



Genetisk analys av Dredd-förmedlad klyvning av Kenny i bananflugans tarm



Elinda Hermanson, 1802070

ehermans@abo.fi

Åbo Akademi

Fakulteten för naturvetenskaper och teknik

Magisterprogrammet i biovetenskaper, huvudämnet cellbiologi

CB00BR56 Pro gradu-avhandling i cellbiologi, 30 sp

2023

Handledare: Annika Meinander

Bihandledare: Aravind Kumar Mohan

Abstrakt

Transkriptionsfaktorn nukleär faktor kappalättkedjeförstärkare av aktiverade B-celler (eng. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B) är mycket viktig för det molekylära immunförsvaret hos bananflugan *Drosophila melanogaster*, i och med att transkriptionsfaktorn styr uttrycket av antimikrobiella peptider. I det här projektet undersöks ställningsproteinet Kenny som är en nyckelreglerare av immunbrist-signaleringsräckan (eng. immunodeficiency pathway, Imd) hos bananflugan. Kenny är essentiell för att aktivera NF- κ B-transkriptionsfaktorn Relish och under basala förhållanden nedbryts Kenny för att undvika en ständig aktivering av immunsigaleringsräckan.

Min hypotes var att kaspaset Dredd klyver Kenny för att eliminera signalen som leder till dess nedbrytning. I det här pro gradu-projektet visas det att Kenny klyvs vid ko-transfektion tillsammans med Dredd i cellen och att klyvningen sker vid aminosyran D21. Utgående från den informationen skapades transgener med olika Kenny-mutanter, med syfte att sedan integrera dem i bananflugans genom. Experiment med de transgena fluglinjerna kommer att ge information om hur Kenny och dess reglering påverkar immunförsvaret. I det här pro gradu-projektet utfördes också klyvningsanalyser av Kenny i bananflugans tarm, vilka antyder att Dredd klyver Kenny även *in vivo*. De sammanställda resultaten visar att en ny kaspasfunktion för Dredd har karakteriserats, vilket tillskriver Dredd en viktig ny funktion inom flugans inflammationsrespons.

Innehållsförteckning

1 Inledning	4
2 Litteraturoversikt.....	7
2.1 Bananflugan som modellorganism	7
2.2 Molekylärbiologiska tekniker och verktyg för genetisk analys av bananflugan	8
2.2.1 Modellorganismdatabasen FlyBase underlättar genetisk analys av bananflugan	9
2.2.1 Användningen av balanserarkromosomer i genetiska korsningar	9
2.2.2 Gal4/UAS-systemet	10
2.2.3 Integrering av transgener i bananflugans genom: Användning av plasmiden pUASTattB	11
2.3 Imd-signaleringsräckan svarar för flugans immunförsvar mot Gramnegativa bakterier	13
2.4 Kenny (IKKgamma) är en nyckelreglerare av Imd-signaleringsräckan	15
2.5 Kaspaser hos människan och bananflugan	16
3 Målsättning	20
4 Material och metoder	21
4.1 Transfektion av S2-celler.....	21
4.2 Framställning av celllysat.....	22
4.3 Affinitetsanalys för precipitering av proteiner.....	22
4.3.1 V5-immunoprecipitering.....	23
4.3.2 Affinitetsanalys med GST-märkt Met1-SUB	23
4.4 Western blot för detektering av specifika proteiner.....	24
4.4.1 Gelelektrofores för separering av proteiner	24
4.4.2 Överföring av proteiner till nitrocellulosamembran.....	25
4.4.3 Detektering av proteiner genom kemiluminiscens	25
4.5 Uppfödning av flugor	27
4.6 Klyvningsanalys av Kenny <i>in vivo</i>	27
4.6.1 Korsning av flugor	28
4.6.2 Bakteriekultur av <i>Erwinia carotovora carotovora</i> 15.....	29
4.6.3 Matning av flugorna med bakterielösning och kaspasinhämmare samt dissekering av flugtarmar	30
4.7 Skapandet av transgena Kenny-flugor.....	30
4.8 Polymeraskedjereaktion	31

4.9 Gelelektrofores för separering av DNA-molekyler	32
4.10 Gel- och PCR-rening av DNA-molekyler	33
4.11 Behandling med restriktionsenzym och defosforylering av vektor	33
4.12 Ligering av DNA-fragment	34
4.13 Transformerings av kompetenta celler för mångfaldigandet av plasmider	34
4.13.1 Tillredning av LB-(ampicillin)plattor	34
4.13.2 Tillredning av kompetenta celler, E.coli Top10	35
4.13.3 Transformerings av kompetenta celler	35
4.14 Plasmidberedning	36
4.14.1 Småskalig plasmidberedning	36
4.14.2 Storskalig plasmidberedning	36
4.15 Sekvensering	38
4.16 Basspecifik mutagenes	38
5 Resultat	40
5.1 Ko-transfektion av Kenny och Dredd leder till att Kenny klyvs.	40
5.2 Kenny klyvs vid D21	40
5.3 Klyvningsanalys av Kenny i bananflugans tarm	42
5.3.1 Matning med kaspasinhämmare hade ingen påtagbar effekt på klyvningen av Kenny	42
5.3.2 Överuttryck av Dredd tillsammans med Kenny ökar klyvningen av Kenny under basala förhållanden	43
5.3.3 Katalytisk Dredd-mutantbakgrund minskar klyvningen av Kenny	44
5.4 Skapandet av transgener med olika versioner av Kenny	45
5.4.1 Vildtyps Kenny och klyvningsresistent Kenny klonades in i pUASTattB-vektorn	47
5.4.3 Ständigt klyvt Kenny uttrycks i pMT-plasmider som ett ubiquitininfusionskonstrukt	48
5.5 Två avvikande nukleotider i pMT-Kenny-HA korrigerades	51
6 Diskussion	53
7 Avslutning	57
8 Litteraturlista	60
Appendix	74

Lista över förkortningar

CARD	Kaspasrekryterande domän (eng. caspase recruiting domain)
DED	Dödseffektordomän
dFadd	<i>Drosophila</i> Fas-associerad dödsdomän
Diap2	<i>Drosophila</i> inhibitor av apoptos 2
Dredd	Dödsrelaterat ced-3/Nedd2-lik kaspas
DrICE	<i>Drosophila</i> interleukin-1 β -konverterande enzym (eng. <i>Drosophila</i> interleukin-1 β converting enzyme)
<i>Ecc15</i>	<i>Erwinia carotovora carotovora</i>
ECL	Förstärkt kemiluminiscens genom luminol (eng. enhanced chemiluminescence by luminol)
GFP	Grönt fluorescerande protein
GST	Glutation-S-transferas
HA	Hemagglutin
IgG	Immunoglobulin G
IKK-komplex	I-KappaB-kinaskomplex
Imd-signaleringsräckan	Immunbrist-signaleringsräckan (eng. immunodeficiency pathway)
LB	Lysogenbuljong (eng. lysogeny broth)
LIR	LC3-samverkande region (eng. LC3 interacting region)
LUBEL	Linjärt ubiquitin-E3-ligas
Met1-SUB	Metionin1-länkat ubikvitinspecifikt ubikvitinbindande protein (eng. Met1-Ubiquitin-specific ubiquitin binder)
Met1-ubikvitin	Metionin1-länkat ubikvitin
MT	Metallotionein
NEMO	NF- κ B-essentiell modulerare
NF- κ B	Nukleär faktor kappalättkedjeförstärkare av aktiverade B-celler (eng. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
OD	Optisk täthet (eng. optical density)
PGRP-LC	Peptidoglykanigenkännande proteinet LC (eng. peptidoglycan recognition protein LC)
RO-vatten	Vatten renat genom omvänd osmos (eng. reverse osmosis)
S2-celler	Schneider2-celler
SDS-PAGE	SDS-polyakrylamidgelelektrofores (eng. Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
SM	Andra multipelt inverterad (eng. second multiply inverted)
Tab2	TAK1-associerat bindningsprotein 2
Tak1	Transformerande tillväxtfaktor- β aktiverat kinas 1 (eng. transforming growth factor- β activated kinase 1)
TM	Tredje multipelt inverterad (eng. third multiply inverted)
TNFR-signaleringsräckan	Tumörnekrosfaktorreceptor-signaleringsräckan (eng. tumour necrosis factor receptor pathway)

1 Inledning

Inflammatoriska sjukdomar ökar i samhället och forskare uppskattar att de står för mer än hälften av dödsfallen i världen (Furman et al., 2019). Påståendet stöds av att de tre ledande dödsorsakerna – kranskärslsjukdom, stroke och kronisk obstruktiv lungsjukdom – är förknippade med inflammation (*The Top 10 Causes of Death*, 2020). Även autoimmuna och neurodegenerativa sjukdomar samt olika cancerformer är uppräknade bland de ledande dödsorsakerna i världen, varav samtliga är kopplade till kronisk inflammation (Furman et al., 2019). För att kunna förebygga och behandla dessa sjukdomar behövs en ingående förståelse av inflammationsprocessen och dess funktionsprinciper.

Inflammationssignalering är ett komplext fenomen som involverar flera signaleringsräckor och aktivering av immunförsvaret. Bland de mest centrala signaleringsräckorna är de som aktiverar transkriptionsfaktorfamiljen nukleär faktor kappa-lättkedjeförstärkare av aktiverade B-celler (eng. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B) som styr uttrycket av ett flertal proinflammatoriska gener (Baldwin, 1996; Liu et al., 2017). Överaktiv NF- κ B-signalering är associerat med kronisk inflammation och är en drivande faktor vid sjukdomstillstånd såsom inflammatoriska tarmsjukdomar (Atreya et al., 2008; Schottelius & Baldwin, 1999). En studie utförd i patienter med inflammatoriska tarmsjukdomar visade att nivån av aktiverat NF- κ B signifikant korrelerar med graden av inflammation i tarmen (Rogler et al., 1998). För att studera hur till exempel NF- κ B-signaleringen påverkar immunförsvaret och hur signaleringsräckan regleras behövs enkla system som kan modifieras enligt de forskningsfrågor som ska besvaras. Ett tillvägagångssätt är att använda sig av modellorganismer för att beskriva processerna i enklare system. Eftersom funktionsprinciperna för molekylärbiologiska och cellbiologiska processer är bevarade genom evolutionen kan dessa studeras i modellorganismer och resultaten tillämpas i människan. Bland annat är de molekylära och cellulära mekanismerna för inflammationssignalering bevarad genom evolutionen och kan studeras exempelvis i bananflugan *Drosophila melanogaster*. Därtill har bananflugan endast det medfödda immunförsvaret, vilket å ena sidan begränsar dess användning till frågor som berör enbart den här typen av immunrespons, men som å

andra sidan gör att inflytande från det adaptiva immunförsvaret inte behöver beaktas i experimenten.

Vid en systemisk bakteriell infektion producerar flugan i första hand antimikrobiella peptider för att bekämpa infektionen och detta utförs genom två NF- κ B-signaleringsräckor: Immunbrist-signaleringsräckan (eng. immune deficiency signaling pathway, Imd) och Toll-signaleringsräckan (Myllymäki et al., 2014; Valanne et al., 2011). Imd-signaleringsräckan i bananflugan motsvarar människans tumörnekrosfaktorreceptor-signalering (eng. tumour necrosis factor receptor pathway, TNFR) som styr cellulära processer såsom celldelning och överlevnad till olika former av celldöd (Buchon et al., 2014; Gough & Myles, 2020). Då flugan utsätts för en lokal bakteriell infektion i tarmen är det enbart Imd-signaleringsräckan som aktiveras och som styr uttrycket av antimikrobiella peptider (Ferrandon et al., 1998; Tzou et al., 2000). Därmed är flugans tarm ett utmärkt organ att studera regleringen av Imd-signaleringsräckan och dess roll i flugans immunförsvaret. Utöver flugans tarm är den så kallade fettkroppen ett viktigt organ för immunförsvaret och står för aktiveringen av en systemisk immunrespons i flugan (Myllymäki et al., 2014). Eftersom immunsignaleringsräckorna är bevarade genom evolutionen kan deras funktionsprinciper ge en insikt i hur delar av människans immunsignalering fungerar.

I mitt projekt studerades ställningsproteinet Kenny som är en nyckelreglerare av Imd-signaleringsräckan. Jag är intresserad av att utreda hur Kenny regleras och jag använde mig av flugans tarm då inflammationssignaleringen i organismen studerades. Tarmen är ett fysiologiskt relevant organ att studera immunförsvaret i eftersom tarmepitelet utgör en yta för värd-mikrob-interaktioner och bidrar därmed med information om en lokal immunrespons. Som tidigare nämnts står Imd-signaleringsräckan för den största delen av immunresponsen i tarmen och därmed kan effekterna som iakttas i detta organ tillskrivas denna signaleringsräcka. I de experiment jag utförde i bananflugan aktiveras Imd-signaleringsräckan i tarmepitelet genom att mata flugorna med bakterien *Ecc15* (Buchon et al., 2009). Jag studerade hypotesen om att Kenny klyvs av kaspaset Dredd för att stabilisera ställningsproteinet och jag utredde också vid vilket ställe Kenny klyvs. Med denna information kan jag sedan generera olika mutanter av Kenny och

studera hur dessa inverkar på regleringen av NF- κ B i flugans tarm. Dessa Kenny-mutanter kommer bidra med information om Kennys roll i immunförsvaret.

2 Litteraturöversikt

2.1 Bananflugan som modellorganism

Bananflugan är en mångsidig modellorganism och används både för grundforskning och mer tillämpade forskningsfrågor. Bananflugan blev den andra multicellulära organismen vars genom sekvenserades, i och med att den första var rundmasken *C. elegans* (Adams et al., 2000; *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Det är relativt kostnadseffektivt att utföra studier i bananflugan, eftersom de kan födas upp under anspråkslösa förhållanden och användningen är främst reglerad av de bestämmelser som gäller för hanteringen av genmodifierade organismer. En annan fördel är den korta generationstiden som endast är 10 dagar vid 25°C (Hartwell et al., 2021). Den korta generationstiden i kombination med de många molekylärbiologiska tekniker som finns tillgängliga för att modifiera bananflugans genom möjliggör att olika genetiska varianter kan skapas rätt fort. Bananflugans genom är cirka 180 miljoner baspar stort och enligt data från 2023 i modellorganismdatabasen FlyBase har forskare identifierat 13 986 proteinkodande gener (Bosco et al., 2007). Genomet är fördelat på fyra kromosompar varvid det första utgörs av sexkromosomerna X och Y, medan det andra, tredje och fjärde kromosomparet utgörs av autosomer (Hales et al., 2015). Majoriteten av generna finns på X-kromosomen och på de längre autosomerna (kromosom 2 och 3, vars vänstra respektive högra "armar" benäms 2L, 2R, 3L och 3R). De resterande kromosomerna, det vill säga Y-kromosomen och den pyttelilla autosomen (kromosom 4), består främst av heterokromatin. Den enkla fördelningen av generna förenklar utförandet av genetiska korsningar.

Historiskt sett har bananflugan som modellorganism bidragit med viktiga upptäckter. Det är oklart när de första experimenten med bananflugan inleddes, men då en amerikansk vetenskapsman vid namn Thomas Morgan upprättade det som kom att bli hans berömda "flugrum" och i bananflugan bevisade den kromosomala teorin om ärftlighet blev *Drosophila melanogaster* en populär modellorganism (Morgan, 1915). Morgans arbete om att arvsanlagen är lokaliserade i kromosomerna godtogs och belönades år 1933 med Nobelpriset i fysiologi eller medicin (*All Nobel Prizes in Physiology or Medicine*, 2023). Fram tills idag har ytterligare fyra Nobelpris tilldelats forskare som studerar bananflugan: Herrman Muller belönades år 1946 för sitt arbete

som bevisade att röntgenstrålning är mutagent och att mutationerna kan gå i arv. År 1995 tilldelades forskarna Christiane Nüsslein-Volhard, Edward Lewis och Eric Wieschaus Nobelpriset för deras upptäckt av en samling gener som kontrollerar den tidiga utvecklingen i ett embryo. Jules Hoffman blev år 2011 Nobelpristagare för sina upptäckter om det medfödda immunförsvaret och år 2017 belönades Jeffrey Hall, Michael Rosbash och Michael Young för sina beskrivningar om den molekylära mekanismen som styr dygnsrytmen. Eftersom bananflugan i över hundra år har använts som modellorganism har en stor mängd information erhållits.

2.2 Molekylärbiologiska tekniker och verktyg för genetisk analys av bananflugan

Det finns ett brett utbud av molekylärbiologiska tekniker som kan användas för att studera olika aspekter av bananflugans genom. För att studera vilken effekt specifika gener har i bananflugan kan transgener med olika egenskaper genereras. För modifiering och integrering av specifika gener används system som utnyttjar integraser men även andra tekniker kan tillämpas i *Drosophila*, såsom CRISPR/Cas9-systemet (eng. clustered regularly interspaced short palindromic repeats). Uttrycket av genen av intresse kan kontrolleras exempelvis med Gal4/UAS-systemet och det syntetiserade proteinet kan styras till specifika ställen i cellen, såsom till cellkärnan om en kärnlokaliseringsignal inkluderas. För att möjliggöra detektering av genprodukterna kan nukleotidsekvenser som kodar för detekterbara protein eller peptider inkluderas i transgenerna. Ett känt exempel är grönt fluorescerande protein (GFP) som tack vare sin fluorescens kan detekteras då den belyses med UV-ljus (Chalfie et al., 1994). GFP-märkningen är ett relativt stort protein, cirka 28 kDa, vilket är över hälften så stort som det protein som studeras i den här pro gradu-avhandlingen (Kenny är cirka 44 kDa). Det är möjligt att GFP-märkningen på grund av sin storlek påverkar egenskaperna hos proteinet det är kopplat till och därför kan det vara fördelaktigt att välja mindre markörer. Exempel på små epitopmarkörer är hemagglutin (HA) från influensavirus och V5-markören som härstammar från fosfo- och V-proteiner i simianvirus 5 (Green et al., 1982; Hanke et al., 1992). Till skillnad från den stora GFP-märkningen är HA-märkningens storlek endast 1,1 kDa och V5-märkningens 1,4 kDa. De tre ovan nämnda markörerna kan bland annat detekteras med

Western blot, flödescytometri, immunoprecipitering och immunofluorescens. Därtill underlättar markörerna isolering av proteinet av intresse.

2.2.1 Modellorganismdatabasen FlyBase underlättar genetisk analys av bananflugan

FlyBase är den främsta modellorganismdatabasen för *Drosophila melanogaster* och dess syfte är att centralisera informationen som finns tillgänglig om bananflugan och göra den åtkomlig för forskare världen över (Gramates et al., 2022). I FlyBase finns data om *Drosophilas* gener och genom samt länkar till publikationer. Databasen inkluderar en samling verktyg som hjälper forskare att hitta specifik information. I databasen finns information från genomik-, transkriptomik- och proteomikstudier vilket bidrar med information om gener, deras homologer och koppling till sjukdomar hos människan, med mera. En annan funktion modellorganismdatabasen uppfyller är att bidra med sammanfattningar om specifika temaområden. Dessa sammanställningar organiserar informationen och gör den lättillgänglig. Bland annat finns det sammanställningar över gengrupper, signaleringsräckor, experimentella tekniker och tillgängliga fluglinjer.

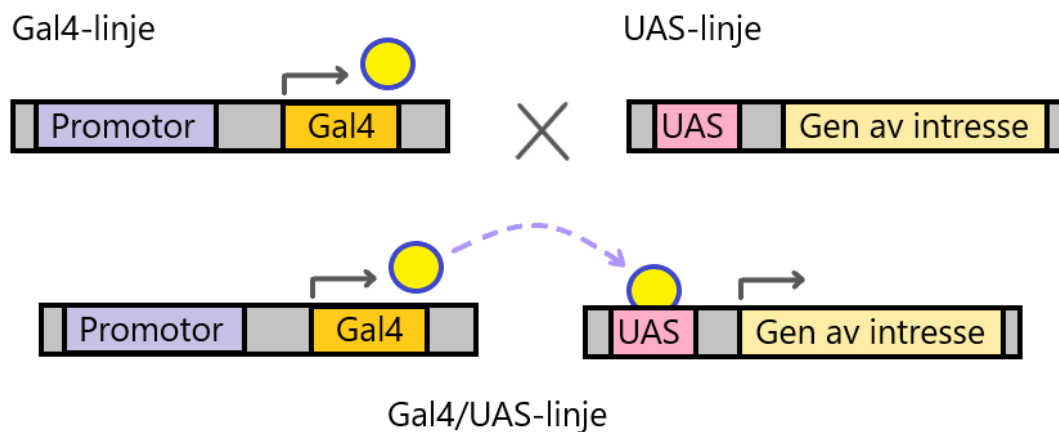
2.2.1 Användningen av balanserarkromosomer i genetiska korsningar

För att underlätta skapandet av flugor med önskade genotyper används så kallade balanserarkromosomer (Miller et al., 2019). Dessa balanserare är designade att uppvisa tre egenskaper som gör dem användbara i genetiska korsningar: För det första bär de på kromosomala inversioner, vilket innebär att balanserarkromosomer undviker genetisk rekombination med homologa kromosomer (Crown et al., 2018; Muller, 1918). Detta innebär att inga nya genkombinationer skapas mellan kromosomerna och att de därmed hålls intakta. För det andra bär balanserarna ofta på markörmutationer som underlättar identifiering och sållning av de flugor som bär på balanserarkromosomen (Ward, 1923). Dessa mutationer innefattar *white* på X-kromosomen som bestämmer ögonfärgen, *Curly* på kromosom 2 som påverkar formen på vingarna samt *Stubble* på kromosom 3 som påverkar längden på borsthåren (Dobzhansky, 1930; Morgan, 1910; Ward, 1923). För det tredje är balanserarkromosomer konstruerade så att de bär på minst en mutation som är recessivt letal för flugan (Araye & Sawamura, 2013; Muller, 1918). Detta gör att ingen avkomma kommer att vara homozygot för balanserarkromosomen och därmed

undviks problemet att genen av intresse med tiden försvinner ur populationen. Exempel på allmänna balanserarkromosomer är den andra multipelt inverterade 2 (eng. second multiply inverted, SM) för den andra kromosomen, samt den tredje multipelt inverterade 3 och 6 (eng. third multiply inverted, TM) för den tredje kromosomen.

2.2.2 Gal4/UAS-systemet

För att styra uttrycket av specifika gener hos bananflugan kan Gal4/UAS-systemet användas (Brand & Perrimon, 1993; Duffy, 2002; Fischer et al., 1988). Gal4 är en transkriptionsfaktor som ursprungligen härstammar från jäst (Giniger et al., 1985). Transkriptionsfaktorn binder till den förstärkande gensekvensen UAS (eng. upstream activation sequence) och aktiverar därmed transkription av genen som kommer nedströms om UAS-sekvensen (figur 1). Promotorn som styr uttrycket av Gal4 kommer indirekt att reglera uttrycket av den UAS-kopplade genen. Denna funktionsprincip möjliggör kontroll av genuttrycket, både tidsmässigt och celltypspecifikt. En förutsättning för användningen av Gal4/UAS-systemet för detta ändamål är att det finns en känd promotor som kan reglera Gal4-uttrycket på ett önskvärt sätt.



Figur 1. Gal4/UAS-systemet kan kontrollera uttrycket av gener av intresse. Den positiva transkriptionsregleraren Gal4 förmår binda till den förstärkande gensekvensen UAS, vilket aktiverar gentranskriptionen för genen nedströms om UAS-sekvensen. Promotorn som reglerar uttrycket av Gal4 kommer därmed indirekt att reglera uttrycket av den UAS-kopplade genen. För att skapa flugor som utnyttjar Gal4/UAS-systemet korsas en drivarlinje som bär på Gal4-elementet med en fluglinje som bär på UAS-elementet. UAS = eng. upstream activation sequence.

Gal4/UAS-systemet används också för att undersöka funktionen av promotorer (Duffy, 2002). Gal4-uttrycket sätts då under reglering av promotorn som studeras och UAS-elementet kopplas till en markör som kan detekteras. Genom att studera uttrycket av markören kan funktionen hos promotorn undersökas. Denna experimentella uppställning kan exempelvis ge information om i vilken celltyp promotorn är aktiv samt vid vilken tidpunkt eller under vilka förhållanden promotorn aktiveras.

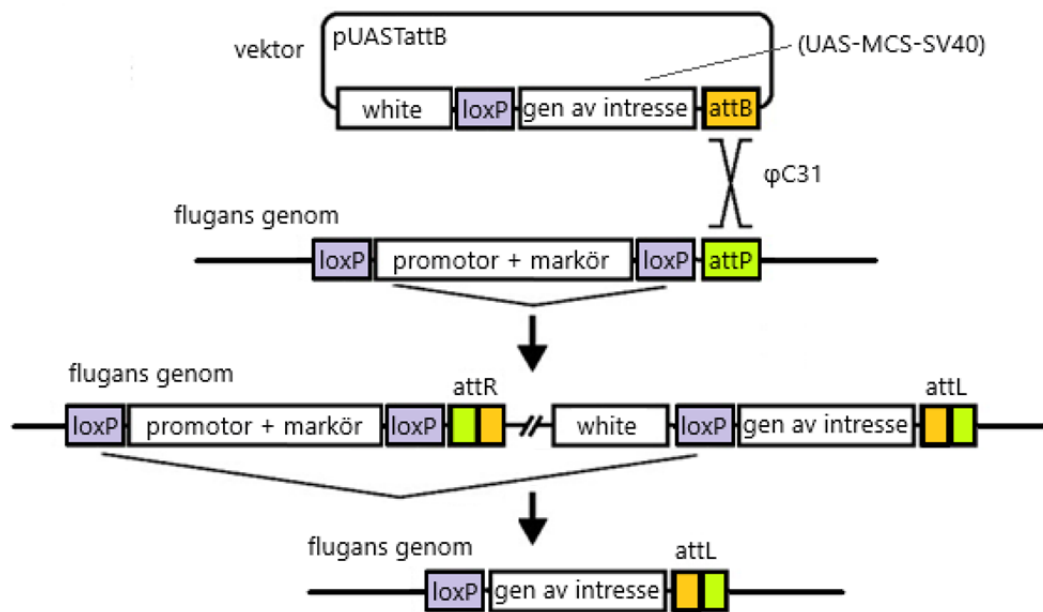
2.2.3 Integrering av transgener i bananflugans genom: Användning av plasmiden

pUASTattB

En övervägande orsak till att bananflugan blev en attraktiv modellorganism för genetiska studier var upptäckten och utvecklingen av tekniker som tillåter integrering av transgener i bananflugans genom. Bland de första och mest framstående teknikerna för transformering av flugembryon grundar sig på det så kallade P-elementet. P-elementet är en transposon som förmår flytta sig i genomet (Rubin et al., 1982). Ursprungligen bestod P-element av inverterade upprepningar som krävs för integreringen i genomet samt en gen som kodar för ett transposasenzym som katalyserar processen. Efter en del modifieringar kunde P-elementet användas som en vektor för att föra in transgener i bananflugans genom, om än på ett slumpmässigt sätt (Rubin & Spradling, 1982). Därefter har bland annat systemets transformationseffektivitet optimerats och nya element med liknande tillämpningar har upptäckts.

För att föra in transgener på förutbestämda ställen i bananflugans genom kan ett system som utnyttjar integraset ϕ C31 användas (Groth et al., 2004). Systemet är utvecklat för att med hög transformationseffektivitet kunna användas för storskalig integrering av transgener i en organisms genom (Bischof et al., 2007). Systemet utnyttjar ϕ C31-integraset förmåga att på ett sekvensberoende sätt katalysera rekombination mellan en bakteriell gensekvens kallad attB samt en gensekvens som kallas attP, vilket härstammar från en bakteriofag (Thorpe et al., 2000). Principen går ut på att en vektor (exempelvis pUASTattB), som innehåller attB-rekombinationssekvensen samt en genkasset med en önskad transgen, injiceras i flugembryon vars genom innehåller ett landningsställe som inkluderar attP-rekombinationssekvensen (figur 2) (Bischof et al., 2007). Integraset ϕ C31 förmedlar därefter rekombination mellan attB och attP vilket

leder till att vektorn integreras i flugans genom. Vektorn samt landningsstället i flugans genom innehåller även loxP-sekvenser, vars rekombination kan initieras genom att tillföra rekombinaset Cre (Sternberg & Hamilton, 1981). Rekombination mellan dessa loxP-sekvenser kan utföras för att spjälka bort den mellanliggande DNA-sekvensen som utgörs av plasmidstommen och landningsstället. Kvar blir då en loxP-sekvens, genkassetten som innehåller transgenen samt en attL-sekvens (figur 2).



Figur 2. Integrering av pUASTattB i attP-landningsställen i bananflugans genom. Vektorn pUASTattB innehåller markören white, rekombinationssekvensen loxP, genkassetten UAS-MCS-SV40, samt rekombinationsstället attB. Genkassetten UAS-MCS-SV40 innehåller multipla kloningsställen i vilket genen av intresse införs. I bananflugans genom har ett landningsställe insatts, vilket består av loxP, promotor+markör samt av rekombinationsstället attP. Integreringen sker genom rekombination mellan attP och attB med hjälp av integraset ϕ C31. Rekombination mellan loxP ställena kan vid behov utföras antingen före eller efter integreringen av pUASTattB (utmärkt med V-formad linje mellan loxP-sekvenser). Figuren är modifierad från (Bischof et al., 2007).

Företaget Bestgene Inc. erbjuder en tjänst för mikroinjektion av flugembryon. De har tillgång till olika fluglinjer som bär på landningsstället som innehåller rekombinationsstället attP och år 2023 erbjuder de nio olika integrationsställen: Ett på X-kromosomen, fyra på kromosom 2, tre på kromosom 3 och ett på kromosom 4. Företaget sållar fram de flugor i vilka det skett en lyckad integrering av pUASTattB-plasmiden med det önskade genkonstruktet. I deras tjänst ingår inte Cre/loxP-tjänsten som skulle avlägsna de överflödiga gensekvenserna som är belägna uppströms om

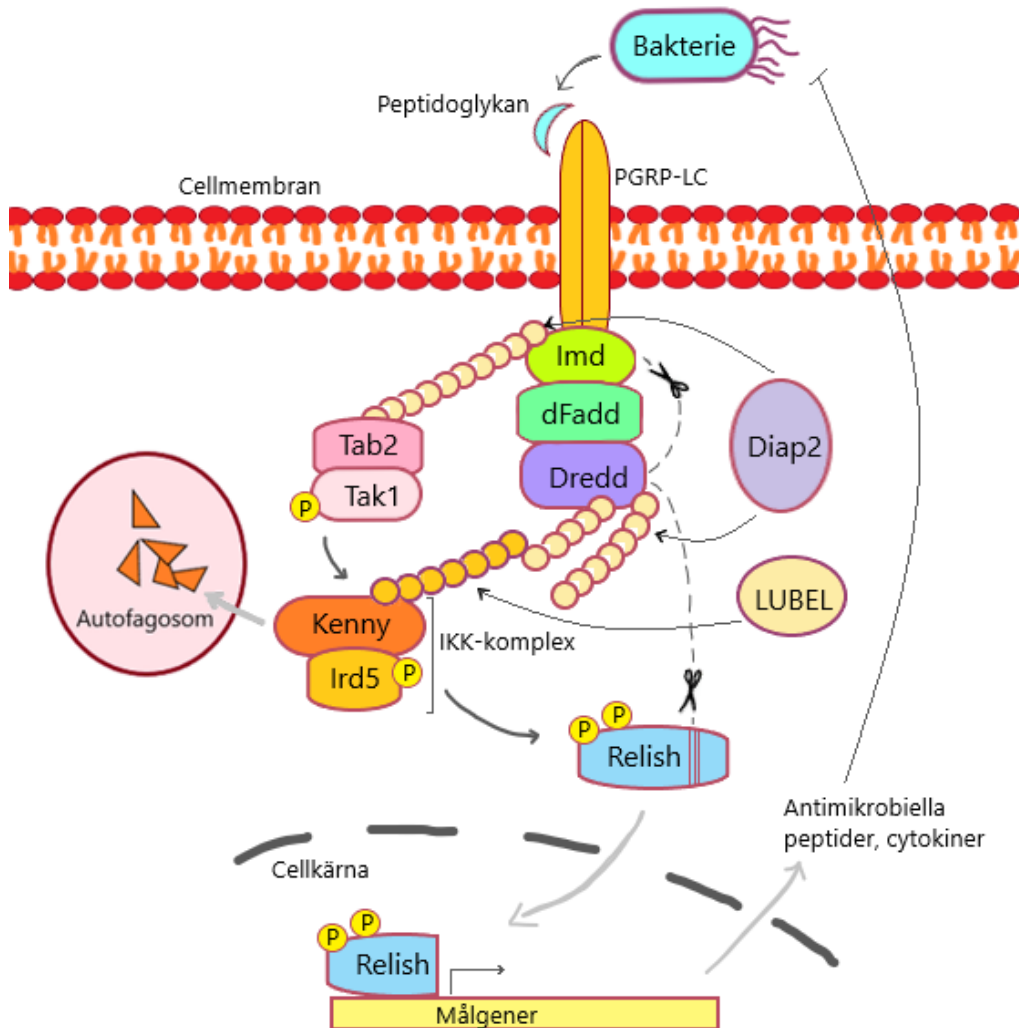
genkassetten med den önskade transgenen. Åtgärden är i de flesta fall inte nödvändig eftersom dessa överflödiga genskvenser inte märkvärdigt inverkar på flugornas livsduglighet och inte heller stör experimentella uppsättningar.

2.3 Imd-signaleringsräckan svarar för flugans immunförsvar mot Gramnegativa bakterier

Flugans molekylära immunförsvar regleras huvudsakligen av två signaleringsräckor: Immunbrist-signaleringsräckan (eng. immune deficiency signaling pathway, Imd) och Toll-signaleringsräckan (Liu et al., 2017; Myllymäki et al., 2014). Imd-signaleringsräckan hos *Drosophila* ansvarar för aktiveringen av NF- κ B-transkriptionsfaktorn Relish (Myllymäki et al., 2014). Denna immunsigaleringsräcka aktiveras av Gramnegativa bakterier och resulterar i uttryck av cytokiner och antimikrobiella peptider. Imd-signaleringsräckan kontrollerar uttrycket av de flesta antimikrobiella peptiderna hos bananflugan, och signaleringsräckan är således oumbärlig för flugans immunförsvar mot bakterier. Funktionsprinciperna för signaleringsräckan är också bevarade genom evolutionen och dess motsvarighet hos däggdjur är tumörnekrosfaktorreceptorersigaleringsräckan (Buchon et al., 2014).

Imd-signaleringsräckan illustreras i figur 3. Imd-signaleringsräckan aktiveras då en receptor i cellmembranet (PGRP-LC; eng. peptidoglycan recognition protein LC) känner igen peptidoglykan som finns i bakteriers cellvägg (Choe et al., 2002). Detta leder till rekrytering av ett signaleringskomplex som består av dödsdomänproteinet Imd, adaptorproteinet *Drosophila* Fas-associerad dödsdomän (dFadd) och kaspaset dödsrelaterat ced-3/Nedd2-lik kaspas (Dredd) (Georgel et al., 2001; Leulier et al., 2002). Därefter aktiveras Dredd av ett E3-ligas vid namn *Drosophila* inhibitor av apoptos 2 (Diap2) genom K63-länkad ubikvitinering (Meinander et al., 2012). Dredd klyver därefter Imd så att ett bindningsställe för Diap2 exponeras (Kim et al., 2014). Rekrytering av Diap2 resulterar i ubikvitinering av Imd, som då erbjuder ett bindningsställe för TAK1-associerat bindningsprotein 2/TGF- β aktiverat kinas 1 -komplexet (Tab2/Tak1-komplexet) (Kleino et al., 2005; Paquette et al., 2010). Ett annat E3-ligas, LUBEL, inducerar M1-länkad ubikvitinering som rekryterar bland annat I-KappaB-kinaskomplexet (IKK-komplexet) (Aalto et al., 2019). Tab2/Tak1-komplexet fosforylerar, och därmed aktiverar, IKK-komplexet (Lu et al., 2001). IKK-

komplexet kan då i sin tur fosforylera transkriptionsfaktorn Relish på flera ställen och därmed aktivera transkriptionsfaktorn (Ertürk-Hasdemir et al., 2009). Slutligen, för att Relish ska kunna translokera till cellkärnan måste en inhiberande C-terminal del klyvas bort (Stöven et al., 2003). Klyvningen av Relish utförs av Dredd (Kim et al., 2014). Under basala förhållanden bryts IKK-komplexet ner i autofagosomen, vilket är ett av många sätt som aktiviteten av Imd-signaleringsräckan regleras på (Tusco et al., 2017).

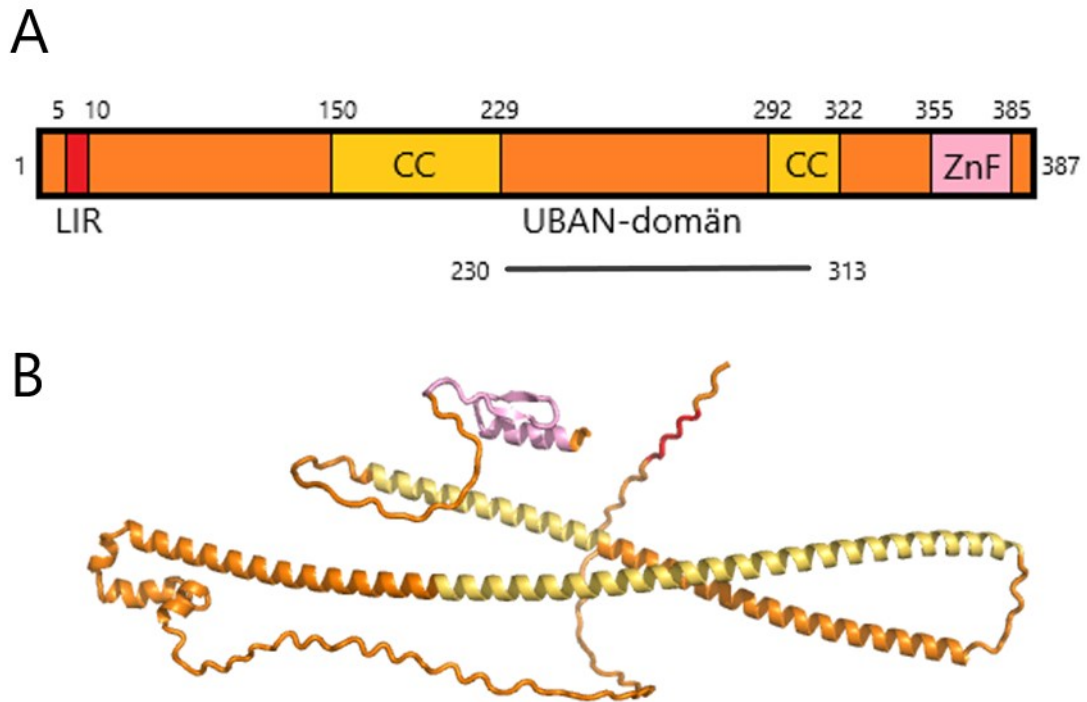


Figur 3. Imd-signaleringsräckan hos *Drosophila melanogaster* aktiverar transkriptionsfaktorn Relish. En membranreceptor (PGRP-LC) känner igen peptidoglykan, vilket då sätter igång en kaskad av molekylära interaktioner som slutligen aktiverar transkriptionsfaktorn Relish. Kaspaset Dredd ansvarar bland annat för att klyva Imd och Relish. Kenny utgör tillsammans med Ird5 IKK-komplexet som fosforylerar Relish, vilket behövs för att effektivisera uttrycket av transkriptionsfaktorns målgener. Under basala förhållanden nedbryts Kenny i autofagosomen. Tjocka mörkgrå pilar visar fosforylering medan tjocka ljusgrå pilar visar passage genom membran (här: autofagosomens membran och kärnmembranet). Svarta saxar symboliserar proteolytisk klyvning. Figuren är modifierad från (Myllymäki et al., 2014)

2.4 Kenny (IKK γ) är en nyckelreglerare av Imd-signaleringsräckan

Kenny är en viktig reglerare av Imd-signaleringsräckan och är homolog till NF- κ B-essentiell modulerare (eng. NF- κ B essential modulator, NEMO) hos däggdjur (Silverman et al., 2000). Kenny kallas även IKK γ och är som namnet antyder en del av IKK-komplexet. Detta proteinkomplex är en reglerare av NF- κ B transkriptionsfaktorn Relish i flugan, varvid Kennys funktion är att fungera som ställning för kinaskomplexet. IKK-komplexet bidrar till aktiveringen av Relish genom att fosforylera den på flera ställen (Silverman et al., 2000). Fosforylering av transkriptionsfaktorn är dock inte nödvändig för dess klyvning utan behövs för att förstärka gentranskriptionen av NF- κ B-målgenerna (Ertürk-Hasdemir et al., 2009). Fosforyleringen gör nämligen att transkriptionsfaktorn mer effektivt kan rekrytera RNA-polymeras II som behövs för initiering av gentranskriptionen.

Kenny innehåller en N-terminal LC3-samverkande region (eng. LC3 interacting region, LIR), en ubikvitinbindande domän, två ”coiled coil”-superhelixstrukturer, ett zinkfingermotiv samt en ubikvitinbindande i ABIN- och NEMO-domän (UBAN-domän) (Tusco et al., 2017) (figur 4). Funktionen av LIR-domänen är att styra Kenny, och därmed hela IKK-komplexet, till autofagosomen för nedbrytning under basala förhållanden (Tusco et al., 2017). Med andra ord bryts Kenny ner under normala omständigheter för att undvika en överaktivering av NF- κ B-signaleringsvägen. Hos människan är NEMO negativt reglerad genom nedbrytning i proteasomen, antingen genom K48-länkad ubikvitinering eller bildandet av ett komplex tillsammans med proteinet p62 (Chathuranga et al., 2020; Zhang et al., 2017). UBAN-domänen i NEMO och Kenny binder selektivt Met1-länkade ubikvitinkedjor och specifika aminosyror i denna domän har visats vara essentiella för att fullborda NF- κ B-signaleringsvägen *in vivo* (Aalto et al., 2019; Rahighi et al., 2009).



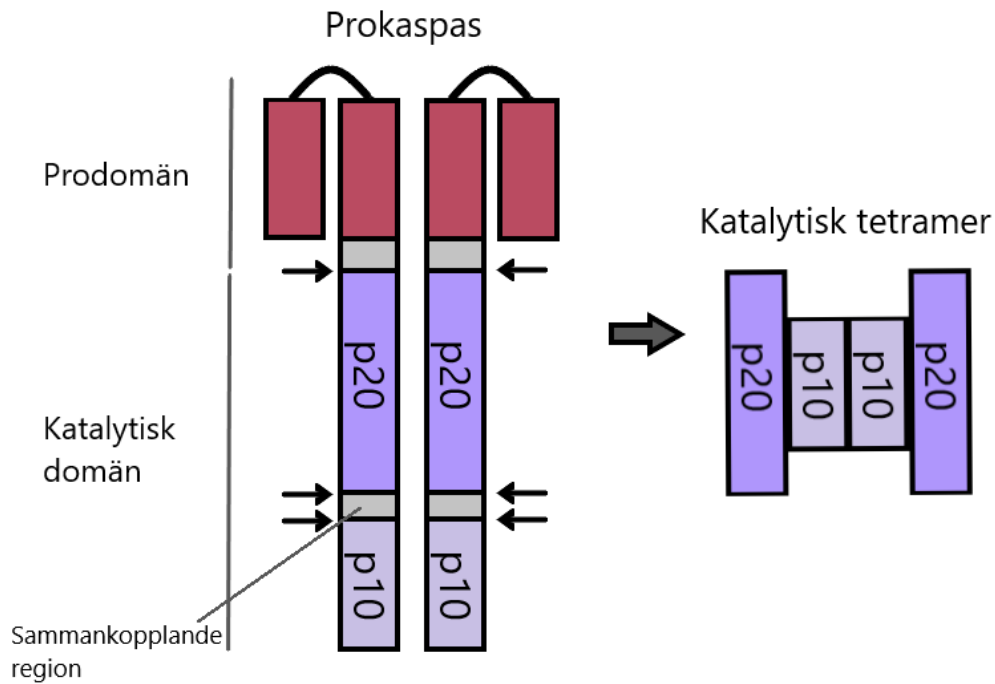
Figur 4. Olika domänstrukturer i Kenny. **A)** Kenny innehåller en LIR-domän vars uppgift är att fungera som signaleringssekvens för autosomal nedbrytning. UBAN-domänen binder Met1-länkade ubikvitinkedjor. LIR: LC3-interagerande region; CC: coiled coil (en tertiärstruktur som bildas då två eller flera alfahelixar tvinnar sig runt varandra och bildar en superhelix); UBAN: ubikvitinbindande i ABIN- och NEMO-domän; ZnF: zinkfingermotiv. Figuren är modifierad från (Tusco et al., 2017). **B)** Den uppskattade proteinstrukturen för Kenny genererades av AlphaFold (AF-Q9GYV5-F1). De olika domänen som indikeras i A) är färglagda med motsvarande färger i proteinstrukturen. Figuren är framställd med PyMOL.

2.5 Kaspaser hos människan och bananflugan

Kaspaser är cysteinberoende proteaser som genom endoproteolys klyver proteiner efter aminosyran asparaginsyra (Lamkanfi et al., 2002; Van Opdenbosch & Lamkanfi, 2019). Kaspaser är främst kända för sin medverkan i processer som leder till apoptos men de förmedlar även celldöd genom pyroptos, nekroptos och autofagi (Shalini et al., 2015). Människan har tolv stycken kaspaser och bananflugan har sju stycken (Julien & Wells, 2017; Kumar & Doumanis, 2000). Kaspaserna har numera upptäckts ha fler uppgifter utöver förmågan att förmedla celldöd, bland annat är de involverade i inflammationssignalering och cellproliferering (Van Opdenbosch & Lamkanfi, 2019). Under basala förhållanden existerar kaspaser som zymogener och befinner sig därmed i en inaktiv form i cytoplasman. Domänstrukturen för pro-kaspaser utgörs av en N-terminal prodomän av varierande storlek och en katalytisk domän som utgörs av en

stor och en liten underenhet kallade p20 respektive p10. Kaspaser med långa prodomän innehåller interaktionsställen för proteiner och kan då rekryteras till multiproteinkomplex där de aktiveras (Mace & Riedl, 2010).

Traditionellt indelas kaspaser som förmedlar apoptos in två grupper beroende på deras roll i cellsignaleringskaskaden: Initierande kaspaser fungerar uppströms i signaleringskaskaden medan utförande kaspaser fungerar nedströms i signaleringskaskaden (Lamkanfi et al., 2002). De initierande kaspaserna aktiveras i början av apoptosprocessen och har i uppgift att aktivera de utförande kaspaserna genom klyvning. De utförande kaspaserna klyver sedan cellulära proteiner vilket slutligen leder till programmerad celledöd. Under basala förhållanden existerar initierande kaspaser som monomerer som måste genomgå dimersiering för att aktiveras. Utförande kaspaser existerar däremot som inaktiva dimerer som måste klyvas för att aktiveras. För att initierande kaspaser efter dimeriseringen ska erhålla sin katalytiska funktion inom apoptosförmedling sker en rad klyvningar genom autoproteolys (Julien & Wells, 2017). I och med autoproteolysen klyvs den katalytiska domänen för vardera kaspas i två underenheter, p20 och p10, som sedan kan återförenas i en ny konformation och bilda en katalytiskt aktiv heterotetramer (figur 5). Prodomänen från respektive kaspas kan också klyvas också bort. Hos initierande kaspaser utgörs prodomänen av kaspasrekryterande domän (CARD) eller av dödseffektordomän (DED). Prodomänen hos utförande kaspaser är däremot mycket mindre och innehåller inga interaktionsställen för andra proteiner.



Figur 5. Aktivering av initierande kaspaser genom dimerisering. Initierande kaspaser befinner sig under basala förhållanden i en inaktiv form som prokaspasmonomerer. Den katalytiska domänen består av två underenheter, p20 och p10 som kopplas ihop av en flexibel sammankopplande region. Prodomänen i prokaspaserna förmedlar dimeriseringen av två stycken prokaspasmonomerer, varvid autoproteolys leder till att de två katalytiska underenheterna separerar från varandra för att därefter kunna bilda en tetramerstruktur. Prodomänen kan också avlägsnas i processen. De små pilarna visar var autoproteolysen sker. Förkortningar: p20= den större underenheten i den katalytiska domänen, p10= den mindre underenheten i den katalytiska domänen. Figuren är modifierad från (Lavrik et al., 2003).

Kaspaser måste i regel klyvas för att kunna utföra sina funktioner inom apoptosförmedling. Intressant nog behövs dock ingen interdomänklyvning för att möjliggöra katalytisk aktivitet för en del andra funktioner. Till exempel förmedlar kaspas-8 LPS-inducerad B-lymfocytproliferering utan att kaspaset genomgår klyvning (Kang et al., 2008). Kaspaser har även visats ha proteasoberoende funktioner, exempelvis fungerar kaspas-8 som ställning för bildandet av ett pro-inflammatoriskt signaleringskomplex som leder till induktion av NF- κ B (Henry & Martin, 2017).

Bananflugan har sju olika kaspaser, varvid tre av dem har långa prodomän vilket antyder att de är initierande kaspaser, medan de övriga fyra kaspaserna har korta prodomän som indikerar att de är utförarkaspaser (Kietz & Meinander, 2022; Kumar & Doumanis, 2000). I det här pro gradu-projektet studerades kaspaset Dredd som är en viktig reglerare av Imd-signaleringsräckan. Dredd har en lång prodomän och hör

därmed till gruppen initierande kaspaser (Kumar & Doumanis, 2000). Prodomänen i Dredd består av två dödseffektordomän som tillsammans med dess övriga struktur gör Dredd till en ortolog till människans kaspas-8 och -10 (Lamkanfi et al., 2002). Dredd förmedlar apoptos och krävs för flugans immunförsvar mot Gramnegativa bakterier (Kumar & Doumanis, 2000; Stöven et al., 2003). I *in vitro*-experiment har Dredd visats klyva både Imd och Relish i Imd-signaleringsräckan och flugor som uttrycker muterade former av Dredd kan inte aktivera transkriptionsfaktorn NF- κ B (Ertürk-Hasdemir et al., 2009; Kim et al., 2014; Stöven et al., 2000, 2003). Dredd har även *in vivo* visats klyva Relish (Meinander et al., 2012). I och med att Dredd klyver den här typen av substrat har kaspaset även egenskaper som associeras med utförarkaspaser. En studie som utfördes *in vitro* och i celler har även visat att interdomänklyvning av Dredd inte behövs för dess funktion att klyva Imd och Relish (Kim et al., 2014). Motsvarigheten till Dredd hos människan, kaspas-8, har visats främja aktiveringen av NF- κ B och – som tidigare nämnts – behöver inte heller klyvas för att utföra en del av sina icke-apoptosrelaterade funktioner, såsom att fungera som ställningsprotein för signaleringskomplex (Henry & Martin, 2017; Hu et al., 2000; Kang et al., 2008).

3 Målsättning

Min hypotes var att Kenny och Dredd binder varandra och att den här samverkan leder till klyvning av Kenny. Denna klyvning kunde avlägsna signalsekvensen som leder till nedbrytning av Kenny, vilket därmed stabiliserar Kenny som då tillåter nedströms aktivering av Imd-signaleringsräckan. Inledningsvis verifierades hypotesen om att Dredd klyver Kenny och sedan fastställdes det var Kenny klyvs. Den andra delen gick ut på att studera ifall Dredd även klyver Kenny *in vivo*. I den tredje delen utvecklades verktyg för att kunna studera ifall klyvningen behövs för en fungerande immunrespons.

1. För att studera om Dredd klyver Kenny i cellen transfekterades dessa i *Drosophila* S2-celler, varvid klyvningen av Kenny iaktogs. För att undersöka vid vilket ställe Kenny klyvs studerades olika mutanter av Kenny, i vilka en asparaginsyra (D) har bytts ut till en glutaminsyra (E). Kenny-mutanterna (D>E) uttrycktes tillsammans med Dredd i S2-celler för att undersöka ifall mutanterna klyvs eller inte.
2. För att studera om klyvningen av Kenny utförs av Dredd *in vivo* studerades fenomenet i bananflugans tarm. Jag använde mig av tre olika strategier: Först studerades effekten av pan-kaspasinhhibitorn Emricasan på klyvningen av Kenny. Därtill undersöktes det ifall överuttryck av Dredd påverkar Kenny-klyvningen. Slutligen undersöktes det om flugor med katalytisk Dredd-mutantbakgrund kommer att inverka på klyvningen av Kenny.
3. För att i framtida studier kunna studera regleringen av Kenny och dess roll i immunförsvaret skapades det med hjälp av molekylär kloning transgena flugor som uttrycker vildtyps och mutant Kenny. De olika Kenny-mutanterna klonades in i plasmidstommen pUASTattB som möjliggör integrering av transgener i bananflugans genom.

4 Material och metoder

4.1 Transfektion av S2-celler

Schneider2-celler (S2-celler) är en cellinje som härstammar från embryonala celler isolerade från *Drosophila melanogaster* (Ivey-Hoyle, 1991). S2-celler växer som ett enskiktat lager och är lätta att underhålla eftersom de är semi-adherenta och cellkulturen upprätthålls vid rumstemperatur. Som cellodlingsmedium för S2-cellerna (Invitrogen, USA) användes Schneiders insektmedium (Sigma-Aldrich, USA) som kompletterats med 10 % fetalkalvserum (Biowest, Frankrike), 1 % L-glutamin (Gibco, USA) och 0,5 % penicillin/streptomycin (Gibco, USA). S2-celler används bland annat som uttryckssystem då man vill studera proteininteraktioner i *Drosophila*-celler. En fördel med S2-celler är att de kan transfekteras med olika slags plasmider och uttrycka dem samtidigt. I de experiment som utförs i cellerna används pMT-plasmider samt en pAc-plasmid för att uttrycka proteiner. Dessa pMT-plasmider innehåller promotorn metallotionein (MT) som kan aktiveras genom tillsats av kopparsulfat till cellodlingsmediet (M. K. Olsen et al., 1992).

Transfektionen utförs i ett sterilt utrymme med Effectene-transfektionsreagens (Qiagen, Nederländerna). Proceduren inleds med att fördela S2-celler i cellodlingsplattor. Konfluenta S2-celler spolats lös från cellodlingsflaskan och överförs till Falconrör som sedan centrifugeras i 4 minuter med 1000 rpm vid rumstemperatur. Supernatanten avlägsnas och cellpelleten löses upp i cellodlingsmedium. De resuspenderade S2-cellerna tillsätts till cellodlingsplattorna. Därefter förbereds transfektionsmixen som består av transfektionsbuffert, 0,2 eller 1,0 µg av respektive plasmid-DNA, förstärkande buffert (eng. Enhancer buffer) och Effectene-reagens. Transfektionsmixen inkuberas i 10 minuter och tillsätts sedan till cellerna för att inleda transfektionen. Cellerna inkuberas därefter i 16 timmar vid rumstemperatur, varvid cellodlingsmediet byts ut till färskt medie. De transfekterade cellerna inkuberas ytterligare i 7 timmar, varvid kopparsulfatlösning tillsätts till en slutlig koncentration på 500 µM för att initiera uttrycket av de proteiner som regleras av promotorn MT. Cellerna skördas 16 timmar efter att uttrycket initierats och för att studera de överuttryckta proteinerna mer ingående kan ett celllysat framställas.

Plasmiderna pMT/Flag-His (kontrollplasmid), pMT-V5-Kenny-V5 och pAc-DIAP2 erhöles av professor Pascal Meier institutet för cancerforskning i London, Storbritannien. Plasmiden pMT-Kenny-HA skapades med pMT-V5-Kenny-V5 som templat. Plasmiden pMT- LUBEL RBR-LDD skapades med en syntetiskt, kodonoptimerad LUBEL RBR-LDD (GeneScript, USA) som templat (Aalto et al., 2019).

4.2 Framställning av celllysat

Cellerna som ska lyseras sköljs lös från cellodlingsplattan de växer i och överförs till centrifugeringsrör. Cellsuspensionen centrifugeras vid 4 °C med 1000 rpm i 5 minuter. Supernatanten avlägsnas och cellpelleten löses upp i kall fosfatbuffrad saltlösning (eng. phosphate-buffered saline, PBS, Medicago AB, Sverige) och överförs till mikrocentrifugtuber. Cellerna centrifugeras vid 12 000 g i 15 sekunder och sedan avlägsnas supernatanten. Cellerna lyseras genom att lösa upp cellpelleten i S2-lyseringsbufferten bestående av 50 mM Tris-bas (Sigma-Aldrich, USA), 150 mM NaCl (Sigma, USA), 1 % Triton X-100 (Honeywell Fluka, USA), 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich, USA) och 10 % glycerol (Sigma-Aldrich, USA) som supplementerats med 5 mM NEM (Sigma-Aldrich, USA), 5 mM kloroacetamid (Aldrich, USA), 1 mM DTT (Sigma, USA) samt Pierce™ proteas- samt fosfatasinhibitor (Thermo Scientific, USA) och inkuberas på is i 10 minuter. De lyserade cellerna centrifugeras sedan vid 4 °C med 12 000 g i 10 minuter. Därefter tas supernatanten med proteinerna tillvara, vilken kan analyseras som den är eller vidare studeras genom exempelvis affinitetsanalyser. Ifall endast lysatet ska analyseras denatureras provet med Laemmli-buffert som består av 10 % glycerol (Sigma-Aldrich, USA), 1 % SDS (Sigma, USA), 0,06 M Tris-bas (Sigma-Aldrich, USA), 0,005 % bromfenolblå (Sigma-Aldrich, USA) och 3 % betamerkaptoetanol (Sigma-Aldrich, USA). Proven kokas i 5 minuter och förvaras därefter vid 4 °C.

4.3 Affinitetsanalys för precipitering av proteiner

För att studera ifall två proteiner associerar med varandra kan affinitetsanalyser utföras. Då proteiner fälls ut med hjälp av antikroppar kallas det för immunoprecipitering. Ett alternativ till användningen av antikroppar är andra proteiner som har en affinitet för de proteiner som ska studeras. Dessa affinitetsproteiner kopplas

till agaroskolor eller dylikt för att få dem att fällas ut ur lösningen. I det här pro gradu-projektet utfördes två olika slags neddragningsanalyser för att studera interaktioner mellan proteiner: V5-immunoprecipitering som precipiterar V5-epitopmärkta proteiner samt en affinitetsanalys i vilken Met1-länkade ubikvitinkonjugat precipiteras.

4.3.1 V5-immunoprecipitering

Med V5-immunoprecipitering avses precipitering av V5-epitopmärkta proteiner med hjälp av antikroppar som är kopplade till agaroskolor. Cellysatet tillreddes i likhet med avsnitt 4.2 ”framställning av cellysat”, men innan tillsats av Laemmli utförs själva immunoprecipiteringen. V5-agaroskulorna tvättas genom att centrifugera ner dem med 1000 rpm i 1 minut, blanda ut dem med PBS och åter centrifugera ner dem med 1000 rpm i 1 minut, varvid supernatanten avlägsnas. V5-agaroskulorna blandas ut i S2-lyseringsbuffert och pipetteras sedan i mikrocentrifugrör. Till dessa tillsätts sedan cellysatet, varvid proven placeras på rotation i 4 °C i 2 timmar. V5-agaroskulorna och eventuella substrat som bundit till dem centrifugeras därefter ner med 1000 rpm i 1 minut och supernatanten avlägsnas. Därpå tvättas kulorna tre gånger med tvättbuffert för immunoprecipitering som består av 10 mM Tris-bas (Sigma-Aldrich, USA), 150 mM NaCl (Sigma, USA), 0,1 % Triton X-100 (Honeywell Fluka, USA) och 5 % glycerol (Sigma-Aldrich, USA) utspätt i vatten som renats genom omvänd osmos (eng. reverse osmosis, RO). Slutligen elueras provet med 4X Laemmli-buffert, kokas i 5 minuter och förvaras i kylskåp (4 °C).

4.3.2 Affinitetsanalys med GST-märkt Met1-SUB

För att studera protein-protein-interaktioner kan även andra proteiner än antikroppar användas. Funktionsprincipen för den här typen av affinitetsanalyser är att ett protein innehåller en affinitetsdomän som binder till en bindningspartner som är kopplad till exempelvis agaroskolor. Då kulorna fälls ut ur cellysatet som ska analyseras följer det bundna proteinet med. För att studera Met1-länkade ubikvitinkonjugat används det rekombinanta proteinet metionin1-länkat ubikvitinspecifikt ubikvitinbindande protein (eng. Met1-Ubiquitin-specific ubiquitin binder, Met1-SUB), vilket är kopplat till glutation-S-transferas (GST). Glutation-S-transferaset binder till tripeptiden glutation som är kopplat till agaroskolor. Met1-SUB tillverkades i labbet genom rekombination

i *E.coli* genom att transformera dem med en plasmid som kodar för NEMO-UBAN som kopplas till affinitetsmärknings GST. UBAN-regionen i NEMO binder specifikt till Met1-länkade ubikvitinkedjor (Rahighi et al., 2009). Plasmiden erhöles av professor Mads Gyrd-Hansen (Köpenhamns universitet, Danmark) och den ursprungliga framställningen av Met1-SUB beskrivs i en artikel av Fiil et al. (Fiil et al., 2013).

Celllysaten tillreddes i likhet med avsnitt 4.2 "framställning av celllys", men innan tillsats av Laemmli utförs själva affinitetsanalysen. Celllysaten blandades med glutation-separos 4B-kulor (GE Healthcare, USA) samt 30 µg Met1-SUB och inkuberades med rotation i cirka 16 timmar i 4 °C. Därefter tvättas kulorna tre gånger med tvättbuffert för immunoprecipitering och elueras med 4X Laemmli-buffert. Slutligen kokas proven i 5 minuter och förvaras vid 4 °C.

4.4 Western blot för detektering av specifika proteiner

Western blot används för att detektera proteiner med hjälp av antikroppar. Först separeras proteinerna enligt storlek genom en metod kallad SDS-polyakrylamidgelelektrofores (eng. sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE). Därefter flyttas proteinerna över till ett nitrocellulosamembran (Cytvia, USA) som sedan behandlas med antikroppar som kan detekteras.

4.4.1 Gelelektrofores för separering av proteiner

SDS-PAGE är en metod för att separera proteiner enligt storlek. Proven som denaturerats med Laemmli-buffert kokas 5 minuter, centrifugeras ner och pipetteras i 10 % akrylamidgeler. Akrylamidgelerna består av två delar, varvid den övre gelen består av 0,0625 M Tris-bas med pH 6,8 (Sigma-Aldrich, USA), 0,1 % SDS (Sigma-Aldrich, USA), 3,75 % akrylamid (BioRad, USA), 0,04 % APS (Sigma-Aldrich, USA), 0,02 % TEMED (Sigma, USA). Den undre gelen består av 0,375 M Tris-bas med pH 8,8 (Sigma-Aldrich, USA), 0,1 % SDS (Sigma-Aldrich, USA), 10 % akrylamid (BioRad, USA), 0,05 % APS (Sigma, USA) och 0,05 % TEMED (Sigma, USA). Gelerna placeras i en elektroforestank som fyllts med körbuffert som består av 25 mM Tris-bas med pH 8,3 (Sigma-Aldrich, USA), 192 mM glycin (Sigma-Aldrich)

och 0,1 % SDS (Sigma-Aldrich, USA) utspätt i RO-vatten. Då en likström slås på bildas ett elektriskt fält genom gelen. Körbufferten och den tvådelade akrylamidgelen med olika pH bildar ett diskontinuerligt buffersystem som ger upphov till skillnader i jonstyrka. Det här leder till att den övre gelen samlar ihop proteinerna så att de lägger sig på samma nivå i gelen, medan den undre gelen separerar proteinerna enligt storlek. I den undre gelen tar sig små proteiner lättare fram genom porerna i gelen och kommer därmed att vandra snabbare. Molekylviktsmarkören Precision Plus Protein Dual Colour Standard (Bio-Rad, USA) används för att kunna identifiera de olika proteinstorlekarna. Gelelektroforesen utförs med konstant spänning på 80 V tills molekylviktsmarkören börjar separera. Därefter höjs spänningen till 120 V och körs tills proteinerna separerat tillräckligt för vidare analys.

4.4.2 Överföring av proteiner till nitrocellulosamembran

Efter gelelektroforesen överförs proteinerna från akrylamidgelen till ett nitrocellulosamembran (Cytvia, USA). Detta görs genom att förbereda en så kallad överföringskasset: På vardera kasetthalva placeras ett par ”björntungor” och tre par Whatman-papper (Cytvia, USA) vilka dränkts i överföringsbuffert som består av 25 mM Tris-bas (Sigma-Aldrich, USA), 192 mM glycin (Sigma-Aldrich, USA), 0,01 % SDS (Sigma-Aldrich, USA), 20% metanol (Sigma-Aldrich, USA) utspätt i RO-vatten. Akrylamidgelen och nitrocellulosamembranet placeras i kassetten som vikts ihop. Kassetten placeras i en överföringskammare med överföringsbuffert så att akrylamidgelen kommer mot den negativa polen och membranet mot den positiva polen. Då likström slås på kommer de negativt laddade proteinerna vandra mot den positiva polen och fångas upp av membranet. Överföringen utförs vid 4 °C med 30 V i 2 timmar.

4.4.3 Detektering av proteiner genom kemiluminiscens

Efter överföringen kokas membranerna i 10 minuter för att ytterligare bryta ner proteinstrukturen i proven för att exponera domän som antikroppar kan binda till. Därefter blockeras membranerna med en fettfri mjölkblandning bestående av cirka 5 % mjölkpulver (Valio, Finland), PBS (Medicago AB, Sverige) och 0,2 % Tween (Sigma, USA) i 1 timme för att minska på eventuell ospecifik bindning av antikropparna till membranets yta. Membranerna tvättas sedan två gånger med en tvättbuffert som består

av PBS (Medicago AB, Sverige) och 0,2 % Tween (Sigma, USA). Därefter inkuberas membranerna med en primär antikropp som binder till proteinet av intresse i cirka 16 timmar vid 4 °C. Ett undantag till inkuberingstiden är den primära antikroppen som binder till Met1-ubikvitin, vilken inkuberas 1 timme vid rumstemperatur. Ofta tillhör de primära antikropparna klassen immunoglobulin G (IgG). Härnäst tvättas membranerna tre gånger innan den sekundära antikroppen tillsätts som då binder till den primära antikroppen. Den sekundära antikroppen är kopplad till en markör kallad pepparrotsperoxidas (eng. horseradish peroxidase, HRP). Detta enzym kommer att katalysera en oxidationsreaktion då substratet ECL (eng. enhanced chemiluminescence by luminol, Cytvia, USA) tillsätts. För att erhålla en starkare signal kan substratet SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (ThermoFisher Scientific, USA) användas. Reaktikonen ger upphov till en detekterbar kemiluminiscent signal. Signalen fångas upp på ljuskänsliga medicinska filmer (Fuji medical X-ray film, Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Tyskland) och framkallas i ett mörkerrum. Signalen framträder som mörka fläckar på filmen, och med hjälp av molekylvitsmarkören kan molekylvikten på proteinbanden fastställas. Styrkan på signalen korrelerar med en högre proteinhalt i provet.

De primära antikropparna som användes var anti-HA som tillverkats i råtta (klon 3F10, #11867423001, Roche, Schweiz), anti-V5 som tillverkats i mus (klon SV5-Pk1, #MCA1360, Serotec, Storbritannien), anti-GFP som tillverkats i kanin (ab6556, Abcam, Storbritannien), anti-Diap2 BIR3 SK34 som tillverkats i kanin (Leulier et al., 2006) och anti- β -aktin som tillverkats i kanin (4967S, Cell Signaling Technology, USA). Två olika antikroppar som binder till Met1-länkade ubikvitinkedjor användes: en kommersiell vid namn 1E3 ZooMAb ZRB2114 (Sigma, USA) samt en anti-Met1 IgG som producerats i labbet. Lösningarna för de primära antikropparna består av 1:500–1:2500 primär antikropp, 1 % bovins serumalbumin och 0,02 % natriumazid (NaN_3) upplöst i PBS (Medicago AB, Sverige). Den egengjorda Met1-antikroppen framställdes genom rekombination i samband med att transfektera celler med två plasmider som uttrycker Fab-fragmentets tunga respektive lätta kedja. Dessa plasmider erhöles från biträdande professor Rune Busk Damgaard (Danmarks tekniska universitet). Tillverkning av den ursprungliga Fab-fragmentet som binder Met1-

länkade ubikvitinkedjor, klon 1E3, beskrivs i en studie utförd av Matsumoto et al. (Matsumoto et al., 2012).

De sekundära antikropparna som används var anti-råtta IgG-HRP (#sc-2006, Santa Cruz Biotechnology, USA), anti-kanin IgG-HRP (#sc-2357, Santa Cruz Biotechnology, USA), anti-mus IgG-HRP (ab6789, Abcam, Storbritannien) och anti-människa IgG-HRP (#31410, Invitrogen, USA). Koncentrationen för samtliga sekundära antikroppar är 1:5000.

4.5 Uppfödning av flugor

Drosophila melanogaster föds upp i plaströr, matas med Nutri-fly Bloomington Formulation (Dutscher Scientific, Essex, Storbritannien) och upprätthålls vid rumstemperatur under en 12h:12h ljus-mörker-cykel. Flugmaten består av jäst, sojamjöl, majs mjöl, maltextrakt, agar, majssirap och konserveringsmedel (Tegosept [Apex, USA] samt propansyra [Sigma-Aldrich, USA]) som blandats ut i RO-vatten. I experimenten användes Canton^S som motsvarighet till vildtypsflugor och dessa erhöles av professor Pascal Meier (institutet för cancerforskning i London, Storbritannien). För experimentet som undersöker klyvningen av Kenny används fluglinjer som överuttrycker GFP-Kenny i tarmen, varvid den ursprungliga fluglinjen har genotypen $\frac{NP1-Gal4}{NP1-Gal4}; \frac{UAS-GFP-Kenny}{UAS-GFP-Kenny}$ (Tusco et al., 2017). Vid behov utfördes genetiska korsningar för att erhålla specifika genotyper. Balanserarlinjen $\frac{CyO}{If}; \frac{TM3}{TM6B}$ erhöles av doktor Ville Hietakangas (Helsingfors universitet, Finland).

4.6 Klyvningsanalys av Kenny *in vivo*

För att studera ifall Dredd klyver Kenny i bananflugan utfördes tre olika experiment: Matning med pan-kaspasinhitrin Emricasan (MedChemExpress, USA), överuttryck av Dredd tillsammans med Kenny samt överuttryck av Kenny i en Dredd-mutantbakgrund. I experimenten utnyttjas Gal4/UAS-systemet för att överuttrycka Kenny och/eller Dredd i flugans tarm och därför används den tarmspecifika promotorn NP1. UAS-elementet är kopplade till GFP-Kenny och Dredd. För att aktivera Imd-signaleringsräckan, och därmed inducera klyvningen av Kenny, matas flugorna med

den Gramnegativa bakterien *Erwinia carotovora carotovora* 15 (*Ecc15*) (Buchon et al., 2009).

4.6.1 Korsning av flugor

För att undersöka hur överuttryck av Dredd inverkar på klyvningen av Kenny överuttrycks både GFP-Kenny och Dredd i tarmen. För att skapa en sådan fluglinje korsas flugor som överuttrycker GFP-märkt Kenny med flugor som överuttrycker Dredd. Båda fluglinjerna utnyttjar Gal4/UAS-systemet, varvid Gal4-uttrycket styrs av NP1-promotorn. Honflugorna som väljs för korsningarna är jungfru-flugor för att säkerställa att de inte bär på spermier från tidigare parningar.

Korsning I, P:

$$\frac{NP1Gal4}{NP1Gal4}; \frac{UAS-GFP-Kenny}{UAS-GFP-Kenny} \times \frac{NP1Gal4}{NP1Gal4}; \frac{UAS-Dredd}{UAS-Dredd}$$

F1:

$$\frac{NP1Gal4}{NP1Gal4}; \frac{UAS-GFP-Kenny}{UAS-Dredd}$$

Avkomman kommer således bära på både UAS-GFP-Kenny och UAS-Dredd. Eftersom flugorna är heterozygota för allelen med UAS-GFP-Kenny kommer kontrollflugorna för GFP-Kenny också att endast ha en uppsättning av GFP-Kenny i sitt genom. Genotypen för dessa kontrollflugor är $\frac{NP1Gal4}{NP1Gal4}; \frac{UAS-GFP-Kenny}{TM3,Sb}$.

För att studera inverkan av en katalytisk Dredd-mutant på klyvningen av Kenny skapades en fluglinje som uttrycker en så kallad Dredd^{L23}-mutant och som därtill överuttrycker GFP-Kenny i tarmen. Genen som kodar för Dredd befinner sig på X-kromosomen, och därför används honflugor som är homozygota för L23-Dredd-mutationen i korsningen så att varje avkomma erhåller en allel av den muterade versionen av Dredd. Fluglinjen med Dredd^{L23}-mutanten erhöles från professor Pascal Meier (Leulier et al., 2000).

Korsning II, P:

$$\frac{Y}{X^+}; \frac{NP1Gal4}{NP1Gal4}; \frac{UAS-GFP-Kenny}{UAS-GFP-Kenny} \times \frac{X^{L23-Dredd}}{X^{L23-Dredd}}; \frac{+}{+}; \frac{+}{+};$$

F1:

$$\frac{Y}{X^{L23-Dredd}}; \frac{NP1Gal4}{+}; \frac{UAS-GFP-Kenny}{+}$$

eller

$$\frac{X^+}{X^{L23-Dredd}}; \frac{NP1Gal4}{+}; \frac{UAS-GFP-Kenny}{+}$$

Den hanliga avkomman kommer att vara hemizygot för de gener som befinner sig på X-kromosomen, vilket är fallet för L23–Dredd-mutationen. Honflugorna i avkomman kommer att bära på en mutant och en vildtyps X-kromosom och kommer således bära på en vildtyps–Dredd-allel. Därmed användes endast hanflugor i detta experiment. Kontrollflugorna för uttrycket av GFP-Kenny kommer att ha genotypen $\frac{Y}{X^+}; \frac{NP1Gal4}{+}; \frac{UAS-GFP-Kenny}{+}$.

4.6.2 Bakteriekultur av *Erwinia carotovora carotovora* 15

Bakteriekulturen framställs genom att skrapa lös frysta, glycerolbevarade, *Ecc15*-bakterier och blanda ut dem i autoklaverad lysogenbuljong (eng. lysogeny broth, LB, tillverkare Sigma-Aldrich). Bakterielösningen inkuberas sedan vid 29 °C i 16 timmar. Därefter centrifugeras bakterierna med 4000 rpm vid 10 °C i 20 minuter och supernatanten avlägsnas. Bakteriepelleten löses åter upp i LB-buljong och den optiska tätheten (eng. optical density, OD) vid våglängden 600 nm mätes med en spektrofotometer (Helios β, UNICAM Instruments, Storbritannien) och justerades till OD = 0,2 (± 0,02).

4.6.3 Matning av flugorna med bakterielösning och kaspasinhjbitor samt dissekering av flugtarmar

Flugorna i vilka klyvningen av Kenny studeras matas med Gramnegativa bakterier (*Ecc15*) för att inducera aktiveringen av Imd-signaleringsräckan och därmed klyvningen av Kenny. Bakterierna löses upp tillsammans med en sackaroslösning (50:50-lösning, slutlig koncentration bakterier OD=0,1 och sackaros 2,5 %) för att locka flugorna att äta av lösningarna. I experimentet som undersöker effekten av kaspasinhjbitor på klyvningen av Kenny tillsattes 10 µM av pan-kaspasinhjbitorn Emricasan (MedChemExpress, USA). Dessa pipetteras sedan på Whatmanpapper (Cytvia, USA) som placerats i rena flugtuber, till vilka både hon- och hanflugor introduceras. Ett undantag till detta är experimentet som studerar effekten av den katalytiska Dredd-mutanten, i vilket endast hanflugor användes (se avsnitt 4.6.1 ”korsning av flugor”, korsning II). Tuberna förvaras i rumstemperatur och flugorna tillåts äta av lösningarna under 16 timmar. Efter behandlingen bedövas flugorna med koldioxid och avlivas genom att frysa ner dem vid -20 °C i 15 minuter. Flugorna förvaras sedan på is i väntan på att bli dissekerade. Åtta till tio tarmar per prov dissekeras i PBS och förvaras tillfälligt i kall PBS. Tarm-proven centrifugeras sedan för att bilda en pellet och supernatanten avlägsnas. Till tarmarna tillsätts sedan S2-lyseringsbufferten bestående av 50 mM Tris-bas (Sigma-Aldrich, USA), 150 mM NaCl (Sigma, USA), 1 % Triton X-100 (Honeywell Fluka, USA), 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich, USA) och 10 % glycerol (Sigma-Aldrich, USA) samt Pierce™ proteasinhjbitor (Thermo Scientific, USA) för att lysera dem. Därefter homogeniseras proven mekaniskt med en mortel och inkuberas på is i 15 minuter. Efter inkubationen tillsätts 4X Laemmli-buffert till en slutlig koncentration på 1X Laemmli och proven kokas i 15 minuter. Proven förvaras vid 4 °C tills de analyseras med Western blot.

4.7 Skapandet av transgena Kenny-flugor

För att studera hur klyvningen av Kenny inverkar på immunförsvaret kommer fluglinjer med tre stycken versioner av Kenny skapas:

- i) Flugor som uttrycker vildtyps-Kenny (figur 6b och 6d). De här fluglinjerna kan användas som vildtyps-kontroll av Kenny då dess roll i immunförsvaret studeras.

- ii) Flugor som uttrycker en klyvningsresistent version av Kenny (D>E, figur 6c). Denna fluglinje kan användas för att undersöka vad som sker då Kenny inte kan klyvas.
- iii) Flugor som uttrycker en konstitutivt klyvd form av Kenny (delta N-term, figur 3e). Denna fluglinje kan användas för att undersöka vad som sker då Kenny är ständigt klyvt.



Figur 6. Olika versioner av Kenny som genereras för att skapa transgena flugor. Kenny-genen är visualiserad som en orange låda och märkningar har visualiserats som mindre lådor kopplade till genen (GFP i grönt, HA i ljusgult och V5 i rosa). **A)** En GFP-märkning har lagts till i N-terminus av vildtyps Kenny. Detta genkonstrukt finns redan insatt i en fluglinje och används i experiment som undersöker olika aspekter av Kenny. **B)** Vildtyps Kenny med en C-terminal HA-märkning. **C)** En kritisk punktmutation (D>E) gör denna form av Kenny oförmögen att klyvas. **D)** Vildtyps Kenny med en C-terminal V5-märkning. **E)** Δ N-term Kenny saknar de första aminosyrorerna, inklusive de som utgör LIR-domänen och utgör därmed en ständigt klyvd form av Kenny.

4.8 Polymeraskedjereaktion

PCR, det vill säga polymeraskedjereaktion, är en metod som används för att mångfaldiga DNA. Metoden går ut på att enzymet DNA-polymeras syntetiserar DNA utgående från ett templat. För mångfaldigandet av DNA används New England BioLabs Reaktionsblandningen vilken består av Q5-buffert, 200 μ M dNTP, 0,5 μ M framåt- respektive bakåtprimers (tabell 1), <1 μ g DNA-templat, Q5-enhancer-lösning och 0,02 U/ μ l Q5-polymeras. Volymen justeras med MQ-vatten till 50 μ l per prov. PCR-cykeln består av sju steg, varvid det första är en uppvärmning av reaktionsblandningen till 98 $^{\circ}$ C i en minut. Det andra steget separerar DNA-trådarna och utförs vid 98 $^{\circ}$ C i

tio sekunder. I det tredje steget sänks temperaturen till ungefär 60 °C i 20 sekunder för att tillåta att primererna binder till sina komplementära DNA-sekvenser. Därefter höjs temperaturen i det fjärde steget till 72 °C i två minuter, varvid DNA-syntetiseras. Det femte steget anger antalet gånger steg nummer två till fyra upprepas, vilket ställs in på 30 då syftet var att amplifiera upp en specifik DNA-sekvens. I det sjätte steget sker den sista syntetiseringen av DNA-sekvensen, även denna vid 72 °C i två minuter. I det sjunde och sista steget kyls proven ner till 4°C, vilket är temperaturen proven sedan förvaras vid.

Tabell 1. Primerer för skapandet av Kenny-transgener. För att föra över HA-märkt vildtyps-Kenny i plasmiden pUAS_{tattB} användes primerparet Kenny-HA. I framåt primern infördes restriktionsstället BglII och i bakåt primern KpnI (markerat i fet stil). I bakåtprimern infördes även ett stop-kodon innan restriktionsstället (markerat i rött). För kloning av ständigt klyvt Kenny som ett ubikvitinfusionskonstrukt användes primerparet pMT-KennyUbfus (vildtyp och Δ21), varvid restriktionsstället SacII inkluderades i framåtprimären och XhoI i bakåtprimern (markerat i fet stil). Därtill tillsattes en extra nukleotid (markerat i lila) i framåtprimererna för att förskjuta läsramen med en nukleotid. I primerparet pUAS_{tattB}-KennyUbfus inkluderades restriktionsstället EcoRI i framåtprimern och NotI införs i bakåtprimern. Samtliga restriktionsställen är markerade i fet stil.

Primer	Nukleotidsekvens
Kenny-HA Framåt	5'-GCGCGCAGATCTATGTCGGACGAAGAC-3'
Kenny-HA Bakåt	5'-CCCAAAGGTACCTTAGGCGTAGTCTGG-3'
pMT-KennyUbfus-vildtyp-Framåt	5'-AAATTTCCGCGGATCGGACGAAGAGTC-3'
pMT-KennyUbfus_Δ21-Framåt	5'-AAATTTCCGCGGAAGTTCCTTGCGGTC-3'
pMT-KennyUbfus-Bakåt	5'-CGCGCGCTCGAGGTTTTTATCCAAACA-3'

4.9 Gelelektrofores för separering av DNA-molekyler

För att separera DNA-proven enligt molekylvikt användes geler bestående av 1 % agaros och vars bas utgjordes av TAE-buffert (Tris-acetat-etylendiamintetraättisyra, Sigma-Aldrich, USA). Gelerna färgades med GelRed® DNA-färg (Biotium, USA) för att möjliggöra detektering av DNA-proven. Gelerna placeras i en elektroforestank som fyllts med körbuffert (1X TAE) och DNA-proven som blandats med DNA-färg pipetteras i brunnarna. Sedan slås en likström på som bildar ett elektriskt fält genom gelen, vilket gör att de negativt laddade DNA-molekylerna vandrar mot den positiva

polen. DNA-molekyler med mindre storlek tar sig lättare fram genom gelen och kommer därmed vandra snabbare. Molekylviktsmarkören GeneRuler 1kb (Thermo Scientific, USA) används för att identifiera de olika molekulstorlekarna. Gelelektroforesen utförs med konstant spänning på 80 V tills DNA-molekylerna vandrat tillräckligt långt för vidare analys.

4.10 Gel- och PCR-rening av DNA-molekyler

För att isolera och rena DNA-molekylerna från agar gelen utförs Gel- och PCR-rening med Macerey-Nagels NucleoSpin® reagensuppsättning och protokoll. DNA-fragmenten som ska renas skärs ut från agarogelen och löses upp i buffer NTI vid 50 °C. För varje 100 mg agarogel används 200 µl buffert NTI. Därefter laddas proven i NucleoSpin® Gel-och PCR-reningskolumner och centrifugeras i 30 sekunder vid 11 000 g, varvid genomflödet avlägsnas. Härnäst tvättas kolumnens kiselmembran genom att tillsätta 700 µl buffert NT3 och centrifugera det i 30 sekunder vid 11 000 g. Tvättprocessen utförs två gånger, varvid genomflödet avlägsnas. Därefter torkas kiselmembranet genom att centrifugera reningskolumnen 1 minut vid 11 000 g. Därefter elueras DNA-provet med 15 µl buffert NE och inkuberas vid rumstemperatur i en minut. Slutligen centrifugeras provet 1 minut vid 11 000 g och genomflödet tas tillvara. Koncentrationen av DNA-provet bestäms med spektrofotometern NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA).

4.11 Behandling med restriktionsenzym och defosforylering av vektor

Innan DNA-fragmenten kan införas i en plasmidvektor måste de behandlas med restriktionsenzym och målvektorn måste därtill defosforyleras. Restriktionsenzym är endonukleaser som klyver DNA-molekyler vid specifika nukleotidsekvenser. Samtliga restriktionsenzym som användes i mitt pro gradu-arbete lämnar specifika 3'-överhängen i DNA-trådarna, vilket underlättar ligeringen av DNA-fragmenten. För att kunna sammanfoga DNA-fragmenten i en bestämd riktning används två olika restriktionsenzym för att klippa DNA-molekylerna. New England BioLabs protokoll och reagensblandningar används för behandling med restriktionsenzym och defosforylering av vektor. Till att börja med löses 0,5 µl av respektive restriktionsenzym upp i 3 µl CutSmart-buffert och tillsätts till 1 µg DNA-prov samt

till 1 µg vektor. Volymen för de båda lösningarna justeras med MQ vatten till 30 µl. Reaktionsblandningarna inkuberas 1 timme vid 37 °C, varefter provet med det klyvda ampikonet förvaras vid 4 °C. Vektorn defosforyleras genom att till provet med den klyvda vektorn tillsätta 2 µl CIP. Reaktionsblandningen inkuberas därefter 1 timme vid 37 °C och förvaras vid 4 °C.

4.12 Ligering av DNA-fragment

Ligering är en metod som sammanför två DNA-fragment. Processen utförs av enzymet DNA-ligas, som förmår återställa fosfodiesterbindningar i DNA-trådarna. Inför ligeringen renas DNA-fragmenten som i avsnitt 4.8.2 ”gelelektrofores för separering av DNA” och 4.8.3 ”gel- och PCR-rening”, varvid koncentrationen bestäms med NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA). Reaktionsblandningen för ligeringen består av 1 µl 10X T4-buffert (New England BioLabs, USA), 1 µl T4 ligas (New England BioLabs, USA), klyvd samt defosforylerad vektor, och klyvt DNA-fragment (insert). Volymen justerades med MQ-vatten till 10 µl. Mängden insert beräknades med formeln:

$$m(\text{insert})[\text{ng}] = \frac{m(\text{vektor})[\text{ng}] \times l(\text{insert})[\text{kb}]}{l(\text{vektor})[\text{kb}]} \times \text{molförhållande} \left(\frac{\text{insert}}{\text{vektor}} \right)$$

Varvid m står för massa och l står för längd. Klamrarna anger enheten på storheterna. Reaktionsblandningen inkuberas 2 timmar vid rumstemperatur.

4.13 Transformerig av kompetenta celler för mångfaldigandet av plasmider

Då DNA-molekyler i form av plasmider ska mångfaldigas kan kompetenta celler användas. Cellerna ska vara kapabla att uppta plasmiderna och sedan syntetisera mer av dem i stor skala. I fallet för ligerade produkter som ska mångfaldigas användes *E. coli* Top10 bakterier, medan XL10-Gold® ultrakompetenta celler (Agilent, USA) användes i smaband med basspecifik mutagenes.

4.13.1 Tillredning av LB-(ampicillin)plattor

LB-plattor används för odling av bakterier på ett fast substrat. Detta möjliggör selektering av bakteriekolonier, vilka härstammar från enskilda bakterier. LB–agar-lösningen tillreds genom att lösa upp 10 g LB-buljongpulver (Lennox, USA) och 10 g

agar (ChemCruz, USA) i 500 ml RO-vatten. Lösningen autoklaveras och då temperaturen sjunkit till 50 °C kan antibiotika för selektion tillsättas. I experimenten som utfördes i mitt pro gradu-projekt användes 50 µg/ml ampicillin (Sigma-Aldrich, USA) för selektering av positiva bakteriekolonier. Den varma LB-agar-lösningen (med ampicillin) hålls i cellodlingsplattor där den stelnar till ett fast substrat. Plattorna tillåts svalna vid rumstemperatur och förvaras sedan vid 4 °C.

4.13.2 Tillredning av kompetenta celler, *E.coli* Top10

För att tillreda kompetenta celler framställs en bakteriekultur. En liten mängd kompetenta celler (*E. coli* Top10 bakterier, Thermo Fisher, USA) sprids med en ögla ut på agarplattor. Plattorna inkuberas 16 timmar vid 37 °C, varvid en enskild bakteriekoloni väljs ut för att inleda bakteriekulturen. Bakteriekolonin löses upp i 3 ml LB-medium med 50 µg/ml streptomycin (Sigma, USA) och inkuberas med rotation i 16 timmar vid 37 °C. Förkulturen flyttas sedan över i 150 ml färskt LB-medium och inkuberas med skak vid 37 °C tills den optiska tätheten vid 600 nm är 0,6 eftersom bakterierna då befinner sig i den exponentiella tillväxtfasen. Bakterielösningen centrifugerades sedan vid 4000 rpm i 10 minuter vid 4 °C. Supernatanten avlägsnades och bakteriepelleten löstes upp i 15 ml steriltfiltrerad TSB buffert (slutlig koncentration: 1X LB [Lennox, USA]; 5 % DMSO [dimetylsulfoxid, Sigma, USA]; 10 mM MgCl₂ [Sigma, USA], 10 mM MgSO₄; [Sigma-Aldrich, USA], 10 % PEG [polyetylen glycol, Sigma, USA]). Cellsuspensionen inkuberades sedan på is i 10 minuter och alikvoterades i sterila Eppendorftuber. De alikvoterade cellerna frystes hastigt ner på torris och förvarades sedan vid -80 °C.

4.13.3 Transformerings av kompetenta celler

DNA-proven (ca 10 ng plasmid-DNA) späds ut i KCM buffert bestående av 0,5 M KCl (Sigma, USA), 0,15 M CaCl₂ (Sigma, USA), 0,25 M MgCl₂ (Sigma, USA) till en total volym på 100 µl och förvaras på is. De kompetenta cellerna får långsamt tina upp, varvid 100 µl cellsuspension sedan tillsätts till DNA-proven. Transformationsblandningen inkuberas därefter 20 minuter på is och ytterligare 10 minuter vid rumstemperatur. Därefter inkuberas de en timme vid 37 °C, varvid cellerna sprids ut på LB-plattor försedda med ampicillin (50 µg/ml). Plattorna inkuberas cirka 16 timmar vid 37 °C. Endast de bakteriekolonier som innehåller plasmiden av intresse

kommer selekteras fram, eftersom plasmiderna försetts med en gen som bidrar med ampicillinresistens. Enskilda bakteriekolonier väljs därefter ut för plasmidberedning.

4.14 Plasmidberedning

Plasmidberedning används för att isolera och rena plasmid-DNA. För en mindre mängd plasmid-DNA (upp till 20 µg) används småskalig plasmidberedning, medan den storskaliga används för en större mängd (300–750 µg).

4.14.1 Småskalig plasmidberedning

För småskalig plasmidberedning användes Macherey-Nagels NucleoSpin® Plasmid reagensuppsättning och protokoll för isolering av hög-kopieplasmider ur *E. coli*. En mättad kultur av Top10 *E.coli* bakterier som bär på plasmiden av intresse centrifugeras 30 sekunder vid 11 000 g och supernatanten avlägsnas. Bakteriepelleten löses upp i 250 µl buffert A1 för att inleda lyseringen av bakterierna. Därefter tillsätts 350 µl buffert A2 och provet blandas varsamt om. Lysatet inkuberas vid rumstemperatur i fem minuter, varvid 300 µl av buffert A3 tillsätts. Proven blandas varsamt om tills den blåa indikatorfärgen försvinner helt. Lysatet klargörs sedan genom centrifugering i 5 minuter vid 11 000 g. Supernatanten laddas i en NucleoSpin®-Plasmid-kolum och centrifugeras i en minut vid 11 000 g. Genomflödet avlägsnas och till kolumnen tillsätts 500 µl tvättbuffert AW. Tvätten av kiselmembranet genomförs genom centrifugering vid 11 000 g i en minut. En ytterligare tvätt med 600 µl buffert A4 utförs genom centrifugering vid 11 000 g i en minut. Kiselmembranet torkas genom att centrifugera kolumnen vid 11 000 g i två minuter. DNA-provet inkuberas med 50 µl elueringsbuffert AE i en minut, som sedan elueras genom centrifugering vid 11 000 g i en minut. Koncentrationen av den renade plasmiden bestäms med NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA).

4.14.2 Storskalig plasmidberedning

För storskalig plasmidberedning användes Qiagens reagensuppsättning och protokoll för isolering och rening av plasmid-DNA med reagensuppsättningen HiSpeed Plasmid Maxi. Tillverkaren Qiagen föredrogs framom andra reagenstillverkare på grund av renhetsgraden av slutprodukten som erhålls. Den storskaliga plasmidberedningen

genomfördes på de pUAST-plasmider som ska skickas till Bestgene Inc. för mikroinjektion av flugembryon.

En bakteriekoloni bestående av Top10 *E.coli* som bär på plasmiden av intresse selekterades på LB-ampicillinplattor (se ”4.8.6 Transformerings av kompetenta celler för mångfaldigandet av plasmider”). Enskilda kolonier inokulerades i 3 ml LB-medium som kompletterats med ampicillin (100 µg/ml). Förkulturen inkuberades med rotation i cirka 8 timmar vid 37 °C och fördes sedan över i 150 ml färskt LB-medium och inkuberades ytterligare med rotation i cirka 16 timmar vid 37 °C. Bakterierna skördades genom att centrifugera ner dem vid 4500 rpm i 20 minuter vid 4 °C och avlägsna supernatanten. Lyseringen av bakteriepelleten inleddes genom att lösa upp den i 10 ml buffert Pierce™ proteasinhämmare (Thermo Scientific, USA). LyseBlue användes som färgindikator. Lyseringsprocessen fortsattes genom tillsats av 10 ml buffert P2. Den nu blåa lösningen blandades om tills den framstod som homogen och inkuberades sedan vid rumstemperatur i 5 minuter. QIA-filteranordningen förbereddes inför filtreringen av provet genom att skruva fast en kork i munstycket till QIAfilter Maxi patronen. Efter inkuberingen av celllysaten tillsattes 10 ml kyld buffert P3, blandades om väl och hölls direkt över i filteranordningen. Lösningen inkuberades i 10 minuter, varvid en fällning flyter upp till ytan av lösningen. Fällning består av protein och genomiskt DNA från cellprovet samt ytaktiva ämnen från buffertarna. HiSpeed Maxi-filtreringsändan förbereddes (eng. equilibrate) genom att låta 10 ml buffert QBT rinna igenom kolumnen. Filtreringen av celllysaten inleds med att skruva bort korken från munstycket till QIAfilter Maxi patronen. Därefter insätts kolven varsamt i patronen och det filtrerade celllysaten leds in i det förberedda HiSpeed Maxi filtreringsändan. Det uppklarnade lysatet tillåts långsamt rinna igenom resinets till följd av sin gravitationskraft. HiSpeed Maxi filtreringsändan tvättas sedan med 60 ml buffert QC, som tillåts med gravitationskraft rinna igenom filtret. Nästa elueras DNA-provet med 15 ml buffert QF. Därefter tillsätts 10,7 ml rumstempererad isopropanol (Sigma-Aldrich, USA) till det eluerade DNA-provet och inkuberas i 5 minuter för att fälla ut DNA-molekylerna. Kolven från en 30 ml spruta dras ut och fäst QIA-Maxi-utfällningsmodulen i sprutans munstycke. Utfällningsmodulen är känslig och måste därför alltid skruvas lös innan kolven dras ut ur sprutan. Eluat-isopropanollösningen hålls i 30 ml sprutan och filtreras med jämn takt genom att trycka

ner kolven med konstant tryck. Därefter lösgjörs QIA-Maxi-utfällningsmodulen från sprutans munstycke, kolven dras ut och utfällningsmodulen fästs åter i sprutans munstycke. Härnäst tillsätts 2 ml 70 % etanol (Anora Industrial, Finland) till sprutan och pressas igenom utfällningsmodulen. QIA-Maxi-utfällningsmodulen lösgjörs från sprutans munstycke, kolven dras ut och utfällningsmodulen fästs åter i sprutans munstycke. Membranet i utfällningsmodulen torkas genom att pressa luft igenom det. Sedan dras kolven ut från en 5 ml spruta och QIA-Maxi-utfällningsmodulen skruvas fast i munstycket på 5 ml sprutan. DNA-provet tas tillvara genom att pressa 1 ml elueringsbuffert TE genom utfällningsmodulen. Eluatet från föregående steg pressades en andra gång igenom utfällningsmodulen för att säkerställa maximal utvinning av DNA-provet. Slutligen bestämdes DNA-koncentrationen med NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA).

4.15 Sekvensering

För sekvensering av plasmider användes Eurofins Genomics tjänst Mix2Sec (Tyskland). Plasmid-DNA (250–500 ng) blandades med 25 pmol sekvenseringsprimer och sändes till Eurofins Genomics för sekvensering. Företaget sekvenserar DNA-sekvensen genom Sangersekvensering. Sekvenseringsdata som erhöles analyserades med SerialCloner 2-6-1.

4.16 Basspecifik mutagenes

Den basspecifika mutagenesen utfördes med biovetenskapsföretaget Agilent's Quick-Change reagensuppsättning och protokoll (USA). Funktionsprincipen är att en PCR utförs med två primers designade för att införa en punktmutation på ett specifikt ställe i en DNA-sekvens (se tabell 2). Till att börja med tillreds PCR-reagensblandningen som består av 1X Quick change lighting reaktionsbuffert, 50 ng dubbeltrådig DNA-templat, 125 ng framåt primer, 125 ng bakåt primer, 1 µl dNTP-blandning och 1,5 µl Quick solution reagens. PCR-reagensblandningen späds ut till 49 µl, varvid 1 µl Quick change lighting enzym (DNA-polymeras) tillsätts. PCR-cykeln består av sju steg: I det första steget värms reaktionsblandningen till 95 °C i två minuter. Det andra steget separerar DNA-trådarna och utförs vid 95 °C i 20 sekunder. I det tredje steget sänks temperaturen till 60 °C i 10 sekunder för att tillåta att primererna binder till sina

komplementära DNA-sekvenser. Därefter höjs temperaturen i det fjärde steget till 68 °C i 2-6 minuter, varvid DNA syntetiseras. Tiden för detta steg bestäms av storleken på DNA-fragmentet som ska amplifieras: För varje kb reserveras trettio sekunder och därtill adderas en minut för att säkerställa att syntetiseringen fullbordas vid varje cykel. Det femte steget anger antalet gånger steg nummer två till fyra upprepas, vilket i detta fall justerades till 18 cykler. I det sjätte steget sker den sista syntetiseringen av DNA-sekvensen, även denna vid 68 °C. Det sjunde och sista steget kyler ner proven till 4 °C. Därefter tillsätts 2 µl DpnI-enzym till det amplifierade DNA-provet för att bryta ner templatet så att endast det nyligen syntetiserade DNA-sekvensen kvarstår. Funktionsmekanismen är att DpnI-enzymet klyver metylerat och hemimetylerat DNA. Eftersom DNA-templaten syntetiserats i *E.coli*-bakterier kommer det vara hemimetylerat, medan det som syntetieras i PCR reaktionen inte är det. Det DpnI-bahandlade provet inkuberas omgående vid 37 °C i 5 minuter och förvaras därefter vid 4 °C.

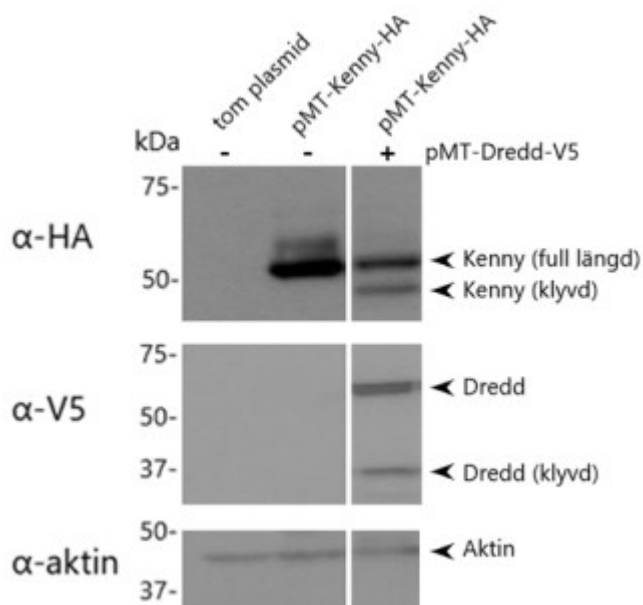
Tabell 2. Införing av punktmutationer i Kenny med hjälp av basspecifik mutagenes. För att generera den klyvningsresistenta versionen av pUASTattB-Kenny-HA införs punktmutationen c63g, varvid kodonet ändras från ett som kodar för asparaginsyra till ett som kodar för glutaminsyra. Korrigering av två punktmutationer i pMT-Kenny-HA med hjälp av basspecifik mutagenes. Primerparet som inför mutationen g106a återställer kodonet som kodar för lysin till ett som kodar för glutaminsyra. Primerparet som inför mutationen t415c ändrar kodonet som kodar för histidin till ett som kodar för tyrosin. Korrigeringen gör att sekvensen för Kenny i pMT-plasmiden motsvarar sekvensen som anges i FlyBase. Nukleotiderna som inför mutationerna är markerade i lila.

Primer	Nukleotidsekvens
Kenny-c63g-Framåt	5'-CTCGCTCATGCCGGA G AGTTCCTTGCGG-3'
Kenny-c63g-Bakåt	5-CCGCAAGGAACT C TCCGGCATGAGCGAG-3'
Kenny-g106a-Framåt	5'-CGCGCAGGAGGCC G AAGGAAACCGTTGC-3'
Kenny-g106a-Bakåt	5'-GCAACGGTTTCCTT C GCCTCCTGCGCG-3'
Kenny-t415c-Framåt	5'- CCAAACCATGCTGAACTAC C ACAACCTGACTCAACAATG- 3'
Kenny-t415c-Bakåt	5'- CATTGTTGAGTCAGGTTCT G GTAGTTCAGCATGGTTTGG- 3'

5 Resultat

5.1 Ko-transfektion av Kenny och Dredd leder till att Kenny klyvs.

För att testa hypotesen om att Kenny klyvs av Dredd i celler utfördes en ko-transfektion av dessa i *Drosophila* S2-celler. Celllysaten analyserades med Western blot för att undersöka ifall en klyvd form av Kenny kan detekteras. Eftersom det inte finns tillgängligt någon antikropp som kan detektera Kenny kopplas markörer till proteinet för att kunna detektera det. Endast full-längd Kenny kunde ses i de celler som enbart transfekterats med Kenny (figur 7, prov 2) medan även en klyvd produkt ses i de celler som transfekterats med både Kenny och Dredd (figur 7, prov 3). Resultatet visar att Kenny klyvs vid ko-transfektion med Dredd vilket antyder att det här kaspaset klyver Kenny i cellen.

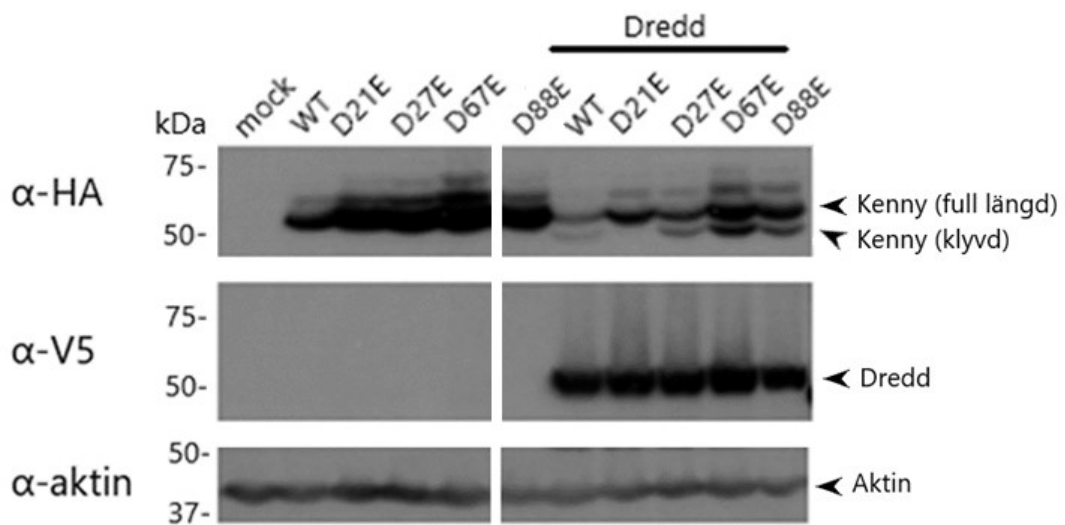


Figur 7. Ko-transfektion av Kenny och Dredd i S2-celler leder till att Kenny klyvs. Kenny är HA-märkt medan Dredd är V5-märkt. Av HA-blotten framgår det att endast full längd Kenny ses i provet som transfekterats med pMT-Kenny-HA, medan det i provet som transfekterats med både pMT-Kenny och pMT-Dredd-V5 även finns en klyvd form av Kenny. Av V5-blotten framgår det att Dredd förekommer i rätt prov. Aktin-nivåerna är jämnt fördelade mellan proven. n>3

5.2 Kenny klyvs vid D21

För att ta reda på vid vilket ställe Kenny klyvs transfekterades olika D>E-mutanter av Kenny tillsammans med Dredd i S2-celler. Kaspaset Dredd klyver sina substrat efter asparaginsyra (Thornberry et al., 1997), och därmed kommer dess igenkänningsställe

att förstöras då aminosyran byts ut till glutaminsyra. Då Kenny ko-transfekteras tillsammans med Dredd ses en klyvningsprodukt av Kenny (figur 7, prov 3). Storleksskillnaden mellan Kenny med full längd och den klyvda versionen är inte särskilt stor. I och med att Kenny i det här fallet var C-terminalt märkt innebär det att det är en liten del av den N-terminala ändan som klyvts bort. Därmed genererades D>E-mutanter för de fyra mest N-terminala asparaginsyrorna, det vill säga D21E, D27E, D67E och D88E. Cellysatet analyserades med Western blot för att studera ifall någon av D>E-mutationerna inhiberar klyvningen av Kenny. Av Western blot-figuren framgår det att både vildtyps-Kenny och D>E-mutanterna uttrycks på liknande sätt i cellerna (figur 8, prov 2–6). Vid ko-transfektion med Dredd iaktas en klyvningsprodukt för Kenny i cellerna (figur 8, prov 7, 9, 10 och 11), med undantag för D21E-mutanten (figur 8, prov 8). Resultatet för klyvningsanalysen i S2-celler visade därmed att D21E är den klyvningsresistenta formen av Kenny, vilket innebär att Kenny klyvs av Dredd vid D21.



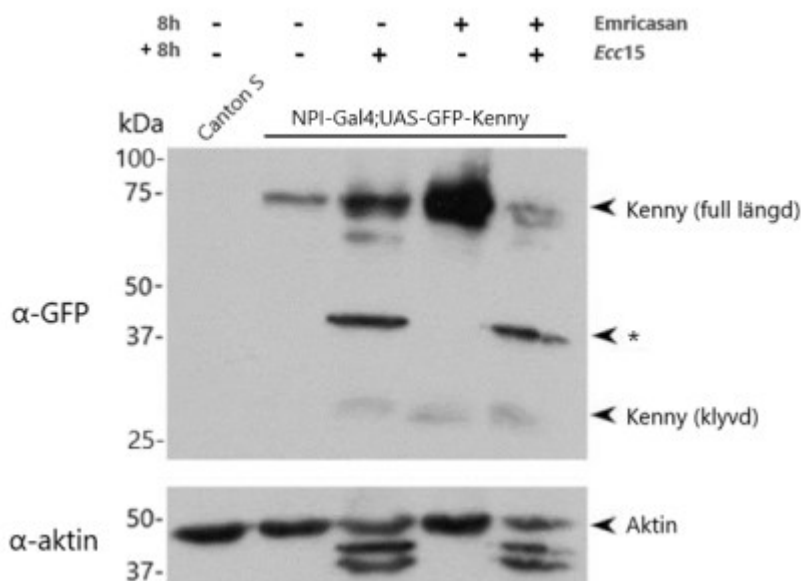
Figur 8. Kenny klyvs vid D21. Vildtyps-Kenny och D>E-mutanter av Kenny transfekterades tillsammans med Dredd i S2-celler. Kenny är HA-märkt medan Dredd är V5-märkt. Av HA-blotten framgår det att mutanterna uttrycks i likhet med vildtyps-Kenny. V5-blotten visar ett jämn nivå av Dredd i de celler som ska överuttrycka Dredd. Aktin-nivåerna är jämnt fördelade mellan proven. n=3

5.3 Klyvningsanalys av Kenny i bananflugans tarm

För att undersöka ifall Dredd klyver Kenny *in vivo* utfördes klyvningsanalyser av Kenny i bananflugans tarm. Tre olika strategier användes för att studera klyvningen av Kenny. I den första versionen av experimentet matades flugorna med en pan-kaspasinhibitor för att se ifall klyvningen av Kenny inhiberas. I det andra fallet överuttrycktes Dredd tillsammans med Kenny för att studera ifall klyvningen av Kenny ökar. I det tredje fallet undersöktes klyvningen av Kenny i en katalytisk Dredd-mutantbakgrund för att se ifall klyvningen minskar.

5.3.1 Matning med kaspasinhibitor hade ingen påtagbar effekt på klyvningen av Kenny

Canton^S (vildtyps-kontroll) och flugor som överuttrycker GFP-Kenny i tarmen ($\frac{NP1-Gal4}{NP1-Gal4}; \frac{UAS-GFP-Kenny}{UAS-GFP-Kenny}$) matades med kaspasinhibitorn Emricasan (MedChemExpress, USA) under totalt 16 timmar, varvid tarmarna dissekerades och analyserades med Western blot. I experimentet administrerades Emricasan och *Ecc15*-bakterierna skilt för sig (8+8 h). *Ecc15*-bakterierna användes för att aktivera Imd-signaleringsräckan och därmed inducera klyvningen av Kenny. Trots behandlingen med kaspasinhibitor förblev nivåerna av klyvt Kenny vid infektion med *Ecc15* detsamma som för de obehandlade flugorna (figur 9, prov 3 och 5). Nivåerna av klyvt Kenny under basala förhållanden tycks snarare öka vid behandling med Emricasan i jämförelse med kontrollflugorna (figur 9, prov 2 och 4). Däremot verkar det som att Kenny med full längd kan detekteras i flugorna som överuttrycker GFP-Kenny i tarmen. Storleken på GFP-Kenny-fusionsproteinet är cirka 72 kDa (28 kDa + 44 kDa). Ifall bandet vid 75 kDa är full längd Kenny kan det konstateras att en kraftig ackumulering av proteinet sker under basala förhållanden då Emricasan administreras, jämfört med de obehandlade flugorna (figur 9, prov 2 och 4). Då flugorna utsätts för en infektion med *Ecc15* leder skador i tarmepitelet till att tarmens storlek minskar (Houtz et al., 2019). Detta är orsaken till att aktin-nivåerna i dessa flugors tarmar är reducerade jämfört med nivåerna som iaktas under basala förhållanden.

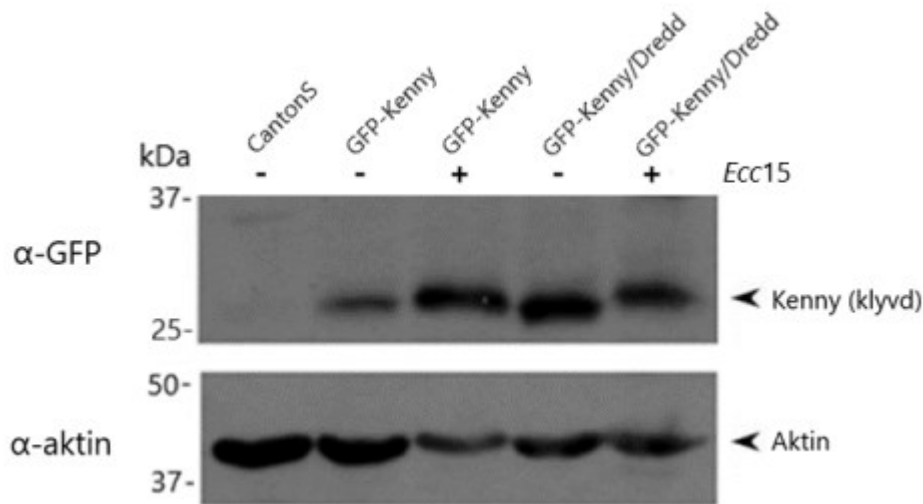


Figur 9. Kenny klyvs trots behandling med kaspasinhhibitorn Emricasan. Åtta tarmar (4 honor + 4 hanar) dissekerades per prov. Canton^S användes som vildtyps kontrollflugor. Behandlingstiden (16 h) var uppdelad i två delar, varvid GFP-Kenny-flugorna ($\frac{NP1-Gal4}{NP1-Gal4}; \frac{UAS-GFP-Kenny}{UAS-GFP-Kenny}$) först matades med Emricasan (8 h) och sedan med *Ecc15*-bakterier (8 h). I GFP-blotten kan klyvt Kenny ses i proven som matats med *Ecc15*, Emricasan, samt det som matats med både *Ecc15* och Emricasan. Asterisken indikerar ett oidentifierat band som framträder i proven med flugorna som matats med *Ecc15*. Proteinbandet som framträder vid 75 kDa kan möjligtvis vara klyvt Kenny. Aktin-nivåerna är relativt jämna mellan proven, men de är lite lägre i de prov som utsatts för infektion. Aktin-nivåerna är relativt jämna. En liten reduktion i nivån av aktin kan iaktas i tarmarna hos flugorna som utsatts för infektion med *Ecc15*. n=3

5.3.2 Överuttryck at Dredd tillsammans med Kenny ökar klyvningen av Kenny under basala förhållanden

Dredd och GFP-Kenny överuttrycktes i tarmen hos flugor med den genetiska uppsättningen $\frac{NP1-Gal4}{NP1-Gal4}; \frac{UAS-GFP-Kenny}{UAS-Dredd}$. Dessa flugor utsattes för en bakteriell infektion genom att mata dem med *Ecc15* i 16 timmar för att aktivera Imd-signaleringsräckan. Som vildtyps-kontroll användes Canton^S och som kontroll för GFP-Kenny användes flugor med genotypen $\frac{NP1-Gal4}{NP1-Gal4}; \frac{UAS-GFP-Kenny}{TM3}$. Cell-lysatet från tarmarna analyserades med Western blot och av resultatet framgår det att mängden klyvt Kenny är större under basala förhållanden i fluglinjen som överuttrycker både Kenny och Dredd, jämfört med fluglinjen som endast överuttrycker Kenny (figur 10, prov 2 och 4). Nivåerna av klyvt Kenny var dock lika höga mellan de två fluglinjerna då Imd-signaleringsräckan aktiverats med *Ecc15* (figur 10, prov 3 och 5), vilket kan

bero på att det endogena uttrycket av Dredd är tillräckligt för att utföra klyvningen av Kenny när Imd-signaleringsräckan aktiveras med *Ecc15*. Med andra ord, en ökning av mängden Dredd då signaleringsräckan är aktiv ökar inte andelen Kenny som klyvs, antagligen för att Dredd inte är den begränsande faktorn för mängden klyvt Kenny. Under basala förhållanden då Kenny endast klyvs i låg grad finns det utrymme för att höja graden av klyvningen, vilket sker vid överuttryck av Dredd.

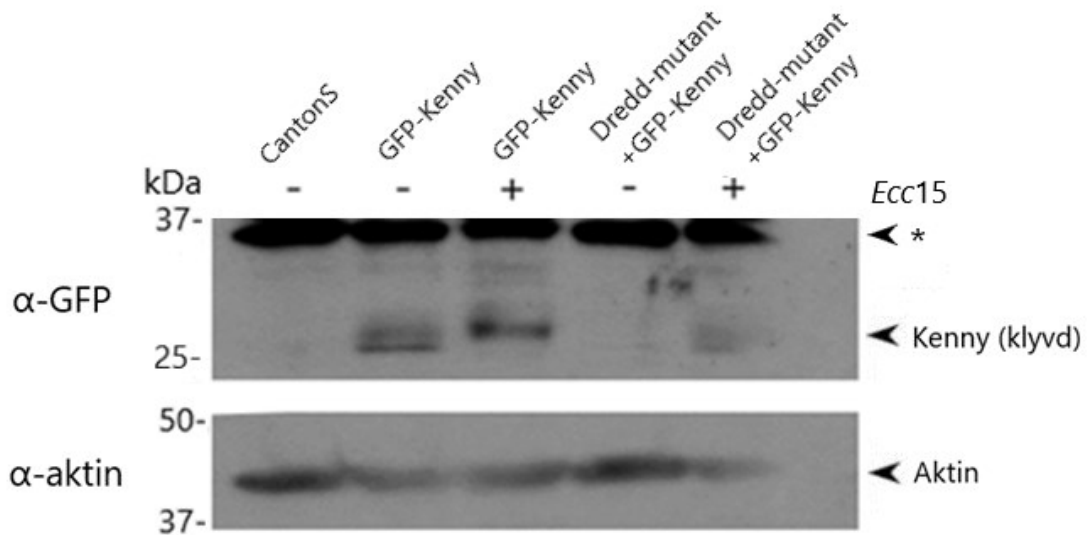


Figur 10. Klyvningen av Kenny ökar under basala förhållanden vid överuttryck av Dredd tillsammans med Kenny. Åtta tarmar (fyra från honflugor och fyra från hanflugor) dissekerades per prov. Ur GFP-blotten framgår det att inget GFP-märkt, klyvt, Kenny kan detekteras i vildtypskontrollflugan Canton^S. Det förekommer en liten mängd klyvt Kenny i provet från GFP-Kenny-kontrollflugorna ($\frac{NP1-Gal4}{NP1-Gal4}; \frac{UAS-GFP-Kenny}{TM3}$) som hölls under basala förhållanden, medan en större mängd klyvt Kenny kan ses i provet från samma fluglinje men som matades med *Ecc15*. I flugorna som överuttrycker både GFP-Kenny och Dredd ($\frac{NP1-Gal4}{NP1-Gal4}; \frac{UAS-GFP-Kenny}{UAS-Dredd}$) ses en ökning av klyvt Kenny under basala förhållanden, medan nivån vid infektion med *Ecc15* är lika jämfört med GFP-Kenny-kontrollflugorna. Ur aktinblotten framkommer det att aktin-nivåerna är relativt jämnt fördelade. n=3

5.3.3 Katalytisk Dredd-mutantbakgrund minskar klyvningen av Kenny

GFP-Kenny överuttrycktes i tarmen hos en fluglinje med katalytisk Dredd-mutantbakgrund. Dredd-mutanten som användes kallas L23, vars mutation befinner sig nära det aktiva centret i Dredd. Därmed kommer Dredd^{L23}-mutanten att ha minskad katalytisk aktivitet. Flugorna med genotypen $\frac{Y}{X^{L23-Dredd}}; \frac{NP1Gal4}{+}; \frac{UAS-GFP-Kenny}{+}$ matades med bakterien *Ecc15* för att aktivera Imd-signaleringsräckan. Som vildtyps kontroll användes Canton^S medan flugor med genotypen $\frac{Y}{X^{+}}; \frac{NP1Gal4}{+}; \frac{UAS-GFP-Kenny}{+}$ användes som kontroll för GFP-Kenny. Klyvningen av Kenny i flugans tarm

analyserades med Western blot. Ur resultatet framgår det att klyvningen av Kenny markant minskar hos flugorna med Dredd-mutantbakgrund i jämförelse med Kenny-kontrollflugorna som uttrycker vildtyps Dredd (figur 11, prov 2 och 3 i jämförelse med 4 och 5). Resultatet visar att katalytiskt aktivt Dredd behövs för att klyva Kenny och stödjer hypotesen om att Dredd utför denna klyvning.



Figur 11. Klyvningen av Kenny minskar i Dredd-mutantbakgrund. Åtta tarmar (från hanflugor) dissekerades per prov. Ur GFP-blotten framgår det att inget GFP-märkt, klyvt, Kenny kan detekteras i vildtypskontrollflugan Canton^S. Det förekommer en liten mängd klyvt Kenny i provet från GFP-Kenny-kontrollflugorna ($\frac{Y}{X^+}; \frac{NP1Gal4}{+}; \frac{UAS-GFP-Kenny}{+}$) som hölls under basala förhållanden, medan en större mängd klyvt Kenny kan ses i provet från samma fluglinje då de matats med *Ecc15*. L23-Dredd är en katalytisk mutant med minskad aktivitet och för dessa flugor ($\frac{Y}{X^{L23-Dredd}}; \frac{NP1Gal4}{+}; \frac{UAS-GFP-Kenny}{+}$) ses inget klyvt Kenny under basala förhållanden, medan en aning kan detekteras efter infektion med *Ecc15*. Asterisken indikerar ett ospecifikt band. Ur aktin-blotten framgår det att aktin-nivåerna är relativt jämnt fördelade. n=3

5.4 Skapandet av transgener med olika versioner av Kenny

Syftet med den molekylära kloningen var att skapa Kenny-transgener (vildtyp, -D>E och - Δ N-term, se figur 6) och föra över dem till ett sådant konstrukt (pUASTattB) som kan integrera transgenen i bananflugans genom. För kloningen valdes en PCR-baserad strategi (figur 12), varvid mjukvaran SerialCloner 2-6-1 användes för design av primerer. Som integreringsställe för Kenny-transgenerna valdes R3-86F8, varvid R3 anger att det befinner sig på den högra armen av den tredje kromosomen och 86F8 anger lokuset, det vill säga den bestämda platsen på kromosomen som gensekvensen är lokaliserad vid. Utgångspunkten för den molekylära kloningen var en pMT-plasmid

som innehåller HA-märkt Kenny. Den kodande sekvensen för Kenny är 1170 baspar stort (*FlyBase Gene Report: Dmel\key*, 2015) och då man räknar med tillsatta restriktionsställen och HA-märkningen blir transgenen 1236 baspar.

Molekylär kloning, arbetssteg

Primerdesign

↳ PCR amplifiering

↳ Gelelektrofores

↳ Gelextrahering och PCR-rening

↳ Behandling med restriktionsenzym

↳ Defosforylering av vektor

↳ Gelelektrofores

↳ Gelextrahering och PCR-rening

↳ Ligering

↳ Transformerings av kompetenta celler

↳ Mini-prep, småskalig plasmidberedning

↳ Sekvensering

↳ Maxi-prep, storskalig plasmidberedning

↳ Sekvensering

Figur 12. Flödesschema för molekylär kloning med en PCR-baserad strategi samt användning av restriktionsenzym. Primererna för PCR-reaktionen avgränsar gensekvensen som kommer att mångfaldigas samt inför vid behov restriktionsställen i amplikonet. Efter utförd PCR-reaktion separeras PCR-produkten enligt molekylvikt genom gelelektrofores. Därefter isoleras amplikonet genom gelextrahering och PCR-rening. Amplikonet och vektorn behandlas sedan med två restriktionsenzym, varvid vektorn även defosforyleras för att undvika självligering. De klyvda produkterna separeras genom gelelektrofores och isoleras genom gelextrahering och PCR-rening. Härnäst ligger det klyvda amplikonet med den klyvda och defosforylerade vektorn. Den nybildade plasmiden transformeras i kompetenta celler som mångfaldigar plasmiden. En småskalig plasmidberedning utförs för att isolera och rena plasmiden. Därefter sekvenseras plasmiden för att bekräfta att insertet är det som önskades, varvid plasmiden kan mångfaldigas genom storskalig plasmidberedning för att erhålla en större mängd plasmid-DNA. Slutligen sekvenseras plasmiden för att säkerställa att genkonstruktionen i inserten är korrekt.

Det finns redan fluglinjer som uttrycker märkt Kenny. Märkningen behövs för att kunna detektera proteinet, eftersom det inte finns tillgängligt någon antikropp som kan detektera endogent Kenny. I klyvningsanalyserna som utförs i bananflugan används en fluglinje med N-terminalt, GFP-märkt, Kenny (figur 6a). Då Kenny klyvs i sin N-terminala ända kan endast den mindre klyvningsprodukten detekteras. För att möjliggöra studier av den aktiva formen av Kenny och dess tänkbara interaktionspartners måste märkningen finnas i den C-terminala ändan. Därmed

kommer de transgena flugorna som skapas innehålla en C-terminal märkning av Kenny.

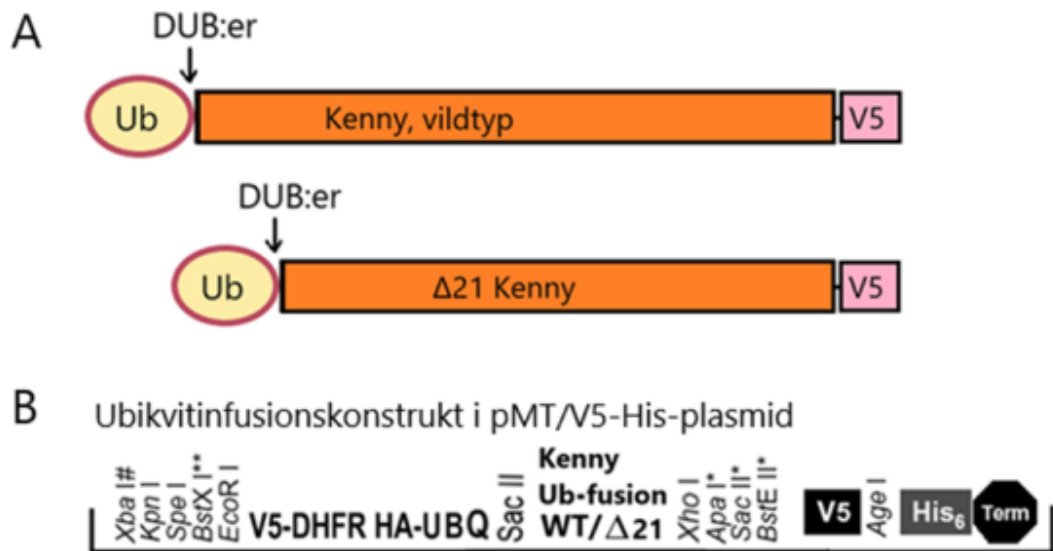
5.4.1 Vildtyps Kenny och klyvningsresistent Kenny klonades in i pUASTattB-vektorn

Som templat för kloningen användes en pMT-plasmid med vildtyps Kenny som har en C-terminal HA-märkning (hädanefter kallad pMT-Kenny-HA. För att skapa flugor med HA-märkt Kenny kommer plasmidstommen att bytas från pMT till pUASTattB. Primererna designas så att de inför lämpliga restriktionsställen i vardera ända av Kenny-HA. Primererna som användes var Kenny-HA_Framåt och Kenny-HA_Bakåt som finns uppställda i tabell 1. Efter utförd PCR klyvs ampikonet och målvektorn med de två utvalda restriktionsenzymen. Därefter ligeras de för att bilda en sammanhängande plasmid och sedan transformeras kompetenta celler med dem. De celler som inkorporerat hela plasmider selekteras och går vidare till småskalig plasmidberedning. Analys av sekvenseringsdata med mjukvaran SerialCloner 2-6-1 bekräftade att integreringen av Kenny-transgenen i pUASTattB-plasmidstommen lyckats. Därefter mångfaldigaedes och renades plasmiden genom storskalig plasmidberedning (Qiagen, Nederländerna) och skickades till Bestgene Inc. för mikroinjektion av flugembryon.

Den klyvningsresistenta (D>E) formen av Kenny innehåller en punktmutation i sin N-terminala ända som ändrar ett kodon som kodar för asparaginsyra till ett som kodar för glutaminsyra (gac>gag). I experimentet då D>E-mutanter av Kenny transfekterades tillsammans med Dredd i S2-celler framkom det att D21E är den klyvningsresistenta formen av Kenny (figur 8, prov 8). Denna punktmutation skapades genom basspecifik mutagenes och primererna som användes var Kenny-c63g, vilka finns uppställda i tabell 2. Templetet för den basspecifika mutagenesen är vildtyps Kenny-HA som har insatts i pUASTattB-vektorn. Efter utförd PCR erhöles därmed klyvningsresistent Kenny som befinner sig i den rätta plasmidstommen, det vill säga i pUASTattB. Analys av sekvenseringsdata bekräftade att den basspecifika mutagenesen lyckats införa D21E-mutationen i Kenny-transgenen. Plasmiden mångfaldigaedes och renades genom storskalig plasmidberedning (Qiagen, Nederländerna) och skickades till Bestgene Inc. för mikroinjektion av flugembryon.

5.4.3 Ständigt klyvt Kenny uttrycks i pMT-plasmider som ett ubikvitinfusionskonstrukt

För att imitera den klyvda formen av Kenny skapas en kortare version av proteinet. Kenny klyvs efter en asparaginsyra och därmed börjar den konstitutivt klyvda formen av Kenny med en annan aminosyra än metionin. För att uttrycka det klyvda Kenny måste ett okonventionellt uttryckssystem tillämpas, och i detta fall användes en ubikvitinfusion. Då ubikvitin syntetiseras i cellerna skapas de först som translationsfusioner med ribosomala proteiner, eller som polyubikvitin (Grou et al., 2015). Dessa kommer sedan att klyvas av deubikvitinaser till sina enskilda ubikvitinenheter. Detta maskineri kan utnyttjas för att skapa translationsfusioner med ubikvitin, som därmed klyvs på ett förutbestämt ställe, det vill säga efter ubikvitinenheten (Varshavsky, 2000). En schematisk illustration av ubikvitinkonstruktet med Kenny ses i figur 13.

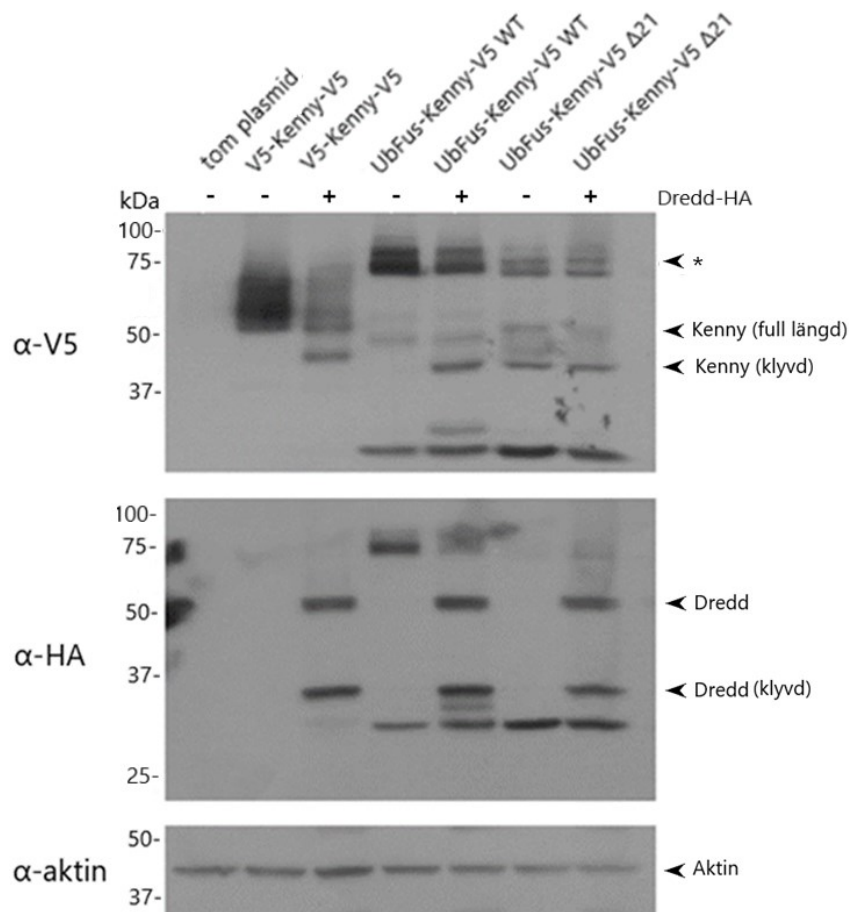


Figur 13. Skapandet av en ständigt klyvd form av Kenny genom en ubikvitinfusion. A) Den klyvda formen av Kenny inleds med aminosyra nummer 22, vilket är ett serin. Eftersom transgenen som kodar för Kenny borde inledas med en annan aminosyra än metionin måste en alternativ uttrycksstrategi tillämpas. För att inducera en klyvning på ett förutbestämt ställe skapades en ubikvitinfusion. Translationsfusioner med ubikvitinenheter klyvs av deubikvitinaser (DUB:er), och således kan proteinet klyvas posttranslationellt och inledas med en annan aminosyra än metionin. En motsvarande vildtypsversion av Kenny skapades med samma konstrukt för att fungera som kontroll för uttrycket av Kenny-transgenen. **B)** De två Kenny-transgenerna klonades in som ubikvitinfusioner i plasmiden pMT-V5-DHFR-HA-UBQ-V5-His. Kenny inleds med nukleotid nummer 4 för vildtypsversionen (eng. wildtype, WT) respektive 64 för $\Delta 21$ -versionen och avslutas med nukleotid nummer 1167.

Till att börja med skapades en gensekvens av Kenny som saknar en del av sin N-terminala ända, vilket sedan klonades in i en plasmid som innehåller komponenterna för ubikvitinfusionen samt en C-terminal märkning (pMT-V5-DHFR-HA-UBQ-V5-His). Arbetsstegen för den molekylära kloningen som utförs är i stora drag PCR, behandling med restriktionsenzym, liggering och plasmidberedning. I figur 12 ges en översikt av de ingående stegen. För att klona in Kenny i pMT-vektorn med ubikvitinkonstruktet användes primerparet pMT-KennyUbfus-vildtyp och pMT-KennyUbfus- Δ 21, vilka använde sig av samma bakåtprimer (tabell 1). Som templat användes pMT-Kenny-HA a106, c415 (se avsnitt 5.5 ” två avvikande nukleotider i pMT-Kenny-HA korrigerades”). Kloningsstrategin utnyttjade restriktionsställena SacII i framåtprimern och XhoI i bakåtprimern. Därtill tillsattes en extra nukleotid (tabell 1, markerat i lila) i framåtprimern för att förskjuta läsramen med en nukleotid så att kodonen kodar för rätt aminosyrasekvens. Gensekvensen som kodar för Kenny inleddes med nukleotid nummer fyra för vildtyps-Kenny för att exkludera det inledande kodonet som kodar för metionin. Detta initierande metionin skulle antagligen interferera med uttrycket av ubikvitinkonstruktet. Gensekvensen som kodar för Δ 21-Kenny inleddes med nukleotid nummer 64. Bakåtprimern som avgränsar slutet av Kenny-genen exkluderade det sista stop-kodonet för att i den nya plasmidstommen tillåta translation av de efterkommande markörerna. Därmed avslutades Kenny-genen i detta fall med nukleotid nummer 1167 istället för 1170 som i det endogena Kenny.

Då viltypsversionen och den ständigt klyvda versionen av Kenny klonats in i plasmiden med ubikvitinkonstruktet (härefter benämns de pMT-Ubfus-Kenny-V5 -vildtyp respektive - Δ 21) studerades deras uttryck genom transfektion av S2-celler. Celllysaten analyserades med Western blot, varvid både vildtyps Kenny och ständigt klyvt Kenny kunde detekteras i respektive prov (figur 14). Uttrycket av Kenny-mutanterna var dock rätt ineffektivt och istället förekommer även en större genprodukt i proven (utmärkt med * i figur 14). Storleken av denna motsvarar den av hela ubikvitinfusionskonstruktet, det vill säga klyvningen som förväntas ske innan Kenny uteblev delvis. Vid analys av sekvenseringsdata upptäcktes en tänkbar orsak till den ineffektiva klyvningen: Ett kodon saknas vid övergången från ubikvitin till Kenny.

Kodonet borde koda för aminosyran glycin vilket är den sista aminosyran i ubikvitinheter. Avsaknaden av ubikvitinets sista aminosyra kan mycket väl inverka på klyvningen av translationsfusionen.

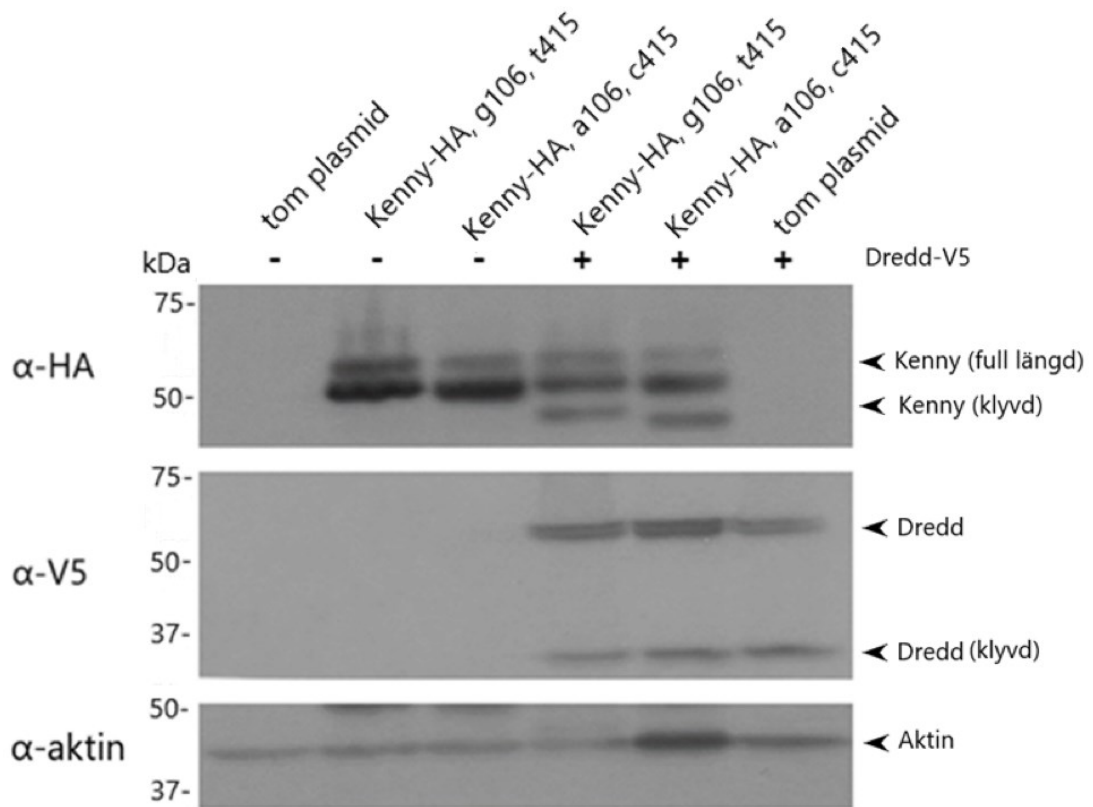


Figur 14. Uttryck av pMT-ubikvitinfusionsplasmiderna med vildtyps samt klyvingsresistent Kenny. Kenny är V5-märkt medan Dredd är HA-märkt. Plasmiden pMT-V5-Kenny-V5 uttrycker vildtyps Kenny som är V5-märkt i båda ändorna och användes som kontrollplasmid för Kenny. Ur V5-blotten framgår det att V5-Kenny-V5 uttrycks och har en storlek på cirka 50 kDa. Vid ko-expression tillsammans med Dredd klyvs V5-Kenny-V5. Vildtyps-Kenny som klonats in i ett ubikvitinfusionskonstrukt (pMT-UbFus-Kenny-V5 WT) uttrycks och är strax under 50 kDa i storlek. Då transgenen uttrycks tillsammans med Dredd leder det till att Kenny klyvs. Den ständigt klyvda versionen av Kenny som klonats in i ett ubikvitinfusionskonstrukt (pMT-UbFus-Kenny-V5 $\Delta 21$) uttrycks och har storleken av den klyvda formen av Kenny. Vid ko-expression av transgenen tillsammans med Dredd sker ingen klyvning, och således ingen storleksförändring av den ständigt klyvda formen av Kenny. I proven som transfekterats med ubikvitinfusions-konstrukten uttycks det förutom Kenny även en överflödigt V5-märkt genprodukt. Storleken av genprodukten motsvarar den av hela ubikvitinfusionskonstruktet utan att en klyvning efter ubikvitin-enheten har ägt rum. Ur HA-blotten framgår det att Dredd förekommer i de rätta proven. I aktin-blotten ses jämna nivåer av aktin mellan proven.

5.5 Två avvikande nukleotider i pMT-Kenny-HA korrigerades

I samband med kloningen av de olika versionerna av Kenny noterades det att det förekom två avvikelser i nukleotidsekvensen för plasmiden pMT-Kenny-HA jämfört med den som anges i FlyBase (FlyBase ID: FBpp0296952). Denna plasmid användes som templat för skapandet av vildtyps Kenny samt klyvningsresistent Kenny med en C-terminal HA-märkning. Avvikelserna som upptäcktes var a106g och c415t, med avseende på de nukleotider som anges för Kenny i FlyBase. Mutationerna ändrar ett positivt laddat lysin till en negativt laddad glutaminsyra (K36E) respektive en positivt laddad histidin till ett polärt, aromatiskt, tyrosin (H139Y). Aminosyrasekvensen för Kenny som anges på UniProt (ID: Q9GYV5) inkluderar E36 samt H139, vilket innebär att endast c415t-mutationen i pMT-Kenny-HA skiljer sig från de båda referenssekvenserna. För att återställa de potentiella punktmutationerna utfördes basspecifik mutagenes. Åtgärden lyckades dock endast i pMT-Kenny-HA, medan mutationerna inte kunde korrigeras i Kenny-transgenerna med pUASTattB-plasmidstomme. Den korrigerade versionen (a106, c415) av pMT-Kenny-HA användes som templat för skapandet av flugor med ständigt klyvt Kenny eftersom nukleotidsekvensen för Kenny då är lika med den som anges i FlyBase.

För att verifiera att den korrigerade versionen av Kenny i pMT-plasmiden uppvisar samma grundläggande egenskaper som den ursprungliga plasmiden utfördes ett par experiment. I det första experimentet studerades klyvningen av Kenny då plasmiderna ko-transfekteras tillsammans med Dredd. Både det ursprungliga samt det korrigerade Kenny klyvs vid ko-transfektion med Dredd (figur 16, prov 4 och 5). Den korrigerade versionen av Kenny verkar dock vara lite mindre än den ursprungliga, eftersom proteinbanden iakttas strax under den ursprungliga motsvarigheten. En posttranslationell modifiering såsom fosforylering kan vara orsaken till att den ursprungliga Kenny-plasmiden med t415 (Y139) är större än den korrigerade plasmiden med c415 (H139). I det andra experimentet undersöktes Kennys egenskap att binda till – och/eller modifieras av – Met1-ubikvitin genom att utföra en Met1-SUB-affinitetsanalys. Experimentet utfördes endast en gång men tyder på att båda versionerna av Kenny är associerat med ubikvitinkedjor (Tilläggsdata, figur T1).



Figur 16. Både den ursprungliga och den korrigerade pMT-Kenny-HA-plasmiden klyvs av Dredd. Den ursprungliga (g106, t415) samt den korrigerade (a106, c415) versionen av pMT-Kenny-HA transfekterades tillsammans med pMT-Dredd-V5 för att studera klyvningen av Kenny. Cellysatet analyserades med antikropparna α -HA, α -V5 och α -aktin. Ur HA-blotten framgår det att båda versionerna av pMT-Kenny-HA uttrycks i lika grad och att de har samma storlek. Vid ko-transfektion tillsammans med Dredd ses en klyvd produkt både för den ursprungliga och den korrigerade versionen av Kenny. Aktin-blotten visar att aktinnivåerna är jämnt fördelade mellan proven. n=2

6 Diskussion

I den här pro gradu-avhandlingen antyder experiment i cellen att Dredd klyver Kenny (figur 7) och att klyvningen sker vid D21 i Kenny (figur 8). Två olika experiment som utfördes i bananflugan visade att Dredd klyver Kenny *in vivo*: Klyvningen av Kenny ökade i de flugor som överuttrycker både Kenny och Dredd i jämförelse med de flugor som endast överuttrycker Kenny (figur 10, prov 2 och 4) samt att klyvningen minskade markant i de flugor som överuttrycker Kenny i en mutant Dredd bakgrund jämfört med Kenny-kontrollflugorna (figur 11, prov 2 och 3 i jämförelse med 4 och 5). Resultatet från dessa två klyvningsanalyser i flugan stöder hypotesen om att vid aktivering av Imd-signaleringsräckan klyver Dredd Kenny. En tänkbar följd av detta är att Kenny inte styrs till autofagosomen för nedbrytning. Därmed stabiliseras Kenny, och IKK-komplexet, för att tillåta nedströms aktivering av Imd-signaleringsräckan. I klyvningsexperimenten som utfördes i flugor utnyttjades N-terminalt märkt Kenny, vilket gör att efter klyvningen kan endast den mindre klyvningsprodukten detekteras. För att kunna iaktta vad som sker med den aktiva formen av Kenny efter klyvningen behövs C-terminalt märkta Kenny-flugor.

Klyvningsexperimentet som utfördes i flugor som matats med pan-kaspasinhibitorn Emricasan hade ingen påtagbar inhiberande effekt på klyvningen av Kenny (figur 9). Tvärtom tyder resultatet på att klyvningen av Kenny ökar efter matning med Emricasan under basala förhållanden (figur 9, prov 1 och 3). I ett försök att optimera experimentet förlängdes behandlingstiden med Emricasan till 16 timmar, varvid kaspasinhibitorn administrerades tillsammans med *Ecc15*-bakterierna. Förändringen inverkar dock inte på resultatet. En tänkbar förklaring till det motstridiga resultatet är att pan-kaspasinhibitorn Emricasan, förutom att ha en inhiberande effekt på Dredd, även inverkar på andra kaspaser i cellen. Ett annat kaspas som är involverat i regleringen av Imd-signaleringsräckan är kaspas-3-homologen *Drosophila* interleukin-1 β -konverterande enzym (eng. *Drosophila* interleukin-1 β converting enzyme, DrICE) (Kietz et al., 2022). Kaspaset DrICE är en negativ reglerare av Imd-signaleringsräckan i och med att det hindrar E3-ligaset Diap2:s aktivitet. Då den negativa regleraren DrICE inhiberas leder det till en ökad aktivering av Imd-signaleringsreckan (Kietz et al., 2022). Därmed skulle en tänkbar förklaring till den

ökade andelen klyvt Kenny i flugor som matats med pan-kaspasinhhibitorn Emricasan vara att den katalytiska aktiviteten hos DrICE inhiberas mer effektivt än den hos Dredd. För att utreda effekten som olika kaspasinhбитorer har på klyvningen av Kenny kunde andra kaspasinhбитorer utöver Emricasan användas. Utav de kaspasinhбитorer som finns på marknaden kunde exempelvis Z-IETD-FMK (inhiberar främst kaspas-8), Z-DEVD-FMK (inhiberar främst kaspas-3) och z-VAD-FMK (pan-kaspasinhбитor som inhiberar kaspas-1–10, med undantag för kaspas-2) användas (Chauvier et al., 2007; Dhani et al., 2021). En ytterligare observation som gjordes i experimentet med Emricasan var att ett proteinband med en storlek kring 75 kDa framträdde i proven från flugorna som överuttrycker GFP-Kenny i tarmen. Ackumuleringen var som störst i flugorna som under basala förhållanden matats med Emricasan (figur 9, prov 4). Ifall detta proteinband motsvarar GFP-Kenny (cirka 72 kDa) vore det intressant att studera stabiliseringen av full-längd Kenny i samband med administrering av kaspasinhбитorer. Den fulla storleken av Kenny brukar vanligtvis inte gå att detektera.

En stor del av det här pro gradu-projekt var att skapa Kenny-mutanter, som bland annat kan användas för att studera deras effekt på immunresponsen i flugan. I samband med skapandet av Kenny-flugmutanterna upptäcktes det att två nukleotider i plasmiden pMT-Kenny-HA, som tidigare använts för experiment, avviker från den angivna nukleotidsekvensen för Kenny i FlyBase. Dessa två avvikelser är a106g och c415t som motsvarar aminosyrorna K36E respektive H139Y. Då mer utförlig sekvensering utfördes av två andra plasmider som innehåller Kenny, pMT-V5-Kenny-V5 och pMTIZ-Kenny-GTC, visade det sig att a106g förekommer även i dessa. Förekomsten av E36 (g106) återfinns dock i UniProt, vilket innebär att aminosyrasekvensen för pMT-V5-Kenny-V5 och pMTIZ-Kenny-GTC överensstämmer med referenssekvensen i UniProt. Både g106 och t415 i pMT-Kenny-HA korrigerades genom basspecifik mutagenes och deras egenskaper undersöktes sedan i S2-celler. Det korrigerade Kenny (a106, c415) klyvs fortfarande i likhet med den ursprungliga versionen (figur 16, prov 4 och 5) och det finns belägg för att Kenny associerar med Met1-ubikvitinkedjor oberoende av de två potentiella punktmutationerna (figur T1). En liten skillnad i proteinstorlek mellan den ursprungliga och den korrigerade versionen av Kenny kunde dock iaktas (figur 16). Storleksskillnaden kunde bero på en posttranslationell modifiering av proteinet. Den ursprungliga versionen av pMT-

Kenny-HA verkar större och innehåller ett tyrsosin istället för en histidin vid aminosyra nummer 139. Tyrosin är en av de aminosyror som mest frekvent fosforyleras (J. V. Olsen et al., 2006). Därmed är det möjligt att den ursprungliga plasmiden fosforyleras på aminosyra nummer 139, medan den korrigerade inte gör det. Eftersom det inte framkom några större skillnader i egenskaperna hos de två versionerna av pMT-Kenny-HA tyder det på att punktmutationerna i själva verket är enbaspolymorfismer av genen som inte inverkar nämnvärt på proteinets funktion. Förekomsten av dessa genvarianter i olika fluglinjer kunde undersökas för att utreda huruvida det rör sig om punktmutationer eller enbaspolymorfism. En strategi för att undersöka detta vore att isolera mRNA som kodar för Kenny, producera cDNA genom användning av omvänt transkriptas och amplifiera sekvensen genom en PCR-reaktion. Amplikonet med Kenny kan då sekvenseras vilket ger svar på vilka nukleotider som finns i nukleotidsekvensen.

Kloningen av vildtyps samt klyvningsresistent Kenny i pUASTattB-plasmiden lyckades och företaget BestGene Inc. genererar flugor med dessa Kenny-mutanter. Utvecklingen av den klyvningsresistenta formen av Kenny fortsätter dock ännu i och med att en aminosyra fattas vid övergången från ubikvitin till Kenny. Ett sätt att införa kodonet som fattas är att utföra kloningen igen men med nya primers som är designade för detta ändamål. Ett annat alternativ är att utföra en restriktionsenzymbaserad metod kallad kodonkassettmutagenes (eng. codon cassette mutagenesis) för att införa kodonet till det önskade stället (Kegler-Ebo et al., 1994). Då kloningen av den ständigt klyvda formen av Kenny har korrigerats och uttrycket av transgenen i cellen har effektiviserats kan konstruktet klonas in i pUASTattB-plasmidstommen. Då flugorna väl anländer från BestGene Inc. måste en del nödvändiga genetiska korsningar utföras. Fluglinjerna måste balanseras så att transgenen förblir inom fluglinjen samt att det endogena Kenny muteras eller tas ur bruk på annat sätt. Produktionen av det endogena Kenny kan inhiberas genom att använda en Kenny-mutantbakgrund såsom Key4 (Rutschmann et al., 2000). Därtill ska uttrycket av UAS-Kenny läggas under kontroll av den enterocyt-specifika promotorn NP1 som är kopplat till Gal4.

En av hypoteserna som studerades var att Kenny klyvs för att stabilisera den aktiva formen av ställningsproteinet, som då förmår förmedla nedströms signalering i Imd-

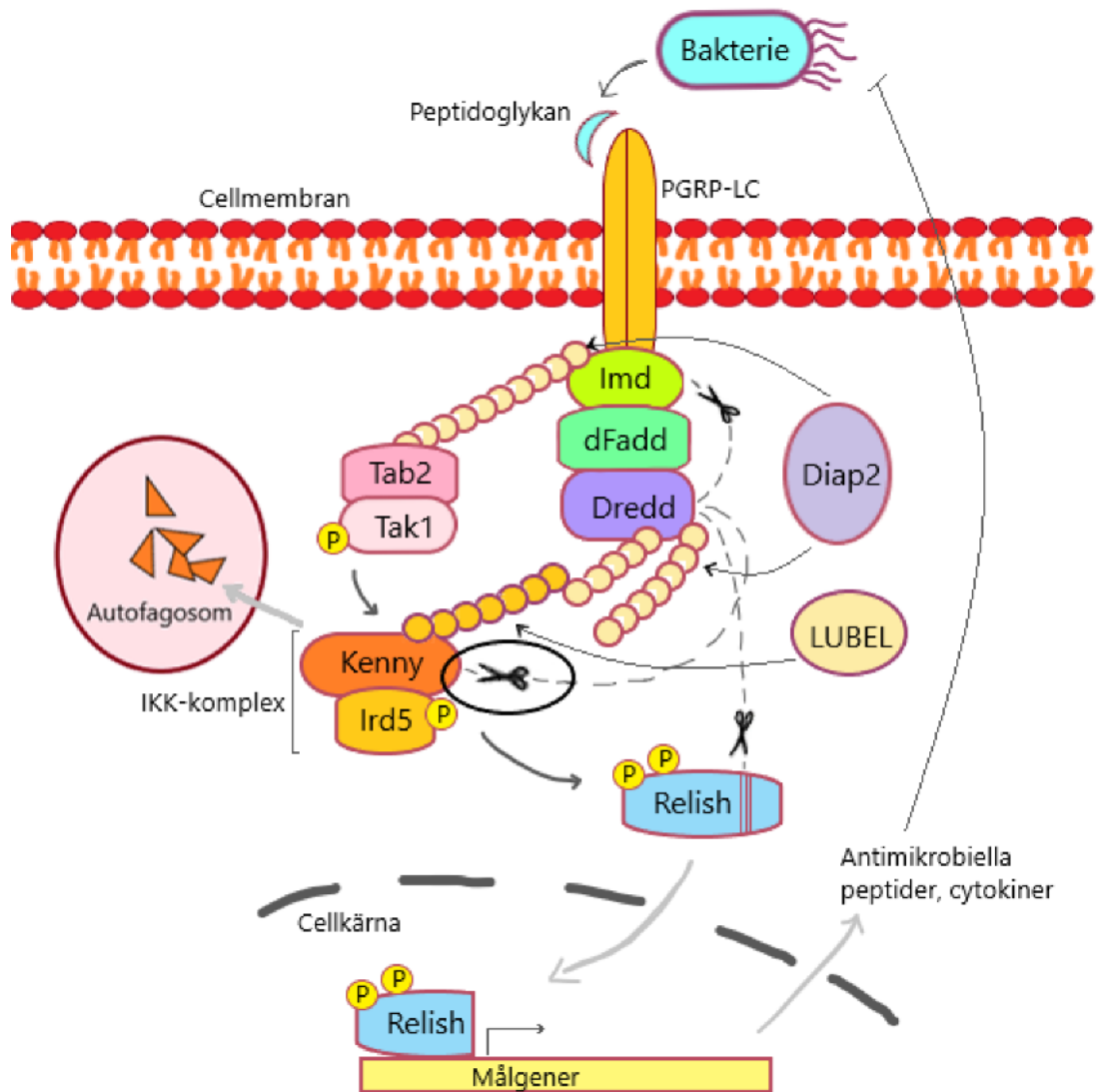
signaleringsräckan. I det här projektet verifierades det att klyvningen av Kenny avlägsnar den N-terminala signalen som styr proteinet till autofagosomen för nedbrytning. Utgående från detta är det tänkbart att flugorna som bär på Kenny-mutanterna som skapats kommer att ha olika effekter på immunresponsen då Imd-signaleringsräckan aktiveras. Kenny-vildtypsflugorna borde ha en normal immunrespons, eftersom det som skiljer dem från vildtypsflugor är att de överuttrycker HA-märkt Kenny under kontroll av Gal4/UAS-systemet. Fluglinjen med klyvningsresistent Kenny kommer ständigt att nedbrytas i autofagosomen och det är möjligt att denna mutant inte kan aktivera någon effektiv immunrespons. Då kloningen av den ständigt klyvda formen av Kenny lyckats och flugor med detta konstrukt genererats kan även dessa studeras. Flugor som överuttrycker ständigt klyvt Kenny kommer antagligen att ha ett överskott av IKK-komplexet vilket då borde öka fosforyleringen av transkriptionsfaktorn NF- κ B. Ett överflöd av IKK-komplexet kan möjligtvis leda till aktivering av Imd-signaleringsräckan även i avsaknad av en bakteriell infektion.

Studier om regleringen av Kenny är nödvändiga trots att Kenny och dess homolog i människan, NEMO, regleras på olika sätt. Nivån av Kenny regleras bland annat genom autofagosomal nedbrytning tack vare sin LIR-domän (Tusco et al., 2017), medan NEMO som saknar en LIR-domän regleras genom nedbrytning i proteasomen (Chathuranga et al., 2020; Zhang et al., 2017). Trots skillnaderna i deras reglering kan det hända att effekten av deras nedbrytning är likartade, i och med att båda reglerar aktiviteten av IKK-komplexet de är del av. Därmed kan studier om hur klyvningen och nedbrytningen av Kenny reglerar IKK-komplexet, och vilka följder detta har, även ge ledtrådar om motsvarande fenomen i människan.

7 Avslutning

För att finna lösningar till problem kring inflammatoriska sjukdomar är det viktigt att förstå hur proteiner som reglerar inflammationssignaleringen fungerar. I och med att inflammationssignalering är ett komplext fenomen är det nödvändigt att använda enkla system för att kunna avgränsa studierna till specifika delar av immunförsvaret. Bananflugan *Drosophila melanogaster* är en lämplig modellorganism för studier av det medfödda immunförsvaret och i den här pro gradu-avhandlingen studerades Imd-signaleringsräckan som är homolog till TNFR-signaleringsräckan hos människan (Buchon et al., 2014). Imd-signaleringsräckan reglerar aktiveringen av NF- κ B-transkriptionsfaktorn Relish som styr uttrycket av målgener vars funktion är att initiera en immunrespons och främja cellöverlevnad. I det här projektet studerades ställningsproteinet Kenny och dess reglering genom proteolytisk klyvning utförd av Dredd. För att i framtida studier kunna utreda effekten av denna reglering på immunresponsen skapades Kenny-transgener.

I figur 15 illustreras en uppdaterad version av Imd-signaleringsräckan i vilket bidraget från det här pro gradu-projektet, det vill säga att Dredd klyver Kenny, finns tillsatt. Hypotesen som studerades var att Dredd klyver bort LIR-domänen i Kenny för att stabilisera den aktiva formen av Kenny vilket då möjliggör nedströms signalering i Imd-signaleringsräckan. I den här pro gradu-avhandlingen visas det att LIR-domänen avlägsnas genom proteolytisk klyvning utförd av Dredd. Genom molekylär kloning skapades två transgena flugor: vildtyps och klyvningsresistent Kenny med en C-terminal HA-märkning. Med dessa Kenny-mutanter kan då den andra delen av hypotesen studeras, det vill säga ifall klyvningen av Kenny stabiliserar dess aktiva form för att möjliggöra nedströms aktivering av Imd-signaleringsräckan. För att studera detta kunde överlevnadsexperiment utföras för att iaktta hur väl flugorna med de olika Kenny-mutanterna överlever bakterieinfektioner. Ett annat sätt att studera aktiveringen av Imd-signaleringsräckan vore att studera uttrycket av NF- κ B-målgener genom Realtids-PCR.



Figur 15. En uppdaterad schematisk illustration över Imd-signaleringsräckan. Signeleringen inleds då membranreceptorn PGRP-LC aktiveras av peptidoglykan, vilket leder till rekrytering av proteiner som genom molekylära interaktioner slutligen aktiverar transkriptionsfaktorn Relish. Kaspaset Dredd ansvarar bland annat för att klyva Imd och Relish. Kenny är en del av IKK-komplexet som fosforylerar Relish, vilket behövs för att effektivisera uttrycket av transkriptionsfaktorns målgener. Under basala förhållanden degraderas Kenny i autofagosomen. Det nya som den här pro gradu-avhandlingen bidragit med är att kaspaset Dredd även klyver Kenny (inringat i svart), vilket avlägsnar signalen för autofagosomal nedbrytning. Tjocka mörkgrå pilar visar fosforylering medan tjocka ljusgrå pilar visar passage genom membran, exempelvis till autofagosomen eller till cellkärnan. Svarta saxar syboliserar proteolytisk klyvning.

Den C-terminala märkningen av Kenny möjliggör detektering av den aktiva formen av Kenny. Därmed kunde Kennys samverkan med andra proteiner som medverkar i Imd-signaleringsräckan studeras. Det vore intressant att studera tänkbara reglerare av

Kenny och IKK-komplexet. Ref(2)P är ett adaptorprotein för autofagosomal nedbrytning och opublicerade data från vårt labb indikerar att Ref(2)P samverkar med Kenny. En annan studie konstaterade att Kenny ackumuleras i cytoplasmiska aggregat och att dessa ko-lokaliserar med Ref(2)P i autofagimutanta flugor (Tusco et al., 2017). Framtida studier skulle kunna klargöra ifall interaktionen mellan Ref(2)P och Kenny ytterligare bidrar med ett sätt att reglera Kenny genom autofagosomal nedbrytning. Homologen i människan för Ref(2)P är p62, och proteinet har visats negativt reglera aktiveringen av NF- κ B genom att associera med NEMO och styra den till autofagosomen för nedbrytning (Zhang et al., 2017).

8 Litteraturförteckning

- 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 & Differentiation*, 26(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0164-x>
- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., ... Venter, J. C. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5461), 2185–2195. <https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2185>
- All Nobel Prizes in Physiology or Medicine*. (2023). NobelPrize.Org. <https://www.nobelprize.org/prizes/lists/all-nobel-laureates-in-physiology-or-medicine>
- Araye, Q., & Sawamura, K. (2013). Genetic decay of balancer chromosomes in *Drosophila melanogaster*. *Fly*, 7(3), 184–186. <https://doi.org/10.4161/fly.24466>
- Atreya, I., Atreya, R., & Neurath, M. F. (2008). NF- κ B in inflammatory bowel disease. *Journal of Internal Medicine*, 263(6), 591–596. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2008.01953.x>
- Baldwin, A. S. (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: New discoveries and insights. *Annual Review of Immunology*, 14, 649–683. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.14.1.649>

- Bischof, J., Maeda, R. K., Hediger, M., Karch, F., & Basler, K. (2007). An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific ϕ C31 integrases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(9), 3312–3317.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0611511104>
- Bosco, G., Campbell, P., Leiva-Neto, J. T., & Markow, T. A. (2007). Analysis of *Drosophila* Species Genome Size and Satellite DNA Content Reveals Significant Differences Among Strains as Well as Between Species. *Genetics*, *177*(3), 1277–1290.
<https://doi.org/10.1534/genetics.107.075069>
- Brand, A. H., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, *118*(2), 401–415.
<https://doi.org/10.1242/dev.118.2.401>
- Buchon, N., Broderick, N. A., Poidevin, M., Pradervand, S., & Lemaitre, B. (2009). *Drosophila* Intestinal Response to Bacterial Infection: Activation of Host Defense and Stem Cell Proliferation. *Cell Host & Microbe*, *5*(2), 200–211.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.01.003>
- Buchon, N., Silverman, N., & Cherry, S. (2014). Immunity in *Drosophila melanogaster*—From microbial recognition to whole-organism physiology. *Nature Reviews Immunology*, *14*(12), 796–810. <https://doi.org/10.1038/nri3763>
- C. elegans Sequencing Consortium. (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. *Science (New York, N.Y.)*, *282*(5396), 2012–2018. <https://doi.org/10.1126/science.282.5396.2012>

- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., & Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science (New York, N.Y.)*, *263*(5148), 802–805. <https://doi.org/10.1126/science.8303295>
- Chathuranga, K., Kim, T.-H., Lee, H., Park, J.-S., Kim, J.-H., Chathuranga, W. A. G., Ekanayaka, P., Choi, Y. J., Lee, C.-H., Kim, C.-J., Jung, J. U., & Lee, J.-S. (2020). Negative regulation of NEMO signaling by the ubiquitin E3 ligase MARCH2. *The EMBO Journal*, *39*(21), e105139. <https://doi.org/10.15252/emboj.2020105139>
- Chauvier, D., Ankri, S., Charriaut-Marlangue, C., Casimir, R., & Jacotot, E. (2007). Broad-spectrum caspase inhibitors: From myth to reality? *Cell Death & Differentiation*, *14*(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402044>
- Choe, K.-M., Werner, T., Stöven, S., Hultmark, D., & Anderson, K. V. (2002). Requirement for a Peptidoglycan Recognition Protein (PGRP) in Relish Activation and Antibacterial Immune Responses in *Drosophila*. *Science*, *296*(5566), 359–362. <https://doi.org/10.1126/science.1070216>
- Crown, K. N., Miller, D. E., Sekelsky, J., & Hawley, R. S. (2018). Local Inversion Heterozygosity Alters Recombination throughout the Genome. *Current Biology: CB*, *28*(18), 2984-2990.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.07.004>
- Dhani, S., Zhao, Y., & Zhivotovsky, B. (2021). A long way to go: Caspase inhibitors in clinical use. *Cell Death & Disease*, *12*(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04240-3>
- Dobzhansky, Th. (1930). The manifold effects of the genes Stubble and stubbloid in *Drosophila melanogaster*. *Zeitschrift Für Induktive Abstammungs- Und Vererbungslehre*, *54*(1), 427–457. <https://doi.org/10.1007/BF01848968>

- Duffy, J. B. (2002). GAL4 system in drosophila: A fly geneticist's swiss army knife. *Genesis*, 34(1–2), 1–15. <https://doi.org/10.1002/gene.10150>
- Ertürk-Hasdemir, D., Broemer, M., Leulier, F., Lane, W. S., Paquette, N., Hwang, D., Kim, C.-H., Stöven, S., Meier, P., & Silverman, N. (2009). Two roles for the *Drosophila* IKK complex in the activation of Relish and the induction of antimicrobial peptide genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(24), 9779–9784. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812022106>
- 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. *The EMBO Journal*, 17(5), 1217–1227. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.5.1217>
- Fiil, B. K., Damgaard, R. B., Wagner, S. A., Keusekotten, K., Fritsch, M., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., Choudhary, C., Komander, D., & Gyrd-Hansen, M. (2013). OTULIN Restricts Met1-Linked Ubiquitination to Control Innate Immune Signaling. *Molecular Cell*, 50(6), 818–830. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.06.004>
- Fischer, J. A., Giniger, E., Maniatis, T., & Ptashne, M. (1988). GAL4 activates transcription in *Drosophila*. *Nature*, 332(6167), Article 6167. <https://doi.org/10.1038/332853a0>
- FlyBase Gene Report: Dmel\key*. (2015). <https://flybase.org/reports/FBgn0041205>
- Furman, D., Campisi, J., Verdin, E., & et.al. (2019). *Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span*. 25, 1822–1832. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0675-0>

Georgel, P., Naitza, S., Kappler, C., Ferrandon, D., Zachary, D., Swimmer, C., Kopczynski, C., Duyk, G., Reichhart, J. M., & Hoffmann, J. A. (2001). Drosophila immune deficiency (IMD) is a death domain protein that activates antibacterial defense and can promote apoptosis. *Developmental Cell*, *1*(4), 503–514.

[https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(01\)00059-4](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(01)00059-4)

Giniger, E., Varnum, S. M., & Ptashne, M. (1985). Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell*, *40*(4), 767–774. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90336-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90336-8)

Gough, P., & Myles, I. A. (2020). Tumor Necrosis Factor Receptors: Pleiotropic Signaling Complexes and Their Differential Effects. *Frontiers in Immunology*, *11*.

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.585880>

Gramates, L. S., Agapite, J., Attrill, H., Calvi, B. R., Crosby, M. A., dos Santos, G., Goodman, J. L., Goutte-Gattat, D., Jenkins, V. K., Kaufman, T., Larkin, A., Matthews, B. B., Millburn, G., Strelets, V. B., & the FlyBase Consortium. (2022). FlyBase: A guided tour of highlighted features. *Genetics*, *220*(4), iyac035.

<https://doi.org/10.1093/genetics/iyac035>

Green, N., Alexander, H., Olson, A., Alexander, S., Shinnick, T. M., Sutcliffe, J. G., & Lerner, R. A. (1982). Immunogenic structure of the influenza virus hemagglutinin. *Cell*, *28*(3), 477–487. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90202-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90202-1)

Groth, A., Fish, M., Nusse, R., & Calos, M. (2004). Construction of transgenic Drosophila by using the site-specific integrase from phage phiC31. *Genetics*, *166*(4).

<https://doi.org/10.1534/genetics.166.4.1775>

- Grou, C. P., Pinto, M. P., Mendes, A. V., Domingues, P., & Azevedo, J. E. (2015). The de novo synthesis of ubiquitin: Identification of deubiquitinases acting on ubiquitin precursors. *Scientific Reports*, *5*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/srep12836>
- Hales, K. G., Korey, C. A., Larracuente, A. M., & Roberts, D. M. (2015). Genetics on the Fly: A Primer on the Drosophila Model System. *Genetics*, *201*(3), 815–842. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.183392>
- Hanke, T., Szawlowski, P., & Randall, R. E. (1992). Construction of solid matrix-antibody-antigen complexes containing simian immunodeficiency virus p27 using tag-specific monoclonal antibody and tag-linked antigen. *Journal of General Virology*, *73*(3), 653–660. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-3-653>
- Hartwell, L., Hood, L., Goldberg, M., Reynolds, A. E., & Silver, L. (2021). Reference D: *Drosophila melanogaster*: Genetic Portrait of the Fruit Fly. In *Genetics: From Genes to Genomes* (7th ed., pp. 76–102). McGraw-Hill Higher Education.
- Henry, C. M., & Martin, S. J. (2017). Caspase-8 Acts in a Non-enzymatic Role as a Scaffold for Assembly of a Pro-inflammatory ‘FADDosome’ Complex upon TRAIL Stimulation. *Molecular Cell*, *65*(4), 715-729.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.01.022>
- Houtz, P., Bonfini, A., Bing, X., & Buchon, N. (2019). Recruitment of Adult Precursor Cells Underlies Limited Repair of the Infected Larval Midgut in *Drosophila*. *Cell Host & Microbe*, *26*(3), 412-425.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.08.006>
- Hu, W.-H., Johnson, H., & Shu, H.-B. (2000). Activation of NF- κ B by FADD, Casper, and Caspase-8 *. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(15), 10838–10844. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.15.10838>

- Ivey-Hoyle, M. (1991). Recombinant gene expression in cultured *Drosophila melanogaster* cells. *Current Opinion in Biotechnology*, 2(5), 704–707.
[https://doi.org/10.1016/0958-1669\(91\)90038-7](https://doi.org/10.1016/0958-1669(91)90038-7)
- Julien, O., & Wells, J. A. (2017). Caspases and their substrates. *Cell Death and Differentiation*, 24(8), 1380–1389. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.44>
- Kang, T.-B., Oh, G.-S., Scandella, E., Bolinger, B., Ludewig, B., Kovalenko, A., & Wallach, D. (2008). Mutation of a self-processing site in caspase-8 compromises its apoptotic but not its nonapoptotic functions in bacterial artificial chromosome-transgenic mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 181(4), 2522–2532.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.4.2522>
- Kegler-Ebo, D. M., Docktor, C. M., & DiMaio, D. (1994). Codon cassette mutagenesis: A general method to insert or replace individual codons by using universal mutagenic cassettes. *Nucleic Acids Research*, 22(9), 1593.
<https://doi.org/10.1093/nar/22.9.1593>
- Kietz, C., & Meinander, A. (2022). *Drosophila* caspases as guardians of host-microbe interactions. *Cell Death & Differentiation*, 30(2), Article 2.
<https://doi.org/10.1038/s41418-022-01038-4>
- Kietz, C., Mohan, A. K., Pollari, V., Tuominen, I.-E., Ribeiro, P. S., Meier, P., & Meinander, A. (2022). Drice restrains Diap2-mediated inflammatory signalling and intestinal inflammation. *Cell Death & Differentiation*, 29(1), Article 1.
<https://doi.org/10.1038/s41418-021-00832-w>

- Kim, C.-H., Paik, D., Rus, F., & Silverman, N. (2014). The Caspase-8 Homolog Dredd Cleaves Imd and Relish but Is Not Inhibited by p35 *. *Journal of Biological Chemistry*, 289(29), 20092–20101. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.544841>
- Kleino, A., Valanne, S., Ulvila, J., Kallio, J., Myllymäki, H., Enwald, H., Stöven, S., Poidevin, M., Ueda, R., Hultmark, D., Lemaitre, B., & Rämet, M. (2005). Inhibitor of apoptosis 2 and TAK1-binding protein are components of the Drosophila Imd pathway. *The EMBO Journal*, 24(19), 3423–3434. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600807>
- Kumar, S., & Doumanis, J. (2000). The fly caspases. *Cell Death & Differentiation*, 7(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400756>
- Lamkanfi, M., Declercq, W., Kalai, M., Saelens, X., & Vandenabeele, P. (2002). Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death & Differentiation*, 9(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400989>
- Lavrik, I., Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Weyd, H., Krammer, P. H., & Kirchhoff, S. (2003). The active caspase-8 heterotetramer is formed at the CD95 DISC. *Cell Death & Differentiation*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401156>
- Leulier, F., Lhocine, N., Lemaitre, B., & Meier, P. (2006). The Drosophila Inhibitor of Apoptosis Protein DIAP2 Functions in Innate Immunity and Is Essential To Resist Gram-Negative Bacterial Infection. *Molecular and Cellular Biology*, 26(21), 7821–7831. <https://doi.org/10.1128/MCB.00548-06>
- Leulier, F., Rodriguez, A., Khush, R. S., Abrams, J. M., & Lemaitre, B. (2000). The Drosophila caspase Dredd is required to resist Gram-negative bacterial infection. *EMBO Reports*, 1(4), 353–358. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvd073>

- Leulier, F., Vidal, S., Saigo, K., Ueda, R., & Lemaitre, B. (2002). Inducible expression of double-stranded RNA reveals a role for dFADD in the regulation of the antibacterial response in *Drosophila* adults. *Current Biology: CB*, *12*(12), 996–1000. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)00873-4](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)00873-4)
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S.-C. (2017). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *2*(1), 17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
- Lu, Y., Wu, L. P., & Anderson, K. V. (2001). The antibacterial arm of the *Drosophila* innate immune response requires an I κ B kinase. *Genes & Development*, *15*(1), 104–110. <https://doi.org/10.1101/gad.856901>
- Mace, P. D., & Riedl, S. J. (2010). Molecular cell death platforms and assemblies. *Current Opinion in Cell Biology*, *22*(6), 828–836. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.08.004>
- Matsumoto, M. L., Dong, K. C., Yu, C., Phu, L., Gao, X., Hannoush, R. N., Hymowitz, S. G., Kirkpatrick, D. S., Dixit, V. M., & Kelley, R. F. (2012). Engineering and Structural Characterization of a Linear Polyubiquitin-Specific Antibody. *Journal of Molecular Biology*, *418*(3), 134–144. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.12.053>
- 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. *The EMBO Journal*, *31*(12), 2770–2783. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.121>
- Miller, D. E., Cook, K. R., & Hawley, R. S. (2019). The joy of balancers. *PLoS Genetics*, *15*(11), e1008421. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008421>

- Morgan, T. H. (1910). SEX LIMITED INHERITANCE IN DROSOPHILA. *Science (New York, N.Y.)*, 32(812), 120–122. <https://doi.org/10.1126/science.32.812.120>
- Morgan, T. H. (1915). *The Mechanism of Mendelian heredity* (pp. 1–286). H. Holt and company. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.22551>
- Muller, H. J. (1918). Genetic Variability, Twin Hybrids and Constant Hybrids, in a Case of Balanced Lethal Factors. *Genetics*, 3(5), 422–499. <https://doi.org/10.1093/genetics/3.5.422>
- Myllymäki, H., Valanne, S., & Rämetsä, M. (2014). The *Drosophila* Imd Signaling Pathway. *The Journal of Immunology*, 192(8), 3455. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303309>
- Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnädig, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., & Mann, M. (2006). Global, In Vivo, and Site-Specific Phosphorylation Dynamics in Signaling Networks. *Cell*, 127(3), 635–648. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.026>
- Olsen, M. K., Rockenbach, S. K., Fischer, H. D., Hoogerheide, J. G., & Tomich, C. S. (1992). Stable production of an analog of human tissue plasminogen activator from cultured *Drosophila* cells. *Cytotechnology*, 10(2), 157–167. <https://doi.org/10.1007/BF00570892>
- Paquette, N., Broemer, M., Aggarwal, K., Chen, L., Husson, M., Ertürk-Hasdemir, D., Reichhart, J.-M., Meier, P., & Silverman, N. (2010). Caspase-Mediated Cleavage, IAP Binding, and Ubiquitination: Linking Three Mechanisms Crucial for *Drosophila* NF- κ B Signaling. *Molecular Cell*, 37(2), 172–182. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.12.036>

- Rahighi, S., Ikeda, F., Kawasaki, M., Akutsu, M., Suzuki, N., Kato, R., Kensche, T., Uejima, T., Bloor, S., Komander, D., Randow, F., Wakatsuki, S., & Dikic, I. (2009). Specific Recognition of Linear Ubiquitin Chains by NEMO Is Important for NF- κ B Activation. *Cell*, *136*(6), 1098–1109. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.007>
- Rogler, G., Brand, K., Vogl, D., Page, S., Hofmeister, R., Andus, T., Knuechel, R., Baeuerle, P. A., Schölmerich, J., & Gross, V. (1998). Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology*, *115*(2), 357–369. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(98\)70202-1](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(98)70202-1)
- Rubin, G. M., Kidwell, M. G., & Bingham, P. M. (1982). The molecular basis of P-M hybrid dysgenesis: The nature of induced mutations. *Cell*, *29*(3), 987–994. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90462-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90462-7)
- Rubin, G. M., & Spradling, A. C. (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science (New York, N.Y.)*, *218*(4570), 348–353. <https://doi.org/10.1126/science.6289436>
- Rutschmann, S., Jung, A. C., Zhou, R., Silverman, N., Hoffmann, J. A., & Ferrandon, D. (2000). Role of *Drosophila* IKK gamma in a toll-independent antibacterial immune response. *Nature Immunology*, *1*(4), 342–347. <https://doi.org/10.1038/79801>
- Schottelius, A. J., & Baldwin, A. S. (1999). A role for transcription factor NF-kappa B in intestinal inflammation. *International Journal of Colorectal Disease*, *14*(1), 18–28. <https://doi.org/10.1007/s003840050178>
- Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., & Kumar, S. (2015). Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death & Differentiation*, *22*(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.216>

- Silverman, N., Zhou, R., Stöven, S., Pandey, N., Hultmark, D., & Maniatis, T. (2000). A *Drosophila* IκB kinase complex required for Relish cleavage and antibacterial immunity. *Genes & Development*, *14*(19), 2461–2471.
- Sternberg, N., & Hamilton, D. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination: I. Recombination between loxP sites. *Journal of Molecular Biology*, *150*(4), 467–486. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90375-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90375-2)
- Stöven, S., Ando, I., Kadalayil, L., Engström, Y., & Hultmark, D. (2000). Activation of the *Drosophila* NF-κappaB factor Relish by rapid endoproteolytic cleavage. *EMBO Reports*, *1*(4), 347–352. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvd072>
- Stöven, S., Silverman, N., Junell, A., Hedengren-Olcott, M., Erturk, D., Engström, Y., Maniatis, T., & Hultmark, D. (2003). Caspase-mediated processing of the *Drosophila* NF-κB factor Relish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(10), 5991–5996. <https://doi.org/10.1073/pnas.1035902100>
- The top 10 causes of death.* (2020, December 9). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
- Thornberry, N. A., Rano, T. A., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V. M., Nordstrom, P. A., Roy, S., Vaillancourt, J. P., Chapman, K. T., & Nicholson, D. W. (1997). A Combinatorial Approach Defines Specificities of Members of the Caspase Family and Granzyme B: FUNCTIONAL RELATIONSHIPS ESTABLISHED FOR KEY MEDIATORS OF APOPTOSIS *. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(29), 17907–17911. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.29.17907>

- Thorpe, H., Wilson, S., & Smith, M. (2000). Control of directionality in the site-specific recombination system of the *Streptomyces* phage phiC31. *Molecular Microbiology*, *38*, 232–241.
- Tusco, R., Jacomin, A.-C., Jain, A., Penman, B. S., Larsen, K. B., Johansen, T., & Nezis, I. P. (2017). Kenny mediates selective autophagic degradation of the IKK complex to control innate immune responses. *Nature Communications*, *8*(1), 1264. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01287-9>
- Tzou, P., Ohresser, S., Ferrandon, D., Capovilla, M., Reichhart, J.-M., Lemaitre, B., Hoffmann, J. A., & Imler, J.-L. (2000). Tissue-Specific Inducible Expression of Antimicrobial Peptide Genes in *Drosophila* Surface Epithelia. *Immunity*, *13*(5), 737–748. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)00072-8](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)00072-8)
- Valanne, S., Wang, J.-H., & Rämet, M. (2011, January 15). *The Drosophila Toll Signaling Pathway | The Journal of Immunology | American Association of Immunologists*. <https://journals.aai.org/jimmunol/article/186/2/649/84470/The-Drosophila-Toll-Signaling-Pathway>
- Van Opendenbosch, N., & Lamkanfi, M. (2019). Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. *Immunity*, *50*(6), 1352–1364. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.05.020>
- Varshavsky, A. (2000). Ubiquitin fusion technique and its descendants. In J. Thorner, S. D. Emr, & J. N. Abelson (Eds.), *Methods in Enzymology* (Vol. 327, pp. 578–593). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(00\)27303-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(00)27303-5)
- Ward, L. (1923). The Genetics of Curly Wing in *Drosophila*. Another Case of Balanced Lethal Factors. *Genetics*, *8*(3), 276–300. <https://doi.org/10.1093/genetics/8.3.276>

Zhang, Y., Guo, X., Yan, W., Chen, Y., Ke, M., Cheng, C., Zhu, X., Xue, W., Zhou, Q., Zheng, L., Wang, S., Wu, B., Liu, X., Ma, L., Huang, L., & Huang, K. (2017). ANGPTL8 negatively regulates NF- κ B activation by facilitating selective autophagic degradation of IKK γ . *Nature Communications*, 8, 2164. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02355-w>

Appendix

Receptbilagor

Akrylamidgelerna som användes i SDS-PAGE består av en övre och en undre gel, varvid den övre gelen består av 0,0625 M Tris-bas pH 6,8 (Sigma-Aldrich, USA), 0,1 % SDS (Sigma-Aldrich, USA), 3,75 % akrylamid (BioRad, USA), 0,04 % APS (Sigma-Aldrich, USA), 0,02 % TEMED (Sigma, USA). Den undre gelen består av 0,375 M Tris-bas pH 8,8 (Sigma-Aldrich, USA), 0,1 % SDS (Sigma-Aldrich, USA), 10 % akrylamid (BioRad, USA), 0,05 % APS (Sigma, USA) och 0,05 % TEMED (Sigma, USA).

IP-lyseringsbufferten består av 10 mM Tris-bas, 150 mM NaCl (Sigma, USA), 5 mM EDTA (Sigma-Aldrich, USA), 0,1 % Triton X-100 (Honeywell Fluka, USA) och 5 % glycerol (Sigma-Aldrich, USA) utspätt i RO-vatten.

Körbufferten för SDS-PAGE består av 25 mM Tris-bas (Sigma-Aldrich, USA), 192 mM glycin (Sigma-Aldrich) och 0,1 % SDS (Sigma-Aldrich, USA) utspätt i vatten

Lösningarna för de primära antikropparna består av 1:500–1:2500 primär antikropp, 1 % bovins serumalbumin, 0,02 % natriumazid (NaN_3) upplöst i PBS (Medicago AB, Sverige).

4X Laemmli-bufferten består av 39 % glycerol (Sigma-Aldrich, USA), 3,9 % SDS (Sigma, USA), 0,24 M Tris-bas (Sigma-Aldrich, USA), 0,019 % bromfenolblå (Sigma-Aldrich, USA) och 3 % betamerkaptoetanol (Sigma-Aldrich, USA).

S2-lyseringsbufferten består av 50 mM Tris-bas (Sigma-Aldrich, USA), 150 mM NaCl (Sigma, USA), 1 % Triton X-100 (Honeywell Fluka, USA), 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich, USA) och 10 % glycerol (Sigma-Aldrich, USA) som inför lysering av celler kompletteras med 5 mM NEM (Sigma-Aldrich, USA), 5 mM kloroacetamid (Aldrich, USA) och 1 mM DTT (Sigma, USA).

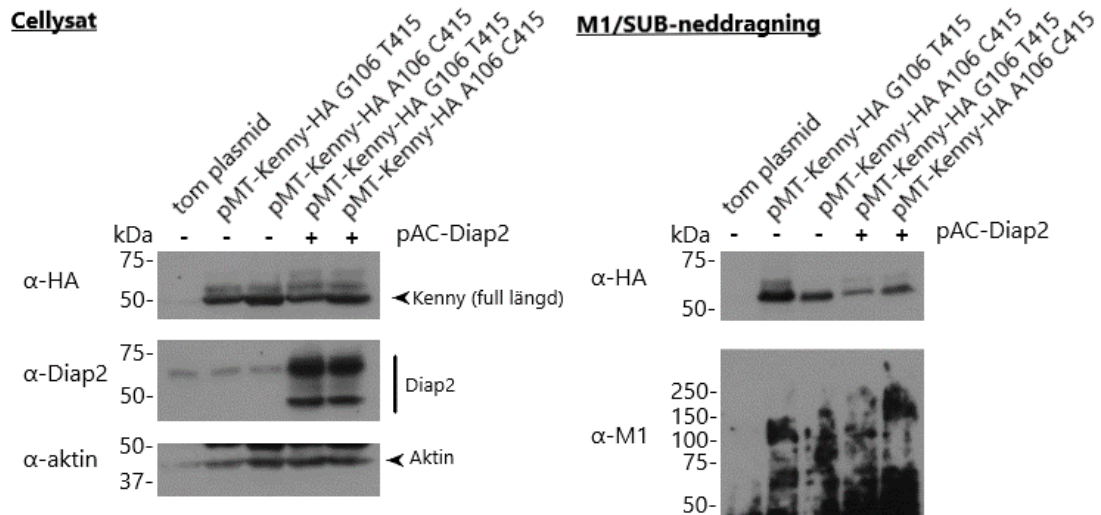
Tvättbufferten består av en tablett PBS (Medicago AB, Sverige) upplöst i 1 liter RO-vatten och 0,2 % Tween (Sigma, USA).

Överföringsbufferten vid SDS-PAGE består av 25 mM Tris-bas (Sigma-Aldrich, USA), 192 mM glycin (Sigma-Aldrich, USA), 0,01 % SDS (Sigma-Aldrich, USA), 20% metanol (Sigma-Aldrich, USA) utspätt i RO-vatten.

Tilläggsdata om experiment

För att verifiera att den korrigerade pMT-Kenny-HA plasmiden har liknande egenskaper som den ursprungliga versionen studeras Kennys egenskap att binda till - och/eller modifieras av- ubikvitin. Detta gjordes genom att utföra en Met1/SUB-affinitetsanalys och studera möjliga ubikvitin-konjugat. Analysen är nödvändig för framtida användning av de korrigerade plasmiderna men eftersom detta ligger utanför avhandlingens målsättning behandlas experimentet som tilläggsmaterial. Experimentet har därmed inte prioriterats vilket är orsaken till att det endast utförts en gång.

Kenny transfekterades tillsammans med E3-ligaset Diap2 för att öka ubikvitineringen av Kenny. Diap2 bygger upp K63-länkade ubikvitinkedjor, vilka antas ingå tillsammans med Met1-länkade sådana i polyubikvitinkedjor som fästs på Kenny. Experimentet tyder på att båda versionerna av Kenny är associerat med ubikvitinkedjor (Figur T1), men fler upprepningar och mer ingående analyser krävs för att fastställa Kennys interaktion med Met1-länkade ubikvitinkedjor. Ur det här experimentet är det svårt att dra någon slutsats om nivån av de Met1-länkade ubikvitinkedjor mellan proven som transfekterats med pMT-Kenny-HA.



Figur T1. Både det ursprungliga och det korrigerade Kenny-HA i pMT-plasmiden binder till ubiquitin eller blir modifierat av det. Den ursprungliga (G106 T415) samt den korrigerade (A106 C415) versionen av pMT-Kenny-HA transfekterades tillsammans med pMT-Dredd-V5 för att studera Kennys förmåga att binda Met1-ubikvitin. Celllysaten analyserades med antikropparna α -HA, α -Diap2 och α -aktin. Ur HA-blotten framgår det att båda versionerna av pMT-Kenny-HA uttrycks i lika grad och att de har samma storlek. Vid ko-transfektion tillsammans med Diap2 ses en modifierad version av Kenny som har ökad molekylvikt både för den ursprungliga och den korrigerade versionen av Kenny. Ökningen beror antagligen på att Kenny blir ubiquitinerat i dessa prov. Met1/SUB-neddragningsprovet analyserades med α -HA, α -Met1. Ur HA-blotten framgår det att båda versionerna av Kenny bildar konjugat med Met1-länkat ubiquitin. I Met1-blotten ses M1-länkade ubiquitinkedjor i samtliga prov från cellerna som transfekterats med Kenny. n=1