57
6.3 Pelles roll i flugans lokala tarmimmunförsvar .....	58
6.4 Toll <sup>Mut</sup> -flugor överlever orala, men inte septiska, infektioner som är orsakade av Ecc15 .....	60
6.5 Studiens problem och styrkor .....	61
6.6 Sammanfattning.....	62
7 Appendix .....	65
8 Buffertar och Kemikalier .....	66
9 Referenser.....	68

# 1 Inledning

Flercelliga organismer är i konstant kontakt med mikroorganismer. Därmed ligger flercelliga organismer även under ett konstant hot av mikroorganismer. På grund av detta konstanta hot har evolutionen utvecklat många effektiva mekanismer som kan förintade potentiellt farliga organismerna (Clarke, 2014). De cellulära mekanismerna som utvecklades i försvar mot mikroorganismer i ursprungsmetazoer utgjorde en så livsavgörande del av deras överlevnad att dessa processer även har bevarats i högre utvecklade metazoer (Hoffmann & Reichhart, 2002). Alla bakterier som flercelliga organismer är i kontakt med utgör dock inte ett hot. En stor del av dem koloniserar sig på ytan av epitelceller där de aktivt påverkar ett flertal funktioner och processer som gynnar den flercelliga värdorganismen. Studier har till exempel visat att kommensala mikroorganismer har en positiv inverkan på värdorganismens metabolism, immunförsvar och näringsintagsförmåga (Schroeder & Bäckhed, 2016).

Vertebraters tarmsystemsepitelceller är bland de epitel där populationen av mikroorganismer är som tätast. Det har visats att mikroorganismpopulationen i tjocktarmen kan till och med nå upp till  $10^{11}$  mikroorganismer per milliliter av lumenalt innehåll (Tlaskalová-Hogenová et al., 2011). Tarmfloras kommensala bakterier har under de senaste åren uppmärksammats inom cellbiologisk och molekylärbiologisk forskning då det har visats att tarmens kommensaler har en oerhört stor påverkan på individens hälsa. I en studie har det till och med visats att tarmmikrofloran hos möss påverkar hjärnutvecklingen hos mössfoster, då avkomman hos möss med en förändrad tarmmikroflora ofta uppvisar utvecklingsstörningar (Vuong et al., 2020). På grund av denna enorma mikroorganismpopulation som råder i tarmen är det därmed synnerligen viktigt att tarmepitelcellerna har ett tillräckligt välutvecklat immunförsvar som klarar av att skilja mellan de patogena bakterierna och de kommensala bakterierna.

En av de viktigaste metoderna för tarmepitelcellerna att upprätthålla tarmhomeostasen är inflammationsresponsen. Cellerna kan aktivera en inflammationsrespons av både yttre eller inre stimulus, och en inflammationsrespons leder slutligen till att cellerna frigör inflammatoriska molekyler, som till exempel antibakteriella peptider, cytokiner och kemokiner. Dessa inflammatoriska molekyler attraherar i sin tur inflammatoriska celler, som till exempel neutrofiler, till området där inflammationsresponsen inträffar,

vilket i bästa fall leder till att infektionen förintas (Cario, 2005). Inflammationsrespons måste dock vara välreglerad och om den inte är det kan det leda till både akuta och kroniska tarminflammationssjukdomar. Studier visar att inflammatoriska tarmsjukdomar blir allt vanligare. Inflammatoriska tarmsjukdomar är en samling autoinflammatoriska sjukdomar som kännetecknas av en långvarig inflammation i någon del av magtarmkanalen, och personer som lider av en inflammatorisk tarmsjukdom kan till exempel lida av diarré, buksmärter och kräkningar. Till de vanligaste inflammatoriska tarmsjukdomarna hör Crohns sjukdom, ulcerös kolit och mikroskopisk kolit. Ingen specifik orsak till att man insjuknar i en inflammatorisk tarmsjukdom har påvisats, men många faktorer som antas kunna bidra till insjuknandet har identifierats, till exempel en plötslig förändring i immunsystemet, omgivningen och genetiska variationer (Fakhoury et al., 2014). En genetisk variation som har till exempel identifierats med en ökad risk för insjuknandet i en inflammatorisk sjukdom är en mutation i genen som kodar intracellulära receptorn NOD2. NOD2-receptorn är en viktig del av cellers medfödda immunförsvarsrespons då den aktiverar många antibakteriella gener (Abbott et al., 2004).

Det har visats att det är främst cellsignaleringsräckor som ingår i det medfödda immunförsvaret som aktiverar frigörelsen av olika inflammatoriska proteiner, som till exempel antibakteriella peptider. Därmed anses det medfödda immunförsvaret ha en central roll då det kommer till upprätthållandet av tarmhomeostasen, vilket har gjort det angeläget att hitta lämpliga modellorganismer för att studera det medfödda immunförsvarets roll i mag-tarmkanalen. Det medfödda immunförsvarets molekylära mekanismer har visats vara evolutionärt välbevarade, vilket har gjort det möjligt att utforska det medfödda immunförsvaret i ett stort antal olika organismer (Newton & Dixit, 2012). Att kunna utforska det medfödda immunförsvaret i olika typer av organismer har skapat ypperliga möjligheter, då det av både etiska och praktiska skäl inte alltid går att utföra denna typ av forskning i däggdjur. En av de mest använda organismerna vid studier som undersöker det medfödda immunförsvarets är *Drosophila melanogaster*. *Drosophila* har använts som modellorganism inom forskningen av det medfödda immunförsvaret sedan år 1996, då det åskådliggjordes att *Drosophilas* Toll-signalering krävs för induktion av den antibakteriella peptiden Drosomycin (Kenmoku et al., 2017, Hoffmann & Reichart, 2002, Lemaitre et al., 1996). Eftersom *Drosophila* saknar ett adaptivt immunförsvar, och har ett välutvecklat



medfött immunförsvar, är den en ypperlig modellorganism för forskning om receptorer och cellsignaleringsvägar som hör till det medfödda immunförsvaret (Govind, 2008). Till *Drosophila*s medfödda immunförsvar hör två huvudsakliga cellsignaleringskaskader, Toll- och IMD-signaleringsvägen (eng. immune deficiency pathway). Både IMD- och Toll-signaleringsvägen delar likheter med cellsignaleringskaskader hos däggdjur. Exempelvis delar Toll-signaleringsvägen likheter med däggdjurs Toll-liknande receptorsignaleringsväg (TLR), medan IMD-signaleringsvägen delar likheter med däggdjurs tumörnekrosfaktorreceptorsignaleringsväg (TNFR) och nukleotidbindande oligomeriseringsdomäninnehållande protein 2-signaleringsväg (NOD2) (Govind, 2008, Kenmoku et al., 2017).

Eftersom IMD- och Toll-signaleringsvägen aktiverar transkriberingen av olika gener via egna signalvägar anses båda vara självständiga och oberoende av varandra. En intressant skillnad mellan *Drosophila*s IMD- och Toll-signaleringsväg är att Toll-receptorerna, som aktiverar Toll-signaleringsvägen, inte kan aktiveras vid direkt kontakt med mikroorganismer, vilket de receptorer som aktiverar IMD-signaleringsvägen kan. På grund av detta antas det att *Drosophila*s epitelceller inte kan aktivera Toll-signaleringsvägen, utan att det är enbart *Drosophila*s fettkropp som kan göra detta (Buchon, Broderick, Poidevin, et al., 2009). Trots detta har det visats att AMP-genen *Drosomycin*, som antas vara en Toll-specifik gen, kan aktiveras i *Drosophila*s luftvägsepitelceller (Ferrandon et al., 1998). Detta skulle kunna innebära att Toll- och IMD-signaleringsvägen delar på gemensamma signaleringsförmedlare.

I mitt pro gradu-projekt, undersökte jag huruvida det finns en molekylär koppling mellan IMD- och Toll-signaleringsvägen i *Drosophila*s tarmepitelceller. Dessutom ville jag identifiera om immunresponsaktiveringen ser annorlunda ut i *Drosophila* under en septisk infektion i förhållande till en lokal tarminfektion. Eftersom det fortfarande finns mycket som är okänt i fråga om både Toll- och IMD-signaleringsvägen ger min studie en djupare inblick i *Drosophila*s immunsignaleringskaskader.

## 2 Litteraturöversikt

### 2.1 Det medfödda immunförsvaret

Det medfödda immunförsvaret spelar en avgörande roll i immunförsvaret hos alla flercelliga livsformer. Till eukaryoters medfödda immunförsvaret hör icke-specifika försvarsmekanismer som aktiveras omedelbart, eller inom några timmar, efter att en främmande molekyl har presenterats för organismen (Clarke, 2014). I högre utvecklade organismer stöder och arbetar det medfödda immunförsvaret tillsammans med det adaptiva immunförsvaret för att generera antigenspecifika mekanismer, som slutligen leder till eliminering av patogenen. Till det medfödda immunförsvaret hör bland annat fysikaliska barriärer, specifika immunceller (exempelvis makrofager), samt produktionen av antibakteriella molekyler (Gasteiger et al., 2017).

En viktig del av det medfödda immunförsvaret är mönsterigenkännande receptorer (eng. pattern-recognition receptors) som detekterar patogenassocierade molekyllära mönster (eng. pathogen-associated molecular patterns) på mikroorganismer. Patogenassocierade molekyllära mönster är produkter av mikroorganismers metabolism, och är evolutionärt välbevarade i en stor mängd av patogener. Exempel på patogenassocierade molekyllära mönster är lipopolysackarider, peptidoglykaner och flagellin (Govind, 2008). Mönsterigenkännande receptorer kan vara membranbundna eller intracellulära, och aktiveras då de kommer i kontakt med ett patogenassocierat molekyllärt mönster. Detta leder till att cellsignaleringskaskader utlöses, vilket i sin tur leder till aktivering av specifika transkriptionsfaktorer som inducerar transkriberingen av gener. Exempel på gener vars transkribering induceras av dessa transkriptionsfaktorer är antibakteriella peptider och inflammatoriska cytokiner eller kemokiner (Wullaert et al., 2006, Gasteiger et al., 2017).

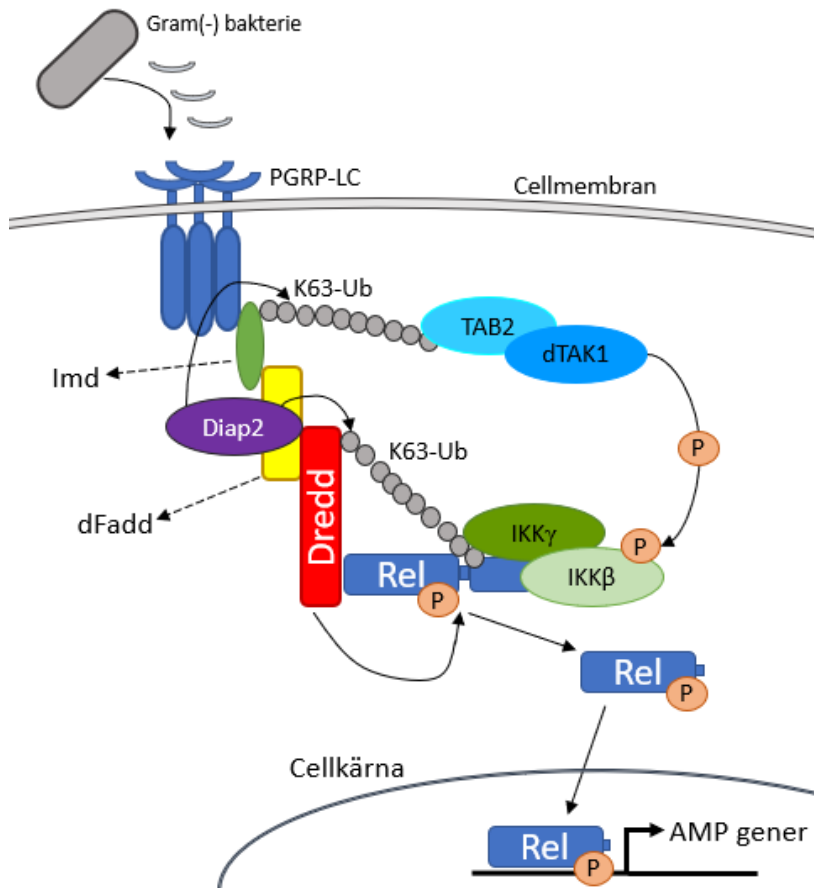
De cellsignaleringsräckor som induceras av specifika mönsterigenkännande receptorer och som leder till aktiveringen av NF- $\kappa$ B-transkriptionsfaktorer, har visats vara speciellt viktiga för organismers medfödda immunförsvaret (Wullaert et al., 2006). NF- $\kappa$ B-transkriptionsfaktorer aktiverar uttrycket av tusentals gener, varav en stor del är olika proinflammatoriska gener. Aktiveringen av NF- $\kappa$ B-transkriptionsfaktorer orsakar en inflammatorisk respons, vilket i sin tur leder till rekrytering av immunceller och aktivering av det adaptiva immunförsvaret. Studier har visat att en felreglerad

aktivering av NF- $\kappa$ B-transkriptionsfaktorer kan leda till insjuknande i kroniska inflammationer och cancer (Liu et al., 2017). Ett flertal cellsignaleringskaskader som aktiverar NF- $\kappa$ B-transkriptionsfaktorer är evolutionärt välbevarade, och homologer till dessa signaleringar har påträffats i många olika organismer (Hoffmann & Reichhart, 2002). Exempel på cellsignaleringskaskader som leder till aktivering av NF- $\kappa$ B-transkriptionsfaktorer i däggdjur är TLR-signaleringsräckan, NOD2-signaleringsräckan och TNFR-signaleringsräckan. Drosophilas IMD-och Toll-signaleringskaskad är de enda signaleringskaskaderna i Drosophila som aktiverar NF- $\kappa$ B-transkriptionsfaktorer.

## 2.2 Drosophilas IMD-signaleringsräcka

IMD-signaleringen i Drosophila aktiveras huvudsakligen av Gramnegativa bakterier (figur 1). När den membranbundna PGRP-LC eller den intacellulära PGRP-LE receptorn kommer i kontakt med DAP-typens peptidoglykaner i Gramnegativa bakteriers cellmembran, oligomeriseras receptorn, vilket tillåter rekryteringen av adaptermolekylerna IMD och dFADD och kaspaset Dredd till receptorn. IMD antas samverka direkt med receptorn, via dess C-terminala dödsdomän, medan dFadd fungerar som en adapter mellan IMD och Dredd (S. Hu & Yang, 2000). Därefter kan E3-ligaset DIAP2 samverka med signaleringskomplexet och bilda K63- bundna ubikvitinkedjor på Dredd, vilket aktiverar Dredds katalytiska förmåga (Paquette et al., 2010, Meinander et al., 2012). Dredd är ett kaspas, och när Dredd aktiveras kan det klyva IMD vid dess N-terminus, vilket leder till att IMD-proteinets IBM-domän blottas. IMD-proteinets IBM-domän kan därefter samverka med DIAP2 (Paquette et al., 2010, Kleino & Silverman, 2014). Denna bindning mellan IMD och DIAP2 tillåter DIAP2 att ytterligare bilda K63-polyubikvitinkedjor på IMD och på andra komponenter i signaleringskomplexet (Leulier et al., 2006). Ubikvitinkedjorna på IMD och Dredd antas fungera som en stödstruktur (eng. scaffold) för TAK1/TAB-komplexet och IKK-komplexet. TAK1 är ett MAP3K-kinas. I Drosophilas IKK-komplex finns proteinerna IRD5 och Kenny, som är Drosophilas homologer till IKK $\beta$  och IKK $\gamma$ , och det antas att TAK1 är kinaset som fosforylerar IRD5. Efter att IRD5 har fosforylerats aktiveras proteinets kinasaktivitet, och det kan därefter fosforylera NF- $\kappa$ B prekursor Relish (Silverman et al., 2000). Eftersom IRD5 fosforylerar Relish,

rekryterar IKK-komplexet med stor sannolikhet Relish till signaleringskomplexet, där Relish proteolytiskt klyvs av det aktiverade Dredd vid Aspartat-545. Den proteolytiska klyvningen av Relish leder till dess aktivering och den kan translokeras till cellkärnan där den bland annat aktiverar transkriptionen av olika AMP-gener, som till exempel diptericin (Stöven et al., 2000).



*Figur 1. IMD-signaleringsräckan.* När IMD (grön) binder till en PGRP-LC-receptor kan den därefter samverka med dFADD (gul), som i sin tur samverka med Dredd. Dredd kan därefter klyva IMD, och Diap2 (lila) kan binda till signaleringskomplexet. Diap2 bildar K63-bundna ubikvitinkedjor på Dredd och IMD, och dessa ubikvitinkedjor fungerar som stödstruktur för TAK1/TAB2, samt IKK-komplexet och Relish. TAK1 och Relish kan aktiveras av signaleringskomplexet, och detta leder slutligen till att Relish translokeras in till cellkärnan (Bild inspirerad från Falschlehner & Boutros, 2012).

Utöver att E3-ligaset DIAP2 har visats vara en viktig del av IMD-signaleringsräckan har även E3-ligaset Lubel konstaterats spela en avgörande roll vid IMD-signaleringsräckans fullbordande i specifika vävnader. Efter att DIAP2 K63-ubikvitinerat Kenny i IKK-komplexet leder det till att Lubel ytterligare bildar M1-ubikvitinkedjor på Kenny. Detta betyder att Kenny modifieras av både K63- och M1-ubikvitinkedjor, och om Lubel av någon orsak inte kan bilda dessa M1-kedjor på

Kenny, är aktiveringen av IMD-gener försvagad. Lubel-muterade flugor har till exempel vistas dö av oral infektion och vid hypoxiska förhållanden (Aalto et al., 2019).

IMD-signaleringsvägen bör vara noggrant reglerad för att uppehålla den cellulära homeostasen. För mycket eller för lite aktivering av IMD-signaleringsvägen kan leda till kronisk inflammation eller cancer. Nedreglerare har visats spela en avgörande roll vid undvikandet av för mycket aktivering av IMD-signaleringsvägen. I Meinanders laboratorium har proteinet drICE till exempel observerats vara en negativ reglerare av IMD-signaleringsvägen i *Drosophila*'s tarmepitelceller, då drICE kan klyva DIAP2 och inhibera dess E3-aktivitet (Kietz et al., 2021). En annan negativ reglerare av IMD-signaleringsvägen är till exempel Pirk (Kleino et al., 2008).

### 2.2.1 Kaspas-8 homologen Dredd

Proteinet Dredd har visats ha en avgörande roll i *Drosophila*'s IMD-signaleringsvägen. Dredd är ett kaspasprotein, och kaspasproteiner är en familj av cysteinproteaser som framförallt är förknippade till både initieringen och aktiveringen av cellers apoptosrespons (J. Li & Yuan, 2008). *Drosophila*'s genom kodar för sju kaspasproteiner varav Dredd är ett av *Drosophila*'s tre initiatorkaspaser. *Drosophila*'s två övriga initierande kaspaser är Dronc och Strica. Dredd, Dronc och Strica har en strukturellt liknande lång prodomän som innehåller två dödseffektordomäner som kallas DED1 och DED2 och en kaspasdomän som delas in i underenheterna p20 och p10 (Figur 3) (C. H. Kim et al., 2014). Denna långa prodomän är vanlig bland initierande kaspaser. Dredd är strukturellt liknande till däggdjurs Kaspas-8 och ett fullstort Dredd har molekylära vikten 52 kDa (C. H. Kim et al., 2014).



*Figur 2. Dredds domäner.* Dredd har en prodomän som består av två dödseffektordomäner, DED1 (grön) och DED2 (mörkblå), samt en domän med katalytisk aktivitet som delas in i underenheterna p20 (ljusblå) och p10 (ljusblå).

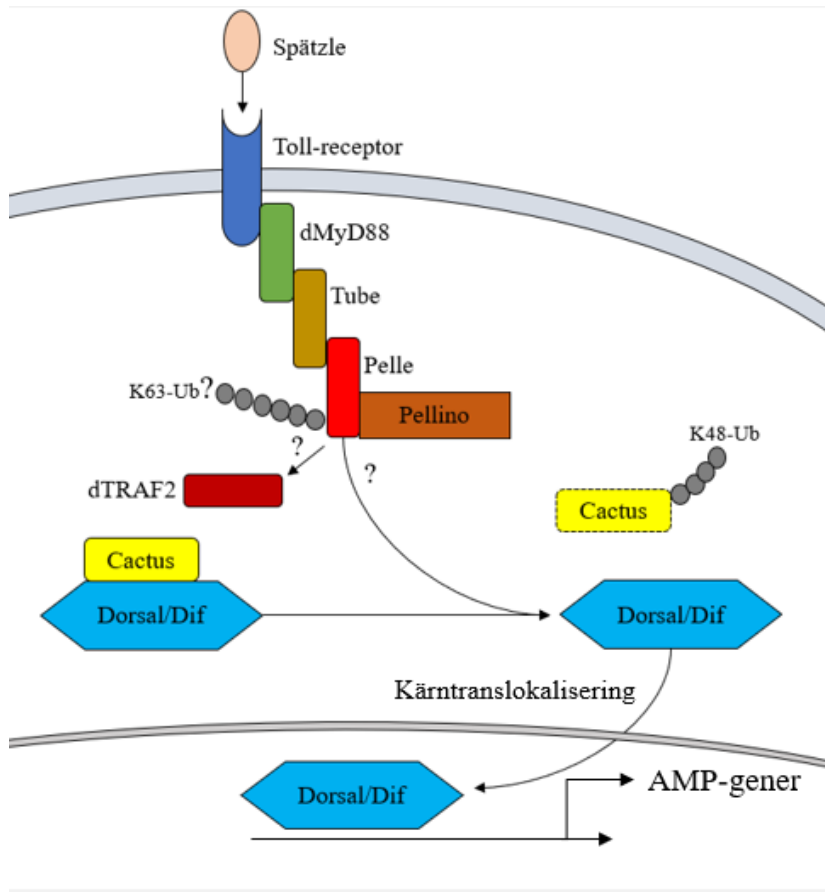
Kaspasproteiner identifierades ursprungligen som proteiner vars enda uppgift är att inducera en apoptosrespons, men det har dock visats att kaspaser även är involverade vid andra fysiologiska processer. Förutom Dredd, som är involverad vid *Drosophila*s immunförsvar mot Gramnegativa bakterier så har även däggdjurs Kaspas-8 visats vara involverad vid aktivering av NF- $\kappa$ B via TRAF2-, RIP-, NIK- och IKK- beroende cellsignaleringsräckor (Oberst & Green, 2011). Därmed kan det konstateras att specifika kaspaser även har en evolutionärt viktig uppgift vid organismers inflammationsrespons. Studier har visat att Dredd är det enda kaspaset som kan klyva IMD och Relish, och liksom många andra kaspaser autoklyver Dredd sig själv efter aktivering. Då Dredd autoklyver sig själv klyver proteinet bort dess prodomän för att generera subenheterna p20 och p10 (C. H. Kim et al., 2014).

Man har identifierat olika Dredd mutationer som påverkar Dredds aktivitet. I studien av Leulier et al., 2000, där man screenade efter mutationer på X kromosomen som försvagar uttrycket av antibakteriella peptiden Diptericin, kunde de isolera fem olika recessiva mutationer i genen som kodar Dredd som leder till en försämrad Diptericin transkribering. Dessa mutationer heter B118, F64, L23, D55 samt D44, och det finns livskraftiga fluglinjer tillgängliga med samtliga mutationer. Allerna B118, F64 och D55 genererar för tidiga stop kodon i Dredds prodomän, medan allelerna L23 och D44 bildas av missens mutationer (Leulier et al., 2000). I allel D44 har Glycin-120 i Dredds DED1 domän byts ut mot en Arginin medan i allel L23 har Tryptofan-458 i Dredds katalytiska domän byts ut mot en Arginin (Leulier et al., 2000, Aalto et al., 2019). Glycin-120-Arginin mutationen gör att Dredd inte ubiquitineras, medan Tryptofan-458-Arginin gör att Dredd inte har någon katalytisk aktivitet. Därmed orsakar både Glycin-120-Arginin och Tryptofan-458-Arginin mutationerna att IMD-signaleringsräckan inte kan slutföras.

### 2.3 *Drosophila*s Toll-signaleringsräcka

Man har identifierat nio gener som kodar för Toll-receptorer i *Drosophila*, och dessa receptorer aktiverar signaleringsräckor som är involverade vid *Drosophila*s utveckling, vid aktivering av hemocytproliferationen och vid aktivering av gener som är involverade i *Drosophila*s immunförsvar (Biemar et al., 2006). Toll-receptorer har

visats aktiveras av Grampositiva bakterier och svamp (Tauszig et al., 2000, Lemaitre et al., 1996). Liksom däggdjurs Toll-receptorer består Drosophilas Toll-receptorer av en N-terminal leucinrik extracellulärdomän (LRR-domän), ett transmembrant helix och av en C-terminal intracellulär Toll/interleukin-1-receptordomän (TIR-domän). Toll-receptorns LRR-domän samverkar med receptorliganden, vilket leder till en konformationsförändring i receptorn, vilket i sin tur leder till att Toll-signaleringsproteiner binder till receptorns TIR-domän (Takeda & Akira, 2005) (figur 3). Toll-1-receptorn var den första Toll-receptorn som identifierades. Till skillnad från IMD-signaleringsräckan, vars receptor kan aktiveras direkt av Gramnegativa bakterier, kan Toll-receptorn enbart bli aktiverad av Toll-receptorliganden Spätzle (Spz), som blivit proteolytiskt klyvd (Valanne et al., 2011). När Toll-receptorn har aktiverats av Spz, binder adaptermolekylen dMyD88 till receptorns TIR-domän (Horng & Medzhitov, 2001). Efter att dMyD88 bundit till Toll-receptorn binder först adaptermolekylen Tube till dMyD88, och därefter binder serin/treoninkinaset Pelle till Tube (Shen & Manley, 2002, Kuraishi et al., 2016). Interaktionerna mellan dMyD88, Tube och Pelle förmedlas via dödsdomäner. Efter att Pelle samverkar med Tube, autofosforyleras Pelle, vilket leder till att Pelles kinasaktivitet aktiveras (Großhans et al., 1994, Shen & Manley, 2002). Därmed antas det att Pelle är kinaset som därefter fosforylerar I $\kappa$ B-proteinet Cactus. Cactus binder NF- $\kappa$ B heterodimeren Dif-Dorsal, och håller dem i en inaktiv form (Meng et al., 1999, Shen & Manley, 2002). Fosforyleringen av Cactus leder till att Cactus degraderas, och Dif-Dorsal kan translokeras in till cellkärnan där de aktiverar transkriptionen av Toll-specifika gener (Belvin et al., 1995, Valenne et al., 2011).



Figur 3. Toll-signaleringsräckan. När det proteolytiskt klyvda Spätzle (ljusröd) binder till Toll-receptorn (blå) kan adaptermolekylerna dMyD88 (grön) och Tube (mörkgul) rekryteras till Toll-receptorns intracellulära domän. Därefter kan Serin/treonin kinaset Pelle (röd) samverka med Tube. När Pelle samverkat med Tube binder E3-ligaset Pellino (brun) till Pelle, och Pellino bildar antagligen samtidigt K63-ubikvitinkedjor på Pelle. Pelle har även visats samverka med kinaset dTRAF2 (mörkröd). Därefter fosforyleras I $\kappa$ B-proteinet Cactus (gul) i en okänd process. Fosforyleringen av Cactus leder till att proteinet degraderas i proteasomen, vilket i sin tur leder till att NF- $\kappa$ B-heterodimeren Dif/Dorsal (indigo) kan translokeras till cellkärnan där den aktiverar Toll-specifika gener, som till exempel AMP-gener.

### 2.3.1 Serin/Treonin kinaset Pelle och dess roll i Toll-signaleringskaskaden

IRAK homologen Pelle anses vara en essentiell del för Drosophilas Toll-signaleringsräcka. Dock finns det fortfarande obesvarade frågor gällande Pelles roll i Toll-signaleringsräckan. Pelle består av en kinasproteindomän och av en dödsdomän (figur 4).





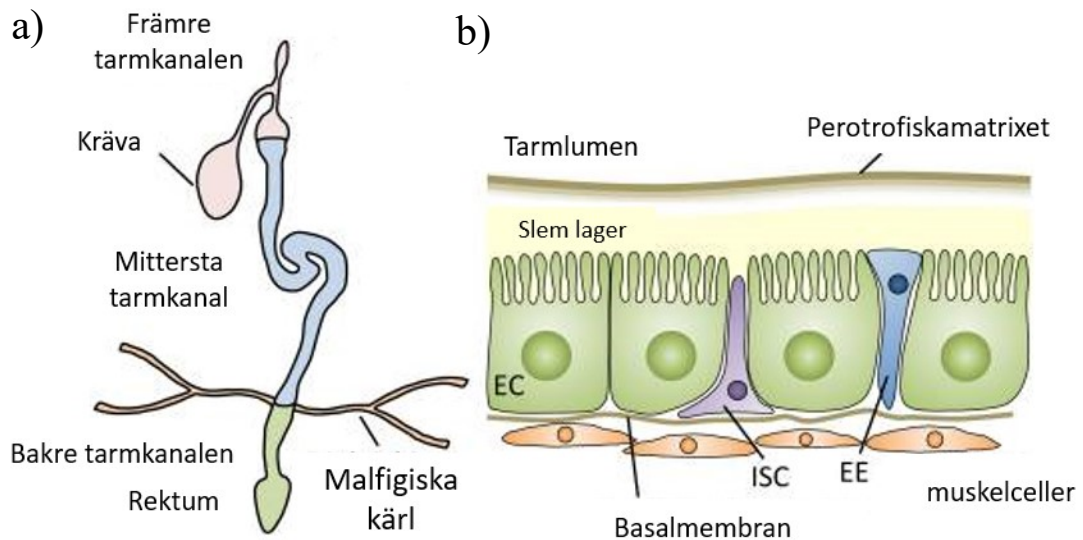
*Figur 4. Pelles domäner.* Pelle har en dödsdomän (DD) (orange) och en proteinkinasdomän (mörkblå).

Studier har visat att Pelle krävs för en fullständig Toll-signaleringsräcka, och att Pelle är åtminstone ett av Serin/Treonin kinasen som kan fosforylera Cactus (Daigneault et al., 2013), men det är till exempel fortfarande oklart hur Pelles fosforylering av Cactus sker. En studie har till exempel visat att Pelle samverkar med kinaset dTRAF2, och att Pelle fosforylerar dTRAF2 (Shen et al., 2001). I samma studie visade de att dTRAF2 och Pelle kan tillsammans aktivera Dorsal i transfekterade celler, och att denna Dorsal aktivering krävde Pelles-kinasaktivitet. Detta skulle kunna innebära att Pelle inte fosforylerar Cactus direkt, utan indirekt via dTRAF2, och därmed även att dTRAF2 är ett Toll-signaleringsprotein nedströms från Pelle. Intressant nog har det visats i en annan studie att Pelle även kan samverka med dTRAF1, vilket är *Drosophila*s andra tumör-nekrosreceptorassocieradefaktor (Zapata et al., 2000). I denna studie visade de även att dTRAF1 och Pelle kan aktiverar NF- $\kappa$ B-uttrycket då de överuttrycks tillsammans i däggdjursceller. Liksom i studien av Shen et al. (2001) visade även denna studie att dTRAF1 potentiellt krävs för att Pelle skall kunna fosforylera Cactus.

Utöver att det fortfarande är oklart om vilka roller Pelle har i Toll-signaleringsräckan, är det även fortsättningsvis oklart vilka alla processer som krävs för att Pelle skall aktiveras. Förutom att det har visats att Tubes samverkande med Pelle leder till aktiveringen av Pelle, har det även visats att E3-ligaset Pellino möjligen kan aktivera Pelles kinasaktivitet (Haghighyeghi et al., 2010). I Studien av Haghighyeghi et al. (2010) visade de att Pellino samverkar med Pelle, och bidrar antagligen till K63-ubikvitinering av Pelle. I studien visade de även att Pellino krävs för en funktionerande Toll-signaleringsräcka, men inte att detta är på grund av att Pellino reglerar Pelles aktivitet (Haghighyeghi et al., 2010, Severo et al., 2013). Eftersom studier har visat att Pelle har många ytor som kan bidra till molekylära interaktioner, och är ett mål för många posttranslationella modifikationer, så var Pelle ett intressant protein för denna studie.

## 2.4 Drosophilas tarimmunförsvar

Drosophilas mag-tarmkanal är både strukturellt och funktionellt likt människans magtarmkanal (figur 4a och 4b). Drosophilas mag-tarmkanal delas in i en främre tarmkanal, en kräva, en mittersta samt en bakre tarmkanal. Dessa delar motsvarar människans matstrupe, magsäck, tunntarm och tjocktarm (Ayyaz & Jasper, 2013, Apidianakis & Rahme, 2011). Den längsta delen av Drosophilas magtarmkanal är dess mittersta del, och denna brukar ytterligare delas in i tre delar: främre, mellersta och bakre mellantarmen. Drosophilas mellantarm motsvarar människans tunntarm och som hos människan sker största delen av näringsämnesabsorberingen i denna del. Från Drosophilas mittersta tarm passerar den intagna maten sedan till bakre tarmen där största delen av Drosophilas vattenabsorbering sker. Den kanske största skillnaden mellan Drosophilas och människans magtarmkanal är de så kallade malfigiska kärlen som finns vid korsningen mellan Drosophilas mittersta och bakre tarmdel och att Drosophilas tarmvävnad saknar kryptor. De malfigiska kärlen sägs motsvara däggjurens njurar, och i Drosophilas malfigiska kärl omvandlas slaggämnen som absorberats från den omgivande hemolymfan, till fasta kväveföreningar (Apidianakis & Rahme, 2011).



Figur 5 a) *Drosophilas* tarmsystemsuppbyggnad. Figuren presenterar de olika delarna som *Drosophilas* tarmsystem delas in i. *Drosophilas* tarmsystem består av en främre tarmkanal, en kräva, en mittersta tarmkanal, en bakre tarmkanal och ett rektum. b) *Tarmlumen och tarmepitelet i Drosophila mittersta tarmkanal*. Figuren visar viktiga fysiologiska komponenterna i *Drosophila* mittersta tarmkanal. De olika celltyperna som presenteras i figuren är absorberande enterocyter (EC) med mikrovilli, ISC tarmstamcellerna, sekretoriska enteroendokrinaceller (EE) och glattmuskelceller. Förutom dessa presenteras i figuren *Drosophilas* peritrofiska matrix, slem lager och basalmembran (bilden tagen från Kuraishi et al., 2013).

*Drosophilas* mellersta tarm består av ett enkelt epitellager som omges av glatt muskulatur och nerver. *Drosophilas* tarmepitel förnyas med en till två veckors mellanrum på grund av pluripotenta ISC-cellers aktivitet. Dessa pluripotenta ISC-celler förnyas sig själva och ger upphov till enteroblaster, som i sin tur differentierar till antingen absorberande enterocyter eller till sekretoriska enteroendokrinaceller (Jin et al., 2017). I *Drosophilas* mellersta mellantarm finns det dessutom en stor mängd med så kallade kopparceller som utsöndrar magsyra, och som därmed bidrar till *Drosophilas* sura tarmmiljö. Däggdjurs gastriska parietalceller och *Drosophilas* kopparceller delar många likheter, som till exempel att båda utsöndrar magsyra och har en djupt invagnerad apikal membrandel som är tätt täckt med mikrovilli (Dubreuil, 2004). Trots att de olika delarna i *Drosophilas* mellantarm anses vara väl etablerade visar studier att specifika gener, som kodar för till exempel matsmätningensenzym och antibakteriella peptider, uttrycks i specifika delar av *Drosophilas* magtarmkanal

(Buchon et al., 2013). Detta indikerar att det fortfarande finns mycket som är okänt om *Drosophilas* magtarmkanal.

Eftersom *Drosophilas* huvudsakliga naturliga föda är ruttna frukter är dess tarmsystem i konstant kontakt med stora mängder mikroorganismer. För att *Drosophila* ska klara av att försvara sig mot den stora mängden mikroorganismer i dess föda, har den ett välutvecklat tarmimmunförsvar (Kuraishi et al., 2013). Tidigare studier har visat att *Drosophilas* tarmimmunförsvar består i huvudsak av fyra komponenter: produktionen av reaktiva syreradikaler (eng. reactive oxygen species), förnyelse av dess tarmepitel, fysikaliska barriärer (som till exempel perotropiskamatrixet) samt produktion av AMP-proteiner via IMD-signaleringsräckan (Bonnay et al., 2013). Dessa fyra komponenter, i kombination med att *Drosophilas* tarmlumen är en sur miljö, bidrar till att dess tarmlumen anses vara en fientlig miljö för mikrobiell kolonialisering (Buchon, Broderick, Poidevin, et al., 2009).

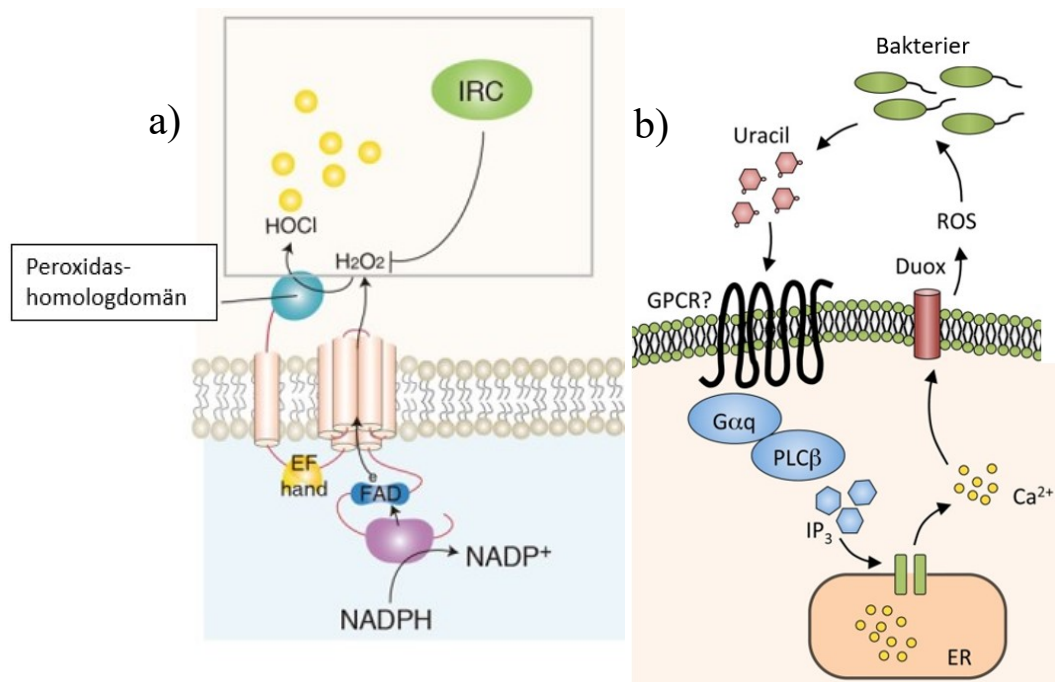
#### 2.4.1 Produktionen av antibakteriella peptider i *Drosophilas* tarm

En av de viktigaste processerna i *Drosophilas* tarmimmunförsvar är en lokal produktionen av IMD-specifika AMP. Liksom vid den systemiska immunresponen aktiveras IMD-signaleringsräckan då den transmembrana eller intracellulära PGRP-receptorn kommer i kontakt med specifika peptidoglykaner i Gramnegativa bakteriers cellmembran (Myllymäki et al., 2014). IMD-signaleringsräckan står därmed för *Drosophilas* huvudtarmimmunförsvar mot Gramnegativa bakterier, och flertalet studier visar att flugor med en bristfällig IMD-signaleringsräcka är känsliga för orala infektioner med Gramnegativa bakterier. Studier har även visat att flugor med en bristfällig IMD-signaleringsräcka har högre koncentrationer av kommensala bakterier i dess tarm, vilket indikerar att IMD-signaleringsräckan är en essentiell del vid uppehållet av *Drosophilas* tarmhomeostas (Kleino & Silverman, 2014). Till skillnad från *Drosophilas* systemiska immunförsvar, anses inte Toll-signaleringsräckan vara en del av *Drosophilas* tarmimmunförsvar. Detta är på grund av att proteinet Spätzle inte kan vistas i tarmlumen av *Drosophilas* mittersta tarm utan att spolats bort. Eftersom Spätzle är den enda kända Toll-receptorliganden, antas det att det inte heller finnas någon Toll-receptoraktivering i dess tarmepitelceller (Buchon et al., 2014). I

jämförelse med *Drosophila*s systemiska immunrespons så vet man inte lika mycket om hur dessa immunsignaleringsräckor påverkar dess tarmimmunrespons. Det är till exempel fortfarande oklart hur *Drosophila*s tarmvävnad känner igen Grampositiva bakterier då Toll-signaleringsräckan är nedsatt (Hori et al., 2018).

#### 2.4.2 Produktionen av ROS i *Drosophila*s tarm

Studier har visat att ROS-producerandeenzymet dDuox har en central roll i *Drosophila*s tarmimmunförsvar, då flugor med en nedsatt dDuox-aktivitet är ytterst mottagliga för tarminfektioner (Ha et al., 2005). Produktionen av reaktiva syreradikaler (ROS) är en viktig del av alla eukaryoters medfödda immunförsvar. Eftersom biokemiska studier har visat att dDuox är den enda källan till infektionsinducerad ROS-produktion i *Drosophila*s tarm, utgör dDuox ett av *Drosophila*s viktigaste sätt att uppehålla tarmhomeostasen (Buchon, Broderick, Chakrabarti, et al., 2009). dDUOX hör till NADPH-oxidasfamiljen och är *Drosophila*s enda Duox-enzym. I *Drosophila* uttrycks dDuox uteslutande i dess barriärepiteleceller (S. H. Kim & Lee, 2014). Strukturen för Duox-enzym är evolutionärt välbevarade och de består av en extracellulär peroxidas-homologdomän, en transmembrandomän, en kalciummodulerad EF-handdomän och en NADPH-oxidasdomän. Duox-enzym producerar molekyler som utgör förstadiet till reaktiva syreradikaler, till exempel omvandlar Duox-enzymet i *Drosophila*  $H_2O_2$  till HOCl. Omvandlingen från  $H_2O_2$  till HOCl sker enbart vid närvaro av klorid, och reaktionen utförs i Duox-enzymets peroxidas-homologdomän (figur 6 a). HOCl har en mikrobicid effekt och det utsöndras från dDuox till tarmlumen (Ha et al., 2005).



Figur 6 a) *Drosophila*s produktion av reaktiva syreradikaler av Duox enzymet. Duox enzymets peroxidashomologdomän omvandlar  $H_2O_2$  till syreradikalen HOCl vid närvaro av klorid. Produktionen av syreradikalerna regleras av enzymet IRC, eftersom IRC avlägsnar fria  $H_2O_2$  molekyler (figur tagen och modifierad från S. H. Kim & Lee, 2014). b) *dDuox* aktivering via fosfolipas  $C\beta$ -signalräckan. Uracil som utsöndrats av patogena bakterier aktiverar ett okänt GPCR-protein. Aktiveringen av den okända GPC-receptorn leder till en aktiveringen av fosfolipas  $C\beta$ -signalräckan, vilket i sin tur leder till att kalcium frisläpps från ER-lumen till cytoplasman. De frisläppta kalciumjonerna reglerar därefter *dDuox* aktiviteten (figur tagen och modifierad från Kuraishi et al., 2013).

Till skillnad från antibakteriella peptider är microbicides ROS-molekyler toxiska för eukaryota celler vid för höga koncentrationer. Därför måste den Duox-inducerade ROS utsöndring vara välreglerad. Studier har till exempel identifierat enzymer som kan avlägsna fria  $H_2O_2$  molekyler, som till exempel enzymet IRC (förkortning från engelskans "immune regulated catalase") (Ha et al., 2005). *Drosophila*s Duox-system regleras på ligandnivå, och studier har visat att inte alla mikroorganismer kan aktivera *dDuox*-systemet. *dDuox*-systemet kan dock aktiveras av en mängd olika sorters mikroorganismer. Anmärkningsvärt är att Duox-systemet i huvudsak inte aktiveras av tarmens kommensala bakterier. Orsaken till detta antas vara för att patogena bakterier utsöndrar uracil medan kommensala bakterier inte gör det (Lee et al., 2013). Studier har visat att uracil kan aktivera en fortfarande okänd G-proteinkopplad receptor, vilket i sin tur leder till *dDuox*-aktivering via fosfolipas  $C\beta$ -signalräckan, och redan små mängder med syntetiskt uracil har visats kunna stimulera den enzymatiska aktiveringen av *dDuox* (figur 6 b). Det är dock fortfarande oklart varför patogena

mikroorganismer utsöndrar uracil medan kommensala bakterier inte gör det (Hori et al., 2018). Duox-systemet kan därmed även aktiveras av både Grampositiva bakterier och svamp. Således antas det att Duox-inducerad ROS utsöndring är den viktigaste immunförsvarsmekanismen mot dessa mikroorganismer i *Drosophila*'s tarm, eftersom det förmodas att det inte finns någon Toll-receptoraktivering i *Drosophila*'s tarmepitelceller.

## 2.5 Molekylär koppling mellan IMD- och Toll-signaleringsräckan

Trots att några studier har visat att det finns möjliga kopplingar mellan *Drosophila*'s IMD- och Toll-signaleringsräcka, är signaleringsräckorna fortsättningsvis etablerade som självständiga. Orsaken till detta är främst för att studierna som utförts gällande ämnet är få. Det har till exempel inte utförts tillräckligt med vävnadsspecifik forskning om en möjlig koppling mellan IMD- och Toll-signaleringsräckan. I studien av Ferrandon et al., 1998 visar de till exempel att transkriberingen av Toll-specifika AMP-genen *Drosomycin* kan aktiveras i *Drosophila*'s luftstrupe trots att det förmodas att det inte finns någon Toll-receptoraktivering i epitelcellerna i *Drosophila*'s luftstrupe. Dock framkommer det inte i denna studie om detta *Drosomycin* uttryck orsakas av en specifik koppling mellan IMD- och Toll-signaleringsräckan.

IMD- och Toll-signaleringsräckorna är välbevarade och har visats vara så gott som identiska i många nära besläktade organismer till *Drosophila*. Eftersom det har visats att i *Tribolium castaneum* och i *Plautia stali*, vilka är besläktade organismer till *Drosophila*, att deras IMD- och Toll-signaleringsräckor antagligen delar på signalkomponenter, är det av intresse att undersöka om detsamma gäller för *Drosophila* (Yokoi et al., 2012, Nishide et al., 2019). De kanske mest förekommande teorierna gällande en möjlig koppling mellan *Drosophila*'s IMD- och Toll-signaleringsräcka är NF- $\kappa$ B-heterodimerteorin och teorin om att en IMD- och en Toll-signaleringsförmedlare samverka via en interaktion som är förmedlad via dödsdomäner.

### 2.5.1 NF- $\kappa$ B-heterodimeren Relish/Dif

Den kanske mest förekommande teorin om en möjlig koppling mellan *Drosophila*s IMD- och Toll-signaleringsräckor är teorin om att Relish och Dif kan samverka och bilda en NF- $\kappa$ B-heterodimer (Tanji et al., 2010, Tanji et al., 2007). NF- $\kappa$ B-proteiner är en familj av transkriptionsfaktorer som framförallt anses vara viktiga för organismers medfödda immunförsvar eftersom de aktiverar transkriberingen av gener som är essentiella för organismers inflammationsrespons. Förutom detta har NF- $\kappa$ B-transkriptionsfaktorer även visats reglera genuttrycket för hundratals andra gener som inte hör till organismers immunförsvar. NF- $\kappa$ B-transkriptionsfaktorer har till exempel visats reglera genuttrycket för gener som är involverade vid cellers tillväxt, differentiering och apoptos (Morgan & Liu, 2011). I däggdjur har NF- $\kappa$ B-proteinerna RelA, RelB, cRel, p100/52 och p105/50 identifierats, och dessa bildar antingen homodimerer eller heterodimerer vid aktivering. Orsaken till att dessa NF- $\kappa$ B-proteiner kan bilda dimerer är för att de har en Rel-homologdomän som bidrar till interaktionen mellan dem. RelB är dock ett undantag då det har visats att detta NF- $\kappa$ B-protein enbart förekommer som en heterodimer (Vallabhapurapu & Karin, 2009). NF- $\kappa$ B-transkriptionsfaktorer är inaktiva när de samverkar med ett I $\kappa$ B-protein. När detta I $\kappa$ B-protein fosforyleras, leder det till dess degradering, vilket i sin tur leder till att NF- $\kappa$ B-transkriptionsfaktorn kan translokeras in till cellkärnan. Väl inne i cellkärnan kan NF- $\kappa$ B-transkriptionsfaktorn sedan bidra till transkriptionsaktiveringen av dess målgener. I de flesta celltyper hos däggdjur anses RelA:p50-heterodimeren vara den fundamentala förmedlaren för NF- $\kappa$ B-funktionerna, men eftersom det bildas olika NF- $\kappa$ B-dimerer i däggdjur bildar däggdjurs NF- $\kappa$ B-proteiner ett ytterst komplext nätverk över de gener vars uttryck de reglerar (Basak & Hoffmann, 2008).

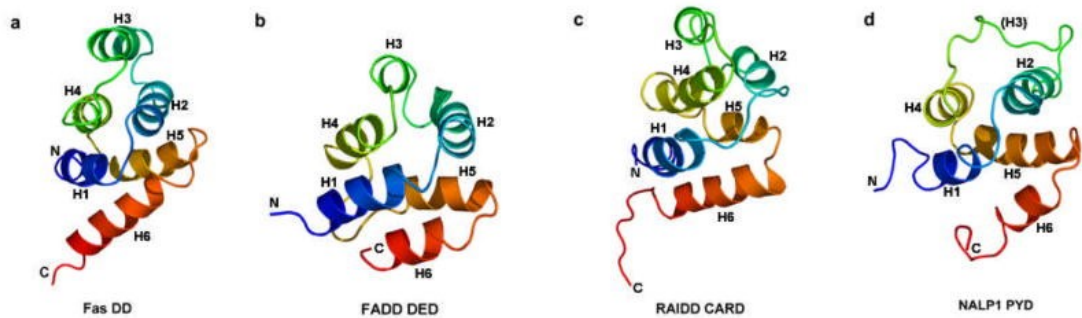
I *Drosophila* har det identifierats tre NF- $\kappa$ B-proteiner, nämligen Relish, Dif och Dorsal. Det har länge antagits att Relish enbart förekommer som en homodimer medan Dif/Dorsal enbart kan förekomma som en heterodimer (Tanji et al., 2007). Relish är involverad i IMD-signaleringskaskaden medan Dif/Dorsal är involverad i Toll-signaleringskaskaden. Trots att det antagits att *Drosophila*s NF- $\kappa$ B-proteiner inte bildar homo- och heterodimerer skulle de i teorin kunna göra det, då de innehar en liknande Rel-homologdomän som förmedlar dimeriseringen i däggdjur (Hetru & Hoffmann, 2009). Anmärkningsvärt är att några studier har visat att Relish och Dif



kan interagera med varandra och därmed bilda en heterodimer (Tanji et al., 2007, Tanji et al., 2010). Dessutom visar författarna i studien av Tanji et al. 2010, att denna Relish/Dif-heterodimer bidrar till en direkt korsreglering av båda signaleringsräckorna då den kan både aktivera uttrycket för IMD- och Toll-specifika gener. I denna studie understryker författarna dock att de lokaliserat interaktionen mellan Relish och Dif då de överuttryckt båda proteinerna, och att de därmed inte kan utesluta att de endogena proteinerna inte samverkar.

### 2.5.2 Dödsdomämförmedlad koppling mellan Toll-och IMD-signaleringsräckan

Eftersom det förekommer proteiner med dödsdomäner i både IMD-och Toll signaleringsräckan är en teori att dessa signaleringsräckor är kopplade till varandra via en interaktion mellan dödsdomäner. Dödsdomäner (DD) hör till dödsdomänssuperfamiljen. Till dödsdomänssuperfamiljen hör, förutom DD-familjen, även dödseffektordomänfamiljen (DED), kaspasrekryterandedomänfamiljen (CARD) och pyrindomänfamiljen (Kohl & Grütter, 2004). Dessa fyra underenhetsdomänfamiljer har visats kunna bilda homotypiska interaktioner med hög affinitet, och proteiner innehållande dessa domäner är framförallt förknippade med ansamlingen och aktiveringen av apoptos-, och inflammationssignaleringskomplex (Hyun et al., 2007, Dickens et al., 2012). Proteiner med domäner tillhörande dödsdomänssuperfamiljen bildar oligomerer då de samverkar med varandra (Hyun et al., 2007). Domäner tillhörande dödsdomänssuperfamiljen är evolutionärt välbevarade och de är bland de mest förekommande protein-proteininteraktionsdomänerna. Alla underenhetsfamiljer i dödsdomänssuperfamiljen har liknande strukturer och de är uppbyggda av sex alfa-helixar som omger varandra (figur 7) (Reed et al., 2004). Trots att dessa fyra underenhetsdomänfamiljer intar en liknande tertiärstruktur, har varje enskild underenhetsdomänfamilj distinkta strukturella egenskaper som bidrar till deras olikheter. Dessutom finns det en stor variation av aminosyresekvensen inom varje underenhetsfamilj, vilket bidrar till de olika domänernas specificitet (Micheau & Tschopp, 2003).



Figur 7. Proteinstrukturer tillhörande dödsdomänssuperfamiljen. Figuren presenterar proteinstrukturerna för de olika underenhetsfamiljerna som tillhör dödsdomänssuperfamiljen. Fas DD a, Fadd DED b, RAIDD CARD c, och NALP1 PYD d. (Figur tagen från Hyun et al., 2007).

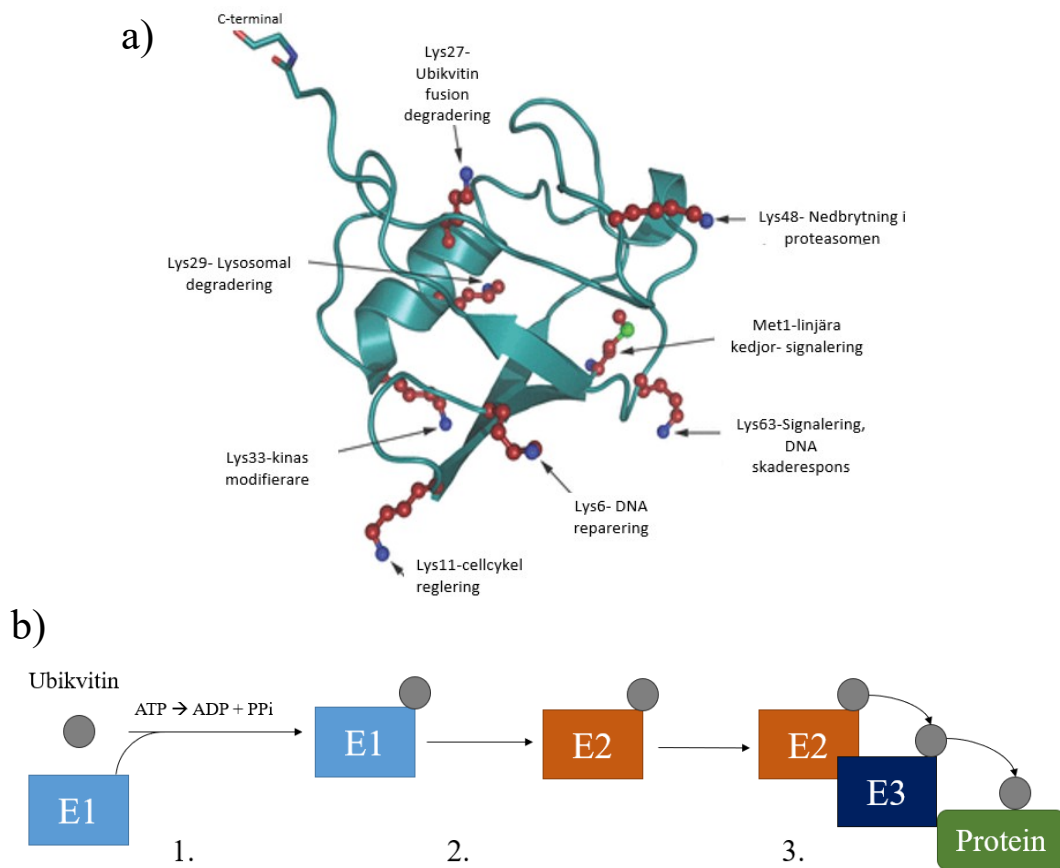
Kristallstrukturen av monomeriska Pelle-DD:Tube-DD-komplexet är den enda existerande kristallstrukturen av ett DD:DD-komplex (Xiao et al., 1999). Utgående från denna kristallstruktur kan man se att samverkningen mellan Pelles-DD och Tubes-DD är en blandning av polära, laddade och hydrofobiska interaktioner. Förutom detta visar kristallstrukturen att den viktigaste samverkningsytan mellan Pelles DD och Tubes DD är förmedlad via Tubes förlängda C-terminal. Till skillnad från samverkningen mellan Pelles DD och Tubes DD anses samverkningen mellan Fas DD och Fadds DD enbart ske på grund av dödsdomänernas motsatt laddade ytor (Xiao et al., 1999, Jeong et al., 1999). Skillnaden mellan Pelles och Tubes samverkande till Fas och Fadds samverkande understryker variationen mellan hur dödsdomäner kan samverka trots deras strukturella likheter. Eftersom studier visar att DD:n kan samverka med varandra på varierande sätt, är det därmed inte osannolikt att okända DD:DD interaktioner existerar. I IMD-signaleringsräckan innehåller proteinerna IMD, Relish och dFADD dödsdomäner, medan i Toll-signaleringsräckan innehåller proteinerna dMyD88, Tube och Pelle dödsdomäner. Dessa proteiner skulle därmed potentiellt kunna samverka med varandra. Det har redan visats att dMyD88 kan samverka med dFADD då de överuttrycks i S2 celler. Detta skulle kunna leda till en aktivering av IMD-specifika gener från Toll-receptorn om de endogena dMyD88 och dFadd också samverkar (Horng & Medzhitov, 2001, Yokoi et al., 2012). I studien av Xiao et al. 1999 spekulerar de även om att dimeriseringen av DD:n möjligtvis kan leda till nya samverkningsytor för andra proteiner som har eller inte har dödsdomäner, vilket ytterligare ökar på möjligheten att en IMD-eller Toll-signaleringsförmedlare samverkar i den andra signaleringsräckan.

Majoriteten av de kända interaktionerna inom dödsdomänssuperfamiljen är homotypiska interaktioner mellan proteiner som tillhör samma underenhetsfamilj. Trots detta har det visats att DED-innehållande proteinet PEA-15 kan interagera med Erk via dess DED (Hill et al., 2002), samt att CARD-innehållande proteinet ARC kan interagera med DD i Fas och med DD i Fadd via dess CARD (Nam et al., 2004). Dessutom har det visats att Dredds DED1 kan både samverka med IMD-signaleringsförmedlarna DIAP2 (Meinander et al., 2012) och Kenny (opublicerade observationer). Därmed är det inte helt uteslutet att en Toll-signaleringsförmedlare med en DD skulle kunna samverka med Dredds eller dFadds DED, och på så sätt förmedla en koppling mellan de båda immunsigaleringsräckorna.

### 2.5.3 Ubikvitinförmedlad koppling mellan IMD-och Toll-signaleringsräckan

En annan teori om koppling mellan IMD och Toll-signaleringsräckan är att signaleringsräckorna är kopplade via ubikvitinering. Ubikvitinering är en posttranslationell modifikation där det regulatoriska proteinet ubikvitin (9 kDa) tillsätts på bestämda proteiner. Ubikvitin tillsätts på proteiner via en enzymatisk kaskad i tre steg som involverar så kallade E1-, E2- och E3-enzym (Figur 8 a och 8 b). I det första steget aktiverar ett E1-enzym ubikvitinet via en process som kräver ATP. Därefter överförs ubikvitinet till ett E2-enzym, och i det sista steget överförs ett E3-enzym ubikvitinet från E2-enzymet till målprotein (Jie Li et al., 2016). Substratspecificiteten bestäms därmed huvudsakligen av E3-ligasena (H. Hu & Sun, 2016). Ubikvitin har sju lysinrester och en metioninrest som kan fungera som mottagare av ytterligare ubikvitinmolekyler, och beroende på hur ubikvitinmolekylerna är bundna till varandra i denna ubikvitinkedja leder det till olika cellulära processer när de tillsätts på målproteiner (Komander, 2009). De vanligaste ubikvitinkedjorna i immunsigaleringskaskaderna är K63-, K48- och M1-ubikvitinkedjor. Då ett ubikvitin eller en ubikvitinkedja är bunden till ett målprotein, kan andra signalproteiner med så kallade ubikvitinbindande domäner (UBD) känna igen och samverka med ubikvitinet. Därmed kan specifika ubikvitinkedjor fungera som byggnadsställningar för ansamling av cellsignaleringskomplex (H. Hu & Sun, 2016). Linjära K63-och M1-ubikvitinkedjor är de främsta ubikvitinkedjorna som

fungerar som byggnadsställningar mellan proteiner i cellsignaleringskaskader medan K48-ubikvitinkedjor har visats markera proteiner för degradering i proteasomen (Komander, 2009). Aktiveringen av IKK-komplexet i däggdjur illustrerar hur ubikvitinkedjor kan fungera som byggnadsställningar mellan cellsignaleringsförmedlare. TAK1 är ett serin/treoninkinas, och eftersom det antas att TAK1 fosforylerar och aktiverar IKK-komplexet, anses det vara en essentiell del av däggdjurs NF- $\kappa$ B-aktivering (Zhang et al., 2017). I däggdjur samverkar TAK1 med TAK1-bindandeproteinerna 1, 2 och 3 (TAB1, TAB2 och TAB3), och det antas att TAB2 och TAB3 binder till K63-ubikvitinkedjor på proteinet NEMO via sin UBD. Dessa ubikvitinkedjor som binder till TAB2 och TAB3 gör att TAK1 kommer nära IKK-komplexet, vilket leder till att TAK1 kan fosforylera proteinet IKK $\beta$  i IKK-komplexet. Detta leder till aktivering av IKK-komplexet (Zhang et al., 2017, Carter et al., 2003).



Figur 8 a) Ubikvitinets tredimensionella struktur. Figuren visar Ubikvitinets proteinstruktur som band med dess sju lysinrester och dess metionin som visas som bollar. Figuren visar även vad de olika aminosyrorerna signalerar vid kedjebildning (Bild modifierad från Komander, 2009). b) Trestegs enzymatisk kaskad för ubikvitinets fästande till målproteiner. Ubikvitin (grå) aktiveras och binds till ett E1-enzym (ljusblå) i en reaktion som kräver ATP. 2) Det aktiverade ubikvitinet överförs från E1-enzymet till ett E2-enzym (orange). 3) Ubikvitinet överförs från E2-enzymet till målproteinet (grön) med hjälp av ett E3-enzym (mörkblå).

Ubikvitinering är en viktig process inom IMD-signaleringsräckan, då både E3-ligaset DIAP2 och Lubel bildar polyubikvitinkedjor på signaleringsproteiner i signaleringskaskaden (Leulier et al., 2006, Aalto et al., 2019). Ubikvitinering inom Toll-signaleringsräckan är dock fortfarande ett relativt outforskat område. Det är inte förrän nyligen som ubikvitinering uppmärksammats i Toll-signaleringsräckan i samband med att E3-ligaset Pellino påträffades som en essentiell del av Toll-signaleringsräckan (Haghighyeghi et al., 2010). Eftersom ubikvitinering fortfarande är en relativt outforskad process i Toll-signaleringsräckan, är det därmed inte omöjligt att tänka sig att IMD-och Toll-signaleringsräckorna är sammankopplade via ubikvitinering.

### 3 Målsättning

Denna studies huvudsakliga målsättning var att identifiera en molekylär koppling mellan *Drosophila*'s IMD- och Toll-signaleringsräcka. Specifikt förväntades det att en tarmspecifik molekylär koppling skulle identifieras. En tarmspecifik molekylär koppling kunde möjligtvis vara grunden till hur flugors tarmepitelceller kompletterar den transkriptionella aktiveringen som krävs för att flugor skall överleva tarminfektioner orsakade av Grampositiva bakterier.

För att visa att IMD- och Toll-signaleringsräckan är kopplade i flugors tarmepitelceller var studiens första mål att identifiera en känd IMD- eller Toll-signaleringsförmedlare som krävs för båda immunsigaleringsräckornas aktivering i flugors tarmepitelceller. Detta undersöktes genom att utföra så kallade överlevnadsexperiment med Grampositiva och Gramnegativa bakterier på IMD- och Toll-signaleringsflugmutanter. Både septiska och orala överlevnadsexperiment utfördes för att bestämma om den identifierade signaleringsförmedlaren enbart bidrar till en tarmspecifik molekylär koppling. För att visa att signaleringsförmedlaren bidrar till en molekylär kopplingen undersöktes även flugmutanters genaktivering med qPCR.

När en känd IMD- eller Toll-signaleringsförmedlare som kopplar samman signaleringsräckorna hade identifierats var studiens förljande mål att bestämma hur denna signaleringsförmedlare kopplas till den andra immunsigaleringsräckan. För att nå detta mål utfördes immunoprecipiteringsexperiment där det undersöktes om den identifierade signaleringsförmedlaren kan samverka med en känd signaleringsförmedlare från den andra immunsigaleringsräckan. Inför studien förväntades att samverkan mellan proteinerna antingen skulle vara direkt via evolutionärt välbevarade proteinssamverkningsdomäner eller indirekt via ubiquitinering. Identifiering av en protein-proteinsamverkan skulle vara en indikering på hur proteinet kopplas till den andra signaleringsräckan.

## 4 Material och metoder

### 4.1 Fluglinjer

Vid överlevnadsexperimenten och vid kvantitativa-PCR experimenten användes positiva vildtypskontroller och negativa kontroller som hade mutationer i gener för proteiner som ingår i IMD-signaleringsräckan och Toll-signaleringsräckan. Fluglinjerna som användes vid experimenten presenteras i tabell 1. Då experimenten i denna studie utfördes var fluglinjerna Tub2/TM8, PII/TM3, w118;P och TLR3/TM3 heterozygoter medan övriga fluglinjer var homozygoter. Flugorna odlades i rumstemperatur och matades med Nutri-fly BF (Dutscher Scientific, Essex).

*Tabell 1:* Fluglinjer som användes i överlevnadsexperimenten och i kvantitativa PCR experimenten

Fluglinje	Kallad i texten	Beskrivning	Experimentell funktion
Canton <sup>S</sup>	Canton <sup>S</sup>	Vildtyp	Kontroll vid de septiska infektionsexperimenten
Gla/CyO	Gla/cyo	Markörlinje	Kontroll vid kvantitativa-PCR experimenten
Cyo/if;Dagal4/TM3	Dagal4	Drivarlinje	Kontroll vid de orala infektionsexperimenten
Dmel\Dredd <sup>D44</sup> (D44)	Dredd <sup>D44</sup>	Punktmutation i den domän av Dredd som ubikvitineras av DIAP2	Negativ kontroll för IMD-signalerings
Dmel\Dredd <sup>L23</sup> (L23)	Dredd <sup>L23</sup>	Punktmutation i Dredds katalytiska domän	Negativ kontroll för IMD-signalerings
Dmel\Rel <sup>E20</sup>	Rel <sup>E20</sup>	Saknar alla fyra startsekvenser för Rel-genen	Negativ kontroll för IMD-signalerings
Lubel <sup>Minos</sup> (Lubel <sup>Mi</sup> )	Lubel <sup>Mi</sup>	Saknar RBR-domänen i Lubel på grund av en insertion som innehåller ett stop kodon i mitten av genen som kodar Lubel	Negativ kontroll för IMD-signalerings
TL(r3)/TM3,sb (Toll)	Toll <sup>Mut</sup>	Har en hypomorfsk allel som kodar en toll-receptor med lägre aktivitet än vildtyps Toll-receptorn.	Negativ kontroll för Toll-signalerings
w118;P (pli) (Pellino)	Pellino <sup>Mut</sup>	Saknar Pellino på grund av en insertion innehållande ett stop kodon i början av genen som kodar Pellino	Negativ kontroll för Toll-signalerings
PII/TM3, sb (Pelle)	Pelle <sup>Mut</sup>	Saknar Pelle på grund av en insertion innehållande ett stop kodon i början av genen som kodar Pelle	Negativ kontroll för Toll-signalerings
Tub2/TM8 (Tube)	Tube <sup>Mut</sup>	Punktmutation som bildar ett stop kodon i mitten av genen som kodar Tube.	Negativ kontroll för Toll-signalerings
ActGal4/cyo;UAS-TripDif/TM6	Dif <sup>Mut</sup>	Uttrycker en VALIUM10 vektor som kodar RNAi av Dif.	Negativ kontroll för Toll-signalerings

## 4.2 Septiska infektionsexperiment och statistik

Fluglinjer med mutationer i gener som kodar proteiner tillhörande antingen IMD- eller Toll-signaleringsräckan infekterades septiskt genom att först doppa en nål i en bakterie-sukrossuspension följt av att nålen stacks vid flugornas torax. 5 hanar och 5 honor plockades till varje prov, och efter att flugorna hade infekterats med bakterierna placerades de i tuber som innehöll flugmat. Därefter räknades antalet överlevande flugor för varje fluglinje med 24 timmars mellanrum, tills 72 timmar hade passerat. Procenten för antalet döda flugor räknades ut med Excel och analyserades sedan med two-way ANOVA med förtroende intervallet 95 %. Grafer gjordes på de slutliga resultaten. Bakterie-sukrossuspensionen som användes vid septiska infektionsexperimenten bestod till 50 procent av en bakteriesuspension med optimala densiteten 100, och till 50 procent av en femprocentig sukroslösning. I septiska infektionsexperimenten med Gramnegativa bakterier användes bakteriestammen *Erwinia carotovora carotovora* 15 (Ecc15) och vid septiska infektionsexperimenten med Grampositiva bakterier användes bakteriestammen *Micrococcus luteus* (M. luteus).

## 4.3 Orala infektionsexperiment och statistik

Fluglinjer med mutationer i gener som kodar proteiner tillhörande antingen IMD- eller Toll-signaleringsräckan placerades i en tub som innehöll ett Whatmanpapper som hade blötts med en bakterie-sukroslösning. 10 hanar och 10 honor plockades till varje prov. Lösningen bestod till 50 procent av bakteriesuspension med optimala densiteten 200, och till 50 procent av en femprocentig sukroslösning. Bakteriestammarna som användes vid experimenten var Ecc15 och M. luteus. Därefter fick flugorna fritt äta bakterie-sukroslösningen. Efter 24 h räknades antalet överlevande flugor och Whatmanpappret byttes ut. Processen upprepades efter varje 24 h tills det gått 72 h. Procenten för antalet döda flugor räknades ut med Excel och analyserades sedan med two-way ANOVA med förtroende intervallet 95 %. Grafer gjordes på de slutliga resultaten.



#### 4.4 Bakterieinducering i flugor inför kvantitativa PCR-experimenten

Fluglinjer med mutationer i gener som kodar proteiner tillhörande antingen IMD- eller Toll-signaleringsräckan plockades och placerades i tomma tuber för två timmar. Därefter placerades flugorna i en tub som innehöll ett Whatmanpapper som hade blötts med en lösning som innehöll bakterier och sukros. Lösningen bestod till 50 procent av bakteriesuspension med optimala densiteten 300, och till 50 procent av en femprocentig sukroslösning. Bakteriestammen Ecc15 användes vid experimenten. Därefter fick flugorna äta lösningen som innehöll bakterier och sukros i ca 24 h under inkubering (25 grader). Efter inkuberingen dissekerades flugorna, så att deras tarm togs ut och placerades i 300 µl RLT-buffert (Qiagen). RLT-bufferten innehöll tillsatt β-merkaptoetanol (10 µl merkaptoetanol per 1 ml RLT-buffert). För varje fluglinje användes ett kontrollprov vars AMP-expression jämfördes med de infekterade flugornas.

#### 4.5 mRNA extrahering inför kvantitativa PCR experimenten

mRNA extraherades med hjälp av extraheringskitet RNeasy (Qiagen). Tarmarna krossades först i RLT-bufferten med en stöt. Efter att larverna hade lyserats homogeniserades proven med ett QIAshredder kit genom att lysatet tillsattes i QIAshredder kolonn och centrifugerades i 2 minuter (10 000 rpm). Vätskan som passerade genom kolonnen bevarades och 300 µl 70 % etanol tillsattes till lysatet, följt av att lysat+etanolblandningen tillsattes till en RNeasy kolonn. Lysat och etanolblandningen centrifugerades i 1 minut (10 000 rpm) och vätskan som passerade genom kolonnen kastades bort. Därefter renades proven genom att tillsätta 700 µl RW1-buffert till RNeasy kolonnen och centrifugera i 1 minut (10 000 rpm), följt av att vätskan som passerade genom kolonnen kastades bort. Sedan tillsattes 700 µl RPE-buffert till RNeasy kolonnen, kolonnen centrifugerades i 1 minut (10 000 rpm) och vätskan som passerade genom kolonnen kastades bort. RNeasy kolonnen centrifugerades sedan i 2 minuter (10 000 rpm) så att den blev torr, varefter mRNA:t eluerades från kolonnen. För elueringen sattes RNeasy kolonnen i ett eppendorfrör och elueringen genomfördes med en TE-buffert (0,1 mM EDTA, 10mM Tris, pH 8). 30 µl av TE-bufferten tillsattes i kolonnen följt av att kolonnen inkuberades på is i 5 minuter.

Sedan centrifugerades proven i 1 minut (10 000 rpm). Elueringssteget utfördes en gång till genom att ta eluatet, sätta det i kolonnen igen och centrifugera i 1 minut (10 000 rpm). Efter mRNA extraheringen förvarades proven i -80 °C tills experimentet fortsatte. Allt arbete som utfördes vid mRNA extraheringen utfördes på is.

#### 4.6 cDNA syntes inför kvantitativa PCR experimenten

För varje prov innehållande mRNA togs ett nytt eppendorfrör och i rören tillsattes x µl mRNA (en volym som hade 1 µg mRNA) och x µl MilliQ vatten (så att totala volymen blev 15 µl). Det förbereddes även ett "NAC" prov, (eng. No amplification control) som innehöll endast 15 µl MilliQ vatten.

För cDNA syntesen förbereddes en mastermix av iScript cDNA synteskit (BioRad) som bestod av 1 µl omvänt transkriptas och 4 µl reaktionsmix för varje prov. Mastermixen förbereddes så att först pipetterades reaktionsmixen i ett eppendorfrör och därefter enzymet, följt av att blandningen vortexades och centrifugerades snabbt. Sedan pipetterades 5 µl av iScript cDNA mastermixen till varje prov, vilket gav den totala slutvolymen 20 µl per prov. Proven inkuberades direkt i 25 °C i 10 minuter, följt av att de inkuberades i 46 °C i 15 minuter (elongeringsfas) och slutligen i 85°C i 5 minuter (inaktivering av enzymet). Proven förvarades sedan i -20 °C tills de användes för qPCR.

#### 4.7 Kvantitativ PCR och statistik

För att kunna utföra kvantitativa PCR-reaktionen måste cDNA proven spädas ut först och standardkurvsproven förberedas. För standardkurvan mättes fem punkter, varav den första var en utspädd blandning som innehöll 10 µl av varje cDNA prov. Därefter förbereddes fyra utspädningar till där varje standardpunkt var fem gånger svagare än den föregående. Dessa förbereddes genom att ta 10 µl från det första standardpunktsprovet och blanda det med 40 µl milliQ vatten. För den tredje standardpunkten togs 10 µl från det andra standardpunktsprovet och det blandades med 40 µl MilliQ vatten. De två övriga standardprovspunkterna tillreddes på samma sätt. En standardkurva bestämdes utgående från dessa standardpunkter vid qPCR mätningen, och med hjälp av dem kunde effektiviteten av PCR-reaktionen avgöras.

Dessutom kunde man med hjälp av standardkurvan avgöra en absolut mätning av mängden DNA. Alla cDNA-templat späddes ut 1:20 innan de användes i PCR-reaktionen.

Reaktionsmixen som pipetterades i 96-hålsplattans brunnar förbereddes enligt följande:

REAKTIONSMIX (100 %) PER BRUNN

2X reaktionsbuffert (Sensifast)	5 µl
Främre primär	0,4 µl = 400 nM
Bakre primär	0,4 µl = 400 nM
MQ-H <sub>2</sub> O	2,2

Totala mängden reaktionsmix beräknades utgående från mängden prover. Reaktionbufferten som användes vid experimenten var en Sensifast SYBR Hi-Rox mix (Bioline) som innehöll, förutom alla vanliga PCR reagenser, även det fluorescensfärgämnet SYBR green som avger fluorescens när det binder till dubbelsträngat DNA, och som därmed kan detekteras. Det förbereddes alltid två olika reaktionsmixer per experiment, en som innehöll primärerna för målgenen och en som innehöll primärerna för kontrollgenen. Kontrollgenerna som användes vid alla experiment var RP49 och  $\beta$ -actin. En kontrollgen användes för att normalisera data som man fick för varje brunn i qPCR-reaktionen, genom att jämföra aktiveringen av målgenen gentemot kontrollgenerna. Denna normalisering av data utfördes för att minska variansen mellan experiment. Målgenerna vars aktivering undersöktes vid experimenten var Dipteracin och IM1. Primererna som användes för att mäta diverse gener i denna studie presenteras i tabell 2.

Tabell 2: Primerer som användes för att mäta genaktiveringen för generna RP49,  $\beta$ -actin, Dipteracin och IM1 vid qPCR-experimenten.

Gen	Framåt primer	Bakåt primer
RP49	5'-AAA CGC GGT TCT GCA TGA G -3'	5'-AAA CGC GGT TCT GCA TGA G -3'
$\beta$ -Actin	5'-GCG TCG GTC AAT TCA ATC TT-3'	5'-AAG CTG CAA CCT CTT CGT CA-3'
Diptericin	5'-ACC GCA GTA CCC ACT CAA TC-3'	5'-ACT TTC CAG CTC GGT TCT GA-3'
IM1	5' -CAC CGT GGA CAT TGC ACA- 3'	5' -GTT TTT GTG CTC GGT CTG CT- 3'

Till brunnarna på en 96-hålsplatta pipetterades först 2 µl av de utspädda cDNA proven, standardproven och NAC, följt av att det pipetterades 8 µl reaktionsmix till alla brunnar som innehöll cDNA eller NAC. Varje cDNA-prov pipetterades i två olika triplikater eller i två olika duplikater på 96-hålsplattan, i den ena tillsattes reaktionsmix för målgenen och i den andra reaktionsmixen för kontrollgenen.

Plattan centrifugerades i 1 minut (1000 rpm) för att all vätska skulle vara på botten av brunnarna. Sedan kördes plattan i en PCR-maskin (Quantstudie 3) där det inte användes någon inbyggd standard. Data exporterades i en Excel-fil och behandlades sedan i ett annat Excel-dokument där man kunde beräkna effektiviteten och det relativa genuttrycket. I Excel-dokumentet som användes uträknades ett  $\Delta C_t$  värde för varje brunn på plattan genom att upphöja värdet för effektiviteten med  $C_t$  värdet. När  $\Delta C_t$  uträknats för både kontrollgenen och målgenen jämfördes de med varandra, vilket gav ett  $\Delta\Delta C_t$  värde. För triplikaten eller duplikaten beräknades sedan ett medelvärde, vilket gav ett slutligt normaliserat data. Relativa genuttrycket uträknades sedan genom att ta medelvärdena för  $\Delta\Delta C_t$  värdena för varje prov och dividera det med motsvarande värde för den icke-infekterade vildtypskontrollen. Detta gjorde att relativa genuttrycket för vildtypskontrollen alltid var 1. Resultaten analyserades sedan med one-way ANOVA med förtroende intervallet 95 %, så att genaktivering för alla oralinfekterade flugprov jämfördes mot den infekterade vildtypskontrollen. Grafer gjordes på de slutliga resultaten.

#### 4.8 Kvantifiering av DNA och mRNA

Kvantifieringen av DNA och mRNA utfördes med en Nanodrop2000TM-spektrofotometer (ThermoFisher). Mätningen av nukleinsyror valdes och blankprovet bestämdes genom att pipettera 2 µl av bufferten som användes vid elueringen av DNA:t eller mRNA:t på mätningområdet. Sedan pipetterades 2 µl av lösningen med DNA eller mRNA på provmätningområdet och dess absorbans mättes. Provens absorbans mättes vid 260 nm ( $A_{260}$ ) för att bestämma DNA- eller mRNA-koncentrationen, samt vid 280 nm ( $A_{280}$ ) och 230 nm ( $A_{230}$ ) för att kontrollera provens renhet med  $A_{260}/A_{280}$ - och  $A_{260}/A_{230}$ -förhållandena. I de fall där renligheten avvek mycket från de önskade värdena förkastades proven. Vid experimenten där mRNA mättes beräknades, utgående från mRNA koncentrationen,

hur många mikroliter RNA av varje prov som behövdes för att uppnå 1 µg mRNA. Beräkningarna utfördes i Excel.

## 4.9 Molekylär kloning av Toll-signaleringsförmedlaren Pelle

Toll-signaleringsspecifika proteinet Pelle klonades in i en pMT/N-V5-C-V5-His vektor. Primererna som användes i PCR:en designades så att Pelle skulle enbart ha en C-terminal V5-tag. Eftersom Pelle har en dödsdomän i dess N-terminal bestämdes det att V5-taggen skulle klonas i Pelles C-terminal, för att minimera taggens påverkan på Pelles samverkande till andra proteiner. För att uppnå detta tillsattes ett startkodon i framåt primeren och inget stoppkodon i bakåt primeren.

### 4.9.1 Amplifiering av genen som kodar Pelle

cDNA från vildtyps *Drosophila* användes som templat vid amplifieringen av genen som kodar Pelle. Genen amplifierades genom PCR med Q5 High-Fidelity DNA-polymeras och de buffertlösningar som följer med polymeraset (BioLabs). För amplifiering användes primererna 5'-GAGGTACCATGAGTGGCGTCCAGACC-3' som innehöll restriktionsklyvningsstället för restriktionsenzymet KpnI, och 5'-GATCTAGACTCGAGGTCGGTAACAAA-3' som innehöll restriktionsklyvningsstället för restriktionsenzymet XbaI. Primerer designades manuellt med hjälp av programmet Serial Cloner. Inför amplifieringen av genen som kodar Pelle blandades 2,5 µl av båda primererna, 1 µl templat, 0,5 µl Q5 DNA polymeras, 10 µl enhancer buffert, 1,5 µl av en lösning med dNTP, 10 µl reaktionsbuffert (5x) och 22 µl nukleasfritt vatten i ett PCR-rör för en total volym på 50 µl. Förutom detta förberedes ett kontrollprov som innehöll 1 µl mera nukleasfritt vatten istället för templat för att utesluta att primererna bundit ospecifikt. Proven amplifierades med 35 PCR-cykler, och efter PCR centrifugerades alla prov snabbt. Protokollet för PCR-reaktionen presenteras i tabell 3.

Tabell 3. PCR reaktionsprotokollet som användes vid amplifieringen av genen som kodar Toll-signaleringsförmedlaren Pelle

PCR-reaktionen	Temperatur	min: sek
1.	98°C	01:00
2.	98°C	00:10
3.	71°C-75°C	02:00
4.	72°C	02:00
5.	Gå TILL STEG 2. x35	
6	72°C	02:00
7.	4°C	∞

#### 4.9.2 DNA-gelelektrofores på PCR produkter

För att rena ut PCR-produkten separerades all PCR-produkt på en agarosgel. Samtidigt kontrollerades att fragmenten som bildats i PCR:en var av rätt storlek och att primererna inte bundit ospecifikt genom att också köra ut kontroll PCR-provet på agarosgelen. Agarosgelen som användes vid separeringen av PCR-produkterna var enprocentig. Agarosgelen tillredes genom att lösa upp 1,5 g agaros i 150 ml TAE-buffert (1x). Agaros och TAE-buffertlösningen kokades snabbt upp i mikrovågsugn tills lösningen var genomskinlig. Därefter tillsattes 7,5 µl Gelred i den upphettade agaros-TAE-buffertlösningen, följt av att den hälldes i gelgutningskärlet som hade kammen färdigt på plats. När gelen hade stelnat monterades den i elektrofores apparaten. TAE (1x) körningsbuffert hälldes på gelen och kammen togs bort. Sedan blandades proven som skulle appliceras på gelen. DNA-markören framställdes genom att blanda 2 µl DNA-standard och 2 µl 6x Loading dye i 8 µl MilliQ vatten, medan PCR-produkterna framställdes genom att blanda hela volymen PCR-produkt med 10 µl 6x Loading dye. Därefter applicerades proven på agarosgelen. Gelen kördes ca 90 minuter i 70 V och resultatet analyserades med iBright FL1000 (ThermoFisher).

#### 4.9.3 Rening av DNA med NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit

DNA renades med elektrofores och ett NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (Biotop, Åbo, Finland). Bandet som bildades i agarosgelen och som motsvarade storleken av genen som kodar Pelle, skars ut när gelen var under UV-ljus och placerades i ett

uppvägt eppendorfrör. Röret vägdes på nytt och mängden utskuren gel beräknades. 200 µl NTI-buffert per 100 mg gelfragment tillsattes till eppendorfröret och lösningen inkuberades ca 10 minuter i 50 °C. Under inkuberingen vortexades provet lite med ca två minuters mellanrum. När all gel hade löst upp sig överfördes provet till en NucleoSpin gel-och PCR-reningskolonn som var placerad i ett ansamlingsrör, följt av att provet centrifugerades 1 minut (11 000 g). Vätskan som passerat kolonnen slängdes och kolonnen placerades tillbaka i ansamlingsröret. 700 µl NT3 buffert tillsattes till kolonnen och kolonnen centrifugerades 1 minut (11 000 g). Vätskan som passerat kolonnen slängdes och kolonnen placerades tillbaka i ansamlingsröret. Tvättningssteget med NT3-buffert upprepades därefter en gång till. Kolonnen torkades sedan genom att den centrifugerades 1 minut (10 000 g), följt av att kolonnen placerades i ett eppendorför. DNA eluerades sedan från kolonnen genom att tillsätta 20 µl NE-buffert följt av att den centrifugerades 1 minut (10 000 g). För att förbättra elueringen inkuberades provet 5 minuter i 50 °C före det centrifugerades. Koncentrationen av DNA mättes med Nanodrop 2000TM enligt beskrivningen i punkt 3.8.

#### 4.9.4 Klyvning av plasmid och Pelle-PCR produkt

Pelle PCR-produkten och pMT/N-V5-C-V5-vektorn klövs med restriktionsenzymerna KpnI och XbaI. För att kunna ligera samman de klyvda plasmiderna och PCR-produkterna behandlades den klyvda vektorn med ett alkaliskt fosfat som kallas CIP (eng., Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) (New England BioLabs) för att avlägsna dess 5'-fosfatgrupp. Restriktionsenzymet KpnI som användes var ett HF enzym (eng. High fidelity). HF restriktionsenzym klyver målsekvenser med högre effektivitet än vanliga restriktionsenzym. Restriktionsenzymerna och buffertlösningarna som användes vid klyvandet av målsekvenserna var från New England Bioabs. Reaktionslösningen innehöll, 20U enzym per µg DNA, 1x CutSmart enzymbuffert och 1,0 µg DNA. Passande mängder av antingen vektor DNA eller PCR-produkt samt båda restriktionsenzym blandades så att 10x CutSmart enzymbufferten späddes ut till rätt koncentration, och nukleasfritt vatten tillsattes vid behov. Både reaktionslösningen med PCR-produkt och plasmid inkuberades sedan i 1 h i 37°C. Därefter behandlades klyvda plasmiden med CIP. Detta utfördes genom att blanda 1 pmol klyvd vektor med

2 µl CIP lösning, 10x CutSmart buffert och rätt mängd nukleasfritt vatten för att göra CutSmart buffertens koncentration till 1x. Sedan inkuberades CIP behandlade plasmiden i 30 min i 37°C. Både restriktionsklyvda, samt CIP behandlade vektorn och den restriktionsklyvda PCR-produkten kördes ut på en agarosgel med elektrofores på samma sätt som i punkt 3.9.2. Band med rätt storlek som motsvarade vektorns storlek och genen som kodar Pelle renades sedan från agarosgelen med Gel and PCR Clean-up kit (Biotop) enligt beskrivningen i punkt 3.9.3. Koncentrationen av PCR produkterna och plasmiderna bestämdes därefter med Nanodrop 2000TM enligt beskrivningen i punkt 3.8.

#### 4.9.5 Ligering av de klyvda plasmiderna och PCR produkterna

T4 DNA-ligas (New England BioLabs) användes vid ligeringen. För att få reda på mängden PCR-produkt som skulle tillsättas till provet, uträknades massaförhållandet mellan insertet och vektorn utgående från det molära förhållandet enligt följande formel (molära förhållandet vektor:insert var 1:3):

$$\frac{ng \text{ av vektor} \times kb \text{ storlek av insert}}{kb \text{ storlek av vektor}} \times \frac{mol.förh. \text{ insert}}{mol.förh.vektor} = x \text{ ng insert}$$

Bufferten som användes var en 10x T4 ligeringsbuffert (New England BioLabs) och koncentrationen av den slutliga lösningen skulle vara 1x. Till provet tillsattes 1 µl vektorlösning, 5,5 µl mål-DNA, 1 µl T4-ligeringsbuffert, 1,5 µl nukleasfritt vatten och 1 µl ligas. Sedan inkuberades lösningen 2 timmar i rumstemperatur.

#### 4.9.6 Transformerig av ligeringslösningen

Ligeringslösningen värmdes 15 min i 65 °C för att inaktivera ligaset. Till ett nytt eppendorfrör tillsattes 20 µl 10x KCM buffert, 10 ng ligeringslösning och rätt mängd milliQ för att få KCM buffertens koncentration till 1x. KCM är en buffertlösning som används vid transformering eftersom den gör kompetenta cellers cellmembran mera permeabelt. KCM-bufferten har fått sitt namn av att den innehåller molekylerna KCL, CaCl<sub>2</sub> och MgCl<sub>2</sub>. Lösningen bevarades på is. Det förberedes dessutom ett kontrollprov som enbart innehöll KCM- buffert och milliQ för att utesluta att det fanns



kontamination i KCM-bufferten eller för att bakterierna som användes vid transformeringen var ampicillin resistent. 100 µl transformeringskompetenta E. Coli TOP10 celler tillsattes till både eppendorfröret innehållande ligeringslösning och KCM-buffert, samt till kontrollprovet som enbart innehöll KCM-buffert och vatten, följt av att lösningarna inkuberades i 20 minuter på is. Därefter inkuberades transformeringslösningarna i rumstemperatur i 10 minuter, följt av att de inkuberades en timme i 37 °C. All transformeringslösning plattades sedan ut på respektive LB-plattor som innehöll 75 µg/ml ampicillin. Plattorna inkuberades sedan övernatt i 37 °C. En tom LB-ampicillinplatta inkuberades också övernatt i 37 °C för att utesluta att LB-plattorna var kontaminerade.

#### 4.9.7 Plasmidrening (miniprep) från bakteriekolonier

pMT-Pelle-V5-vektorer renades från enskilda bakteriekolonier på LB-plattorna med ett Plasmid DNA Purification kit (Macherey-Nagel). Tio stycken 15 ml odlingsrör fylldes med 5 ml LB-medium som innehöll 75 µg/ml ampicillin. En enskild bakteriekoloni plockades från LB-plattan med en platinaögla och öglan doppades i ett av de tio odlingsrören. Detta upprepades nio gånger till så att varje odlingsrör fick en bakteriekoloni. Alla tio rören placerades i en skakinkubator och inkuberades i 37 °C övernatten.

Från alla tio odlingsrör pippeterades 1 ml av odlingslösningen till fem olika eppendorfrör. Eppendorfrören centrifugerades 1 minut (12 000 rpm) och all supernatant avlägsnades. Pelleterna som härstamma från samma odlingsrör löstes upp och sammanfogades i 250 µl A1 buffert genom suspendering. Därefter tillsattes 250 µl A2 buffert till alla rör och lösningarna suspenderades och inkuberades i rumstemperatur för 5 minuter. 300 µl A3 buffert tillsattes till rören och lösningarna blandades genom att inventera rören 10 gånger eller tills lösningen blev färglös, följt av att rören centrifugerades 5 minuter (12 000 rpm). All vätska överfördes sedan till skilda centrifugeringskolonner och de centrifugerades 1 minut (12 000 rpm). Vätskan som passerat kolonnen hölls bort och 500 µl AQ buffert tillsattes till alla tio kolonner. Kolonnerna centrifugerades 1 minut (12 000 rpm) och vätskan som hade passerat kolonnen hölls bort. 750 µl A4 buffert tillsattes till kolonnerna och de centrifugerades 1 minut (12 000 rpm). Vätskan som passerade kolonnerna hölls bort,

följt av att alla kolonner centrifugerades 1 minut (12 000 rpm) så att de blev torra. Kolonnerna placerades i nya eppendorfrör och 50 µl AE buffert pipetterades till dem. AE bufferten fick stå 1 minut i kolonnen, följt av att kolonnerna centrifugerades 1 minut (12 000 rpm). DNA koncentrationen för eluatet bestämdes med NanoDrop 2000™ (ThermoFisher) enligt beskrivningen i punkt 3.8.

#### 4.9.8 Analys av kloningen

Att kloningen lyckats bekräftades genom att först klyva de tio pMT-Pelle-V5 plasmiderna med restriktionsenzymerna KpnI-HF och XbaI, följt av att de sedan analyserades med gelelektrofores. Mängden plasmid, enzym och andra komponenter som skulle tillsättas i reaktionsblandningen bestämdes enligt beskrivningen i punkt 3.9.4. En DNA-standard förberedes också för att kunna verifiera storleken av fragmenten som bildades på gelen. Klyvningen utfördes enligt beskrivningen i punkt 3.9.4, varefter klyvningsprodukterna separerades med elektrofores enligt beskrivningen i punkt 3.9.2. Efter att kloningsresultaten kontrollerats med gelelektrofores valdes två av de tio pMT-Pelle-V5 proven för att skickas för sekvensering till Eurofinns.

### 4.10 Transfektering av plasmider och studerandet av Pelles samverkande med IMD-signaleringsförmedlare

#### 4.10.1 Experiment i S2 celler

Alla experiment som gjordes i denna studie utfördes i Drosophila S2-celler. S2-celler är en makrofag-liknande cellinje, och cellerna odlades i 25 °C i 75 centimeters cellodlingsflaskor. Cellodlingsmediet som användes var Schneiders insektmedium (Sigma-Aldrich). Före Schneiders insektmedium tillsattes i cellodlingsflaskorna med S2-cellerna förberedes mediet genom att tillsätta 50 ml 10 procentigt fetalt kalvserum (FBS), 2,5 ml 100 U penicillin, 0,1 mg/ml streptomycin och 5 ml L-glutamin till det. Kultiverandet, omhändertagandet av cellodlingen och transfekterandet av celler utfördes i en steril miljö.

#### 4.10.2 Transfektering av S2-celler

Transfekteringen utfördes med ett Effectene kit (Quiagen). Effectene reagensen är en icke-liposomal transfekteringsreagens med log toxicitet. S2-cellerna kultiverades på 10 centimeters cellodlingsplattor inför transfektering. Vid dessa experiment uppskattades det att en 100 % konfluent 75 centimeters cellodlingsflaska hade tillräckligt med celler för fem 10 centimeters cellodlingsplattor. Eftersom det i denna studie studerades en möjlig protein-proteinsamverkan mellan en IMD-signaleringsförmedlare och Toll-signaleringsföredlaren Pelle, transfekterades cellproven både med pMT-Pelle-V5-vektorn och en plasmid som kodade en IMD-signaleringsförmedlare. Alla transfekterade IMD-signaleringsförmedlare som användes vid experimenten var HA-taggade. S2-cellerna transfekterades totalt med 2  $\mu\text{g}$  DNA, vilket innebar 1  $\mu\text{g}$  av plasmiden som kodar för en IMD-signaleringsförmedlare och 1  $\mu\text{g}$  av plasmiden som kodar för Pelle. För varje protein som transfekterades iordningställdes det även ett kontrollcellprov där det transfekterade proteinet transfekterades tillsammans med mock DNA. Kontrollproven förbereddes för att utesluta att transfekterade proteinerna antingen bundit ospecifikt till agaroskulorna, eller för att de inte bundit till agaroskulorna trots att detta var meningen. Till dessa kontrollprov tillsattes det också totalt 2  $\mu\text{g}$  DNA. Det förberedes även alltid ett kontrollprov som enbart innehöll 2  $\mu\text{g}$  mock DNA.

#### 4.10.3 Utförandet av transfekteringen

Den totala volymen transfektionsbuffert och plasmid var 500  $\mu\text{l}$ . På basen av plasmidkoncentrationen uträknades mängden plasmid som skulle tas för att få 1  $\mu\text{g}$  plasmid, och mängden plasmid subtraherades från 500 för att få mängden transfekteringsbuffert som skulle tillsättas till provet. Därefter tillsattes 20  $\mu\text{l}$  effectene buffert och 16  $\mu\text{l}$  enhancer buffert till alla plasmid- och transfekteringsbuffertslösningar, och proven blandades ordentligt genom suspension. Sedan inkuberades plasmid- transfektionsbuffertlösningarna i minst 10 minuter. S2-celler suspenderades lösa i cellodlingsflaskan med en 10 milliliters pipett, och en tillräcklig mängd med celler överfördes till falconrör. Cellerna centrifugerades 4 minuter i 1000 rpm, och det tillsattes 9 ml Schneiders insektmedium till en rätt mängd

med 10 centimeters cellodlingsplattor. Supernatanten sögs bort och cellpelleten/cellpelleterna löstes försiktigt upp i en passlig mängd med Schneiders insektmedium. Därefter pipetterades 1 ml celler till varje cellodlingsplatta, och cellerna blandades om i cellodlingsplattorna genom att försiktigt röra på cellodlingsplattorna på laminarskåpsytan. Därefter pipetterades transfekteringslösningen droppvis till sin egen cellodlingsplatta, och cellodlingsplattan blandades ordentligt. Cellerna inkuberades sedan i rumstemperatur övernatten.

Följande morgon byttes cellodlingsmediet för de transfekterade cellerna ut genom att suga upp och överföra det från cellodlingsplattorna till 15 milliliters falconrör. Odlingsmediet från varje enskild cellodlingsplatta överfördes till ett eget falconrör. Falconrören centrifugerades sedan 4 minuter i 1000 rpm för att cellerna som varit lösa i odlingsmediet skulle kunna tas tillvara och överföras tillbaka till cellodlingsplattan. Det tillsattes snabbt 9 ml odlingsmedium till cellodlingsplattorna och supernatanten i falconrören sögs bort. Varje enskild cellpellet i falconrören löstes försiktigt upp i 1 ml odlingsmedium, följt av att cellerna pipetterades tillbaka till rätt cellodlingsplatta. På eftermiddagen inducerades transfekteringen genom att tillsätta 50  $\mu$ l  $\text{CuSO}_4$  till cellodlingsplattorna, följt av att cellodlingsplattorna blandades ordentligt. Därefter inkuberades cellerna i rumstemperatur övernatten.

#### 4.10.4 Insamling av celler inför immunoprecipitering och SDS-PAGE

Transfekterade celler skördades för SDS-PAGE genom att först suspendera cellerna lösa i mediet på cellodlingsplattan, och sedan överföra mediet med cellerna från varje cellodlingsplatta till ett eget falconrör. Denna del av cellarbetet utfördes inte mera i en steril miljö. Därefter centrifugerades falconrören 1000 rpm i 4 minuter och supernatanten sögs bort. Cellerna tvättades genom att homogenisera dem i 1 ml kall PBS, följt av att de överföra till ett eget 1,5 ml eppendorfrör. Cellerna centrifugerades sedan med snabbspinn och PBS:en avlägsnades. Cellerna kunde därefter förvaras i -80 °C eller användas vid immunoprecipitering.

#### 4.10.5 Immunoprecipitering med V5-agaroskolor

Transfekterade celler lyserades i 200 µl S2-lyseringsbuffert som innehöll 1x proteas- och fosfatasinhibitor (Thermo Fisher). Cellerna homogeniserades ordentligt i lyseringsbufferten, och proven inkuberades sedan på is i 10 minuter. Därefter centrifugerades lysatet 12 000 rpm i 4 °C i 10 minuter. Från varje prov överfördes det 160 µl till ett eppendorfrör som var avsett för immunoprecipiteringen, och 20 µl till ett annat eppendorfrör som var enbart avsett för cell-lysat. Cell-lysatet blandades direkt med 20 µl 4x Laemmlibuffert, och denaturerades sedan i 5 minuter i 97 °C. Eftersom det Pelle som uttrycktes i dessa experiment var V5-tagat bestämdes det att V5-antikroppsagaroskolor skulle användas vid immunoprecipiteringen.

V5-antikroppsagaroskulorna (Sigma-Aldrich), bestod till 80 % av antikroppstäckta agaroskolor och till 20 % av en fosfatbuffrad saltlösning, och därmed måste saltlösningen först renas bort före V5-agaroskulorna kunde tillsättas till immunoprecipiteringsproven. V5-agaroskulorna renades genom att ta 20 % mera V5-agaroskulsblandning per prov än vad det var avsatt och centrifugera lösningen i 1000 rpm för 1 minut. Vid immunoprecipiteringen användes det 15 µl V5-agaroskolor per prov. Saltlösningen kunde sedan sugas bort och agaroskulorna tvättades en gång med 1 ml kall PBS. PBS:en avlägsnades sedan genom att suga bort den efter att V5-agaroskulslösningen hade centrifugerats i 1000 rpm för 1 minut. Därefter homogeniserades V5-agaroskulorna i S2-lyseringsbuffert som innehöll 1x proteas- och fosfatasinhibitor (Thermo Fisher Scientific). Det tillsattes tillräckligt med S2-lyseringsbuffert till V5-agaroskulorna så att 100 µl av V5-agaroskulslysatblandningen skulle räcka till alla prov. Därefter pipetterades 100 µl av V5-agaroskulslysatblandning till alla prov som var avsedda för immunoprecipitering, och proven sattes och roteras för 2 timmar i 4 °C. Sedan centrifugerades proven i 1000 rpm för 1 minut och supernatanten avlägsnades. V5-agaroskulorna renades tre gånger genom att först lösa upp dem i immunoprecipiteringstvättbuffert, följt av att sedan centrifugeras i 1000 rpm för 1 minut och därefter avlägsna supernatanten. Efter sista reningen pipetterades 25 µl 4x Laemmlibuffert till V5-agaroskulorna och proven inkuberades sedan i 5 minuter i 97 °C.

#### 4.10.6 SDS-PAGE och transfer

Immunoprecipiteringsproven och cell-lysatproven laddades på akrylamidgeler med en akrylamidkoncentration på 10 %. På gelen laddades även en proteinstandard (Precision Plus Protein Dual Color Standard, Bio-rad) som innehöll molekyler med kända molekylvikter för att kunna identifiera de transfekterade proteinerna. Proteinerna i de laddade proven separerades på akrylamidgelerna på basen av deras storlek. Denna typ av proteinseparering är möjligt då akrylamidgelerna innehöll natriumdodecylsulfat (SDS). SDS gör proteiner negativt laddade, vilket leder till att proteinerna vandrar mot en positivt laddad pol då man utsätter dem för en elektrisk ström. Mindre proteiner kan lättare vandra igenom akrylamidgelen än större proteiner, och därmed kan man identifiera proteiners molekylvikt med hjälp av en proteinstandard som innehar kända molekylvikter (Schägger & von Jagow, 1987). Akrylamidgelen som användes vid experimenten bestod av en undre del och en övre del. Den övre delen packar samman proteinerna som finns i de laddade proven så att alla proteiner i proven övergår till den undre gelen parallellt. I den undre gelen separeras proteinerna sedan på basen av deras storlek.

Proteinerna tilläts separera på akrylamidgelerna tillräckligt länge för att deras identifierande skulle underlättas, och därefter överfördes proteinerna från akrylamidgelen till ett polyvinylidenfluoridmembran (PVDF-membran), med en så kallad "wet transfer". PVDF-membranet och akrylamidgelen innehållande proteinerna placerades intill varandra i en överföringskammare som innehöll transferbuffert. Inuti kammaren var akrylamidgelen placerad mot en negativt laddad pol medan membranet var placerad mot en positivt laddad pol, vilket gjorde det möjligt att överföra proteinerna från akrylamidgelen till membranet då man tillförde elektricitet till kammaren. Proteinerna överfördes till PVDF-membranet genom att utsätta dem för 30 V i 2 timmar vid 4 °C.

#### 4.10.7 Westernblotanalys

PVDF-membran med proteiner blockerades med mjölk i två timmar. Sedan tvättades membranerna 3 gånger 10 minuter med 0,2 % PBS-tween20 lösning, varefter membranerna inkuberades med en primärantikropp övernatten vid 4 °C.

Primärantikropparna och deras kompletterande sekundärantikroppar som användes vid dessa experiment presenteras i tabell 4.

*Tabell 4:* Primär-och sekundärantikroppar som användes vid experimenten i denna studie, samt deras **koncentrationer**

<b>Primär antikropp</b>	<b>Koncentration</b>	<b>Sekundär antikropp</b>	<b>Koncentration</b>
V5-Tag Polyclonal Antibody (Serotec)	1:2500, i PBS innehållande 1 % BSA och 0,02 % NaN <sub>3</sub>	Anti-mus (sc2005) (Santa Cruz Biothechnology)	1:5000, i 5 % mjölk
Anti-HA High Affinity (Sigma -Aldrich)	1:2000, i PBS innehållande 0,5 % BSA och 0,02 % NaN <sub>3</sub>	Anti-råtta (sc2006) (Santa Cruz Biothechnology)	1:5000, i 5 % mjölk
Actin Antibody (C11) polyclonal IgG (Santa Cruz Biothechnology)	1:2000, i PBS innehållande 0,1 % BSA och 0,02 % NaN <sub>3</sub>	Anti-get (sc2020) (Santa Cruz Biothechnology)	1:5000, i 5 % mjölk

Primärantikropparna som användes kunde kopplas till proteiner som transfekterats. Därefter tvättades PVDF-membranen tre gånger 10 minuter med 0,2 % PBS-tween20 lösning, följt av att membranerna inkuberades med en sekundärantikropp i 2 timmar. Sekundära antikroppen kan samverka med den primära antikroppen. Eftersom de sekundära antikropparna som användes vid dessa experiment var försedda med kemiluminescerande pepparrotsperoxidase, var det möjligt att visualisera transfekterade proteinerna med en Invitrogen™ iBright™ maskin (Thermo Fisher Scientific). För att kunna visualisera proteinerna måste membranerna först inkuberas i ECL-buffert, eftersom ECL-buffert aktiverar pepparrotsperoxidaset kemiluminescerande effekten.

## 5 Resultat

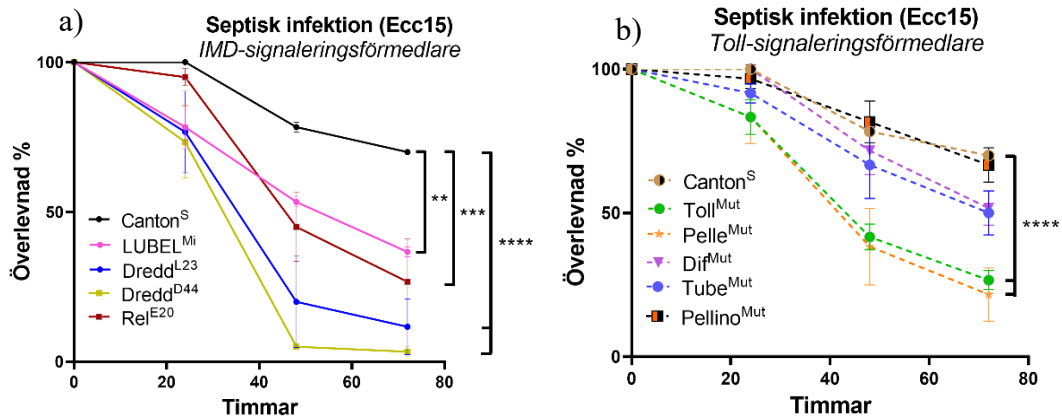
### 5.1 Toll och Pelle behövs för överlevnad vid septisk Ecc15 infektion

För att identifiera en etablerad Toll-signaleringsförmedlare som potentiellt kunde koppla samman IMD-och Toll-signaleringsräckan i *Drosophila* utfördes septiska infektionsexperiment med bakterierna Ecc15 på flugmutanter med muterade Toll-signaleringsförmedlare. Vildtypsfluglinjen Canton<sup>S</sup> användes som kontroll vid de septiska infektionsexperimenten. För att först verifiera att metoden fungerade utfördes septiska infektionsexperimenten på flugmutanter med muterade IMD-signaleringsförmedlare. Detta användes som verifieringssätt, eftersom tidigare studier har visat att flugor med muterade IMD-signaleringsförmedlare inte överlever septiska infektioner orsakade av Gramnegativa bakterier (Leulier et al., 2000). Fluglinjerna med muterat Dredd uppvisade högst känslighet av IMD-signaleringsmutanterna för septiska infektionen med Ecc15, och medeltalsöverlevnaden för Dredd<sup>D44</sup> var ca 5 % efter 72 timmars infekteringstid medan den var ca 10 % för Dredd<sup>L23</sup> (figur 9 a). IMD-signaleringsmutanten som var minst känslig för septiska infektionen med Ecc15 var Lubel<sup>Mi</sup>, vars medeltalsöverlevnad var ca 45 % efter 72 timmars infektionstid. Rel<sup>E20</sup>-flugornas genomsnittliga överlevnad var däremot ca 35 % efter 72 timmars septisk infektering med Ecc15. Eftersom resultaten från de septiska infektionsexperimenten på IMD-signaleringsförmedlarmutanterna visade att samtliga IMD-signaleringsmutanter hade en signifikant lägre överlevnad i förhållande till Canton<sup>S</sup>, var resultaten i linje med tidigare studiers resultat. Därmed bestämdes det att den septiska infektionsmetoden med Ecc15 även kunde genomföras på Toll-signaleringsmutanter.

Då Toll-signaleringsmutanter utsattes för den septiska infektionen med Ecc15 överlevde endast 50 % av Tube<sup>Mut</sup>- och Dif<sup>Mut</sup>-flugorna (figur 9 b). Detta skilde sig inte signifikant från dödligheten för Canton<sup>S</sup>, vars genomsnittliga överlevnad var ca 70 % efter 72 timmars infekteringstid. Liksom för Tube<sup>Mut</sup>- och Dif<sup>Mut</sup>-flugorna var mortaliteten för Pellino<sup>Mut</sup>-flugorna inte signifikant gentemot Canton<sup>S</sup>. Pellino<sup>Mut</sup>-flugornas mortalitet var dock mycket mera lik mortaliteten för Canton<sup>S</sup> då deras medeltalsöverlevnad var enbart några procentenheter lägre än Canton<sup>S</sup>. Till skillnad från de Pellino<sup>Mut</sup>, Tube<sup>Mut</sup> och Dif<sup>Mut</sup>-flugorna uppvisade Pelle<sup>Mut</sup>- och Toll<sup>Mut</sup>-



flugorna en betydligt högre mortalitet gentemot Canton<sup>S</sup>. Efter 72 timmar var medeltalet för antalet överlevande flugor för Toll<sup>Mut</sup>-flugorna ca 25 % medan det var ca 20 % för Pelle<sup>Mut</sup>-flugorna. Skillnad för medeltalet av överlevande flugor för Pelle<sup>Mut</sup>- och Toll<sup>Mut</sup>-flugorna var signifikant gentemot medeltalet av överlevande flugor för Canton<sup>S</sup>.

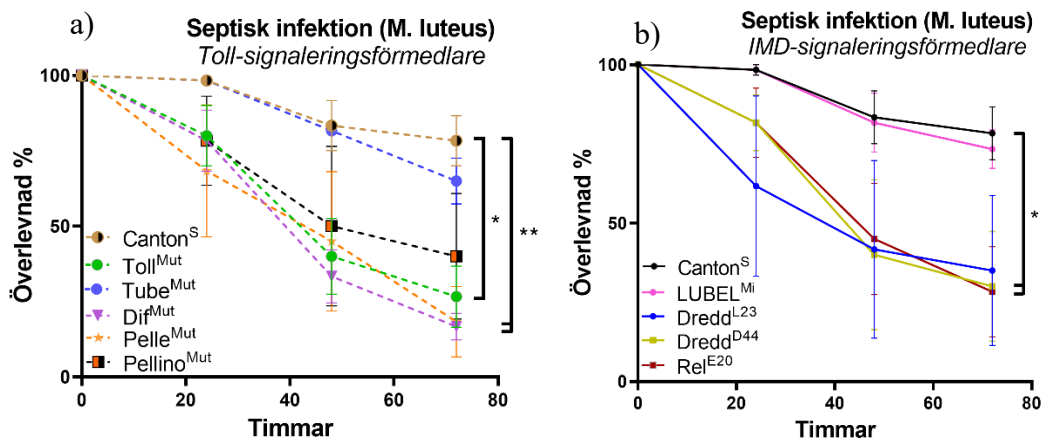


Figur 9. a) Septisk infektion med Ecc15 på IMD-signaleringsförmedlare. Överlevnaden av vildtypskontrollflugor (Canton<sup>S</sup>) och fluglinjer med muterade IMD-signaleringsförmedlare efter att de inducerats septiskt med Ecc15. De olika fluglinjernas överlevnadsprocent presenteras på y-axeln medan antalet passerade timmar presenteras på x-axeln. Resultaten som presenteras i grafen erhöles från tre olika experiment. Statistisk signifikans i jämförelse mot Canton<sup>S</sup> efter 72 timmar anges som \*\*\*\* för  $P < 0,0001$ , \*\*\* för  $P < 0,001$  och \*\* för  $P < 0,01$ . b) Septisk infektion med Ecc15 på Toll-signaleringsförmedlare. Överlevnaden av vildtypskontrollflugor (Canton<sup>S</sup>) och fluglinjer med muterade Toll-signaleringsförmedlare efter att de inducerats septiskt med Ecc15. De olika fluglinjernas överlevnadsprocent presenteras på y-axeln medan antalet passerade timmar presenteras på x-axeln. Resultaten som presenteras i grafen erhöles från tre olika experiment. Statistisk signifikans i jämförelse mot Canton<sup>S</sup> efter 72 timmar anges som \*\*\*\* för  $P < 0,0001$ .

För att identifiera en etablerad IMD-signaleringsförmedlare som potentiellt kunde koppla samman IMD-och Toll-signaleringsräckan i Drosophila utfördes septiska infektionsexperiment med bakterien *M. luteus* på flugmutanter med muterade IMD-signaleringsförmedlare. För att först verifiera att metoden fungerade utfördes septiska infektionsexperiment med *M. luteus* på flugmutanter med muterade Toll-signaleringsförmedlare eftersom det har i tidigare studier visats att Toll-signaleringsmutanter inte överlever septiska *M. luteus* infektioner (Tauszig et al., 2000, Rutschmann et al., 2002). Liksom vid de septiska infektionsexperimenten med Ecc15 användes vildtypsfluglinjen Canton<sup>S</sup> som kontroll för de septiska infektionsexperimenten med *M. luteus*. Vid dessa septiska infektionsexperiment visade Pelle<sup>Mut</sup>-, Dif<sup>Mut</sup>- och Toll<sup>Mut</sup>-flugorna ha en signifikant högre mortalitet

gentemot vildtypskontrollen efter 72 timmars infekteringstid (figur 10 a). Medeltalet för överlevande flugor efter 72 timmars infekteringstid var ca 15 % för Pelle<sup>Mut</sup>- och Dif<sup>Mut</sup>-flugorna medan den var ca 20 % för Toll<sup>Mut</sup>-flugorna. Motsvarande procent var ca 80 för vildtypskontrollen. Medeltalet för överlevande flugor för Pellino<sup>Mut</sup>-flugorna var ca 40 % efter 72 timmars infektionstid, vilket var betydligt lägre än överlevnaden för vildtypskontrollen, men inte tillräcklig för att vara en signifikant skillnad gentemot vildtypskontrollen. Överlevnaden för Tube<sup>Mut</sup>-flugorna var mycket lik vildtypskontrollens överlevnad, då deras medeltal för överlevande flugor var ca 65 % efter 72 timmars infekteringstid. Anmärkningsvärt var dock att dessa flugmutanter uppvisade en rätt så stor variation i antalet döda flugor mellan experimenten, vilket indikeras i resultatfiguren med stora felmarginaler. Eftersom Pelle<sup>Mut</sup>-, Dif<sup>Mut</sup>- och Toll<sup>Mut</sup>-flugorna uppvisade en signifikant högre mortalitet i jämförelse mot vildtypskontrollen beslöts att metoden skulle prövas på IMD-signaleringsmuterade fluglinjer.

I de septiska infektionsexperimenten med *M. luteus* på IMD-signaleringsmutanter var Lubel<sup>Mi</sup> den enda fluglinjen som uppvisade en liknande dödlighet som vildtypskontrollen (figur 10 b). Lubel<sup>Mi</sup>-flugornas medeltalsöverlevnad var ca 70 % efter 72 timmars infektionstid medan motsvarande procent var ca 80 % för vildtypskontrollen. Däremot uppvisade fluglinjerna Dredd<sup>D44</sup>, Dredd<sup>L23</sup> och Rel<sup>E20</sup> en avsevärt högre dödlighet än vildtypskontrollen. Medeltalsöverlevnaden för dessa fluglinjer var ca 20 % för Dredd<sup>D44</sup> och Rel<sup>E20</sup> och ca 30 % för Dredd<sup>L23</sup> efter 72 timmars infekteringstid. Trots denna skillnad i överlevnad mellan vildtypskontrollen och dessa fluglinjer var det enbart Dredd<sup>D44</sup> och Rel<sup>E20</sup> som hade en signifikant högre dödlighet i jämförelse mot vildtypskontrollen. Liksom för Toll-signaleringsmutanterna uppvisade även IMD-signaleringsmutanterna en stor variation i antalet döda flugor mellan experimenten, men för IMD-signaleringsmutanterna var variationen ennu större.



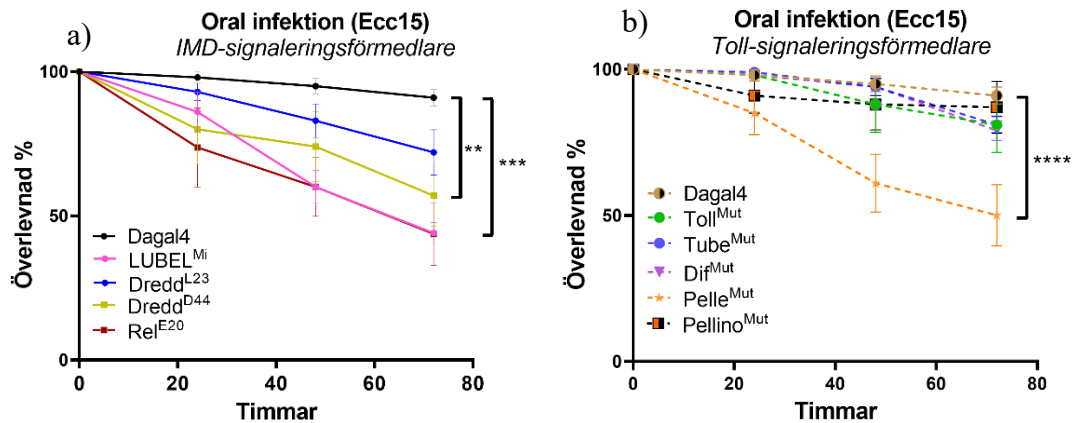
Figur 10. a) Septisk infektion med *M. luteus* på Toll-signaleringsförmedlare. Överlevnaden av vildtypskontrollflugor (Canton<sup>S</sup>) och fluglinjer med muterade Toll-signaleringsförmedlare efter att de inducerats septiskt med *M. luteus*. De olika fluglinjernas överlevnadsprocent presenteras på y-axeln medan antalet passerade timmar presenteras på x-axeln. Resultaten som presenteras i figuren erhöles från tre olika experiment. Statistisk signifikans i jämförelse mot Canton<sup>S</sup> efter 72 timmar anges som \*\* för  $P < 0,01$  och \* för  $P < 0,05$ . b) Septisk infektion med *M. luteus* på IMD-signaleringsförmedlare. Överlevnaden av vildtypskontrollflugor (Canton<sup>S</sup>) och fluglinjer med muterade IMD-signaleringsförmedlare efter att de inducerats septiskt med *M. luteus*. De olika fluglinjernas överlevnadsprocent presenteras på y-axeln medan antalet passerade timmar presenteras på x-axeln. Resultaten som presenteras i figuren erhöles från tre olika experiment. Statistisk signifikans i jämförelse mot Canton<sup>S</sup> efter 72 timmar anges som \* för  $P < 0,05$ .

## 5.2 Pelle krävs för oral infektion med Ecc15

För att identifiera proteiner som potentiellt kunde koppla samman IMD-och Toll signaleringsräckan i *Drosophila*s tarmepitelceller utfördes orala infektionsexperiment med bakterierna Ecc15 och *M. luteus* på olika IMD- och Toll-signaleringsmutanter. De orala infektionsexperimenten utfördes även för att identifiera om det finns en skillnad mellan hur flugmutanterna överlever en lokal tarminfektion och en systemisk infektion. Denna skillnad ville identifieras för att få en indikering om en IMD- eller Toll-signaleringsförmedlare enbart bidrar till en korsreglering av signaleringsräckorna i *Drosophila*s tarmepitelceller. Drivarfluglinjen Dagal4 användes som kontroll vid både de orala infektionsexperimenten med Ecc15 och *M. luteus*. Liksom vid de septiska infektionsexperimenten infekterades först IMD-signaleringsförmedlarmutanter med Ecc15 för att verifiera att experimenten fungerade. Detta användes som verifieringsmetod för de orala experimenten med Ecc15 eftersom studier har visat att IMD-signaleringsmutanter inte överlever orala infektioner med Ecc15 (Buchon, Broderick, Poidevin, et al., 2009). Orala

infektionsexperiment med *M. luteus* har inte publicerats så för de orala infektionsexperimenten med *M. luteus* fanns det inget sätt att kontrollera att metoden fungerade.

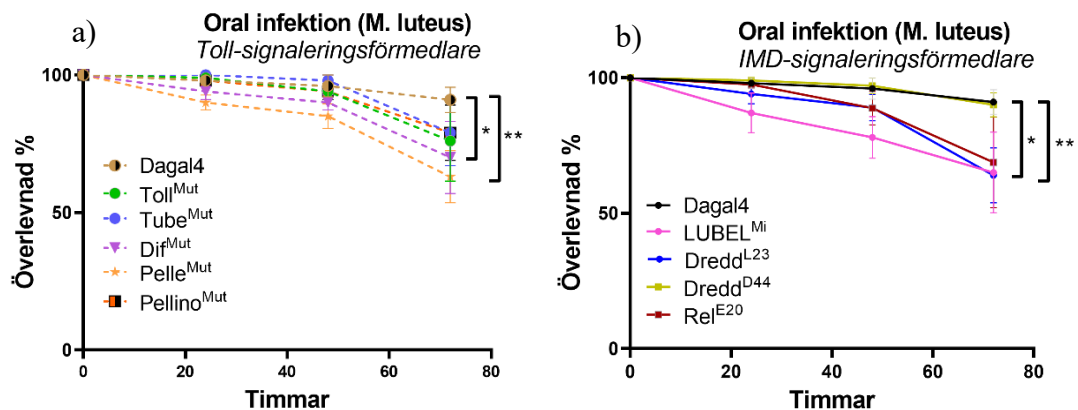
Fluglinjerna Dredd<sup>D44</sup>, Lubel<sup>Mi</sup> och Rel<sup>E20</sup> visade en signifikant högre dödlighet för den orala Ecc15 infektionen mot vildtypskontrollen efter 72 timmars infektionstid (figur 11 a). Medeltalet för antalet flugor som överlevt infektionen var ca 45 % för Lubel<sup>Mi</sup>- och Rel<sup>E20</sup>-flugorna medan motsvarande procent var ca 55 % för Dredd<sup>D44</sup>-flugorna efter 72 timmars infekteringstid. Vildtypskontrollens medeltalsöverlevnad var ca 95 procent efter 72 timmars infekteringstid. Till skillnad från de övriga IMD-signaleringsmutanterna uppvisade inte Dredd<sup>L23</sup>-flugorna en signifikant lägre överlevnad i jämförelse mot vildtypskontrollen. Dredd<sup>L23</sup>-flugorna överlevde dock inte lika bra den lokala tarminfektionen som vildtypsflugorna då deras medeltalsöverlevnad var ca 75 % efter 72 timmars infekteringstid. Denna skillnad var inte tillräcklig för att Dredd<sup>L23</sup>-flugornas överlevnad skulle ha varit signifikant mot vildtypskontrollens. Eftersom Dredd<sup>D44</sup>- och Rel<sup>E20</sup>-flugorna uppvisade en signifikant högre mortalitet i jämförelse mot vildtypskontrollen beslöts det att metoden kunde utföras på Toll-signaleringsflugmutanter. Dessa orala infektionsexperiment visade att Pelle<sup>Mut</sup>-flugorna har en signifikant högre dödlighet i jämförelse mot vildtypskontrollen (figur 11 b). Enbart 50 % av Pelle<sup>Mut</sup>-flugorna överlevde den orala infektionen med Ecc15 efter 72 timmars infektionstid, medan motsvarande överlevnad var ca 95 % för vildtypskontrollen. Däremot överlevde Tube<sup>Mut</sup>-, Toll<sup>Mut</sup>-, Dif<sup>Mut</sup>- och Pellino<sup>Mut</sup>-flugorna den orala infektionen med Ecc15 i stort sett lika bra som vildtypsflugorna. Deras överlevnad var dock något sämre än vildtypskontrollen, men inte tillräcklig för att vara signifikant.



Figur 11. a) och b) Oral infektion med Ecc15 på IMD- och Toll-signaleringsförmedlare. Överlevnaden av vildtypskontrollflugor (Dagal4) och fluglinjer med muterade IMD-signaleringsförmedlare (figur a)) och Toll-signaleringsförmedlare (figur b)) efter att de inducerats oralt med Ecc15. De olika fluglinjernas överlevnadsprocent presenteras på y-axlarna medan antalet passerade timmar presenteras på x-axlarna. Resultaten som presenteras i figurerna erhöles från fem olika experiment. Statistisk signifikans i jämförelse mot Cantons efter 72 timmar anges som \*\* för  $P < 0,01$  och \*\*\* för  $P < 0,001$  i figur a) och som \*\*\*\* för  $P < 0,0001$  i figur b).

Resultaten från de orala infektionsexperimenten med *M. luteus* på Toll-signaleringsmutanter visade att alla av Toll-flugmutanterna som användes vid experimenten överlevde den orala infektionen sämre än vildtypskontrollen efter 72 timmars infektionstid (figur 12 a). Skillnaderna i överlevnad mellan Toll-signaleringsmutanterna och vildtypskontrollen var dock relativt små. Tube<sup>Mut</sup>- Toll<sup>Mut</sup>- och Pellino<sup>Mut</sup>-flugorna hade en liknande överlevnad efter den orala *M. luteus* infektionen, och deras genomsnittliga överlevnad var ca 80 % efter 72 timmars infektion. Denna skillnad var dock inte signifikant i jämförelse mot vildtypskontrollen som hade en medeltalsöverlevnad på ca 95 %. Till skillnad från Tube<sup>Mut</sup>- Toll<sup>Mut</sup>-och Pellino<sup>Mut</sup>-flugorna uppvisade Dif<sup>Mut</sup>- och Pelle<sup>Mut</sup>-flugorna att de hade en signifikant lägre överlevnad i förhållande till vildtypskontrollen efter 72 timmars infektionstid. Efter 72 timmars infektionstid var Dif<sup>Mut</sup>-flugornas medeltalsöverlevnad ca 70 % medan den var ca 65 % för Pelle<sup>Mut</sup>-flugorna. Anmärkningsvärt är dock att både Dif<sup>Mut</sup>- och Pelle<sup>Mut</sup>-flugorna verkar avlida kraftigt först efter 48 timmars infektionstid. De orala *M. luteus* infektionsexperimenten på IMD-signaleringsmutanter visade att Rel<sup>E20</sup>- och Dredd<sup>D44</sup>-flugorna inte hade en signifikant lägre överlevnad i jämförelse mot vildtypskontrollen (figur 12 b). Medeltalsöverlevnaden för Rel<sup>E20</sup>-flugorna var ca 70 % medan den var ca 90 % för

Dredd<sup>D44</sup>-flugorna efter 72 timmars infekteringstid. Liksom vid de orala infektionsexperimenten med *M. luteus* på Toll-signaleringsmutanter var vildtypskontrollens medeltalsöverlevnad ca 95 % efter 72 timmars infektionstid. De IMD-signaleringsmuterade flugorna som uppvisade en signifikant lägre överlevnad i jämförelse mot vildtypskontrollen var däremot Dredd<sup>L23</sup>- och Lubel<sup>Mi</sup>-flugorna. Både Lubel<sup>Mi</sup>- och Dredd<sup>L23</sup>-flugorna hade en medeltalsöverlevnad på ca 60 % efter 72 timmars infekteringstid. Dredd<sup>L23</sup>-flugorna hade dock en snäppet lägre procent än Lubel<sup>Mi</sup>-flugorna.



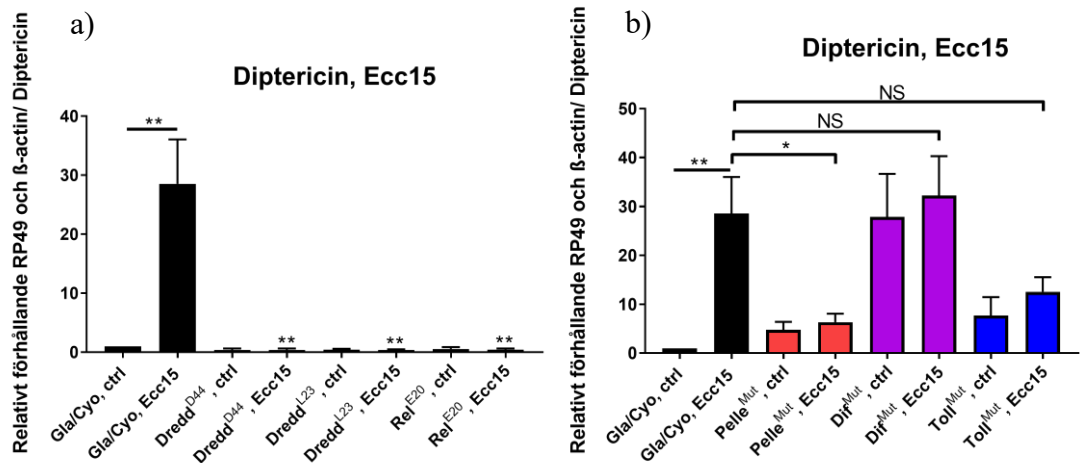
Figur 12 a) och b) Oral infektion med *M. luteus* på IMD- och Toll-signaleringsförmedlare. Överlevnaden av vildtypskontrollflugor (Dagal4) och fluglinjer med muterade Toll-signaleringsförmedlare (figur a)) och IMD-signaleringsförmedlare (figur b)) efter att de inducerats oralt med *M. luteus*. De olika fluglinjernas överlevnadsprocent presenteras på y-axlarna medan antalet passerade timmar presenteras på x-axlarna. Resultaten som presenteras i figurerna erhöles från fem olika experiment. Statistisk signifikans i jämförelse mot CantonS efter 72 timmar anges som \*\* för  $P < 0,01$  och \* för  $P < 0,05$  i både figur a) och b).

### 5.3 Pelle behövs för diptericingenuttryck i tarmen efter oral infektion med Ecc15

Eftersom vi funnit att Pelle<sup>Mut</sup>-flugor varken överlever septiska eller orala infektioner med Gramnegativa bakterien Ecc15 fortsatte studien genom att undersöka om Pelle<sup>Mut</sup>-flugorna avlider på grund av en bristfällig IMD-signaleringsaktivering. Detta utfördes genom att mäta Pelle<sup>Mut</sup>-flugornas förmåga att aktivera IMD-specifika gener. I experimenten undersöktes genuttrycket av genen diptericin med kvantitativ PCR på Pelle<sup>Mut</sup>-flugornas, och andra Toll-signaleringsflugmutanter, tarmvävnad efter att de infekterats oralt med Ecc15. För att verifiera att metoden fungerade undersöktes först om Dredd<sup>D44</sup>, Dredd<sup>L23</sup> och Rel<sup>E20</sup>-flugor hade en nedsatt förmåga att aktivera

diptericingenuttrycket i deras tarmvävnad efter att de infekterats oralt med Ecc15. Detta användes som verifieringsmetod eftersom det har visats i tidigare studier att dessa flugmutanter inte kan aktivera genuttrycket för diptericin (Leulier et al., 2000, Hedengren et al., 1999). I experimenten användes markörfluglinjen Gla/Cyo som vildtypskontroll. En tydlig ökning av diptericingenuttrycket för den infekterade vildtypskontrollen kunde observeras då deras relativa diptericingenuttryck var 28,54. De infekterade Dredd<sup>D44</sup>-, Dredd<sup>L23</sup>- och Rel<sup>E20</sup>-flugorna kunde däremot inte aktivera uttrycket för diptericin i deras tarmvävnad eftersom deras relativa diptericingenuttryck varierade mellan 0,30 och 0,44 i både de infekterade flugorna samt i deras kontrollflugor (figur 13 a). Eftersom Dredd<sup>D44</sup>-, Dredd<sup>L23</sup>- och Rel<sup>E20</sup>-flugornas relativa diptericingenuttryck var lägre än den icke-infekterade vildtypskontrollen, samt för att den infekterade vildtypskontrollen hade ett förhöjt diptericingenuttryck, beslöts att metoden fungerade och kunde utföras på Toll-signaleringsmutanterna.

Det relativa genuttrycket för diptericin i de infekterade Dif<sup>Mut</sup>- och Toll<sup>Mut</sup>-flugorna var 26,23 respektive 10,3, vilket betydde att de inte hade en signifikant förlust i deras diptericingenaktivering i jämförelse mot den infekterade vildtypskontrollen (figur 13 b). Emellertid gällde detta inte för de infekterade Pelle<sup>Mut</sup>-flugorna. De infekterade Pelle<sup>Mut</sup>-flugorna hade ett signifikant lägre diptericingenuttryck i jämförelse mot den infekterade vildtypskontrollen då deras relativa diptericingenuttryck var 5,22. Anmärkningsvärt i resultaten var även att de icke infekterade Dif<sup>Mut</sup>-flugorna uppvisade ett högt genuttryck för diptericin, då deras relativa genuttryck var 17,39.



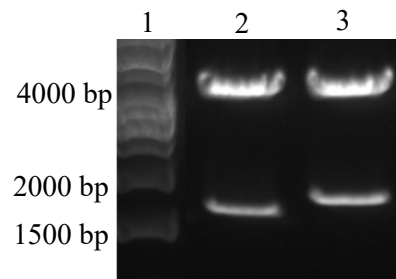
Figur 13 a) Det relativa genuttrycket för diptericin i IMD-signaleringsflugmutanter: Figuren visar diptericingenaktiveringen i IMD-signaleringsmutanters tarmvävnad efter att de ätit en sukroslösning innehållande Ecc15 i 24 timmar. De relativa genuttrycken för Diptericin visas på grafens y-axel medan typ av fluga visas på x-axeln. Varje flugtyp har en kontroll som inte matats med bakterier. Vildtypskontrollen i experimenten var Gla/Cyo. Resultaten som presenteras i figuren erhöles från fem olika experiment. Statistisk signifikans i jämförelse mot Gla/Cyo, Ecc15 anges som \*\* för  $P < 0,01$ . b) Det relativa genuttrycket för diptericin i Toll-signaleringsflugmutanter: Figuren visar diptericingenaktiveringen i Toll-signaleringsmutanters tarmvävnad efter att de ätit en sukroslösning innehållande Ecc15 i 24 timmar. De relativa genuttrycken för Diptericin visas på grafens y-axel medan typ av fluga visas på x-axeln. Varje flugtyp har en kontroll som inte matats med bakterier. Vildtypskontrollen i experimenten var Gla/Cyo. Resultaten som presenteras i figuren erhöles från fem olika experiment. Statistisk signifikans i jämförelse mot Gla/Cyo, Ecc15 anges som \* för  $P < 0,05$ , och som \*\* för  $P < 0,01$ .

#### 5.4 Pelle samverkar med IMD-signaleringsförmedlaren Dredd

Pelle<sup>Mut</sup>-flugors bristande förmåga att överleva en oral Gramnegativ infektion, och oförmåga att aktivera IMD-signalerings-specifika AMP-molekylen Diptericin ledde till intresset att identifiera om Pelle samverkar direkt med en IMD-signaleringsförmedlare. För att kunna utföra dessa experiment måste först en V5-markerad Pelle-vektor klonas (figur 14). I resultatet presenteras två av de tio isolerade pMT-Pelle-V5-vektorprodukterna från den slutliga gelelektroforesanalysen. I brunnarna där de restriktionsbehandlade vektorproven är applicerade har det bildats ett större och ett mindre band på gelen. Detta betyder att restriktionsklyvningen av de isolerade vektorerna har lyckats. Det större bandet i båda vektorproven är ca 4700 bp, vilket motsvarar storleken för pMT-vektorn. Anmärkningsvärt för de båda vektorproven är att deras mindre band som bildats på gelen inte är av samma storlek. Det mindre bandet som bildats på gelen av vektorprovet som applicerats i brun tre är

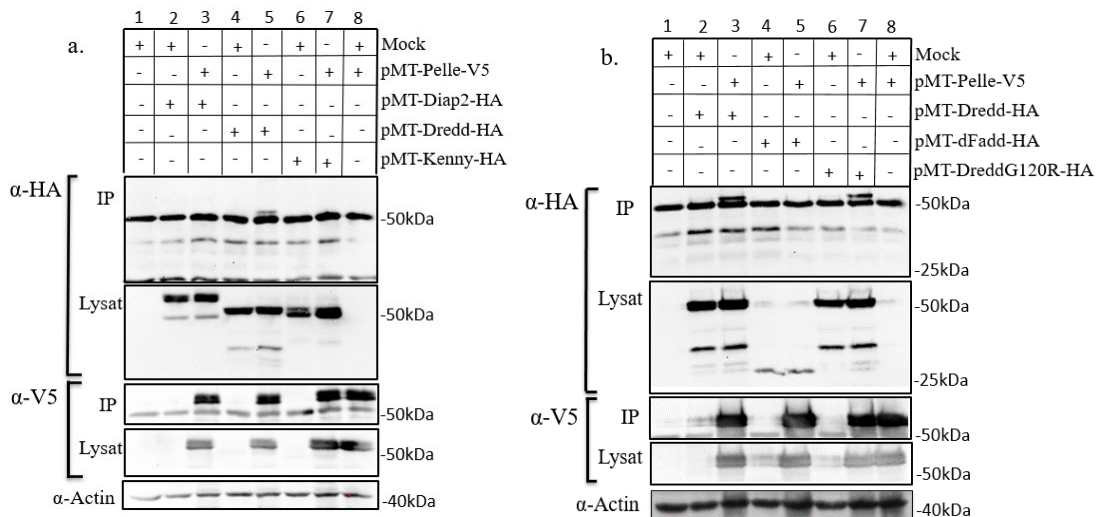


lite större än det mindre bandet som bildats på gelen av vektorprovet som applicerats i brun två. Båda av vektorprovets mindre restriktionsprodukt är lite större än 1500 bp. Storleken för genen som kodar Pelle är 1506 pb. Eftersom Pelle har en splicingvariant där en av Pelles två introner inte tagits bort, indikerar resultatet att båda splicingvarianterna av genen som kodar Pelle har klonats in i pMT-vektorer. Eftersom Pelle bör vara lite större än 1500 bp på grund av V5-markören indikerar detta resultat att den molekylära kloningen av Pelle lyckats. Dessa resultat verifierades av sekvenseringsresultaten på vektorerna då dessa visade att båda varianterna av Pelle hade isolerats. Sekvenseringsresultaten av plasmiderna visade även att V5-markören för båda varianterna av Pelle var rätt insatt (eng. in frame). Vektorn med Pellevarianten som saknar båda intronerna användes i de fortsatta experimenten.



*Figur 14. Slutliga resultatet för kloningen av pMT-Pelle-V5 plasmiden:* Figuren presenterar resultatet från elektrofores av de renade pMT-Pelle-V5-vektorerna. XbaI och KpnI kluvna pMT-Pelle-V5-vektorer (brunn 2 och 3), DNA-standard (brun 1).

För att bestämma om Pelle samverkar med en IMD-signaleringsförmedlare utfördes immunoprecipiteringar på lysat från celler som var transfekterade med en plasmid som uttryckt Pelle, och med en plasmid som uttryckt en IMD-signaleringsförmedlare. Proteinerna som de transfekterade vektorerna uttryckte var kopplade med peptidtaggar för att deras möjliga interaktioner skulle kunna bli detekterade. För att detektera protein-proteininteraktionen mellan proteinerna som de transfekterade vektorerna uttryckte utfördes westernblotanalyser (figur 15 a och b).



Figur 15 a och b. Sällningsundersökning för Pelles samverkan mellan IMD-signaleringsförmedlare: Figur 8 a och b presenterar de erhållna resultaten på anti-HA, anti-V5, och anti-Actin immunoprecipiteringsblottarna från experimenten där det undersöktes om Pelle samverkar med en IMD-signaleringsförmedlare. Varje transfekterat protein har en kontroll där proteinet har transfekterats tillsammans med Mock.

I denna studie undersöktes om IMD-signaleringsförmedlarna Diap2, Dredd, Kenny eller dFadd kunde samverka med Pelle. Dessutom undersöktes om Dredd mutanten G120R kunde samverka med Pelle. Transfekteringen och överuttryckningen av Pelle, Dredd, Diap2, Kenny och dFadd har lyckats då de kan lokaliseras i  $\alpha$ -HA- och  $\alpha$ -V5-lysatsblottanalyserna. Resultaten visar att IMD-signaleringsförmedlarna Diap2 (brunn 2 och 3 figur 15 a), Kenny (brunn 6 och 7 figur 15 a) och dFadd (brunn 4 och 5 figur 15 b) inte kan samverka med Pelle. Detta kan fastslås eftersom Diap2, Kenny och dFadd inte kan lokaliseras i  $\alpha$ -HA-IP-blottanalyserna medan V5-märkade Pelle kan lokaliseras i  $\alpha$ -V5-IP-blottanalyserna. I  $\alpha$ -HA-IP-blottarna kan man däremot identifiera ett proteinband, som är lite större än 50 kDa i de cellprov där Pelle har blivit överuttryckt tillsammans med Dredd (brunn 5 figur 15 a, brunn 3 figur 15 b). Samma 50 kDa stora proteinband kan lokaliseras i  $\alpha$ -HA-IP-blotten i brunnen som innehåller cellprovet med överuttryckt Pelle och DreddG120R (brunn 7 figur 15 b). Eftersom Dredds molekylstorlek är 52 kDa motsvarar proteinbanden Dredds molekylvikt. Dessa proteinband på ca 50 kDa är de enda specifika proteinbanden som kan lokaliseras i  $\alpha$ -HA-blottanalyserna i IP-proven. Anmärkningsvärt i  $\alpha$ -HA-lysatsblottanalyserna är att det finns mera klyvt Dredd i de cellprov där Dredd, och DreddG120R, har överuttryckts tillsammans med Pelle, än i de cellprov där Dredd och DreddG120R har

överuttryckts tillsammans med Mock DNA. I proven där Dredd och Pelle har överyttryckts tillsammans kan man både se att det stora klyvda Dredd bandet är tydligare och att det finns flera mindre klyvda Dredd band än i de prov där Dredd har uttryckts tillsammans med Mock DNA. Detta är framför allt tydligt i  $\alpha$ -HA-lysotblottanalysen i figur 15 a. Storleken för de mindre proteinbanden som kan lokaliseras i  $\alpha$ -HA-lysotblottanalyserna i cellproven som innehåller Dredd är ca 30 kDa, 20 kDa och 10 kDa.

## 6 Diskussion

Den huvudsakliga hypotesen inför denna studie var att IMD- och Toll-signaleringsräckorna kopplas samman via en gemensam eller gemensamma signaleringsmolekyler i *Drosophilas* tarmepitelceller. Idén till studien uppkom främst på grund av tidigare studier, som till exempel studien av Tanji. et al., 2007, som visat att dessa immunsigaleringsräckor kan korsreglera varandra. Hypotesen om att det skulle finnas en specifik oidentifierad molekyler koppling i *Drosophilas* tarmepitelceller uppkom däremot främst på grund av resultat som erhållits i Meinanders laboratorium. I Meinanders laboratorium har de i tidigare studier observerat att både larver och fullvuxna flugor med mutationer i specifika proteiner som är involverade i IMD-och Toll-signaleringsräckan påverkar uttrycket av båda signalräckornas målgener efter att de infekterats oralt med Gramnegativa bakterier (opublicerat data). Studien som visat att Toll-specifika AMP-genen *Drocomycin* uttrycks i epitelcellerna i *Drosophilas* luftstrupe, trots en frånvarande Toll-receptoraktivering, bidrog även till tanken om att en molekyler koppling mellan immunsigaleringsräckorna i *Drosophilas* tarmepitelceller möjligen skulle kunna identifieras (Ferrandon et al., 1998).

Man kan observera att många av de viktigaste studierna angående *Drosophilas* medfödda immunförsvar är gjorda för länge sedan. Eftersom det inte har utförts uppföljande studier på många av de viktiga studierna som behandlar *Drosophilas* medfödda immunförsvar, har många av de obesvarade frågorna angående *Drosophilas* medfödda immunförsvar lämnats obesvarade. I denna studie har vi möjligtvis lyckats besvara frågor angående *Drosophilas* immunsigaleringsräckor.

### 6.1 Toll-signaleringsförmedlaren Pelle krävs för en fullständig IMD-signaleringsaktivering

Utgående från de erhållna resultaten i denna studie står det klart att den etablerade Toll-signaleringsförmedlaren Pelle även är involverad i IMD-signaleringsräckans aktivering. Detta kan konstateras eftersom *Pelle<sup>Mut</sup>*-flugorna varken överlever infektioner orsakade av Gramnegativa bakterien *Ecc15* och för att de uppvisar ett signifikant lägre genuttryck för diptericin i deras tarmvävnad efter en oral

Gramnegativ infektion. Eftersom vi kunde konstatera att Pelle samverkar med IMD-signaleringsförmedlaren Dredd kunde vi även visa att Pelle är direkt kopplad till IMD-signaleringsräckan. Därmed kan vi säga att IMD- och Toll-signaleringsräckan delar på åtminstone en gemensam signaleringsförmedlare. Trots att det står klart att Pelle krävs för en fullständig IMD- och Toll-signaleringsaktivering kan man inte utgående från resultaten i denna studie med säkerhet konstatera att Pelle bidrar till en korsreglering av de båda signaleringsräckorna. Orsaken till att man inte kunde konstatera detta i denna studie är att vi inte kunde visa att Pelle är involverad vid aktiveringen av Toll-specifika gener under en Gramnegativ bakterieinfektion. Detta undersöktes i studien genom att studera genuttrycket för den Toll-specifika genen IM1 i qPCR-experimenten, men dessa genuttrycksmätningar gav inga resultat av värde (se appendix).

Trots att vi inte kunde visa att Pelle kan aktivera Dif/Dorsal från IMD-signaleringskomplexet bör det nämnas att detta i teorin skulle kunna vara möjligt. Eftersom Pelle har visats fosforylera I $\kappa$ B-proteinet Cactus som inhiberar Dif/Dorsals kärnlokalisering, skulle Pelle potentiellt kunna aktivera Dif/Dorsal från IMD-signaleringskomplexet (Daigneault et al., 2013). Detta skulle dock enbart vara möjligt om Pelles kinasaktivitet aktiveras då Pelle samverkar med Dredd, följt av att Dif/Dorsal sedan skulle rekryteras till IMD-signaleringskomplexet där Pelle kunde fosforylera Cactus. Ifall Pelle bidrar till denna korsaktivering av Relish och Dif/Dorsal var denna studies metoder antagligen inte de rätta för att lyckas detektera denna korsaktivering. Det är även möjligt att IM1:s genuttryck inte är lämpligt att studera då man undersöker aktiveringen av Dif/Dorsal i *Drosophila*s tarmepitelceller. Därför skulle det krävas ytterligare studier på ämnet där andra typer av metoder används.

## 6.2 Pelle påverkar IMD-signaleringsräckans fullbordande genom att reglera Dredds aktivering

Trots att resultaten i denna studie pekar mot att Pelle krävs för en fullständig IMD-signaleringsräcka, och att Pelle är direkt kopplad till IMD-signaleringsförmedlaren Dredd, kvarstår fortfarande frågan om hur Pelle påverkar IMD-signaleringsräckans fullbordande. I IP-experimentens lysatanalyser kunde observeras att då Pelle överuttryckts tillsammans med Dredd fanns mera kluvet Dredd än i de cell-lysatprov

där Dredd hade transfekterats med mock DNA. Eftersom den enzymatiska aktiveringen av Dredd leder till Dredd autoklyvning, pekar dessa resultat på att Pelle påverkar Dredds enzymatiska aktivering (C. H. Kim et al., 2014). Ifall Pelles samverkan krävs för aktiveringen av Dredd, skulle det antagligen innebära att detta är Pelles tillvägagångssätt att påverka aktiveringen av Relish. Pelles och Dredds samverkan skulle vara essentiell ifall Pelle påverkar aktiveringen av Dredd, eftersom Dredd är det enda kaspaset i *Drosophila* som kan klyva Relish. Relish klyvning är i sin tur en essentiell del av aktiveringen av Relish (C. H. Kim et al., 2014). Eftersom man inte i någon annan organism har kunnat se att ett kaspasprotein skulle kräva samverkan av ett liknande protein som Pelle för dess aktivering, skulle det vara unikt om detta var fallet för Dredd. Eftersom det dessutom har visats tidigare att Diap2 förmedlad K63-ubikvitinering av Dredd krävs för Dredds aktivering skulle det vara synnerligen intressant om det även visade sig att Pelles samverkan med Dredd krävs för aktiveringen av Dredd (Meinander et al., 2012). Om Pelle krävs för Dredds enzymatiska aktivering skulle detta kunna representera en ny mekanism för hur icke-apoptotisk kaspasmedierad signalering fungerar. För att undersöka om Pelle påverkar Dredds aktivering skulle man kunna använda sig av kommersiella kit som mäter enzymatiska aktiviteten av Kaspas-8 och Kaspas-8 homologer, som till exempel Caspase-Glo 8.

Förutom att det verkar som att Pelle påverkar Dredds aktivering, skulle det även vara intressant att undersöka om Pelle påverkar IMD-signaleringsräckans fullbordande på annat sätt. Studier har visat att Relish fosforylering är en essentiell del av aktiveringen och kärnlokaliseringen av Relish, och Relish har visats bli fosforylerad av Serin/Treoninkinaset IRD5 (IKK $\beta$ ) (Silverman et al., 2000). Eftersom Pelle är ett Serin/Treoninkinas, och för att Relish möjligtvis kommer i närheten av Pelle då Relish rekryteras till IMD-signaleringskomplexet, skulle det även vara intressant att undersöka om Pelle kan fosforylera Relish (Stöven et al., 2000). Om det skulle visas att Pelle kan fosforylera Relish skulle detta innebära att Pelle påverkar Relish aktiveringen direkt. För att undersöka om Relish är ett mål för Pelles fosforylering skulle man till exempel kunna genomföra masspektrometri studier där man undersöker fosforyleringen av Relish.

### 6.2.1 Hur bidrar Pelle till aktiveringen av Dredd?

Eftersom resultaten i immunoprecipiteringsexperimenten visar att Pelles och Dredds samverkan möjligtvis leder till aktiveringen av Dredd, skulle det även vara intressant att veta vad i denna samverkan som leder till Dredds aktivering. Eftersom Pelle är ett Serin/Treoninkinas, och för att det har visats att kaspaser regleras av fosforylering, skulle det potentiellt vara möjligt att Pelle reglerar Dredds aktivering genom fosforylering (Kurokawa & Kornbluth, 2009). Påfallande är dock att kaspasfosforylering främst är förknippat med kaspasinaktivering. Några studier har dock visat att kaspaser kan aktiveras av fosforylering som till exempel fosforyleringen av Kaspas-2, på dess S139, av kinaset DNA-PK, och därmed skulle det även vara intressant att undersöka om samma gäller för Pelle och Dredd (Shi et al., 2009).

Eftersom Dredd är en homolog till Kaspas-8 är det sannolikt att det är själva samverkan mellan Dredd och Pelle som aktiverar Dredd. Kaspas-8 är en initierande kaspas, och initierande kaspasers aktivering är främst förknippat med inducerad närhetsaktivering (eng. the induced-proximity model) (Salvesen & Dixit, 1999). Inducerad närhetsaktivering utlöses då initierande kaspaser samverkar med ett protein med liknande samverkningsdomän, vilket leder till en konformationsförändring av kaspaset. Denna konformationsförändring av kaspaset leder till att kaspasets katalytiska aktivitet aktiveras. Ett exempel på en inducerad närhetsaktivering är då Kaspas-8 samverkar via sin dödsefektordomän med Fadds dödsefektordomän (Ashkenazi & Dixit, 1998). Eftersom Pelle har en dödsdomän och Dredd har två dödsefektordomäner är det möjligt att Pelle samverkar via sin dödsdomän till en av Dredds dödsefektordomäner. Om Dredd och Pelle samverkar med varandra via dessa domäner, är det möjligt att själva samverkan mellan Pelle och Dredd är det som orsakar konformationsförändringen av Dredd, vilket leder till dess enzymatiska aktivering. Ifall Dredd och Pelle samverkar via dessa samverkningsdomäner skulle detta i sig vara intressant då det anses att domäner tillhörande dödsdomänsuperfamiljen enbart bildar homotypiska samverkningar (Hyun et al., 2007). För att identifiera de domäner som förmedlar samverkan mellan Dredd och Pelle skulle man kunna utföra liknande IP-experiment som de IP-experimenten som genomfördes i denna studie. I dessa IP-experiment skulle man i stället för att uttrycka hela Dredd eller Pelle i cellerna, transfektera cellerna med vektorer som enbart uttrycker specifika domäner av

proteinerna. De domäner som kan lokaliseras på blotten är de domäner som förmedlar Dredds och Pelles samverkan.

### 6.3 Pelles roll i flugans lokala tarmimmunförsvar

Vid jämförelse av de erhållna septiska och orala överlevnadsexperimentresultaten gick det att urskilja både likheter och skillnader för de olika flugmutanterna. Den mest påfallande likheten är att Pelle<sup>Mut</sup>-flugorna är känsliga för både orala och septiska infektioner med Ecc15. Eftersom Pelle<sup>Mut</sup>-flugorna är känsliga för båda typerna av infektioner pekar resultaten mot att Pelle är involverad i aktiveringen av IMD-signaleringsräckan i både *Drosophila*s lokala tarmimmunförsvar och systemiska immunförsvar (Kleino & Silverman, 2014, Stöven et al., 2000). Dock skulle det vara av betydelse att undersöka om uttrycket för dipterisin är liknande för Pelle<sup>Mut</sup>-flugorna efter att de infekterats septiskt med Ecc15, som efter att de infekterats oralt med Ecc15. Dessa experiment skulle verifiera att Pelle<sup>Mut</sup>-flugorna dör av den septiska infektionen på grund av en bristfällig Relish aktivering. Före det är bekräftat att Pelle<sup>Mut</sup>-flugorna dör av den septiska infektionen på grund av en bristfällig Relish aktivering, kan man inte med säkerhet säga att Pelle är involverad i IMD-signaleringsräckan i både *Drosophila*s systemiska immunförsvar och lokala tarmimmunförsvar.

Eftersom diptericingenuttrycket för Pelle<sup>Mut</sup>-flugorna inte i denna studie mättes efter att de infekterats septiskt finns det fortsättningsvis utrymme för spekulation. Ifall det skulle visas att Pelle enbart påverkar IMD-signaleringsräckan i *Drosophila*s tarmepitelceller skulle detta kunna besvara många frågor om *Drosophila*s tarmimmunförsvar. Pelles medverkan i IMD-signaleringsräckan i flugors tarmepitelceller skulle till exempel kunna vara svaret på hur IMD- och Toll-signaleringsräckan kompletterar den transkriptionella aktiveringen som krävs för att flugorna skall överleva tarmvävnadsinfektioner orsakade av Grampositiva bakterier. Pelle skulle potentiellt kunna vara svaret på denna fråga om det även visas att Pelle kan aktivera Dif/Dorsal från IMD-signaleringskomplexet.

Ifall det visar sig att Pelle enbart är involverad i IMD-signaleringsräckan i flugors tarmepitelceller, skulle Pelles samverkan med Dredd potentiellt besvara ett olöst mysterium angående Dredd<sup>D44</sup>- och Dredd<sup>L23</sup>-flugmutanterna. I Meinanders



laboratorium har de i tidigare studier påträffat att Dredd<sup>D44</sup>-flugor är känsligare än Dredd<sup>L23</sup>-flugor för orala infektioner med Gramnegativa bakterier (opublicerat data). Samma mortalitetsskillnad mellan dessa Dredd-flugmutanter har de inte kunnat identifiera i liknande septiska infektionsexperiment. Som redan nämnts har Dredd<sup>D44</sup>-flugors Glycin-120 i Dredds DED1 domän byts ut mot en Arginin, medan i Dredd<sup>L23</sup>-flugorna har Tryptofan-458 i Dredds katalytiska domän byts ut mot en Arginin (Leulier et al., 2000, Aalto et al., 2019). Mutationen i Dredd<sup>D44</sup>-flugorna gör att Dredd inte ubikvitineras, medan mutationen i Dredd<sup>L23</sup>-flugorna gör att Dredd inte har någon katalytisk aktivitet. Denna mortalitetsskillnad mellan Dredd-flugmutanterna kan även iaktas i denna studie, då det enbart är Dredd<sup>D44</sup>-flugorna som uppvisar en signifikant högre dödlighet i de orala infektionsexperimenten med Ecc15. Eftersom både Dredd<sup>D44</sup>-och Dredd<sup>L23</sup>-flugorna saknar aktivt Dredd, förmodas det att deras mortalitet skulle vara liknande i överlevnadsexperiment, och därför är denna mortalitetsskillnad i de orala överlevnadsexperimenten överraskande (Leulier et al., 2000). Dessa resultat indikerar att ubikvitinkedjorna som Diap2 tillsätter på Dredd är involverade i en immunförsvarsaktiveringsprocess i Drosophilas tarmepitelceller, men inte de celler som aktiverar Drosophilas systemiska immunförsvar. Denna obesvarade fråga om Dredd-flugmutanterna var orsaken till att vi i denna studie ville undersöka om samverkan mellan Pelle och Dredd är förmedlad via ubikvitinkedjor. IP-experimenten visade dock att Pelle även samverkar med DreddG120R, vilket indikerar att ubikvitinkedjor inte är involverade i Pelles och Dredds samverkan, och att deras samverkan är förmedlad via bindningsytor. Därmed verkar det osannolikt att Pelle är involverad i denna mortalitetsskillnad mellan dessa Dredd-mutanter, fastän det skulle visa sig att Pelle enbart medverkar i IMD-signaleringsräckan i flugornas tarmepitelceller. Detta bör dock hållas i åtanke inför fortsatta studier då Pelles roll i IMD-signaleringsräckan fortsättningsvis är oklar. För att verifiera att ubikvitin inte är involverad i Pelles och Dredds samverkan skulle man till exempel kunna undersöka om Pelles och Dredds samverkan stärks då de överuttrycks tillsammans med Diap2 än då Diap2 är frånvarande.

## 6.4 Toll<sup>Mut</sup>-flugor överlever orala, men inte septiska, infektioner som är orsakade av Ecc15

De kanske mest intressanta resultaten i överlevnadsexperimenten med Ecc15, utöver resultaten för Pelle<sup>Mut</sup>-flugorna, uppvisar Toll<sup>Mut</sup>-flugorna. Resultaten visar att Toll<sup>Mut</sup>-flugorna överlever den oral infektionen med Ecc15 medan de inte överlever den septiska infektionen med Ecc15. Dessa resultat pekar därmed på att Toll-receptorn möjligtvis krävs vid Drosophilas immunförsvar mot Gramnegativa bakterier i flugans systemiska immunförsvar, men inte i flugans lokala tarmimmunförsvar. Detta resultat är svårtolkat då flertalet studier har visat att Drosophilas Toll-receptor aktiveras av Grampositiva bakterier och svamp (Valanne et al., 2011, Buchon, Broderick, Poidevin, et al., 2009). Eftersom tidigare studier visat att Toll-receptorn inte aktiveras av Gramnegativa bakterier är det mer sannolikt att Toll<sup>Mut</sup>-flugorna haft något fel då de septiska Ecc15 experimenten genomfördes. Toll<sup>Mut</sup>-flugorna kan till exempel ha haft en infektion redan före de infekterades septiskt med Ecc15. Dessa resultat kan dock även indikera att Toll-receptorn är involverad i en korsreglering av immunsignaleringsräckorna i Drosophilas systemiska immunförsvar. Som redan nämnts har det visats att Toll-signaleringsförmedlaren MyD88 kan samverka med IMD-signaleringsförmedlaren dFadd i IP-experiment (Hornig & Medzhitov, 2001). Om denna samverkan sker mellan de endogena proteinerna skulle dFadd kunna rekrytera IMD-signaleringskomplexet till Toll-receptorn, vilket i slutändan skulle leda till aktiveringen och translokaliseringen av Relish. Eftersom dMyD88 samverkar med Toll-receptorn skulle detta därmed leda till att flugor med ett nedsatt genuttryck av Toll-receptorn även har ett försämrat uttryck av Relish specifika gener. Ifall detta visas stämna skulle detta kunna vara en förklaring till varför Toll<sup>Mut</sup>-flugorna dör av den septiska infektionen med Ecc15. En förklaring till att Toll<sup>Mut</sup>-flugorna däremot inte är känsliga för den orala infektionen med Ecc15 kan till exempel vara att Drosophila har alternativa immunförsvarssystem i dess tarmepitelceller. Dessa alternativa immunförsvarssystem, till exempel dDuox-systemet, kan möjligtvis kompensera för den Relish specifika genuttrycksförlusten som skulle ha aktiverats från Toll-receptorn (S. H. Kim & Lee, 2014). Detta är dock spekulativt, och eftersom det i denna studie varken användes dFadd- eller dMyD88-muterade flugor, måste denna teori förstärkas med fler experiment.

## 6.5 Studiens problem och styrkor

Fastän de flesta av metoderna och experimenten som genomfördes i denna studie var lyckade, medförde vissa av experimenten även utmaningar och problem. Studiens största problem var överlevnadsexperimenten med *M. luteus*. Orsaken till att de septiska *M. luteus* överlevnadsexperiment inte var lyckade är för att det fanns en stor spridning av antalet avlidna flugor i de enskilda experimenten. Denna spridning av antalet avlidna flugor i de olika flugproven är en indikering på att *M. luteus* bakterierna möjligtvis haft något fel då experimenten genomfördes. Eftersom tidigare studier har visat att Toll-signaleringsmuterade flugor är känsliga för septiska infektioner med Grampositiva bakterier är det dock möjligt att resultaten är pålitliga då några av Toll-signaleringsmutanterna uppvisar en signifikant högre mortalitet gentemot vildtypskontrollen (Rutschmann et al., 2002). På grund av denna spridning av antalet avlidna flugor mellan de enskilda experimenten är det dock svårt att dra slutsatser utgående från resultaten.

Eftersom de använda *M. luteus* bakteriernas kvalitet är oklar, är även resultaten för de orala överlevnadsexperimenten med *M. luteus* möjligtvis missvisande. Om dessa orala infektionsexperiment med *M. luteus* skulle visas vara pålitliga indikerar resultaten att *M. luteus* inte kan aktivera Toll-receptorn i *Drosophila*s tarmepitelceller. Dessa resultat indikerar detta eftersom samtliga Toll-signaleringsflugmutanter avlider först efter att de infekterats i 48 timmar av *M. luteus*. Ifall *M. luteus* skulle aktivera Toll-receptorn i flugans tarmepitelceller skulle de Toll-signaleringsmuterade fluglinjerna antagligen avlida tidigare än först efter 48 timmars infekteringstid. En orsak till att flugorna avlider först efter 48 timmars infekteringstid är kanske för att bakterierna i detta skede kunnat penetrera genom flugornas tarmvävnad och därmed startar en systemisk immunrespons i stället för en lokal tarmimmunrespons. Eftersom Grampositiva bakterier har visats aktivera Toll-receptorn under en systemisk immunrespons skulle detta således leda till att dessa Toll-signaleringsmutanter inte kan försvara sig mot infektionen, och därför avlider de (Tauszig et al., 2000, Rutschmann et al., 2002). Därmed bör dessa orala överlevnadsexperiment med *M. luteus* utföras igen.

Till skillnad från överlevnadsexperimenten med *M. luteus* som var en misslyckad metod i denna studie, var samtliga experiment med *Ecc15* denna studies styrka.

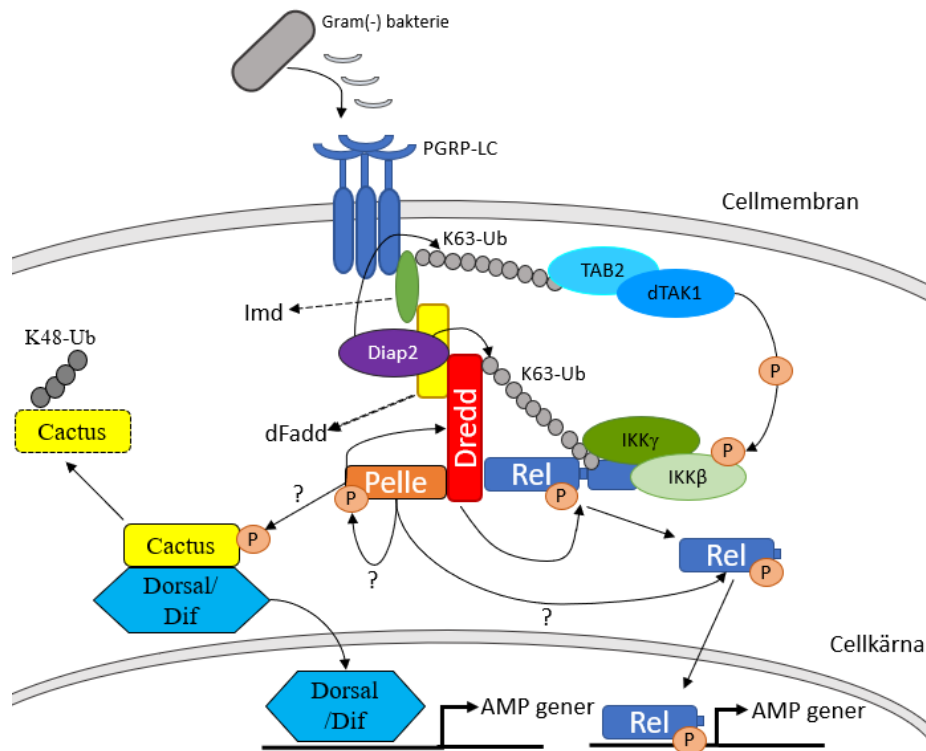
Experimenten med Ecc15 var denna studies styrka eftersom de fungerade från början och gav tydliga resultat i både överlevnadsexperimenten och diptericingenuttrycksmätningarna. Det fanns dock ett problem med diptericingenuttrycksmätningarna, vilket var att icke-infekterade kontrollen för Dif<sup>Mut</sup>-flugorna uppvisade ett högt diptericingenuttryck. Eftersom Dif har visats vara involverad vid genuttrycksaktivering för gener som är både essentiella förflugors utveckling och inflammationsrespons, är det dock möjligt att Dif-muterade flugor är mera mottagliga för infektioner än övriga flugmutanter (Stein et al., 1998, Meng et al., 1999). Dif<sup>Mut</sup>-flugorna hade därmed möjligtvis en kronisk tarminflammation som orsakade att deras icke-infekterade kontrollprov hade ett högt diptericingenuttryck. Detta var dock inte ett stort problem i studien eftersom det höga diptericingenuttrycket för icke-infekterade Dif<sup>Mut</sup>-flugorna också underströk att Dif-muterade flugor kan aktivera IMD-specifika gener.

Studiens sista problem var att några av Toll-signaleringsmutanterna var heterozygoter under tiden då experimenten genomfördes. Eftersom några av flugmutanterna var heterozygoter är det i princip omöjligt att veta om dessa flugors resultat är pålitliga. Detta problem var speciellt tydligt för Tube<sup>Mut</sup>-flugorna då de uppvisade en liknande mortalitet som vildtypsflugorna i samtliga överlevnadsexperiment. Eftersom flertalet studier har visat att Tube är involverad vid Toll-signaleringsaktivering förväntades andra resultat för Tube<sup>Mut</sup>-flugorna (Xiao et al., 1999, Shen & Manley, 2002). Detta utgjorde dock inte ett stort problem i studien, eftersom experimenten med Ecc15 visade att Pelle<sup>Mut</sup>-flugorna inte överlever infektioner orsakade av Ecc15 på grund av en ofullständig IMD-signaleringsaktivering, trots att Pelle<sup>Mut</sup>-flugorna var heterozygoter.

## 6.6 Sammanfattning

Utgående från resultaten i denna studie kan vi med säkerhet säga att den etablerade Toll-signaleringsförmedlaren Pelle är involverad vid aktiveringen av IMD-signaleringsspecifika NF- $\kappa$ B-transkriptionsfaktorn Relish. Studiens resultat pekar mot att Pelle är kopplad till IMD-signaleringsräckan via en direkt protein-proteinsamverkan med IMD-signaleringsförmedlaren Dredd. Dessutom indikerar IP-

resultaten att Pelle är involverad vid processen som aktiverar Dredd, vilket i sin tur är en essentiell del för aktiveringen av Relish. Däremot har vi möjligtvis lyckats besvara en fråga gällande *Drosophila*'s IMD-signaleringsaktivering. Eftersom vi kunde visa att Pelle samverkar med, och möjligtvis aktiverar, IMD-signaleringsförmedlaren Dredd, är Pelle direkt kopplad till IMD-signaleringskomplexet (figur 16).

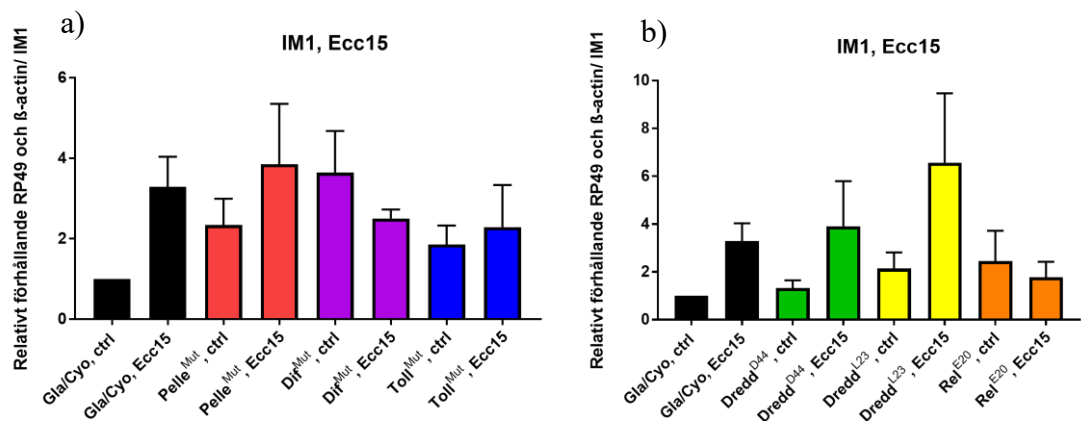


*Figur 16. Etablerade Toll-signaleringsförmedlaren Pelle i IMD-signaleringsräckan. När IMD (grön) binder till en PGRP-LC-receptor kan den därefter samverka med dFADD (gul), som i sin tur samverka med Dredd. E3-ligaset Diap2 (lila) rekryteras därefter till signaleringskomplexet där det bildar K63-bundna ubikvitinkedjor på Dredd och IMD. Serin/Treoninkinaset Pelle (orange) rekryteras också till signaleringskomplexet via dess samverkan med Dredd. Pelles samverkande med Dredd, samt tillförandet av de K63-bundna ubikvitinkedjorna på Dredd, leder till att Dredds enzymatiska aktivitet aktiveras. De Diap2 tillsatta ubikvitinkedjorna på molekyler i signaleringskomplexet fungerar som en stödstruktur för TAK1/TAB2, samt IKK-komplexet och Relish. Rekryteringen av Relish till signaleringskomplexet leder till att Relish klyvs av Dredd, och fosforyleras av IKKβ. Relish translokeras därefter in till cellkärnan. Det är fortsättningsvis oklart om Pelle kan bidra till fosforyleringen av Relish eller av IκB-proteinet Cactus från IMD-signaleringskomplexet (Bild inspirerad från Falschlehner & Boutros, 2012).*

Fastän de flesta av studiens målsättningar blev besvarade, förblev en del frågor obesvarade. I denna studie kunde vi till exempel inte visa att Pelles samverkan i IMD-signaleringsräckan direkt skulle bidra till en korsreglering av IMD- och Toll-

signaleringsräckan. Eftersom Pelle har visats kunna fosforylera I $\kappa$ B-proteinet Cactus skulle detta dock i teorin vara möjligt, och därför bör detta undersökas i framtida studier. En annan fråga som förblev obesvarad var att vi inte kunde visa att Pelles samverkan i IMD-signaleringsräckan är en tarmvävnadsspecifik process. Eftersom resultaten från överlevnadsexperimenten visade att Pelle<sup>Mut</sup>-flugor varken överlever septiska eller orala infektioner med Ecc15 indikerar resultaten snarare att Pelle är involverad i IMD-signaleringsräckan både i *Drosophila*s tarmepitelceller och celler i dess fettkropp. För att verifiera dessa resultat bör det dock utföras flera experiment där man studerar IMD-signaleringsaktiveringen i Pelle<sup>Mut</sup>-flugorna under en septisk infektion. Eftersom studien väckte många nya frågor om Pelles roll i *Drosophila*s immunförsvarsrespons, fungerar denna studie som en ypperlig starpunkt för fortsatta studier.

## 7 Appendix



a) *Det relativa genuttrycket för IM1 i Toll-signaleringsflugmutanter:* Figuren visar IM1-genaktiveringen i Toll-signaleringsmutanternas tarmvävnad efter att de ätit en sukroslösning innehållande Ecc15 i 24 timmar. De relativa genuttrycken för IM1 visas på grafens y-axel medan typ av fluga visas på x-axeln. Varje flugtyp har en kontroll som inte matats med bakterier. Vildtypskontrollen i experimenten var Gla/Cyo. Resultaten som presenteras i figuren erhöles från fem olika experiment. b) *Det relativa genuttrycket för IM1 i IMD-signaleringsflugmutanter:* Figuren visar IM1-genaktiveringen i IMD-signaleringsmutanternas tarmvävnad efter att de ätit en sukroslösning innehållande Ecc15 i 24 timmar. De relativa genuttrycken för IM1 visas på grafens y-axel medan typ av fluga visas på x-axeln. Varje flugtyp har en kontroll som inte matats med bakterier. Vildtypskontrollen i experimenten var Gla/Cyo. Resultaten som presenteras i figuren erhöles från fem olika experiment.

## 8 Buffertar och Kemikalier

### 1x PBS

Komemrsiella PBS Tabletter (innehållande NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O samt LH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) blandades i 1 liter dH<sub>2</sub>O

### LB medium (1l)

20 g LB-broth blandades i 1 l dH<sub>2</sub>O. Lösningen autoklaverades och förvarades i 4°C.

### LB-ampicillin agarplattor

10 g agar och 10 g LB-broth blandades i 1 l dH<sub>2</sub>O, följt av att lösningen autoklaverades. När temperaturen sjunkit till ca 60°C tillsattes 250 µl 100 mg/ml ampicillin

### KCM buffert 5x (30 ml)

Bufferten innehöll: 5 ml 3M KCL, 4,5 ml 1M CaCl<sub>2</sub>, 7,5 ml 1M MgCl<sub>2</sub> och 13 ml dH<sub>2</sub>O

### TE buffert (5 ml)

Bufferten innehöll: 1 µl 0,5M EDTA (pH 8,0), 49 µl 1M Tris (pH 8,0) och 4,949 ml dH<sub>2</sub>O

### 50x TAE buffert (1 l)

Bufferten innehöll: 100 ml 0,5M EDTA, 242 g Tris, 57,1 ml Glacial acetic acid och 842,9 ml dH<sub>2</sub>O.

### S2 lyserings buffert



Bufferten innehöll: 50mM Tris (pH 7.5), 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 10 % glycerol och 1mM EDTA

### **IP tvättbuffert**

Bufferten innehöll: 10 mM Tris (pH 7.5), 150mM NaCl, 0,1% Triton X-100 och 5% glycerol.

### **4x Laemmli provbuffert (100 ml)**

Bufferten innehöll: 30 ml 100 procentig glycerol, 10 ml 20 procentig SDS, 8,3 ml 0,625M Tris-HCl (pH 6.8), 10 ml 0,15 procentig bromphenolblue och 12 ml ddH<sub>2</sub>O. Före användning tillsattes alltid  $\beta$ -merkaptoetanol så att slutliga koncentrationen för  $\beta$ -merkaptoetanol var 3 %.

## **Kemikalier**

<b>Produkt</b>	<b>Företag</b>
Agar	Santa Cruz
$\beta$ -merkaptoetanol	Sigma
Akrylamid	Sigma
EDTA	Sigma
PBS (Phosphate Buffered Saline) tabletter	Biotop
Tris	Sigma
LB-broth	Sigma
Triton X-100	Fluka
SDS (Sodium dodecyl sulfat solution)	Sigma
Proteas och fosfat inhibitor mini tabletter	Thersmo Fisher Scientific

## 9 Referenser

- 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*. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0164-x>
- Abbott, D. W., Wilkins, A., Asara, J. M., & Cantley, L. C. (2004). The Crohn's disease protein, NOD2, requires RIP2 in order to induce ubiquitylation of a novel site on NEMO. *Current Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.12.032>
- 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>
- Ashkenazi, A., & Dixit, V. M. (1998). Death receptors: Signaling and modulation. In *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.281.5381.1305>
- Ayyaz, A., & Jasper, H. (2013). Intestinal inflammation and stem cell homeostasis in aging *Drosophila melanogaster*. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00098>
- Basak, S., & Hoffmann, A. (2008). Crosstalk via the NF- $\kappa$ B signaling system. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2008.04.005>
- Belvin, M. P., Jin, Y., & Anderson, K. V. (1995). Cactus protein degradation mediates *Drosophila* dorsal-ventral signaling. *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.9.7.783>
- Biemar, F., Nix, D. A., Piel, J., Peterson, B., Ronshaugen, M., Sementchenko, V., Bell, I., Manak, J. R., & Levine, M. S. (2006). Comprehensive identification of *Drosophila* dorsal-ventral patterning genes using a whole-genome tiling array. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604484103>
- 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>
- Buchon, N., Broderick, N. A., Chakrabarti, S., & Lemaitre, B. (2009). Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in *Drosophila*. *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.1827009>
- Buchon, N., Broderick, N. A., Poidevin, M., Pradervand, S., & Lemaitre, B. (2009). *Drosophila* Intestinal Response to Bacterial Infection: Activation of Host Defense and Stem Cell Proliferation. *Cell Host and Microbe*. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.01.003>
- Buchon, N., Osman, D., David, F. P. A., Yu Fang, H., Boquete, J. P., Deplancke, B.,

- & Lemaitre, B. (2013). Morphological and Molecular Characterization of Adult Midgut Compartmentalization in *Drosophila*. *Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.04.001>
- Buchon, N., Silverman, N., & Cherry, S. (2014). Immunity in *Drosophila melanogaster*-from microbial recognition to whole-organism physiology. In *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri3763>
- Cario, E. (2005). Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. In *Gut*. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.062794>
- Carter, R. S., Pennington, K. N., Ungurait, B. J., Arrate, P., & Ballard, D. W. (2003). Signal-induced ubiquitination of I kappaB Kinase-beta. *The Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310686200>
- Clarke, T. B. (2014). Microbial Programming of Systemic Innate Immunity and Resistance to Infection. *PLoS Pathogens*. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004506>
- Daigneault, J., Klemetsaune, L., & Wasserman, S. A. (2013). The IRAK Homolog Pelle Is the Functional Counterpart of IκB Kinase in the *Drosophila* Toll Pathway. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075150>
- Dickens, L. S., Boyd, R. S., Jukes-Jones, R., Hughes, M. A., Robinson, G. L., Fairall, L., Schwabe, J. W. R., Cain, K., & MacFarlane, M. (2012). A Death Effector Domain Chain DISC Model Reveals a Crucial Role for Caspase-8 Chain Assembly in Mediating Apoptotic Cell Death. *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.05.004>
- Dubreuil, R. R. (2004). Copper cells and stomach acid secretion in the *Drosophila* midgut. In *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.07.004>
- Fakhoury, M., Negrulj, R., Mooranian, A., & Al-Salami, H. (2014). Inflammatory bowel disease: Clinical aspects and treatments. In *Journal of Inflammation Research*. <https://doi.org/10.2147/JIR.S65979>
- Falschlehner, C., & Boutros, M. (2012). Innate immunity: Regulation of caspases by IAP-dependent ubiquitylation. *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.148>
- Ferrandon, D., Jung, A. C., Cricqui, M. C., Lemaitre, B., Uttenweiler-Joseph, S., Michaut, L., Reichhart, J. M., & Hoffmann, J. A. (1998). A drosomycin-GFP reporter transgene reveals a local immune response in *Drosophila* that is not dependent on the Toll pathway. *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.5.1217>
- Gasteiger, G., D'osualdo, A., Schubert, D. A., Weber, A., Bruscia, E. M., & Hartl, D. (2017). Cellular Innate Immunity: An Old Game with New Players. In *Journal of Innate Immunity*. <https://doi.org/10.1159/000453397>
- Govind, S. (2008). Innate immunity in *Drosophila*: Pathogens and pathways. In *Insect Science*. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2008.00185.x>
- Großhans, J., Bergmann, A., Haffter, P., & Nüsslein-Volhard, C. (1994). Activation

- of the kinase Pelle by Tube in the dorsoventral signal transduction pathway of *Drosophila* embryo. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/372563a0>
- 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>
- Haghighyeghi, A., Sarac, A., Czerniecki, S., Grosshans, J., & Schöck, F. (2010). Pellino enhances innate immunity in *Drosophila*. *Mechanisms of Development*. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2010.01.004>
- Hedengren, M., Åsling, B., Dushay, M. S., Ando, I., Ekengren, S., Wihlborg, M., & Hultmark, D. (1999). Relish, a central factor in the control of humoral but not cellular immunity in *Drosophila*. *Molecular Cell*. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80392-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80392-5)
- Hetru, C., & Hoffmann, J. A. (2009). NF- $\kappa$ B in the immune response of *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.
- Hill, J. M., Vaidyanathan, H., Ramos, J. W., Ginsberg, M. H., & Werner, M. H. (2002). Recognition of ERK MAP kinase by PEA-15 reveals a common docking site within the death domain and death effector domain. *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf641>
- Hoffmann, J. A., & Reichhart, J. M. (2002). *Drosophila* innate immunity: An evolutionary perspective. In *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/ni0202-121>
- Hori, A., Kurata, S., & Kuraishi, T. (2018). Unexpected role of the IMD pathway in *Drosophila* gut defense against *Staphylococcus aureus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.004>
- Horng, T., & Medzhitov, R. (2001). *Drosophila* MyD88 is an adapter in the Toll signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.231471798>
- 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>
- Hyun, H. P., Lo, Y. C., Lin, S. C., Wang, L., Jin, K. Y., & Wu, H. (2007). The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation. In *Annual Review of Immunology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141656>
- Jeong, E. J., Bang, S. H., Lee, T. H., Park, Y. I., Sim, W. S., & Kim, K. S. (1999). The solution structure of FADD death domain. Structural basis of death domain interactions of Fas and FADD. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.23.16337>
- Jin, Y., Patel, P. H., Kohlmaier, A., Pavlovic, B., Zhang, C., & Edgar, B. A. (2017). Intestinal Stem Cell Pool Regulation in *Drosophila*. *Stem Cell Reports*.

<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.04.002>

- 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>
- Kietz, C., Mohan, A. K., Pollari, V., Tuominen, I.-E., Ribeiro, P. S., Meier, P., & Meinander, A. (2021). Drice restrains Diap2-mediated inflammatory signalling and intestinal inflammation. *Cell Death & Differentiation*. <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*. <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. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00116>
- Kleino, A., Myllymäki, H., Kallio, J., Vanha-aho, L.-M., Oksanen, K., Ulvila, J., Hultmark, D., Valanne, S., & Rämet, M. (2008). Pirk Is a Negative Regulator of the *Drosophila* Imd Pathway. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.8.5413>
- Kleino, A., & Silverman, N. (2014). The *Drosophila* IMD pathway in the activation of the humoral immune response. *Developmental and Comparative Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.05.014>
- Kohl, A., & Grütter, M. G. (2004). Fire and death: The pyrin domain joins the death-domain superfamily. In *Comptes Rendus - Biologies*. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2004.08.006>
- Komander, D. (2009). The emerging complexity of protein ubiquitination. In *Biochemical Society Transactions*. <https://doi.org/10.1042/BST0370937>
- Kuraishi, T., Hori, A., & Kurata, S. (2013). Host-microbe interactions in the gut of *Drosophila melanogaster*. In *Frontiers in Physiology*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00375>
- Kuraishi, T., Kanoh, H., Momiuchi, Y., Kenmoku, H., & Kurata, S. (2016). The *Drosophila* Toll Pathway: A Model of Innate Immune Signalling Activated by Endogenous Ligands. In *Chronic Inflammation*. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-56068-5\\_10](https://doi.org/10.1007/978-4-431-56068-5_10)
- Kurokawa, M., & Kornbluth, S. (2009). Caspases and Kinases in a Death Grip. In *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.021>
- Lee, K. A., Kim, S. H., Kim, E. K., Ha, E. M., You, H., Kim, B., Kim, M. J., Kwon, Y., Ryu, J. H., & Lee, W. J. (2013). Bacterial-derived uracil as a modulator of mucosal immunity and gut-microbe homeostasis in *Drosophila*. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.009>
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., & Hoffmann, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/Cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*.

[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80172-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80172-5)

- 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*. <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, J., & Yuan, J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond. In *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.297>
- 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, 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>
- 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*. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.121>
- Meng, X., Khanuja, B. S., & Ip, Y. T. (1999). Toll receptor-mediated Drosophila immune response requires Dif, an NF- $\kappa$ B factor. *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.13.7.792>
- Micheau, O., & Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00521-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00521-X)
- Morgan, M. J., & Liu, Z. G. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B signaling. In *Cell Research*. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.178>
- Myllymäki, H., Valanne, S., & Rämet, M. (2014). The Drosophila Imd Signaling Pathway. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303309>
- Nam, Y. J., Mani, K., Ashton, A. W., Peng, C. F., Krishnamurthy, B., Hayakawa, Y., Lee, P., Korsmeyer, S. J., & Kitsis, R. N. (2004). Inhibition of both the extrinsic and intrinsic death pathways through nonhomotypic death-fold interactions. *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.08.020>
- Newton, K., & Dixit, V. M. (2012). Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006049>
- Nishide, Y., Kageyama, D., Yokoi, K., Jouraku, A., Tanaka, H., Futahashi, R., & Fukatsu, T. (2019). Functional crosstalk across IMD and Toll pathways: Insight into the evolution of incomplete immune cascades. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.2207>

- Oberst, A., & Green, D. R. (2011). It cuts both ways: Reconciling the dual roles of caspase 8 in cell death and survival. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm3214>
- 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*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.12.036>
- Reed, J. C., Doctor, K. S., & Godzik, A. (2004). The domains of apoptosis: a genomics perspective. In *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*. <https://doi.org/10.1126/stke.2392004re9>
- Rutschmann, S., Kilinc, A., & Ferrandon, D. (2002). Cutting Edge: The Toll Pathway Is Required for Resistance to Gram-Positive Bacterial Infections in *Drosophila*. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.4.1542>
- Salvesen, G. S., & Dixit, V. M. (1999). Caspase activation: The induced-proximity model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.10964>
- Schägger, H., & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2)
- Schroeder, B. O., & Bäckhed, F. (2016). Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. In *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm.4185>
- Severo, M. S., Sakhon, O. S., Choy, A., Stephens, K. D., & Pedra, J. H. F. (2013). The “ubiquitous” reality of vector immunology. In *Cellular Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/cmi.12128>
- Shen, B., Liu, H., Skolnik, E. Y., & Manley, J. L. (2001). Physical and functional interactions between *Drosophila* TRAF2 and Pelle kinase contribute to Dorsal activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.141235698>
- Shen, B., & Manley, J. L. (2002). Pelle kinase is activated by autophosphorylation during Toll signaling in *Drosophila*. In *Development*.
- Shi, M., Vivian, C. J., Lee, K. J., Ge, C., Morotomi-Yano, K., Manzl, C., Bock, F., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Zhu, R., Haug, J. S., Swanson, S. K., Washburn, M. P., Chen, D. J., Chen, B. P. C., Villunger, A., Florens, L., & Du, C. (2009). DNA-PKcs-PIDDosome: A Nuclear Caspase-2-Activating Complex with Role in G2/M Checkpoint Maintenance. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.12.021>
- 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*. <https://doi.org/10.1101/gad.817800>

- Stein, D., Goltz, J. S., Jurcsak, J., & Stevens, L. (1998). The Dorsal-related immunity factor (Dif) can define the dorsal-ventral axis of polarity in the *Drosophila* embryo. *Development*. <https://doi.org/10.1242/dev.125.11.2159>
- 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*. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvd072>
- Takeda, K., & Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. In *International Immunology*. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh186>
- Tanji, T., Hu, X., Weber, A. N. R., & Ip, Y. T. (2007). Toll and IMD Pathways Synergistically Activate an Innate Immune Response in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.01814-06>
- 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*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009473107>
- Tauszig, S., Jouanguy, E., Hoffmann, J. A., & Imler, J. L. (2000). Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.180130797>
- Tlaskalová-Hogenová, H., Tpanková, R., Kozáková, H., Hudcovic, T., Vannucci, L., Tuková, L., Rossmann, P., Hrní, T., Kverka, M., Zákostelská, Z., Klimeová, K., Pibylková, J., Bártová, J., Sanchez, D., Fundová, P., Borovská, D., Rtková, D., Zidek, Z., Schwarzer, M., ... Funda, D. P. (2011). The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: Contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. In *Cellular and Molecular Immunology*. <https://doi.org/10.1038/cmi.2010.67>
- Valanne, S., Wang, J.-H., & Rämetsä, M. (2011). The *Drosophila* Toll Signaling Pathway. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002302>
- Vallabhapurapu, S., & Karin, M. (2009). Regulation and function of NF- $\kappa$ B transcription factors in the immune system. In *Annual Review of Immunology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132641>
- Vuong, H. E., Pronovost, G. N., Williams, D. W., Coley, E. J. L., Siegler, E. L., Qiu, A., Kazantsev, M., Wilson, C. J., Rendon, T., & Hsiao, E. Y. (2020). The maternal microbiome modulates fetal neurodevelopment in mice. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2745-3>
- Wullaert, A., Heyninck, K., Janssens, S., & Beyaert, R. (2006). Ubiquitin: tool and target for intracellular NF- $\kappa$ B inhibitors. In *Trends in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.it.2006.09.003>
- Xiao, T., Towb, P., Wasserman, S. A., & Sprang, S. R. (1999). Three-dimensional structure of a complex between the death domains of pelle and tube. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81542-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81542-1)



- Yokoi, K., Koyama, H., Minakuchi, C., Tanaka, T., & Miura, K. (2012). Antimicrobial peptide gene induction, involvement of Toll and IMD pathways and defense against bacteria in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Results in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.rinim.2012.03.002>
- Zapata, J. M., Matsuzawa, S. I., Godzik, A., Leo, E., Wasserman, S. A., & Reed, J. C. (2000). The *Drosophila* tumor necrosis factor receptor-associated factor-1 (DTRAF1) interacts with pelle and regulates NF $\kappa$ B activity. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.16.12102>
- Zhang, J., Macartney, T., Peggie, M., & Cohen, P. (2017). Interleukin-1 and TRAF6-dependent activation of TAK1 in the absence of TAB2 and TAB3. *Biochemical Journal*. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170288>