



drICE förhindrar bakterieförmedlad inflammation i
Drosophila melanogasters tarm

Pro gradu-avhandling i cellbiologi, 223996.0, 40 sp

Vilma Pollari 37990

vpollari@abo.fi

Handledare: FD Annika Meinander

Praktisk handledning: Christa Kietz

Fakulteten för naturvetenskaper och teknik

Åbo Akademi, 2018

Förord

När jag studerade i gymnasiet var min stora dröm att bli veterinär. Eftersom det var väldigt svårt att komma in till veterinärlinjen vid Helsingfors Universitet, sökte jag även till andra skolningslinjer vid andra universitet. En av linjerna var cellbiologi vid Åbo Akademi. Jag kom inte in till veterinärlinjen, men till min stora överraskning, blev cellbiologi vid Åbo Akademi min studieplats för de följande fem åren. Snabbt efter att studierna börjat fick jag veta att min bror dött. Det att min bror var borta startade en händelsekedja där de fem följande åren blev de tyngsta men samtidigt mest lärorikaste åren i mitt liv. Även om jag gick i genom otrevliga händelser i mitt liv, blev cellbiologin mera och mera viktig. Att få gå in i cellbiologins värld, blev en ljusprick i tider när allt kändes grått.

Jag vill först tacka Annika Meinander för hennes handledning igenom hela Pro gradu-projektet. Jag vill även tacka Annika för möjligheten att fått arbeta i hennes labb och tack för alla goda råd och kämpningar under åren. Ett stort tack också till min praktiska handledare Christa Kietz som handlett mig utmärkt i labbet. Jag vill även tacka hela vår labbgrupp eftersom ni gör arbetet alltid ett steg roligare.

Till sist vill jag tacka Helena, Sandra och Taru, mina bästa vänner som fungerat som min familj nummer två här i Åbo under studieåren. Också ett tack till min familj upp i Karleby som gett stöd och kämpat mig framåt.

ÅBO AKADEMI

Fakulteten för naturvetenskaper och teknik

Ämnesområde: cellbiologi

Vilma Pollari, 2018

drICE förhindrar bakterieförmedlad inflammation i *Drosophila melanogaster*s tarm

Pro gradu-avhandling, 72 sidor

Nyckelord: axeniska flugor, bakterier, drICE, *Drosophila melanogaster*, IMD-signaleringsräckan, tarmen

Redan vid födseln koloniserar människans tarmkanal av symbiotiska bakterier, även kallade för kommensala bakterier. De kommensala bakteriearterna hjälper att skydda tarmepitelet från patogena mikroorganismer. En minskad mängd av kommensala bakterier i människans tarm kan ge upphov till inflammation och utveckla tarmsjukdomar, som t.ex. Crohns sjukdom. I likhet med människans tarm, finns det kommensala bakterier i tarmen hos *Drosophila melanogaster* och avsaknad av kommensala bakterier i *Drosophila melanogaster*s tarm kan förorsaka inflammation. Eftersom *Drosophila melanogaster*s och människans tarmkanal påminner strukturellt om varandra och liknande signaleringsräckor har bevarats i människans och flugans tarmceller under evolutionens gång, utgör *Drosophila* en lämplig modellorganism som kan användas för att bättre förstå samverkan mellan bakterier och immunförsvaret i människans tarm.

Gramnegativa bakterier aktiverar NF- κ B-förmedlad inflammationsrespons i *Drosophila melanogaster*s tarm. Aktiveringen leder till produktion av antimikrobiella peptider, som krävs för att bekämpa bakterieinfektioner. I detta Pro gradu-projekt har jag undersökt om flugkaspaset drICE (eng. *Drosophila* interleukin-1-beta converting enzyme) nedreglerar NF- κ B-förmedlad inflammationsrespons under basala förhållanden i tarmen och således hindrar kommensala bakterier från att aktivera en immunrespons i flugan. Detta har jag undersökt genom att utveckla en metod att odla axeniska, d.v.s. bakteriefria flugor. Jag har sedan jämfört inflammationsresponsen i bakteriefria vildtypsflugor och konventionellt uppfödda vildtypsflugor samt bakteriefria drICE-mutanta flugor och konventionellt uppfödda drICE-mutanta flugor. Undersökningarna visade att kaspaset drICE nedreglerar NF- κ B-förmedlade inflammationsresponser som förorsakas av kommensala bakterier i flugans tarm. Kommensala bakterier orsakar inflammation i tarmen hos flugor som inte kan producera drICE.

ÅBO AKADEMI UNIVERSITY

Faculty of Science and Engineering

Subject area: Cell Biology

Vilma Pollari, 2018

drICE prevents bacterial mediated inflammation in the gut of *Drosophila melanogaster*

Master's thesis, 72 pages

Keywords: axenic flies, bacteria, drICE, *Drosophila melanogaster*, IMD-signaling pathway, gut

Already at birth, the human intestinal tract is colonized by symbiotic bacteria, also called commensal bacteria. The commensal bacterial species help protect the intestinal epithelium from pathogenic microorganisms. A reduced number of commensal bacteria in the human intestine can cause inflammation and can lead to development of various inflammatory diseases, such as Crohn's disease. As in humans, the *Drosophila melanogaster* intestine is colonized by commensal bacteria. Lack of commensal bacteria in the intestine of *Drosophila melanogaster* can similarly cause inflammation leading to an intestinal disease. The intestine of *Drosophila melanogaster* and humans are reminiscent of each other and similar signaling pathways have been preserved in the intestinal cells of humans and flies during evolution. Due to functional and structural similarities to the human gut, makes *Drosophila melanogaster* a suitable model organism that can be used to gain understanding the interaction between bacteria and the immune system in the human intestine.

Gram-negative bacteria activate a NF- κ B-mediated inflammatory response in *Drosophila melanogaster*'s intestine. Activation leads to the production of antimicrobial peptides that are needed to fight bacterial infections. In this project, I have investigated whether the fly-caspase drICE (*Drosophila* Interleukin-1-beta Converting Enzyme) regulates NF- κ B-mediated inflammatory response under basic intestinal conditions, thus preventing commensal bacteria from inducing an immune response in the fly. I have developed a method of cultivating axenic flies, i.e. bacteria-free flies. I have then compared the immune responses in bacteria-free wild-type flies and conventionally bred wild-type flies as well as bacteria-free drICE-mutant flies and conventionally bred drICE-mutant flies. The investigation showed that drICE caspase downregulates NF- κ B mediated inflammatory responses caused by commensal bacteria in the fly gut. Commensal bacteria cause inflammation in the intestine of flies that cannot produce drICE.

Innehållsförteckning

1 Introduktion	1
2 Litteraturöversikt	3
2.1 <i>Drosophila melanogaster</i> s biologi.....	3
2.2 Tarmkanalens struktur i den vuxna <i>Drosophila melanogaster</i>	3
2.3 Funktionella och strukturella likheter mellan <i>Drosophila melanogaster</i> s och människans tarm	5
2.4 Det förekommer både kommensala och patogena bakteriearter i <i>Drosophila melanogaster</i> s tarm.....	8
2.5 IMD-signaleringsräckan aktiveras av Gramnegativa bakterier i tarmen	9
2.5.1 PGRP-immunreceptorer aktiveras av DAP-peptidoglykaner	9
2.5.2 IMD-signaleringsräckan aktiverar Relish	11
2.5.3 IMD-signaleringsräckan kan jämföras med människans NOD2-signaleringsräcka	13
2.6 Negativ reglering av IMD-signaleringsräckan i <i>Drosophila melanogaster</i>	15
2.7 DUOX producerar ROS för att döda patogena mikroorganismer.....	17
3 Målsättningar	20
4 Material och metoder	21
4.1 Fluglinjer och korsningar.....	21
4.2 Flugornas diet	22
4.3 Metoden för att odla axeniskaflugor	23
4.3.1 Odling av flugor matade med antibiotika	23
4.4 Odling av bakterier på LB-plattor.....	24
4.5 16S PCR-metoden för bakteriedetektion	24
4.6 Mätning av AMP-nivåer med hjälp av qRT-PCR-metoden.....	26
4.7 Mätning av NF- κ B-aktivering X-GAL-analys.....	28
4.8 Verifiering av drICE-RNAi flugorna med Westernblotanalys	30
4.8.1 Lysisprov av flugor	30
4.8.2 SDS-PAGE separerar proteinerna enligt storlek.....	30
4.8.3 Halvtorr överföring och immunoblotting med förstärkt kemiluminescens	31
4.9 Statistiska analyser.....	32
5 Resultat	33
5.1 Odling av axeniska <i>Drosophila melanogaster</i>	33
5.1.2 Optimering av kontrollflugor till de axeniska flugorna	33
5.1.3 Odling av en bakteriefri kontroll till experimenten med de axeniska flugorna	35

5.2 Verifiering av de axeniska flugorna med hjälp av LB-plattor och 16S PCR-metoden.....	36
5.3 drICE-kaspaset nedreglerar IMD-signaleringsräckan.....	38
5.3.1 Diptericin produceras mera aktivt i drICE-RNAi-flugor i jämförelse till kontrollflugor	39
5.3.2 IMD-signaleringsräckan påverkas av kommensala tarmbakterier.....	41
6 Diskussion	44
6.1 Skillnader i samverkan mellan bakterierna och värden hos <i>Drosophila melanogaster</i> och människan	44
6.2 Axeniska flugor ger möjligheten att undersöka samverkan mellan värden och bakterier på en ny nivå.....	46
6.3 drICE-kaspaset nedreglerar IMD-signaleringsräckan och förhindrar inflammation	47
6.4 IMD-signaleringsräckan startar genom PGRP-receptoraktivering av bakterier	48
7 Slutsatser	50
Referenser	51
Bilaga 1 – Kemikalier och ämnen	59
Bilaga 2 – Receptbilaga	61

Förkortningar

AMP	Antimikrobiell peptid
ATF2	Aktiverande transkriptionsfaktor 2
β -ME	β -merkaptoetanol
cDNA	Komplementärt-DNA (eng. Complementary DNA)
Da	Daughterless
DAP	Diaminopimeliksyra
DED	Dödseffektordomän
dFADD	Drosophila Fas-associerad dödsdomän (eng. Fas-associated deathdomain)
DIAP2	Drosophila inhibitor av apoptos 2
Dipt	Diptericin
DNR1	Försvarsrepressor (eng. Defense repressor)
DUOX	Dualoxidas
DREDD	Dödsrelaterat ced-3/Nedd2-liknande protein (eng. Death related ced-3/Nedd2-like protein)
drICE	Drosophila interleukin-1-beta konverterande enzym (eng. Drosophila interleukin-1-beta converting enzyme)
ECL	Reagens-stärkande kemiluminens (eng. Enhanced chemiluminescence)
ERK	Extracellulära signalreglerade kinaser
FAF1	Fas-associerad faktor 1
G α q	G-protein alfa subenhet q
HRP	Pepparrotsperoxidase (eng. Horseradish peroxidase)
IBM	Inhibitor av apoptos-bindande motiv
IKK	I κ B-kinas
IL	Interleukin
IMD	Immundefekt
IP3	Inositol-1,4,5-trifosfat
JNK	c-Jun N-terminala kinaser
LB	Luria-buljong

Lys	Lysin
MAPK	Mitogen-aktiverade proteinkinaser
MDP	Muramyl dipeptid
MRS	Man, Rogosa och Sharpe
NAC	Amplifieringskontroll (eng. No amplification control)
NF- κ B	Kärnfaktorn kappa-lättkedjaförstärkaren av aktiverade B-celler (eng. Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
NOD2	Nukleotidbindande oligomeriseringsdomän innehållande protein 2 (eng. Nucleotide-binding and oligomerization domain containing protein 2)
NTC	Templatkontroll (eng. No template control)
PAMP	Patogenassocierat molekylärt mönster (eng. Pathogen-associated molecular pattern)
PBS	Fosfat-buffrad saltlösning (eng. Phosphate-buffered saline)
PCR	Polymeraskedjereaktion (eng. Polymerase chain reaction)
PIRK	PGRP-LC-integrerande inhibitor av IMD-signaleringsdomänen (eng. [PGRP]-LC-interacting inhibitor of IMD signalling)
PLC β	Fosfolipas C β (eng. Phospholipase C β)
PGRP	Peptidoglykanigenkännande proteiner (eng. Peptidoglycan recognition proteins)
qRT-PCR	Kvantitativ omvänd transkriptions-PCR (eng. Quantitative reverse transcription PCR)
RING	Mycket intressant ny gen (eng. Really interesting new gene)
RIP1	Receptorintegrerande protein 1 (eng. Receptor interacting protein 1)
RLT	RNeasy lysis buffert
S2	Schneider 2
SDS-PAGE	Natriumlaurylsulfat polyakrylamidelektrofores (eng. Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis)
TAB	TAK1-bindande protein
TAE	Tris-acetat
TAK1	Transformerande tillväxtfaktor β -aktiverande kinas 1 (eng. Transforming growth factor beta-activated kinase 1)

1 Introduktion

Tarmen hos människan innehåller 400–1000 olika bakteriearter (Lee & Lee, 2014). Människans tarmkanal koloniseras av icke-patogena bakterier direkt efter födseln och tarmfloran ändras under hela livstiden (Dominguez-Bello et al., 2010). Bakteriefloren påverkas av yttre faktorer som t.ex. livsstil, stress, föda och intag av antibiotika. En av de viktigaste uppgifterna som kommensala bakterier har i människan är att bidra till utvecklingen och regleringen av tarmens immunförsvar (Min et al., 2015). Många år av samevolution mellan kommensala bakterier i tarmen och människan har lett till en mutualism, där bakterierna förmår att styra immunreaktionerna i tarmen för att inte själva få en ogynnsam miljö att leva i. De kommensala bakterierna skyddar dessutom tarmepitelet hos människan från patogena bakterier. Förändring i mängden kommensala bakteriearter i tarmen har visat sig vara kopplad till utvecklingen av immunrelaterade sjukdomstillstånd som t.ex. inflammationer i tarmen, allergier, astma, diabetes och fetma (Lee & Lee, 2014; Min et al., 2015).

Orsaker som leder till rubbningar i tarmfloran samt hur bakterierna styr och aktiverar immunresponser är svåra att undersöka i människan. Mångfalden av bakterier i tarmen är stor och sammansättningen varierar från person till person. Detta betyder att det är svårt att lista ut varje bakteriearts inverkan på tarmens hälsa. Det är besvärligt samt oetiskt att utveckla bakteriefria människor men bakterier i kroppen kan minskas med hjälp av antibiotika. För att bättre förstå tarmbakteriernas roll i regleringen av hälsan, har modellorganismer som t.ex. flugan, musen och råttan använts (Kostic et al., 2013; Lee & Lee, 2014).

Drosophila melanogaster har använts som modellorganism inom vetenskaplig forskning i över 100 år för att bättre förstå genetik, signaleringsräckor och strukturer som förekommer i människan. 75 % av människans gener, som orsakar sjukdomar, har en homolog gen i *Drosophila melanogaster* (Pandey & Nichols, 2011). *Drosophila melanogaster* är en användbar modellorganism eftersom den producerar mycket avkomma, har ett sekvenserat genom och kort generationstid. Dessutom styrs användningen av flugan av få etiska regler och flugan är ett billigt forskningsobjekt att upprätthålla (Stephenson & Metcalfe 2013). Bananflugan utgör en bra tarmmodell eftersom flugans tarm påminner strukturellt och funktionellt om människans tarm och flera signaleringsräckor har evolutionärt bevarats mellan flugan och människan.

*Drosophila melanogaster*s tarm innehåller kommensala bakterier som flugan lever i symbios med (Charroux & Royet, 2012). Symbiosen med kommensala bakterierna har utvecklats till följd av en positiv selektion under miljoner år av evolution. Vid ett överflöd av patogena mikroorganismer i flugans tarm, minskar mängden kommensala bakterier i tarmen och bakteriell dysbios utvecklas. Dysbios orsakar immunresponser i flugans tarm, bland annat aktivering av dualoxidas (DUOX) och immundefekt (IMD)-signaleringsräckan (Charroux & Royet, 2012). Hur flugan skiljer mellan patogena och probiotiska bakterier är tills vidare okänt.

2 Litteraturöversikt

2.1 *Drosophila melanogaster*s biologi

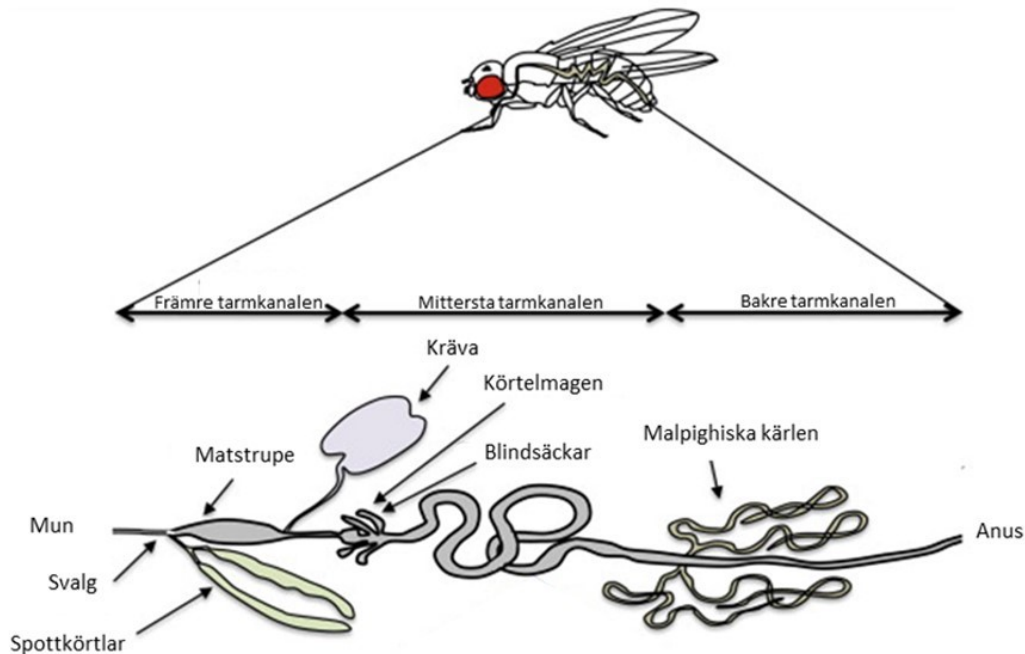
Drosophila melanogaster är en insekt som har fyra utvecklingsstadier: ägg, larv, puppa och fullvuxen individ. Det tar ca 10 dagar i 25 °C för flugan att utvecklas från ägg till en fullvuxen individ. I lägre temperaturer är utvecklingen från ägg till fullvuxen långsammare, medan i temperaturer upp till 27 °C är utvecklingen snabbare (Valanne & Rämét, 2011). En fullvuxen hona kan lägga upp till 100 ägg per dag i 10–12 dagar (Jennings, 2011). Flugan är vanligtvis 2–2,5 mm lång och väger ca ett milligram. I naturen äter flugan mest frukter, både färska och ruttnade. Ruttnade frukter innehåller mycket mikroorganismer och därför har flugan utvecklat ett effektivt immunförsvar mot mikroorganismer. I laboratorier får flugan en geléliknande mat som består vanligtvis av en vattenblandning med majs mjöl, jäst, sojamjöl, maltextrakt, majssirap och agar (Jennings, 2011).

Vildtyps *Drosophila melanogaster* har röda ögon och kroppen är gulbrun. *Drosophila melanogaster*s bakdel har svarta ränder. Hanen har en mörk och rundad bakdel medan honan har en mera ljus och spetsigare bakdel. Honan är även större än hanen. Hanen har ett par könskammar på sina framben som hjälper hanen att klättra upp på honans rygg när de skall para sig (Valanne & Rämét, 2011).

2.2 Tarmkanalens struktur i den vuxna *Drosophila melanogaster*

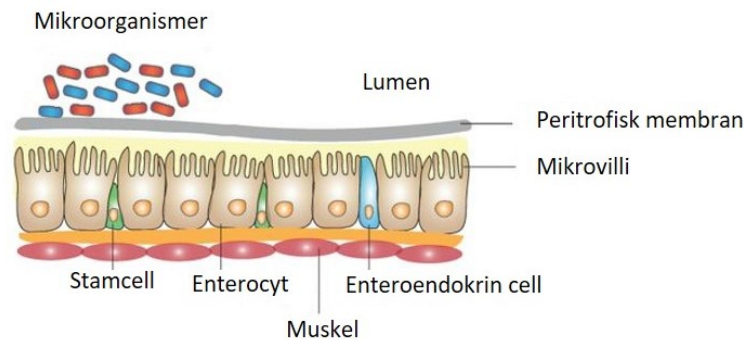
*Drosophila melanogaster*s tarmkanal kan delas i tre delar: främre tarmkanalen, mittersta tarmkanalen och bakre tarmkanalen (Figur 1) (Charroux & Julien, 2012). Den främre tarmkanalen består av svalget, matstrupen, krävan och körtelmagen. I krävan lagras maten, medan nedbrytningen av födan påbörjas i körtelmagen. Största delen av matspjälkningen sker i mittersta tarmkanalen. Mittersta tarmkanalen absorberar även födan. Slutet av den mittersta tarmkanalen kopplas till malpighiska kärl. De malpighiska kärlen påminner till funktionen om däggdjurens njurar eftersom de sorterar bort avfallsprodukter från flugans cirkulerande kroppsvätska, hemolymfan. Mittersta tarmkanalen innehåller även en region med kopparjoner och järn som orsakar ett lågt pH. Det låga pH:t hjälper att döda patogena mikroorganismer (Apidianakis &

Rahme, 2011). I den bakre tarmkanalen absorberas vatten. Avfallsprodukter transporteras via anus ut ur kroppen (Charroux & Julien, 2012).



Figur 1. Tarmkanalens uppbyggnad i *Drosophila melanogaster*. Tarmkanalen i flugan kan delas in i tre delar: främre tarmkanalen, mittersta tarmkanalen och bakre tarmkanalen. Främre tarmkanalen består av svalget, spottkörtlarna, matstrupen, krävan och körtelmagen. Den mittersta tarmkanalen är kopplad till blindsäckarna. Blindsäckarna finns i flugan endast vid larvstadiet. Malpighiska kärlen sammankopplar mittersta tarmkanalen och bakre tarmkanalen (modifierad från Charroux & Royet, 2012).

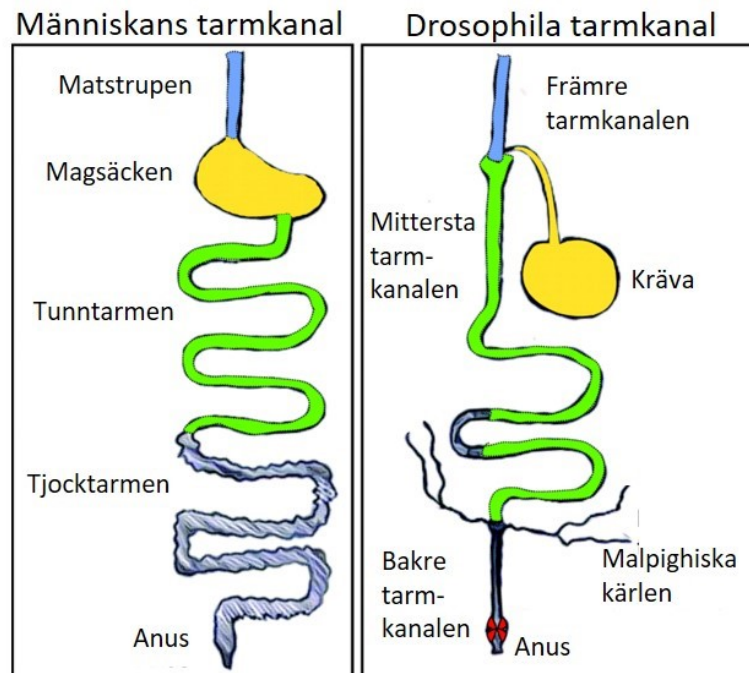
Flugans tarmepitel består av tre sorters olika celler: enteroendokrina celler, enterocyter och intestinala stamceller (Figur 2) (Wong et al., 2016). Enteroendokrina celler är sekretoriska celler. De innehåller vesikler fyllda med peptider som reglerar kolhydratmetabolismen, lipidmetabolismen och peristaltik (Wong et al., 2016). Enterocyterna har en absorberande funktion. De intestinala stamcellerna förnyar flugans tarmepitel i likhet med däggdjurens tarmkanal. Stamcellerna kan antingen dela sig till nya stamceller eller differentieras till progenitorceller som kallas enteroblaster (Figur 2). Enteroblasterna kan sedan differentieras till enterocyter eller enteroendokrina celler. Det peritrofiska membranet ligger ovanpå epitelcellerna och består av kitin och proteoglykaner. Det peritrofiska membranet skyddar flugans tarmepitel och hjälper att bryta ned födan (Figur 2) (Wong et al., 2016).



Figur 2. Uppbyggnaden av tarmepitelet hos *Drosophila melanogaster*. Flugans tarmepitel består av enterocyter, enteroendokrina celler och intestinala stamceller. Peritrofiska membranet skyddar tarmepitelet (modifierad från: Wong et al., 2016).

2.3 Funktionella och strukturella likheter mellan *Drosophila melanogaster* och människans tarm

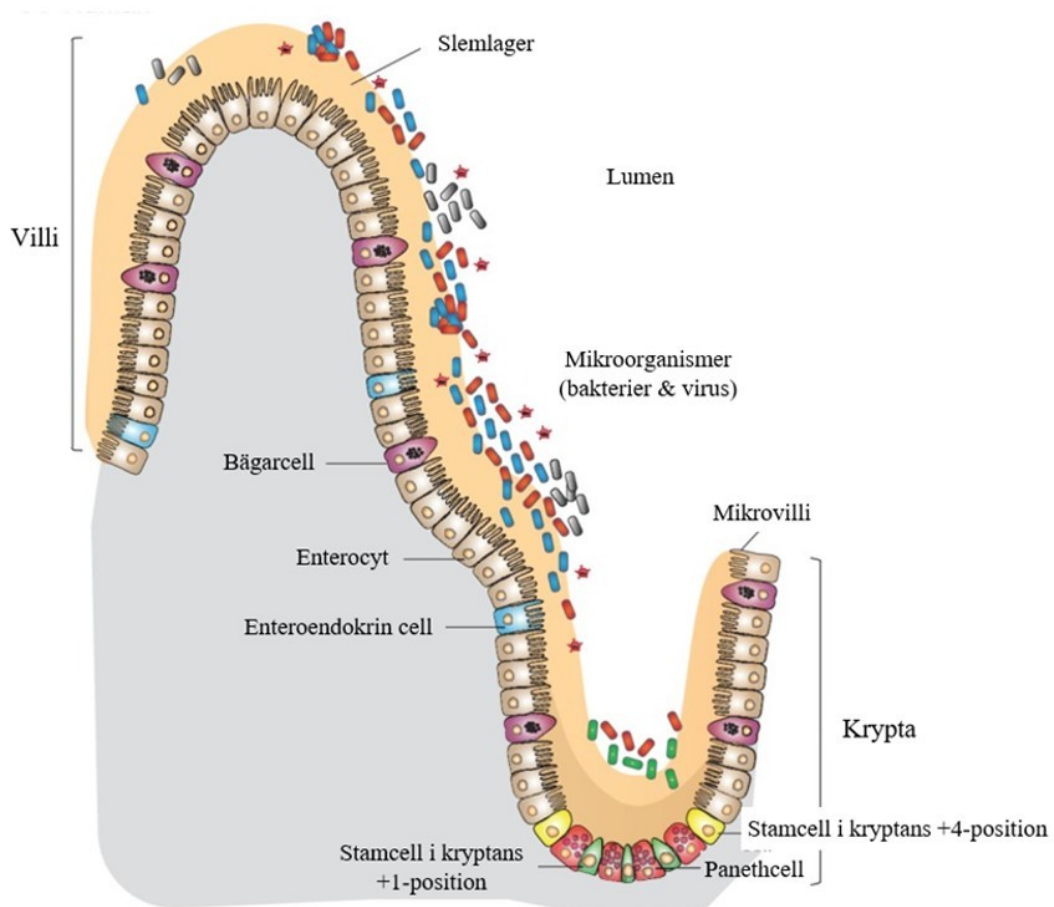
Drosophila melanogaster och människans tarmkanal liknar strukturellt varandra. Tarmkanalens uppbyggnad i flugan kan ses som en förenklad version av människans tarmkanal (Figur 3). I människan framskrider födan från svalget via matstrupen till magsäcken. Magsäckens uppgift är att bryta ned födan till en lös massa före den framskrider till tunntarmen (Thompson & Malagelada, 1981). Hos människan är magsäckens pH lägre än i resten av kroppen p.g.a. den sura magsaften. Magsaftens pH ligger vid 1,5–2. Många mikroorganismer dör i den sura magsaften. Människans svalg, matstrupe och magsäck kan jämföras med flugans främre tarmkanal eftersom nedbrytningen av födan påbörjas i dessa områden. Efter magsäcken fortsätter födan till tunntarmen i människan. I tunntarmen absorberas största delen av de viktiga näringsämnena från födan (Thompson & Malagelada, 1981). Tunntarmens funktion i människan kan jämföras med den mittersta tarmkanalens funktion i flugan (Apidianakis & Rahme, 2011). Från människans tunntarm framskrider födan till tjocktarmen. Tjocktarmens uppgift hos människan är att bl.a. absorbera natriumjoner och vatten från födan. Tjocktarmen i människan kan jämföras med flugans bakre tarmkanal. Likasom i flugan, förs icke-spjälkad föda ut genom anus i människan (Figur 3) (Apidianakis & Rahme, 2011).



Figur 3. Jämförelse mellan människans och *Drosophila melanogaster*s tarmkanal. Till vänster kan ses en illustrerad bild av människans tarmkanal. Människans tarmkanal består av svalget, matstrupen, magsäcken, tunntarmen, tjocktarmen och anus. Till höger kan ses flugans tarmkanal som består av främre tarmkanalen, mittersta tarmkanalen, malpighiska kärnen, bakre tarmkanalen och anus (Modifierad från Apidianakis & Rahme, 2011).

Uppbyggnaden av tarmepitelet i människan och flugan har många strukturella likheter. Människans tarmepitel består av enterocyter, bägarceller, enteroendokrina celler, Panethceller och stamceller (Figur 4) (Wong et al., 2016). I människans tarmepitel formar de olika tarmcellerna toppar som kallas villi och dalar som kallas kryptor. Flugans tarmepitel saknar kryptor och villi. Likasom flugans enterocyter, utvecklar alla epitelceller i människans tarm mikrovilli för att få en förstörd absorberingsyta. Enterocyternas huvuduppgift är att absorbera näringsämnen från tarmen. Bägarcellerna utsöndrar slem som utvecklar en skyddande slemhinna på tarmepitelet (Birchenough et al., 2015). Den skyddande slemhinnan i människans tarmkanal påminner om den peritrofiska membranen i flugans tarmkanal. De enteroendokrina cellerna i människans tarmepitel aktiveras av näringsämnen som passerar i tarmen. Aktiveringen leder till stimulering av G-proteinkopplade receptorer på enteroendokrina cellernas yta (Gribble & Reimann, 2016). De G-proteinkopplade receptoreerna orsakar utsöndring av små peptidhormoner från cytoplasmiska vesikler i den extracellulära miljön. Dessa peptidhormoner stimulerar sedan

kolhydratmetabolismen, lipidmetabolismen, peristaltik och mättnadskänslan (Gribble & Reimann, 2016; Wong et al., 2016). Flugans enteroendokrina celler har kemosensoriska receptorer. Med hjälp av de kemosensoriska receptorerna kan de enteroendokrina cellerna reglera fysiologiska funktioner som t.ex. mattupptagning, näringsabsorption och sockerhomeostas (Park & Kwon, 2011).



Figur 4. Människans tarmepitel. Människans tarm består av kryptor och villi. Tarmepitelet är skyddat av en slemlinna. Mikrosvillus från epitelcellerna ökar absorptionsytan för näringsämnen. Människans tarmepitel består av bägarceller, enterocyter, enteroendokrina celler, två olika sorters stamceller och Panethceller (modifierad från Wong et al., 2016).

Enbart en stamcellslinje har identifierats i *Drosophila melanogaster*s tarmepitel, medan människans tarmepitel innehåller två olika sorters stamceller (Figur 4). Flugans stamcellslinje i tarmen kompletterar alla tarmcelltyper som går förlorade till följd av normal åldrande eller akut tarmskada (Amcheslavsky et al., 2009). I människans tarm differentieras stamceller i kryptans +4-position endast vid stimuli från infektioner,

medan stamceller i kryptans +1-position delar sig konstant (Umar, 2010; Wong et al., 2016). Vissa av stamcellerna i kryptans +1-position differentieras till stamceller som migrerar upp till toppen av villi. Panethcellerna kan hittas endast i kryptans botten i människotarmen och dessa celler har som uppgift att upprätthålla en lämplig miljö för stamcellerna att differentieras i. Panethcellerna utsöndrar även antibakteriella peptider och enzymer (Clevers & Bevins, 2013). Människans tarmepitel är konstant i kontakt med det specifika och ospecifika immunförsvaret. Flugan saknar antikroppsberoende immunceller som utgör det specifika immunförsvaret. Detta betyder att enbart epitelet iflugans tarm ansvarar för immunreaktioner (Apidianakis & Rahme, 2011).

2.4 Det förekommer både kommensala och patogena bakteriearter i *Drosophila melanogaster*s tarm

*Drosophila melanogaster*s tarm innehåller 5–20 olika bakteriearter, vilket är betydligt mindre i jämförelse med människans tarm som innehåller 400-1000 olika bakteriearter (Lee & Lee, 2014). De specifika orsakerna bakom den stora skillnaden mellan antalet bakteriearter i människans och flugans tarm har tills vidare inte hittats. En av orsakerna som anses påverka antalet bakteriearter i tarmen är livstiden. Människans långa livstid möjliggör att tarmen samverkar med flera olika bakteriearter i en längre period (Broderick & Lemaitre, 2012). Människan äter också mera mångsidigt, vilket leder till att människans tarm kommer i kontakt med en större mångfald av bakterier än flugans tarm (Broderick & Lemaitre, 2012). Flugans livscykel anses också påverka antalet bakterier i tarmen. T.ex. vid metamorfosen, ersätts larvens tarm med en vuxen flugtarm. Enligt undersökningar är uttrycket av antimikrobiella peptider förhöjt en tid efter att puppan utvecklats (Samakovlis et al., 1990). Antimikrobiella peptider är proteiner som produceras i flugan för att döda bakterier. 24 timmar efter puppans utveckling, minskar mängden bakterier på grund av en aktiv produktion av antimikrobiella peptider. 24 timmar senare har produktionen av antimikrobiella peptider avtagit och bakteriemängden normaliseras. De höga nivåerna av antimikrobiella peptider och minskningen i mängden bakterier under puppa-stadiet indikerar att flugan begränsar bakterietillväxten i puppan tills vävnaderna har formats (Broderick & Lemaitre, 2012).

Bakteriearterna i tarmen skiljer sig till en del mellan flugor som lever i naturen och flugor som lever i laboratorieomgivning (Erkosar & Leulier, 2014). Flugor i naturen har en högre diversitet av bakteriearter i tarmen än flugor som lever i laboratorieomgivning. Tarmen hos flugor som lever i naturen är dominerad av *Gluconobacter* arter, medan tarmen hos flugor som lever i laboratorieomgivning är dominerad av *Acetobacter* eller *Lactobacillus* arter. *Acetobacter* och *Lactobacillus* anses stimulera viktiga signaleringsräckor i flugan som t.ex. insulinutsöndring och Tor signalering (Kim & Lee, 2014).

En ökad mängd patogena bakterier i *Drosophila melanogaster*s tarm orsakar inflammationer. Exempel på patogena bakterier som orsakar infektion i flugans tarm är *Erwinia carotovora*, *Gluconobacter morbifer*, *Pseudomonas entomophila* och *Serratia marcescens* (Kim & Lee, 2014). *Erwinia carotovora* används ofta i laboratorier för att inducera immunresponser i flugornas tarmar. Infektionerna av *Erwinia carotovora* är inte dödliga för friska flugor. *Erwinia carotovora* har även utvecklat mekanismer för att utnyttja flugor som deras värd (Basset et al., 2000). Infektioner orsakade av *Pseudomonas entomophila* och *Serratia marcescens* i flugans tarm är oftast dödliga (Vodovar et al., 2005; Nehme Et al., 2007).

2.5 IMD-signaleringsräckan aktiveras av Gramnegativa bakterier i tarmen

IMD-signaleringsräckan är en del av immunresponserna som aktiveras av patogena mikroorganismer i *Drosophila melanogaster*s tarm. IMD-signaleringsräckan aktiveras av Gramnegativa bakterier och IMD-signaleringsräckan aktiverar ett NF- κ B-proteinkomplex. NF- κ B-proteinkomplexet stimulerar produktionen av antimikrobiella peptider som dödar bakterier (Kleino & Silverman, 2015).

2.5.1 PGRP-immunreceptorer aktiveras av DAP-peptidoglykaner

På mikrobers yta finns det molekyler som kallas för patogenassocierat molekyllärt mönster (eng. pathogen-associated molecular pattern, PAMP) som känns igen av värdorganismen (Ryu et al., 2010). Den vanligaste PAMP-strukturen som

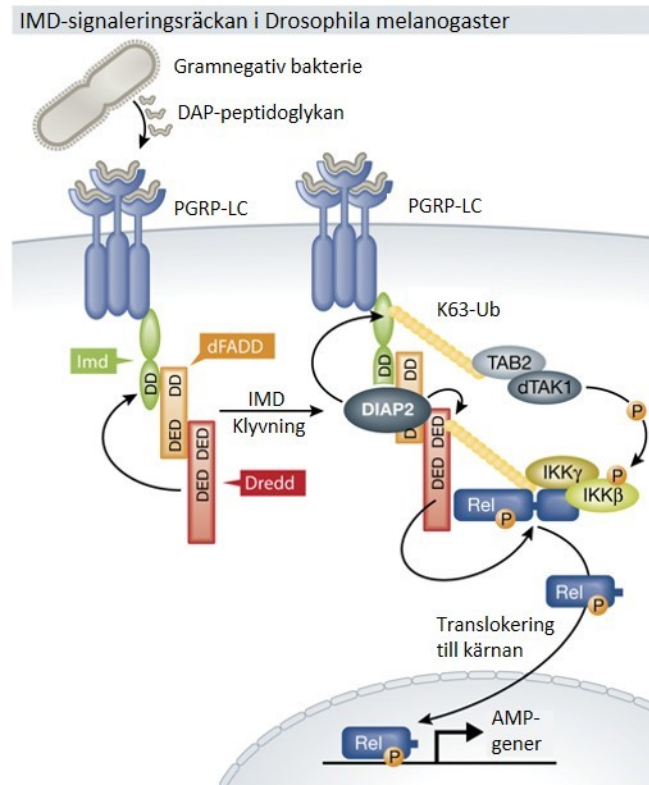
mikroorganismerna producerar är peptidoglykaner. Peptidoglykaner är viktiga byggstenar i bakteriecellväggen. Peptidoglykan formas av kolhydratkedjor med alternerande N-acetylmuramylsyror och N-acetylglukosaminer som är tvärbundna av kedjor bestående av minst fyra stycken aminosyror (Kleino & Silverman, 2014). Hos Gramnegativa bakterier är den tredje aminosyran i den tvärbundna aminosyrakedjan diaminopimeliksiyra (DAP)-peptidoglykan (Leulier et al., 2003; Kaneko et al., 2004). I Grampositiva bakterier är den tredje aminosyran lysin (Lys). IMD-signaleringsräckan i *Drosophila melanogaster* aktiveras endast av DAP-peptidoglykan (Kaneko et al., 2006).

I *Drosophila melanogaster* binder peptidoglykan till peptidoglykan-igenkännande receptorer (eng. Peptidoglycan recognition proteins, PGRP) (Kenko et al., 2006). De flesta insekter har 13 gener som kodar för 19 olika PGRP-proteiner, medan det i däggdjur finns bara fyra olika PGRP-proteiner (Werner et al., 2000; Liu et al., 2000). Hos insekter kan PGRP-proteiner fungera som aktiverare av signaleringsräckor och protolytiska kaskader. Dessutom kan vissa PGRP-receptorer fungera som nedbrytare av peptidoglykaner. Hos däggdjur har vissa PGRP-proteiner amidasaktivitet, medan vissa fungerar som bakteriedödande proteiner (Werner et al., 2000; Liu et al., 2000).

I *Drosophila melanogaster* har det hittills identifierats två olika PGRP-receptorer som aktiverar IMD-signaleringsräckan: PGRP-LC och PGRP-LE (Myllymäki et al., 2014). PGRP-LC är ett transmembranprotein och kan endast binda DAP-peptidoglykan. Efter att PGRP-LC bundit DAP-peptidoglykan, aktiverar den IMD-signaleringsräckan. Det finns två olika former av PGRP-LE i flugan: korta och långa (Kaneko et al., 2006; Neyen et al., 2012). Den långa formen av PGRP-LE kan hittas i cellens cytoplasma, var den binder DAP-peptidoglykan som lyckats komma in i cellen. Den långa PGRP-LE aktiverar IMD-signaleringsräckan inne i cellen efter att den bundit DAP-peptidoglykan. (Lim et al., 2006; Myllymäki et al., 2014). Den korta formen av PGRP-LE utsöndras från celler till flugans hemolymfa, var den binder DAP-peptidoglykan (Takehana et al., 2002). Den korta PGRP-LE presenterar den bundna DAP-peptidoglykanen till PGRP-LC och detta leder till ökad aktivering av IMD-signaleringsräckan.

2.5.2 IMD-signaleringsräckan aktiverar Relish

När DAP-peptidoglykan från Gramnegativa bakterier binder till PGRP-LC eller PGRP-LE receptorer, oligomeriseras receptorerna och bildar ett receptorkomplex innehållande IMD-adaptorproteinet, dFADD (Drosophila fas-associated Death domain) och DREDD (eng. Death related ced-3/Nedd2-like caspase) (Figur 6) (Myllymäki et al., 2014). IMD-adaptorproteinet binder till PGRP-LC och PGRP-LE receptorererna. IMD-adaptorproteinet har inte någon homolog i människan, men den har en dödsdomän (DD) som motsvarar Receptorintegrerande protein 1 (RIP1) dödsdomänen i människan (Georgel et al., 2001). Dödsdomänen i flugans IMD-adaptorprotein binder via en DD-samverkan till dFADD (Naitza et al., 2002). Efter att dFADD bundit till IMD-adaptorproteinet, rekryteras DREDD till receptorkomplexet (Figur 6) (Leulier et al., 2000). DREDD är homolog till kaspas-8 i människan. DREDD binder till dFADD via sin dödseffektordomän 1 (DED1) och aktiveras. När DREDD aktiverats, klyver kaspaset IMD-adaptorproteinet nära N-terminus. Klyvningen leder till att IMD-adaptorproteinet IBM-domän (eng. Inhibitor of apoptosis-bindning motif) blottas (Paquette et al., 2010). IBM-domänen kan efter blottningen binda till BIR2/3-domänen hos E3-ligaset DIAP2 (eng. Drosophila inhibitor of apoptosis 2). DIAP2 märker sedan IMD-adaptorproteinet med K63-länkade ubikvitinkedjor (Figur 6). DIAP2 aktiverar även DREDD genom ubikvitinering (Meinander et al., 2012).



Figur 6. IMD-signaleringsräckan i *Drosophila melanogaster*. DAP-peptidoglykan från Gramnegativa bakterier aktiverar PGRP-LC. Aktiveringen leder till att PGRP-LC, IMD-adaptorproteinet, dFADD och DREDD bildar ett receptorkomplex. Rekryteringen av receptorkomplexet leder till att DREDD kan klyva IMD-adaptorproteinet. Efter klyvningen märker DIAP2 IMD-adaptorproteinet med K63-länkad ubiquitin. Efter detta rekryterar IMD-adaptorproteinet TAB2/TAK1-proteinkomplexet. TAB2/TAK1-proteinkomplexet fosforilerar och aktiverar IKK-komplexet. IKK-komplexet fosforilerar Relish medan DREDD till slut klyver Relish. N-terminalen av Relish transporterats till cellens kärna medan C-terminalen stannar i cytoplasman. I kärnan aktiverar N-terminalen transkriptionen av antimikrobiella peptider (AMP) (modifierad från Falschlehner & Boutros, 2012).

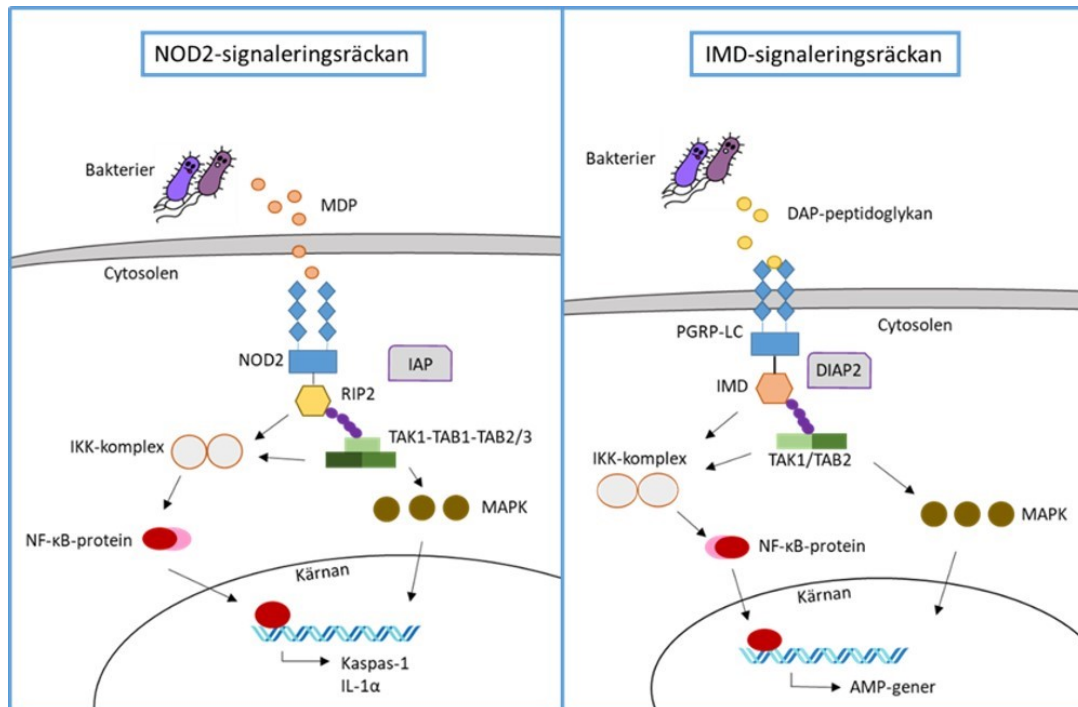
Efter att IMD-adaptorproteinet ubiquitinerats, antas det rekrytera TAK1/TAB2-komplexet (eng. Transforming growth factor β -activated protein kinase 1/TAK1-binding protein 2) via Npl4 zinkfinger domänen i TAB2 (Figur 6) (Kleino & Silverman, 2014). Efter rekryteringen antas TAB2/TAK1-komplexet fosforilera och aktivera IKK-komplexet (IkB-kinas) (Aggarwal, 2003). TAB2/TAK1-komplexet har visats fosforilera IKK-komplexet i däggdjur (Wang et al., 2001). IKK-komplexet byggs upp av två subenheter; den katalytiska subenheten IKK β och den regulatoriska subenheten IKK γ . IKK γ och IKK β är homologa till människans IKK γ -och IKK β -subenheter. IKK-komplexet behövs för aktivering av Relish (Silverman et al., 2000).

Relish är ett av tre *Drosophila* NF- κ B-proteiner och Relish behövs för att antimikrobiella peptider skall produceras via IMD-signaleringsräckan (Kleino &

Silverman, 2014). Exempel på antimikrobiella peptid-gener som Relish aktiverar är attacin och diptericin. Relish består av en N-terminal och en C-terminal domän. N-terminalen innehåller en DNA-bindande Rel68-domän. C-terminalen består av ankyrin-upprepningar (Kleino & Silverman, 2014). När DREDD aktiverats, klyver kaspaset Relish vid mitten och frigör transkriptionsfaktordomänen Rel68 (Figur 6). IKK β fosforylerar Rel68 varefter Rel68 transporteras till cellens kärna var transkriptionen av målgenerna börjar. C-terminalen av Relish stannar i cellens cytoplasma och bryts ned (Stöven et al., 2000; 2003; Wiklund et al., 2009).

2.5.3 IMD-signaleringsräckan kan jämföras med människans NOD2-signaleringsräcka

NOD2 (eng. nucleotide-binding and oligomerization domain containing protein 2) är en cytosolisk receptor som aktiveras av bakterier i människans epitelceller. NOD2 aktiveras av intracellulär muramyldipeptid (MDP) som är en komponent i bakteriecellväggen (Kawai & Akira 2009; Negroni et al., 2018). För att upprätthålla en lämplig mängd bakterier i människans tarm, reglerar NOD2 immunologiska responser i epitelcellerna som hör till det ospecifika immunförsvaret. Aktivering av det ospecifika immunförsvaret leder till vidareaktivering av immunceller som transporteras till tarmen. Hos patienter med inflammatoriska tarmsjukdomar som t.ex. Crohns sjukdom eller Blaus syndrom, har det visats att NOD2-proteinet har mutationer och inte fungerar normalt (Ogura et al., 2001; Kanazawa et al., 2005). NOD2-och IMD-signaleringsräckan kan jämföras med varandra eftersom NOD2-signaleringsräckan aktiverar ett NF- κ B-protein och utnyttjar samma signalproteiner som IMD-signaleringsräckan (Figur 7).



Figur 7. Jämförelse av NOD2-signaleringsräckan i människan och IMD-signaleringsräckan i *Drosophila melanogaster*. MDP från bakterier aktiverar NOD2-signaleringsräckan och DAP-peptidoglykan från bakterier aktiverar IMD-signaleringsräckan. NOD2-receptorn i NOD2-signaleringsräckan kan jämföras med PGRP-LC-receptorn i IMD-signaleringsräckan. I NOD2-signaleringsräckan aktiverar RIP2 TAK1-TAB1-TAB2/3-proteinkomplexet samt IKK-komplexet. I IMD-signaleringsräckan aktiverar IMD-proteinkomplexet TAK1/TAB2-proteinkomplexet. I både IMD- och NOD2-signaleringsräckan aktiverar TAK-TAB-proteinkomplexet IKK-komplex samt MAPK-kinaser. IKK-komplexet aktiverar sedan ett NF-κB-protein.

I IMD-signaleringsräckan aktiveras PGRP-receptorerna av DAP-peptidoglykan utanför cellen medan i NOD2-signaleringsräckan tas MDP in i cellen antingen genom bakteriell invasion eller fagocytos. När MDP kommit in i cellen, flyttar sig NOD2 till plasma membranet. Då MDP binder till NOD2-receptorn, oligomeriserar NOD2 och rekryterar RIP2 (Figur 7) (Girardin et al., 2003; Ting et al., 2010). NOD2 i NOD2-signaleringsräckan kan jämföras med PGRP-LC och PGRP-LE i flugan medan RIP2 i NOD2-signaleringsräckan kan jämföras med IMD-proteinkomplexet i flugan (Figur 7). När RIP2 bundit till NOD2, aktiverar RIP2 IKK-komplexet som fosforylerar IκB. IκB är bundet till ett NF-κB-proteinkomplex och fosforyleringen av IκB orsakar att IκB frigörs från NF-κB, ubiquitineras och nedbryts i cellens proteasom. När IκB har nedbrytits kan NF-κB translokeras till kärnan (Negroni et al., 2018). I kärnan reglerar NF-κB-transkriptionsfaktorn uttrycket av kaspas-1 och interleukin-1α (IL-1α) (Qilin et al., 2007). Kaspas-1 klyver andra interleukiner till deras aktiva form medan IL-1α reglerar immunologiska responser.

NOD2-signaleringsräckan reglerar även celldifferentiering och proliferation genom att aktivera mitogen-aktiverade proteinkinaser (MAPK) (Negroni et al., 2018). När NOD2 har rekryterat RIP2, aktiverar RIP2 ett TAK1-TAB1-TAB2/3-proteinkomplex (Figur 7). TAK1-TAB1-TAB2/3-proteinkomplexet aktiverar sedan extracellulära signalreglerade kinaser (ERK), c-Jun N-terminala kinaser (JNK) och p38 som hör till MAPK-familjen (Negroni et al., 2018). I flugan aktiveras JNK av TAB2 när IMD-signaleringsräckan är aktiv (Zhuang et al., 2006).

2.6 Negativ reglering av IMD-signaleringsräckan i *Drosophila melanogaster*

Okontrollerade immunresponser i en organism kan leda till skadliga följder och påverka organismens hälsa dramatiskt. Därför är det viktigt att immunresponser regleras. En oreglerad IMD-signaleringsräcka orsakar inflammation i *Drosophila melanogaster*s tarm. En konstant aktiv IMD-signaleringsräcka leder till att inte bara de patogena bakterierna förstörs i flugans tarm, utan också de kommensala bakterierna (Lee et al., 2013). Produktionen av antimikrobiella peptider, som aktiveras av Relish, kan inte skilja mellan kommensala bakterier och patogena bakterier och därför är negativ reglering av IMD-signaleringsräckan viktigt. I vår forskningsgrupp har vi undersökt hur kaspaset drICE nedreglerar IMD-signaleringsräckan i flugan.

Kaspaser är kända för deras funktion som inducerare av apoptos. Kaspaser är även viktiga komponenter i regleringen av icke-apoptotiska signaleringsräckor. Vid till exempel celldifferentiering och immunologiska processer är kaspaser aktiva utan att aktivera apoptos (Ribeiro et al., 2007). drICE är ett kaspas som aktiverar celldöd i flugan. drICE är homolog med människans kaspas-3 (Ribeiro et al., 2007) drICE aktivitet regleras av E3-ligaset DIAP2. Då apoptosignaleringen inte är aktiv, binder drICE och DIAP2 kovalent till varandra (Kietz et al., opublicerade resultat). När DIAP2 och drICE är kovalent bundna till varandra, kan inte DIAP2 ubikvitinera DREDD vilket leder till att IMD-signaleringsräckan inte framskrider (Kietz et al., opublicerade resultat; Ribeiro et al., 2007). Exempel på andra negativa reglerare av IMD-signaleringsräckan är katalytiska PGRP-proteiner, PGRP-LC-integrerande inhibitor av IMD-signaleringen (PIRK), Caudal och kaspasinhibitörerna DNR1 (eng. Defense repressor 1) och Caspar (Kleino & Silverman, 2014).

Forskning har visat att PGRP-SC1/2, PGRP-LB och PGRP-LF fungerar som negativa reglerare av IMD-signaleringsräckan. Både PGRP-SC1/2 och PGRP-LB uttrycks i flugans tarmepitel (Kleino & Silverman, 2014). PGRP-SC1/2 och PGRP-LB binder DAP-peptidoglykan och klyver det i små fragment så att PGRP-LC eller PGRP-LE inte kan känna igen dem. Eftersom PGRP-LC eller PGRP-LE inte känner igen det klivna DAP-peptidoglykanet, aktiveras inte IMD-signaleringsräckan (Mellroth et al., 2005; Zaidman-Rémy et al., 2006). PGRP-LF är ett transmembranprotein som negativt reglerar IMD-signaleringsräckan i flugan genom att binda till PGRP-LC och därmed hindra PGRP-LC-aktivering av DAP-peptidoglykan (Basbous et al., 2011).

För att PIRK skall uttryckas, måste IMD-signaleringsräckan vara aktiv, d.v.s. uttrycket av PIRK är beroende av Relish (Lhocine et al., 2008). PIRK binder till både PGRP-LC och IMD-adaptorproteinet. Det anses att PIRK reglerar IMD-signaleringsräckan i flugan antingen genom att hindra bildningen av PGRP-LC-IMD-receptorkomplexet eller genom att binda till PGRP-LC och missleda PGRP-LC till lysosomer för nedbrytning (Lhocine et al., 2008; Kleino & Silverman, 2014). Tills vidare har det inte hittats PIRK-homologer i människan.

Ryu et al. har visat att transkriptionsfaktorn Caudal inhiberar uttrycket av IMD-beroende antimikrobiella peptidgener. Caudal ockuperar promotor-regionerna som behövs för transkription av NF- κ B-relaterade gener. Detta betyder att IMD-signaleringsräckan framskrider, men inga antimikrobiella peptider produceras. Nedreglering av IMD-signaleringsräckan genom Caudal sker endast i flugans tarm och inte i hela organismen (Ruy et al., 2008).

DNR1 (eng. Defense repressor 1) anses inhibera framskridning av IMD-signaleringsräckan genom att hindra DREDD-kaspasets aktivitet (Foley & O'Farrell, 2004). DNR1 innehåller en C-terminal RING-domän (eng. Really interesting new gene) och anses fungera som ett E3-ligas. Nedsatt DNR1-uttryck i flugor orsakar en förhöjd produktion av antimikrobiella peptider både efter och vid pågående inflammation (Foley & O'Farrell, 2004; Guntermann et al., 2009).

Caspar i flugan är homolog till människans Fas-associerad faktor 1 (FAF1). FAF1 fungerar som en nedreglerare av NF- κ B-signaleringsväg. I människan anses FAF1 binda till RelA och hindra RelA-lokalisering till kärnan (Park et al., 2004; Kleino & Silvermann, 2014). FAF1 kan också binda till IKK β . FAF1-bindning till IKK β

förhindrar bildning av IKK-komplexet. Utan IKK-komplexet kan NF- κ B-signaleringsräckan inte framskrida (Park et al., 2007). Nedsatt Caspar uttryck i flugor höjer produktionen av antimikrobiella peptider. Caspar har visats inhibera DREDD-beroende klyvning av Relish in vivo (Kim et al., 2007). Hur Caspar hindrar DREDD-beroende klyvning av Relish är tills vidare obesvarat.

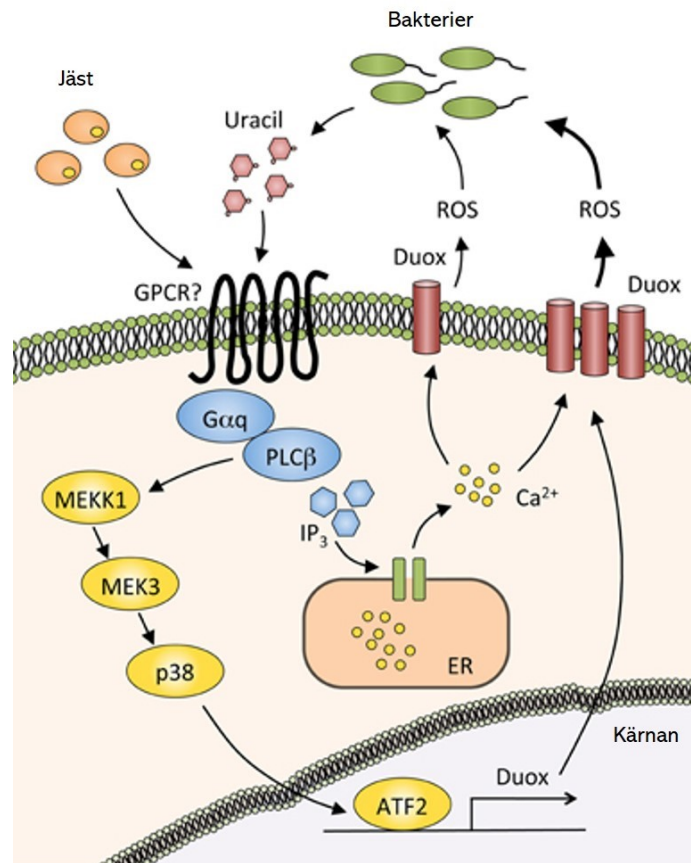
2.7 DUOX producerar ROS för att döda patogena mikroorganismer

DUOX är en medlem i nikotinamidadenindinukleotidfosfat-familjen (NADPH) och producerar reaktiva syreföreningar (ROS) som försvar mot patogena mikroorganismer i *Drosophila melanogaster*s tarm (Ha et al., 2015). ROS dödar inte enbart patogena mikroorganismer utan är även inblandad i många andra biologiska funktioner som t.ex. förnyande av epitelceller, redox-beroende modulering av signaleringsräckor, tvärbinding av molekyler och igenkänning av sjukdomsalstrande eller nyttiga bakterier (Kim & Lee, 2014).

En komponent som aktiverar DUOX är uracil (Kim & Lee, 2014). Enligt undersökningar med *Escherichia coli* (*E.coli*), utsöndrar bakterier uracil endast när tillväxtmiljön är ogynnsam (Rinas et al., 1995). Orsaken varför bakterier utsöndrar uracil vid ogynnsamma tillväxtmiljöer är tills vidare oklar, men det har spekulerats att uracil hjälper bakterierna att omforma genuttrycket vid stressfulla förhållanden (Kim & Lee, 2014). Patogena bakterier som kommer till flugans tarm t.ex. via födan är inte vana med miljön i tarmen. De kan känna tarmens miljö som ogynnsam och till följd av detta producera uracil (Lee et al., 2013). Den bakomliggande mekanismen hur bakterier utsöndrar uracil är tills vidare obesvarad.

DUOX-aktivering i flugans tarm påbörjas av uracil. Under basala förhållanden aktiveras $G\alpha_q$ (eng. G protein alpha subunit q) och $PLC\beta$ (eng. phospholipase C β) i flugans tarm konstant av jäst samt av små mängder uracil för att hålla nivån av mikroorganismer lämplig (Figur 5) (Kuraishi et al., 2013). $G\alpha_q$ och $PLC\beta$ aktiverar inositol-1,4,5-trifosfat (IP3) som efter aktiveringen binder till IP3-receptorn vid endoplasmatiska nätverket (Ha et al., 2009a). IP3 stimulering av IP3-receptorn leder till utsöndring av kalcium från endoplasmatiska nätverket. Det utsöndrade kalciumet aktiveras sedan DUOX enzymatiskt (Ha et al., 2009a). Under svåra infektioner med

många sjukdomsalstrande bakterier i flugans tarm, måste ROS produceras från DUOX mera intensivt (Figur 5) (Kuraishi et al., 2013). När stora mängder uracil kan detekteras i flugans tarm, aktiveras transkriptionen av DUOX genom MEKK1- MKK3- p38- och MAPK-signaleringsräckorna och aktiverande transkriptionsfaktor 2 (ATF2) (Ha et al., 2009b).



Figur 5. DUOX producerar ROS för att bekämpa sjukdomsalstrande bakterier i *Drosophila melanogaster*s tarm. DUOX-signaleringsräckan aktiveras genom att uracil binder till Gαq och PLCβ. Under basala förhållanden aktiveras kalciumutsöndring från endoplasmatiska nätverket (ER). Kalcium stimulerar DUOX att producera ROS som sedan dödar patogena mikroorganismer. Under infektioner med en förhöjd mängd patogena mikroorganismer i flugans tarm, produceras ROS mera intensivt. Då aktiveras MEKK1- MKK3- p38- och MAPK-signaleringsräckorna och dessa stimulerar ATF2, som inducerar transkriptionen av flera DUOX-komplex (modifierad från Kuraishi et al., 2013).

ROS som produceras av DUOX är inte enbart effektivt mot prokaryota celler, utan förstör även flugans egna tarmepitelceller. Därför är det viktigt att flugans tarmepitel förnyas konstant genom proliferation och differentiering av stamceller (Marianes & Spradling, 2013). Kronisk DUOX-aktivitet förekommer hos flugor och kan orsakas av

mutationer i DUOX-signaleringsräckan eller på grund av specifika bakterier som t.ex. *Gluconobacter morbifer*. Tarminflammation orsakad av kronisk DUOX-aktivitet leder till apoptos i flugans tarm och tidig död. Tarminflammation orsakad av kronisk DUOX-aktivitet i flugan kan jämföras med däggdjurens inflammatoriska tarmsjukdomar. Enligt undersökningar är proteinuttrycket av DUOX högt i människor med inflammatoriska tarmsjukdomar (MacFie et al., 2014). DUOX anses därför vara ett potentiellt terapeutiskt mål för att bekämpa inflammatoriska tarmsjukdomar (Chu et al., 2017).

I människan produceras det två olika DUOX-komplex medan det i flugan produceras bara ett (Ruy et al., 2010). Det första DUOX-komplexet som identifierades i människan producerar H_2O_2 för tyreoidhormonsyntesen i sköldkörteln (Dupuy et al., 1999). Det andra DUOX-komplexet identifierades senare och visats vara aktivt i människans epitelceller som befinner sig i tarmen, luftvägarna, alveolerna, spottkörtlarna och i prostatan (Ruy et al., 2010). DUOX-komplexen i människans sköldkörtel och epitelceller skiljer sig från varandra till uppbyggnad och funktion. Det anses att DUOX-komplexen i epitelcellerna är viktiga i försvaret mot mikrober. Undersökningar med DUOX knockout-möss har påvisat att DUOX-komplexet i tarmens epitelceller minskar koloniseringen av patogena mikrober i tarmen (Grasberger et al., 2015). DUOX-komplexet som befinner sig i människans epitelceller kan jämföras med DUOX-komplexet i flugans tarmepitel.

3 Målsättningar

Målsättningen med min Pro gradu-avhandling var att utveckla ett system där jag kan påverka bakteriefloran i *Drosophila melanogaster*s tarm och med hjälp av detta system, förstå bättre samverkan mellan IMD-signaleringsräckan och tarmfloran i flugan. (A). Eftersom drICE är en nedreglerare av IMD-signaleringsräckan under basala förhållanden, hade jag även som målsättning att undersöka om drICE behövs för att förhindra tarminflammation (B) samt om drICE-förmedlad IMD-aktivitet beror på kommensala bakterier i flugans tarm (C).

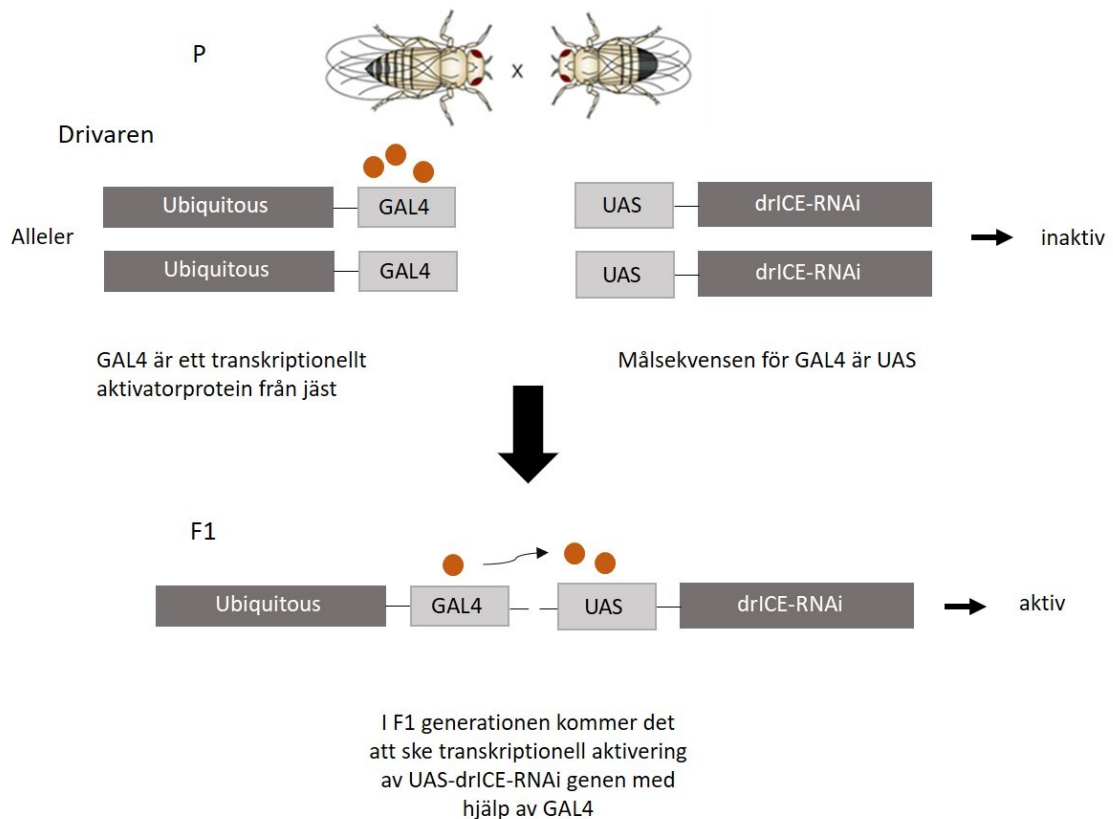
- A. Utveckla en metod för odling av bakteriefria flugor
- B. Undersöka om drICE förhindrar tarminflammation
- C. Undersöka om de kommensala tarmbakterierna i flugan påverkar drICE-förmedlad IMD-signalering.

4 Material och metoder

4.1 Fluglinjer och korsningar

Med UAS-GAL4-systemet är det möjligt att aktivera genuttryck i specifika celler eller vävnader i organismer som t.ex. *Drosophila melanogaster*. GAL4 är ett transkriptionellt aktivatorprotein som ursprungligen identifierats i jäst (Duffy, 2002). GAL4 har förmågan att aktivera uppströms aktiverande sekvenser (UAS). UAS kan kopplas till en specifik transgen och fungera som en promotor. För att transgenen som är kopplad till UAS skall uttryckas, måste GAL4 binda till UAS (Duffy, 2002). För att erhålla en fluga som uttrycker en UAS-kopplad transgen, bör en GAL4-drivarfluga korsas med en fluga innehållande en UAS-transgen (Figur 9). Avkomman av dessa flugor ärver GAL4-genen av ena föräldern och UAS-transgenen från andra föräldern, vilket resulterar i att transgenen kan uttryckas.

I denna Pro gradu-avhandling har jag använt RNA-interferens-tekniken för att odla upp flugor som inte producerar kaspaset-drICE. RNAi är en teknik med vilken man kan hindra uttrycket av en specifik gen i celler. Flugor med UAS-drICE-RNAi-transgenen korsades med Ubiquitous (Ubi)GAL4-drivarflugor (Figur 9). Korsningen ledde till att F1-generationens flugor bar både på UbiGAL4-genen och UAS-drICE-RNAi-genen. Med hjälp av UAS-GAL4-systemet uttrycktes drICE-RNAi-transgenen i F1-generationen vilket ledde till en hindrad produktion av kaspaset drICE i dessa flugor. Som kontrollflugor i denna Pro gradu-avhandling har jag använt vildtypsflugan Canton^s och UbiGAL4-drivarflugor.



Figur 9. GAL4-UAS systemet i flugor. GAL4 är ett transkriptionellt aktivatorprotein ursprungligen från jäst med förmågan att aktivera UAS-förstärkare. drICE-RNAi innehållande UAS är enbart aktivt om GAL4 binder till UAS. I P-generationen korsas en drivarfluga innehållande GAL4 med en fluga innehållande drICE-RNAi-genen kopplad till UAS. I F1-generationen binder GAL4 till UAS, vilket leder till transkriptionell aktivering av transgenen. Från F1-generationen väljs sedan flugor med både GAL4-och UAS-transgenen.

4.2 Flugornas diet

Flugornas diet bestod av Jazz-mix (Fisher Scientific, Waltham, USA) eller Nutri-Fly (Dutscher Scientific, Essex, Storbritannien). Nutri-Fly är en färdig blandning av jäst, mjöl av soja, majsmjöl, maltextrakt, agar och majssirap. Medan Jazz-mix är en färdig blandning av brunt socker, majsmjöl, jäst, agar, bensoesyra, metylparaben och propionsyra. Vid tillredningen av Nutri-Fly blandades en Nutri-Fly dospåse i 1 l destillerat vatten. Nutri-Fly-vattenblandningen värmdes upp till kokande under omrörning. Nutri-Fly-vattenblandningen kokades i 2 minuter och efter kokningen kylde blandningen ner till 60 °C. Efter nerkyllningen tillsattes 10 ml 10 % Tegosept (Apex™ BioResearch, Diamed, Fribourg, Schweiz) och 4,8 ml 99 % propansyra i blandningen. Vid tillredning av Jazz-mixen tillsattes 1,2 l destillerat vatten i 227 g Jazz-mix och blandningen fick koka i 10 minuter. Båda blandningarna pipetterades

sedan i matrör för flugor. I ett rör pipetterades 5 ml av blandningen. Blandningen fick sedan stelna i matrören i rumstemperatur över natten. Efter blandningen stelnat förvarades matrören i 4 °C. Det användes två olika dieter för flugorna eftersom Nutri-Fly-blandningen inte var tillgänglig att beställas från tillverkaren i slutskedet av praktiska arbetet inför Pro gradu-avhandlingen.

4.3 Metoden för att odla axeniska flugor

Axeniska flugor är bakteriefria flugor som är uppväxta i sterila förhållanden utan mikrober. Axeniska flugor odlades genom att placera flugor av intresse i burar som är utvecklade för att samla *Drosophila* ägg. På burarnas botten placerades en platta med saftagar (se Bilaga 2). På plattan tillsattes 70 µg jästpasta som bestod av jäst och vatten. Burarna med flugor ställdes i 25 °C i 24 h. Efter 24 h plockades flugorna från burarna genom att söva ner dem med koldioxid. Sedan plockades flugornas ägg från saftagarplattorna. Före äggen plockades torkades alla ytor med 70 % etanol och skyddsutrustning som t.ex. handskar och labbrock användes för att hindra kontaminationer. Flugornas ägg samlades och tvättades i 10 % hypoklorit, 70 % etanol och destillerat vatten. Genom att behandla äggen med 10 % hypoklorit i 5 minuter, bryts äggens korion ner. Korion är äggens yttersta hinna och i korion fastnar alla bakterier från modern. Genom att bryta ned korion, förlorar äggen sina bakterier. Därefter överfördes äggen till sterila utrymmen i autoklaverad mat. Äggen utvecklades i ca 14 dagar till fullvuxna axeniska flugor. Före användning av flugorna i fortsatta experiment, verifierades att flugorna var bakteriefria genom 16S polymeraskedjereaktion-metoden (eng. Polymerase Chain Reaction, PCR) och genom att undersöka bakterietillväxten från flughomogenat på LB-plattor (Kietz, Pollari & Meinander, 2018)

4.3.1 Odling av flugor matade med antibiotika

Flugor matades med olika koncentrationer av antibiotika för att undersöka mängden bakterier och uttrycket av antimikrobiella peptider i jämförelse till de axeniska flugorna. Antibiotikan som användes var tetracyklin hydroklorid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Tyskland). Koncentrationerna av antibiotikan i flugornas mat var 50

$\mu\text{g/ml}$ och $100 \mu\text{g/ml}$. Flugor av intresse placerades i mattuberna med antibiotika i 24 h. Efter 24 h flyttadesflugorna bort från mattuberna. Äggen som de lagt i mattuberna med antibiotikan, fick utvecklas till vuxna individer. Dessa flugor kunde sedan användas för vidare experiment.

4.4 Odling av bakterier på LB-plattor

Till en LB-platta (se Bilaga 2) valdes antingen två honor eller två hanar av intresse. Flugorna homogeniserades med en stöt i $50 \mu\text{l}$ LB-medium (se Bilaga 2), varefter $50 \mu\text{l}$ av homogenatet pipetterades på LB-plattan. Blandningen spreds ut på LB-plattan med en kilformad spridare. LB-plattan inkuberades i rumstemperatur i 24–48 h, varefter bakterieväxten kontrollerades. För att förhindra kontaminationer under experimentet, torkades alla ytor med 70 % etanol och skyddsutrustning användes.

4.5 16S PCR-metoden för bakteriedetektion

PCR-metoden används för att amplifiera ett fåtal kopior av en specifik DNA-sekvens genom att i en PCR-maskin värma upp och kyla ner DNA. Cykler värmer upp och kyler ned DNA-sekvensen, vilket leder till att DNA denatureras och replikeras. Nyckelkomponenter i PCR är DNA-polymeraset och primrer som är komplementära till DNA-målsekvensen. DNA-polymeraset känner igen primrerna och kan med hjälp av dem binda till rätta stället i DNA-strängen. DNA-polymeraset sammanfogar nukleotider till en DNA-sträng och uppbygger ett dubbelsträngat DNA på detta sätt.

I denna Pro gradu-avhandling användes 16S PCR-metoden för att verifiera att de axeniskaflugorna inte har kontaminationer och att tetracyklinbehandlingen har dödat bakterierna. 16S ribosomalt RNA är en komponent i 30S subenheten som hör till prokaryotiska ribosomen, d.v.s. alla bakterier uttrycker 16S ribosomalt RNA (Weisburg et al., 1991). Eftersom 16S ribosomalt RNA kan detekteras i bakterier, används 16S PCR-metoden för sekvensering samt för att identifiera om ett prov innehåller bakteriellt DNA. Det finns flera olika universala 16S PCR-primrer. Som framåtprimer användes 8F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (TAG Copenhagen, Fredriksberg, Danmark) och som bakåtprimer 519R 5'-

GWATTACCGCGGCKGCTG-3' (TAG Copenhagen, Fredriksberg, Danmark). För att isolera DNA från flugorna samt sätta upp 16S PCR-reaktionen användes Phire Animal Tissue Direct PCR kit (Thermo Scientific, Massachusetts, USA).

För att isolera DNA från flugor valdes två flugor av samma kön. Flugorna homogeniserades med en stöt i 20 µl utspädningsbuffert och 0,5 µl DNA frisättningsbuffert. Blandningen inkuberades 5 minuter i rumstemperatur, varefter den kokades 2 minuter i 98 °C. Själva PCR-reaktionen innehöll 10 µl 2 x reaktionsbuffert, 1 µl av framåtprimer, 1 µl av bakåtprimer, 0,4 µl av Phire polymeras och 6,6 µl destillerat H₂O per prov. När PCR-reaktionen blandats, ställdes proven i en PCR-maskin och PCR-programmet som kan ses i Tabell 1 utfördes (T100™ Thermal Cycler, Bio-Rad, Kalifornien, USA).

Tabell 1: 16S PCR-programmet

		Temperatur	Tid	Upprepningar
Steg 1	Denaturering	98 °C	5 minuter	-
Steg 1	Denaturering	98 °C	5 sekunder	x 20
Steg 2	Bindning	52 °C	5 sekunder	x 20
Steg 3	Elongering	72 °C	20 sekunder	x 20
Steg 4	Elongering	72 °C	1 minut	-
	Förvaring	4 °C	∞	-

För att detektera de amplifierade DNA-sekvenserna, kördes PCR-proven på en 1 % agarosgel. Agarosgelen bestod av 1,5 g agaros (BioLine, London, Storbritannien) som blandades ihop med 150 ml 1 x Tris-acetat (TAE) buffert (se Bilaga 2). Blandningen kokades tills agarosen löst upp sig i TAE-bufferten. 7,5 µl av GelRed (Biotium, Fremont, USA), som är ett fluorescerande färgningsmedel som binder till nukleinsyror, tillsattes i agaros-TAE-blandningen. Sedan hölls lösningen i en agarosgelställning för gjutning.

En 6 x DNA-laddningsfärg (Thermo Scientific, Massachusetts, USA) tillattes i PCR-proven. En markör för molekylviktstorleken blandades ihop av 1 kB Gene ruler DNA-markör (Thermo Scientific, Massachusetts, USA), 6 x DNA-laddningsfärg och destillerat vatten. Markören för molekylviktstorleken och PCR-proven pipetterades i agarosgelen brunnar. Agarosgelen fastkopplades i en elektroforesmaskin som för

elektrisk ström genom agarosgelen. Eftersom DNA är negativt laddat, kommer DNA att vandra mot positiva polen. Agarosgelen kördes i elektroforesmaskinen i ca 2 h med 70 V. När elektroforesmaskinen kört färdigt, erhöles resultatet genom att ställa agarosgelen under UV-ljus i iBright-maskinen (Thermo Scientific, Massachusetts, USA).

4.6 Mätning av AMP-nivåer med hjälp av qRT-PCR-metoden

Målgener för Relish är bl.a. attacin, diptericin och drocosin. För att mäta aktiviteten av IMD-signaleringsräckan i realtid, mättes uttrycket av attacin-, diptericin- och drocosin-generna med hjälp av kvantitativ omvänd transkriptions-PCR (eng. Quantitative reverse transcription-PCR, qRT-PCR). Genom qRT-PCR-metoden mäts mängden mRNA i ett prov genom att med enzymet omvänt transkriptas omvandla mRNA till komplementärt DNA (eng. complementary DNA, cDNA). När mRNA omvandlats till cDNA kan mängden cDNA mätas i provet med hjälp av cyaninfärgämnet SYBR Green. SYBR Green kan endast binda till dubbelsträngad DNA och avger till följd av detta fluorescerande ljus då primern binder till DNA-sekvensen vid PCR-reaktionen. Ju flera amplifikationer det sker, desto mer finns det DNA-produkt för SYBR Green att binda till. Den fluorescerande ljusmängden blir alltså större ju mera SYBR Green binder till DNA. Ljusmängden kan sedan detekteras av en qRT-PCR-maskin och den relativa mängden mRNA i provet kan räknas ut med hjälp av en hushållsgen.

RNA-extrahering från flugor gjordes med RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden Tyskland). Extraheringen börjades med att samla 10 flugor till ett prov. Flugorna homogeniserades med en stöt i 300 µl RNeasy lysisbuffert (RLT) innehållande 1 % β-merkaptoetanol (β-ME). β-ME bryter disulfidbindningar och kan fungera som en biologisk antioxidant. Efter homogeniseringen av flugorna tillsattes ytterligare 300 µl av RLT-β-ME-blandningen i provet. Lysatet pipetterades i en QIAshredder kolumn (Qiagen, Hilden, Tyskland) som användes för att avlägsna exoskelett, vingar och ben från provet. Lysatet centrifugerades sedan 2 minuter i 10 000 rpm. Efter centrifugeringen tillsattes 600 µl av etanol i provet. Etanol tillsattes för att främja bindningen av RNA till silicagel-membranet. Lysatet med etanol flyttades från QIAshredder kolumnen till RNeasy mini kit-kolumnen. Lysatet med etanol

centrifugerades 1 minut i 10 000 rpm. RNA från lysatet fastnade i filtret som finns i kolumnen medan resten av vätskan filtrerades igenom. Vätskan som filtrerades igenom kastades bort. Sedan tvättades filtret i kolumnen med 700 µl RW1 buffer och 700 µl RPE buffer. RW1 buffer har som uppgift att avlägsna biomolekyler som t.ex. kolhydrater, proteiner och fettsyror från provet, medan RPE bufferten avlägsnar salter. Efter tvättningen centrifugerades provet ytterligare 2 minuter i 10 000 rpm för att torka kolumnen. Sedan eluerades RNA i 45 µl TE-buffert (se Bilaga 2). TE-bufferten med RNA inkuberades i rumstemperatur 2 minuter och sedan centrifugerades blandningen 30 sekunder i 10 000 rpm. RNA-koncentrationen mättes med NanoDrop2000 spektrofotometern (Thermo Scientific, Massachusetts, USA). Som blank användes TE-buffert. RNA-proven förvarades i -80 °C.

Efter mRNA extraheringen från flugorna, omvandlades RNA till cDNA med hjälp av iScript (Bio-Rad, Kalifornien, USA). Med hjälp av mätningarna från NanoDrop, utspäddes varje prov med vatten så att 1 µg av RNA användes i varje prov. 5 x iScript reaktionsmix och iScript omvänt transkriptas blandades ihop och pipetterades sedan i proven. En amplifieringskontroll (eng. No Amplification Control, NAC) användes för att försäkra att det inte skett kontaminationer av genomiskt DNA till proven. NAC blandades ihop av 5 x iScript reaktionsmix, iScript omvänt transkriptas och destillerat vatten. cDNA syntetiserades slutligen genom att inkubera proven 5 minuter i 25 °C, 20 minuter i 46 °C, 1 minut i 95 °C och förvarades i 4 °C.

När mRNA var omvandlat till cDNA, mättes mängden cDNA i proven med hjälp av cyaninfärgämnet SYBR Green. Till en brunn i en 96-hålsplatta pipetterades 8 µl av reaktionsmix och 2 µl av cDNA. Reaktionsmixen bestod av 3,5 µl 2x reaktionsbuffert (KAPA biosystems, Massachusetts, USA), 0,2 µl av 10 µM framåtprimer, 0,2 µl av 10 µM bakåtprimer och 4,1 µl destillerat vatten. Framåt- och bakåtprimrerna som använts i denna Pro gradu-avhandling kan ses i tabell 2. Före cDNA pipetterades i brunnarna, utspäddes det 20 gånger med destillerat vatten. En templatkontroll (eng. No Template Control, NTC) användes ytterligare för att undersöka att det inte skett kontaminationer. NTC innehöll primärerna, KAPA och destillerat vatten.

Tabell 2: Framåt och bakåt primrerna som användes i qRT-PCR

Gen	Framåt-primer	Bakåt-primer
Attacin	5'-ATGCTCGTTTGGATCTGA-3'	5'-GACCTTGGCATCCAGATTGT-3'
Diptericin	5'-ACCGCAGTACCCACTCAATC-3'	5'-ACTTTCAGCTCGGTTCTGA-3'
RP49	5'-GACGCTTCAAGGGACAGTATC-3'	5'-AAACGCGGTTCTGCATGA-3'

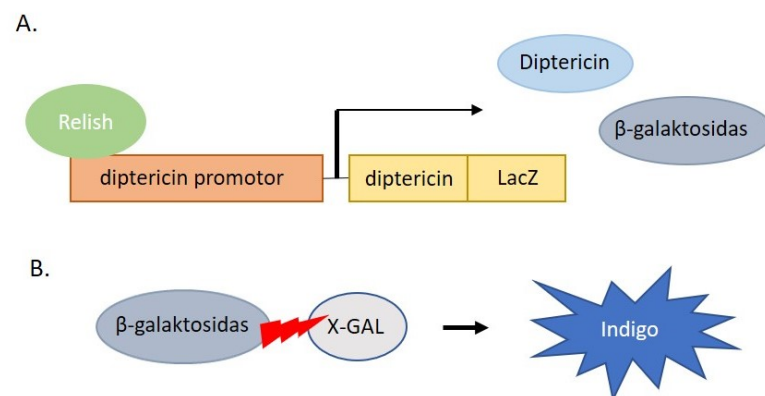
Av icke-utspädd cDNA togs 5 µl av varje prov och blandades ihop för att göra en standardlösning. Standard 1 av cDNA proven utspäddes fem gånger i förhållandet 1:5, d.v.s. utspädningarna var 1:1, 1:5, 1:25, 1:125 och 1:625. Standardkurvan användes för att jämföra enskilda DNA-provers genamplifikationsvärden.

cDNA och standardlösningarna pipetterades i triplikat med reaktionsmixen till 96-hålsplattan. När plattan var färdigt pipetterad, centrifugerades den 30 sekunder i 1000 rpm. Efter det sattes 96-hålsplattan in i StepOnePlus™ Real-Time PCR System-maskinen (Thermo Scientific, Massachusetts USA). qRT-PCR-programmet som plattan kördes i var följande: 3 minuter i 95 °C, 3 sekunder i 95 °C, 20 sekunder i 60 °C, 15 sekunder i 95 °C, 1 minut i 60 °C och 15 sekunder i 95 °C. Cykeln upprepades 20 gånger. Hushållsgenen RP49 användes i alla qRT-PCR-experiment som kontrollgen. Till sist analyserades resultaten i programmen excel och Graphpad Prism.

4.7 Mätning av NF-κB-aktivering X-GAL-analys

Nyckelkomponenterna i X-GAL-analysen är LacZ-reportergenen, β-galaktosidas och X-GAL. LacZ-reportergenen behövs för laktosmetabolismen i E.coli. Det är möjligt att koppla ihop LacZ-reportergenen med en gen av intresse. När LacZ-reportergenen är kopplad med genen av intresse, uttrycks LacZ-reportergenen samtidigt som cellen ger instruktioner att uttrycka genen av intresse. När genen av intresse uttrycks, produceras både β-galaktosidas från LacZ-reportergenen samt målproteinet. X-GAL är en organisk beståndsdel som består av galaktos och indol. När β-galaktosidas kommer i kontakt med X-GAL, separeras galaktos och indol, vilket leder till att indol dimeriserar till indigo som är ett blått färgämne. Eftersom β-galaktosidas har producerats i samma grad som målproteinet, är det sedan möjligt att undersöka hur aktivt genen av intresse producerats genom att se hur mycket indigo som bildats då β-galaktosidas klyvt X-GAL.

I denna Pro gradu-avhandling har X-GAL-analysen använts för att undersöka mängden uttryckt dipterucin i tarmen hos drICE-mutanta flugor. I dessa flugor var LacZ-reportergenen kopplad med dipterucin-genen (Figur 11). Eftersom LacZ-reportergenen var kopplad med dipterucin-genen, producerades det både dipterucin och β -galaktosidas när dipterucin-genens uttryck aktiverades. β -galaktosidas fick reagera med X-GAL i flugornas tarmar. Mängden uttryckt dipterucin korrelerade sedan med mängden blå färg i flugornas tarmar (Ave et al., 1997).



Figur 11. X-GAL-analys i *Drosophila melanogaster* med dipterucin-lacZ-genen. A. *Drosophila melanogaster* med dipterucin-lacZ-genen, producerar både β -galaktosidas och dipterucin när Relish aktiverar dipterucin promotorn. B. LacZ-genen producerar β -galaktosidas som klyver X-GAL. Klyvningen frigör indol. Efter klyvningen dimeriseras indol till indigo. Indigo är ett blått färgämne. På detta sätt korrelerar mängden producerad dipterucin med mängden blå färg.

För X-GAL-färgningen dissekerades flugornas tarmar i kall 1 x Fosfat-buffrad saltlösning (PBS). Efter dissekeringen fixerades tarmarna 15 minuter i 0,5 ml X-GAL-fixativ (se Bilaga 2). Efter fixeringen tvättades tarmarna 3 x 5 minuter i 1 x PBS. För att göra en färgningsblandning, blandades en del X-GAL-lösning (se Bilaga 2) till 20 delar X-GAL-färgningsbuffert (se Bilaga 2). Blandningen filtrerades för att minimera eventuell utfällning i form av kristaller. Av blandningen som gjordes av X-GAL-lösning och X-GAL-färgningsbuffert pipetterades 200 μ l på tarmarna. Tarmarna inkuberades i blandningen 2 h i 37 °C i skydd från ljus.

Efter 2 h, tvättades tarmarna 3 x 5 minuter i 1 x PBS. 12 μ l Mowiol pipetterades på ett objektglas. Tarmarna flyttades på ett täckglas och placerades försiktigt i Mowiol droppen på objektglaset. Mowiolet limmar täckglaset fast i objektglaset och

därför fick Mowiolet mellan täckglaset och objektglaset påverka i 20 minuter. Efter 20 minuter kunde resultaten observeras under mikroskop.

4.8 Verifiering av drICE-RNAi flugorna med Westernblotanalys

Westernblotanalysen används för att identifiera specifika proteiner med hjälp av antikroppar. Westernblot användes i denna Pro gradu-avhandling för att verifiera att drICE-proteinet saknades i drICE-RNAi-flugor.

4.8.1 Lysisprov av flugor

För att göra Westernblotanalys gjordes lysat av flugor. För ett prov blandades 142,5 µl Schneider-2 (S2) -lysisbuffert (se Bilaga 2) och 7,5 µl 20 x proteasinhämmare (Thermo Scientific, Massachusetts, USA). Tio flugor av intresse homogeniserades med en stöt i S2-lysisbuffert innehållande 1 x proteasinhämmare. Proven inkuberades på is i 10 minuter. Sedan centrifugerades provet 10 minuter vid 4 °C i 13 000 rpm. Genom att centrifugera proven separerades tre olika lager i provet. Exoskelettet, vingarna och benen av flugorna bildade bottenlagret, som hade en brun färg, det mittersta lagret bestod av proteiner och DNA och hade en klar färg, medan det översta lagret bestod av fett och hade en gul färg. Det mittersta lagret flyttades till ett nytt Eppendorfrör. Eppendorfröret centrifugerades 5 minuter i 4 °C med 13 000 rpm. 50 µl av den centrifugerade supernatanten flyttades till ett nytt Eppendorfrör. I Eppendorfröret tillsattes 16,5 µl av 4 x Laemmlibuffert (se Bilaga 2). Provet kokades 5 minuter och kunde sedan användas för vidare experiment. Kokandet orsakade denaturering. Proteinernas disulfidbryggor bröts ned p.g.a. β-ME som fanns i bufferten.

4.8.2 SDS-PAGE separerar proteinerna enligt storlek

Med hjälp av natriumlaurylsulfat polyakrylamidelektrofores (eng. sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) separerades proteinerna enligt deras molekylvikt. Proven kokades 5 minuter före de laddades i polyakrylamidgelen (se Bilaga 2). Polyakrylamidgelen i SDS-PAGE består av en övre

gel och en nedre gel. Den övre gelen har som uppgift att packa proteinerna ihop medan den nedre gelen separerar proteinerna enligt storlek. SDS, som finns både i bufferten och polyakrylamidgelen, orsakar att alla proteiner får en negativ laddning p.g.a. att proteinernas egna laddningar täcks av SDS-molekylernas negativa laddning. När alla proteinerna är negativt laddade, möjliggörs separering av proteinerna med hjälp av elektrisk ström eftersom de små proteinerna vandrar igenom polyakrylamidgelen snabbare än stora. Den övre gelen behandlades med spänningen 80 V i ca 20 minuter, medan den nedre gelen behandlades med spänningen 120 V i ca 60 minuter. För att kunna bestämma proteinernas storlek användes en proteinmarkör (Precision Plus Protein™, Bio-Rad, Kalifornien, USA).

4.8.3 Halvtorr överföring och immunoblotting med förstärkt kemiluminescens

När proteinerna separerats enligt deras molekylstorlek i polyakrylamidgelen, överfördes proteinerna till ett nitrocellulosamembran. I denna Pro gradu-avhandling användes halvtorr överföring av proteinerna. Vid halvtorr överföring placerades tre Whatman-papper på hög på botten av en transfermaskin. På de tre Whatman-pappren placerades ett nitrocellulosamembran och på membranet en polyakrylamidgel med de separerade proteinerna. På polyakrylamidgelen placerades ytterligen tre Whatman-papper. Alla Whatman-papper blöttes i överföringsbuffert (se Bilaga 2) före användning. Transfermaskinen ställdes på 400 mA. Transfermaskinen fick sedan överföra proteinerna från polyakrylamidgelen till nitrocellulosamembranen i 45 minuter. Eftersom proteinerna var negativt laddade, rörde de sig mot pluspolen i transfermaskinen och därmed in i nitrocellulosamembranet, som var placerat mot pluspolen om polyakrylamidgelen.

Med immunoblotting kan proteiner av intresse detekteras i ett prov med hjälp av primära och sekundära antikroppar som binder till proteinets epitop. Efter den halvtorra överföringen placerades nitrocellulosamembranen i 3 % mjölk-1 x PBS-0,2 % Tween blandning för att blocka proteinerna i membranen och på detta sätt minimera ospecifik bindning. Efter att membranen varit i mjölkblandningen, tvättades membranet med 1 x PBS-0,2 % Tween 20 (se Bilaga 2) tre gånger. Sedan inkuberades membranet över natten med en primär antikropp (Tabell 3) som band till proteinet av intresse. Följande morgon tvättades membranet 3 x 10 minuter i 1 x PBS-0,2 % Tween

20. Sedan inkuberades membranet med en sekundär antikropp (Tabell 4) som blandades med 3 % mjölk-1 x PBS-0,2 % Tween. Den sekundära antikroppen band till den primära antikroppen. Den sekundära antikroppen inkuberades i en timme varefter membranet tvättades 3 x 10 minuter med 1 x PBS-0,2 % Tween 20. Den sekundära antikroppen innehåller pepparrotsperoxidase (eng. horseradish peroxidase, HRP) som nedbryts när det reagerar med ECL (eng. enhancer chemiluminescence) (GE Healthcare, Helsingfors, Finland). Nedbrytningen orsakar att HRP avger ljus som gör att proteinerna kan detekteras på röntgenfilm.

Tabell 3: Primära antikroppar för Westernblotningen.

Primär antikropp	Typ av antikropp	Koncentration	Tillverkare
anti-aktin (C-11)	Polyclonal anti-get IgG	1:2000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA
anti-drICE (SK31)	anti-marsvin	1:2000	Tenev et al., 2005

Tabell 4: Sekundära antikroppar för Westernblotningen.

Sekundär antikropp	Typ av antikropp	Koncentration	Tillverkare
Åsna-antigen	IgG-HPR	1:5000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA
Get-antimarsvin	IgG-HPR	1:5000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA

4.9 Statistiska analyser

Resultaten från qRT-PCR analyserades statistiskt. Grafer samt statistiska analyser gjordes med datorprogrammet GraphPad Prism. Resultatet från två grupper analyserades med t-test medan undersökningar med tre grupper eller flera analyserades med envägs ANOVA. Bonferroni post hoc testet utfördes för att undersöka signifikanta skillnader mellan proven.

5 Resultat

5.1 Odling av axeniska *Drosophila melanogaster*

För att bättre förstå värdorganismens och tarmbakteriernas relation till varandra, har forskare utvecklat metoder för att odla bakteriefria d.v.s. axeniska flugor (Bakula, 1969). Med hjälp av axeniska flugor kan t.ex. aktiviteten av olika signaleringsräckor, inflammation och levnadstiden undersökas mellan flugor som saknar eller innehåller bakterier. Med hjälp av axeniska flugor är det möjligt att utveckla gnotobiotiska flugor. Gnotobiotiska flugor utvecklas genom att introducera en specifik bakterieart i axeniska flugor. I gnotobiotiska flugor kan det sedan undersökas hur en specifik bakterieart påverkar flugans hälsa (Johnson, 2015). I denna Pro gradu-avhandling utvecklades det en metod för att odla axeniska flugor i laboratorier med standardutrustning. De axeniska flugorna användes sedan för vidare experiment för att undersöka hur kommensala tarmbakterier påverkar aktiviteten av IMD-signaleringsräckan.

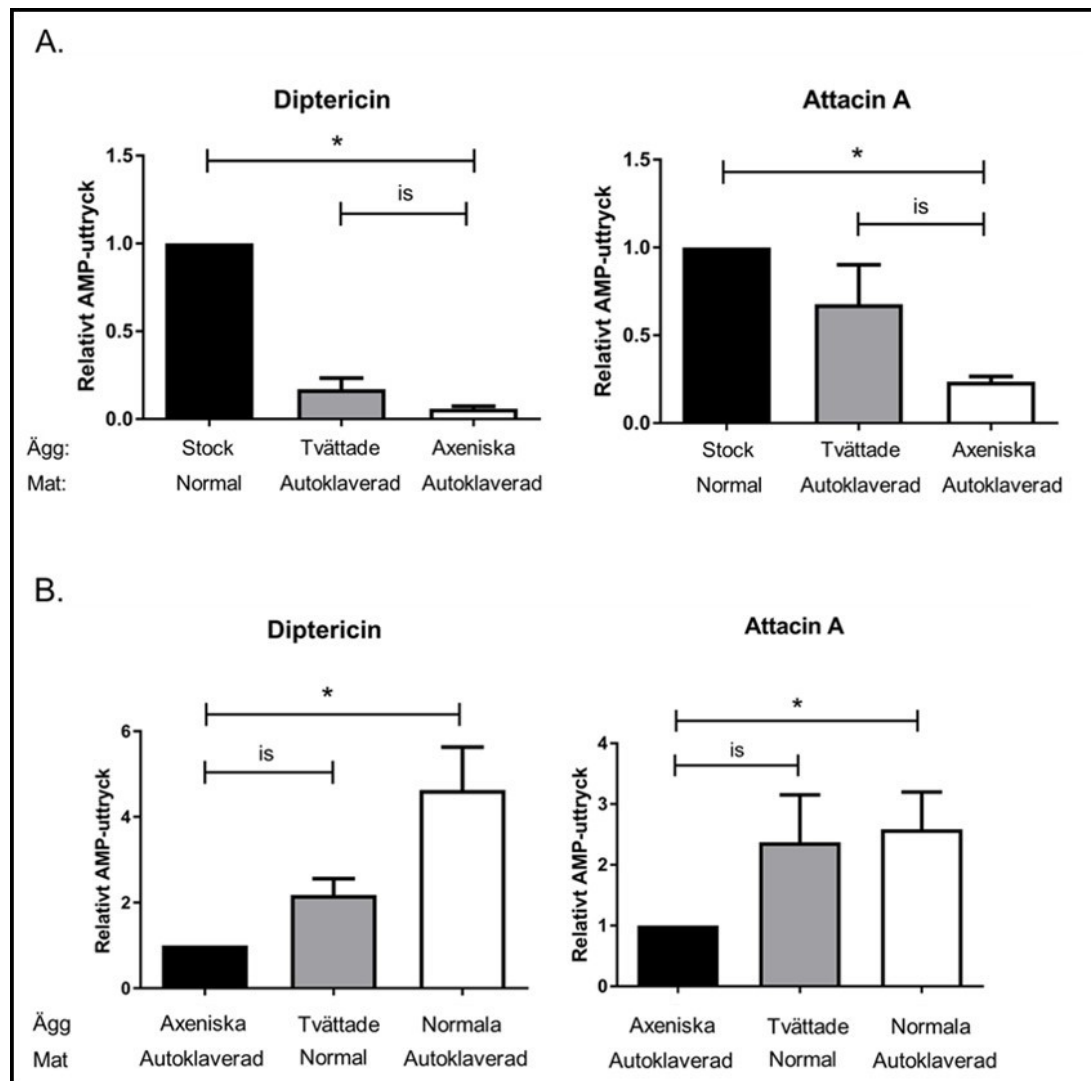
5.1.2 Optimering av kontrollflugor till de axeniska flugorna

För att verifiera att de axeniska flugorna är bakteriefria, var det viktigt att utveckla en stabil kontroll som behandlats på liknande sätt som de axeniska flugorna. Det var också viktigt att kontrollflugorna erhöll en bakterieflora som påminner om den som uppstår under normala förhållanden. Stockens flugor var inte optimal som kontroll eftersom stockens flugor inte behandlats på samma sätt som de axeniska flugorna. Immunrespons orsakade av bakterier hos flugorna kontrollerades med hjälp av qRT-PCR-metoden. Som målgener för qRT-PCR-metoden användes diptericin och attacinA. Diptericin och attacin A är antimikrobiella peptider som dödar bakterier i flugan. Diptericin och attacin A är målgener för IMD-signaleringsräckan.

För att erhålla kontrollflugor tvättades äggen med destillerat vatten och sedan odlades äggen till fullvuxna individer i autoklaverad mat. Dessa kontrollflugors genuttryck av diptericin och attacin A jämfördes med axeniska flugornas och stockflugornas genuttryck (Figur 12 A). Uttrycket av antimikrobiella peptider varierade starkt i dessa kontrollflugorna. Ibland kunde tvättningen av äggen avlägsna alla bakterier och ibland var uttrycket av antimikrobiella peptider närmare stockflugornas. Dessa

kontrollflugors dipterin- och attacin A-uttryck var icke-signifikanta i jämförelse med uttryckt dipterin och attacin i de axeniska flugorna. Eftersom odling av tvättade ägg i autoklaverad mat utvecklade alltför rena kontrollflugor, utvecklade jag nya metoder för att odla kontrollflugor.

Jag provade odla kontrollflugor genom att enbart tvätta äggen med destillerat vatten och sedan placera äggen i normal mat. Enbart tvättning av äggen med destillerat vatten utvecklade också för rena kontrollflugor (Figur 12 B). Dessa kontrollflugornas uttryck av dipterin och attacin A var icke-signifikant i jämförelse med uttryckt dipterin och attacin A i de axeniska flugorna. Slutligen odlades kontrollflugorna genom att placera kontrollflugornas ägg enbart i autoklaverad mat. Tvättningen av äggen med destillerat vatten lämnades bort. Dessa kontrollflugor uttryckte högre nivåer av dipterin och attacin A än de andra kontrollflugorna och dessutom uttryckte dessa kontrollflugor en signifikant högre mängd dipterin och attacin A än de axeniska flugorna (Figur 12 B). Kontrollflugorna odlades framöver genom att enbart placera äggen i autoklaverad mat.

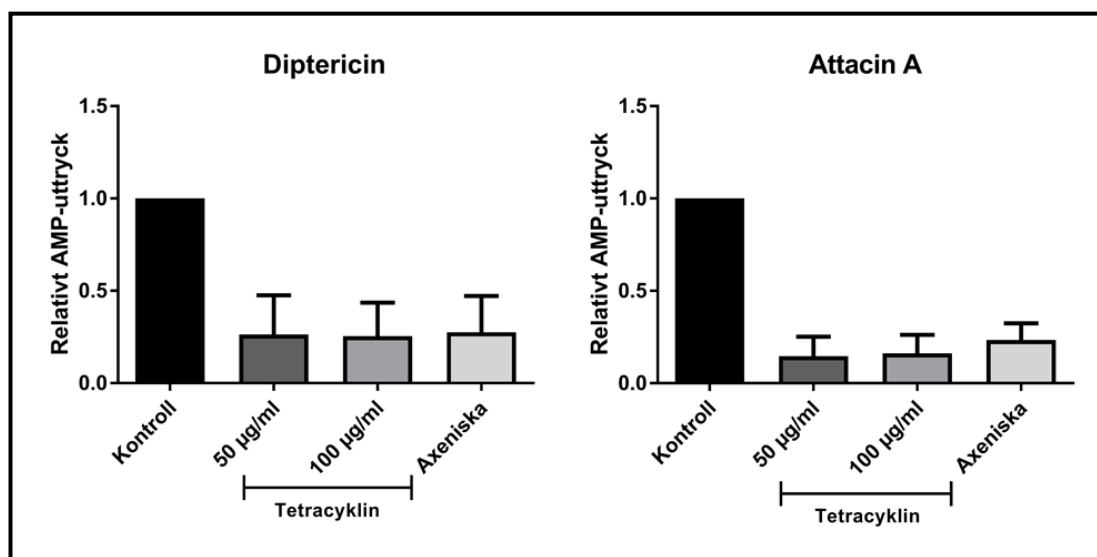


Figur 12. Optimering av kontrollflugor till experiment med axeniska flugor. Med hjälp av qRT-PCR-metoden, undersöktes genuttrycket av diptericin och attacin A i Canton^s stock, Canton^s kontrollflugor och Canton^s axeniska flugor. I alla grafer anger Y-axeln det relativa uttrycket av antimikrobiella peptider (AMP) och X-axeln anger hur flugornas ägg samt matrör behandlats. RP49 användes som hushållsigen i dessa experiment. Statistisk analys: Tvåvägs ANOVA, Bonferroni-test, medelvärde \pm SEM, $n=3$, *, $p<0,05$, is = icke-signifikant.

5.1.3 Odling av en bakteriefri kontroll till experimenten med de axeniska flugorna

För att avlägsna bakterier från flugorna med andra metoder, utvecklades det en till bakteriefrik kontroll. Den bakteriefri kontrollen utvecklades genom att mata flugor med olika koncentrationer av antibiotikan tetracyklin. Tetracyklin är en effektiv antibiotika mot Gramnegativa och Grampositiva bakterier. Med koncentrationerna 50 $\mu\text{g/ml}$ och 100 $\mu\text{g/ml}$ tetracyklin i autoklaverad flugmat, är det möjligt att eliminera >99 % av bakterierna i flugorna (Ridley et al., 2012). För att verifiera den bakteriefria kontrollen,

jämfördes mängden uttryckt diptericin och attacin A i flugor matade med antibiotika och axeniska flugor (Figur 13). Kontrollflugorna uttryckte största mängden antimikrobiella peptider. Nivån av uttryckt diptericin och attacin A hos flugorna matade med 50 µg/ml och 100 µg/ml antibiotika samt hos de axeniska flugorna är 75 %-80 % lägre i jämförelse med kontrollflugornas uttryck av antimikrobiella peptider. Eftersom uttrycket av diptericin och attacin A var lika lågt hos tetracyklin-behandlade flugor och axeniska flugor, godkändes tetracyklin-behandlade flugorna som en bakteriefrik kontroll för de axeniska flugorna.

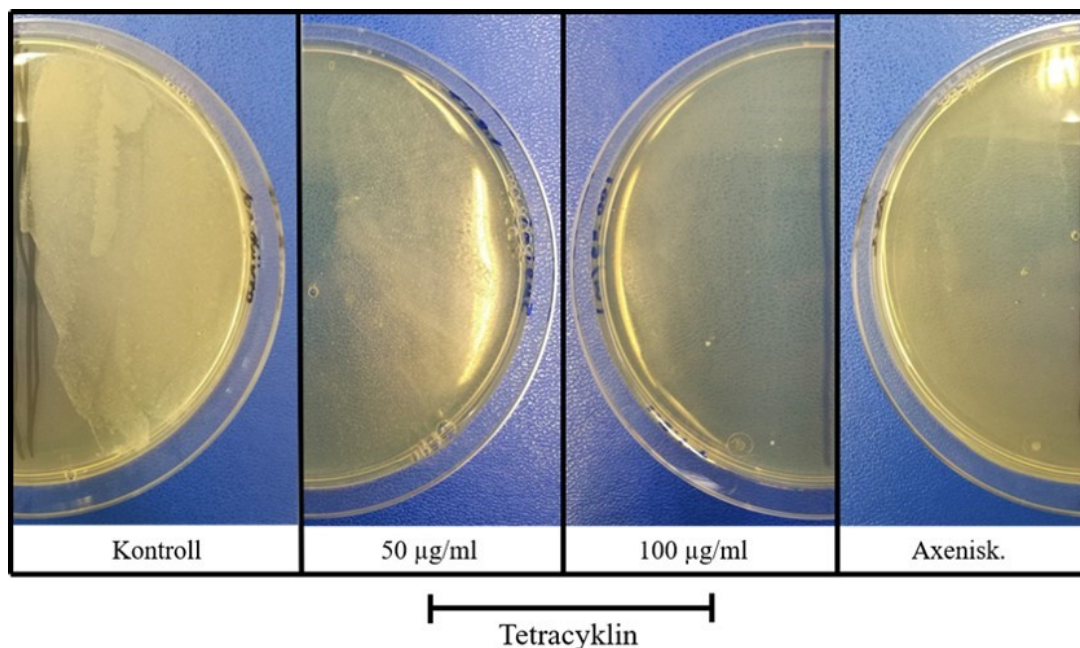


Figur 13. Jämförelse av diptericin-och attacin A-uttrycket hos flugor matade med olika koncentrationer av antibiotika samt axeniska flugor. Med hjälp av qRT-PCR-metoden undersöktes mängden genuttryck av diptericin och attacin A i Canton^s kontrollflugor, Canton^s flugor matade med 50 µg/ml och 100 µg/ml antibiotika samt Canton^s axeniska flugor. X-axeln anger fluglinjerna medan Y-axeln anger relativa uttrycket av antimikrobiella peptider (AMP). Detta experiment har upprepats två gånger (n=2) och därför kan inga statistiska analyser genomföras. RP49 användes som hushållsgen i dessa experiment.

5.2 Verifiering av de axeniska flugorna med hjälp av LB-plattor och 16S PCR-metoden

Eftersom qRT-PCR-resultaten anger endast aktiviteten av målgener för IMD-signaleringsräckan och därmed enbart om flugorna lider av inflammation, behövdes det andra metoder för att verifiera att de axeniska flugorna saknade bakterier. För att verifiera att de axeniska flugorna saknade bakterier, homogeniserades flugor i LB-medie och spreds ut på LB-plattor för att undersöka bakterietillväxten. I Figur 14 kan

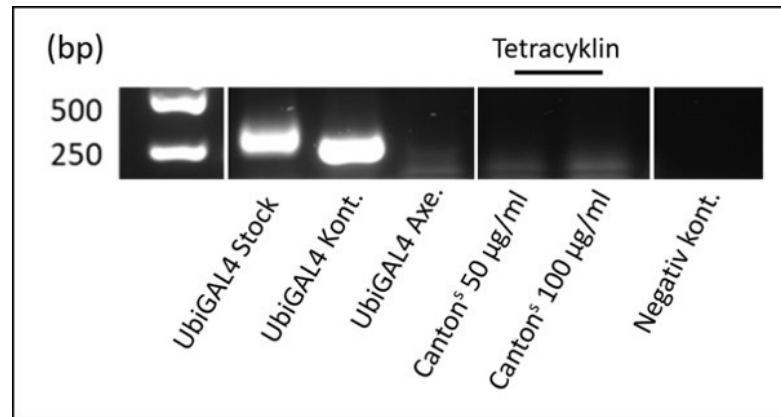
resultaten från LB-plattor innehållande flughomogenat av Canton^s kontrollflugor, flugor matade med antibiotika och axeniska flugor betraktas. Bakterier utvecklar en vitkiftande läggning på LB-plattans yta. Eftersom LB-plattan med flughomogenat av kontrollflugorna har en tät vit läggning av kolonier, innehåller kontrollflugorna bakterier (Figur 14). LB-plattorna med flughomogenat av flugor matade med 50 µg/ml och 100 µg/ml antibiotika samt LB-plattan med flughomogenat av axeniska flugor saknade kolonier. Det som kan ses på LB-plattan med flughomogenat av flugor matade med 50 µg/ml antibiotika är LB-medie med rester från flughomogenatet som reflekteras från lamporna. Eftersom ingen bakterieväxt kan ses på LB-plattorna innehållande flughomogenat av flugor matade med 50 µg/ml och 100 µg/ml antibiotika samt på LB-plattan med flughomogenat av de axeniska flugorna, antas dessa flugor vara som bakteriefria.



Figur 14. Verifiering av de axeniska flugorna med hjälp av LB-plattor. För att verifiera att de axeniska flugorna inte innehåller bakterier användes LB-plattor. LB-plattorna innehåller flughomogenat av Canton^s kontrollflugor, Canton^s matade med 50 µg/ml eller 100 µg/ml antibiotika eller Canton^s axeniska flugor.

Eftersom alla bakterier inte växer på LB-plattor, genomfördes det ytterligare 16S PCR-metoden för att verifiera att inget bakteriellt DNA fanns i flugorna. 16S uttrycks i ribosomen hos alla prokaryoter, d.v.s. alla bakterier uttrycker 16S ribosomalt-RNA. I UbiGAL4 stock-och kontrollproven finns det DNA av storleken 250 bp. Detta tyder

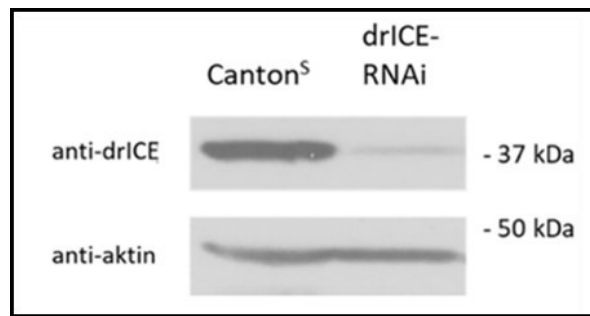
på att UbiGAL4 stockflugorna och UbiGAL4 kontrollflugorna innehåller bakteriellt DNA. I proven med UbiGAL4 axeniska, Canton^s 50 µg/ml och Canton^s 100 µg/ml kan det inte detekteras DNA av storleken 250 bp och därför anses proven vara bakteriefria.



Figur 15. Verifiering av axeniska flugor med hjälp av 16S PCR-metoden. 16S PCR-metoden användes för att verifiera att de axeniska flugorna inte innehåller bakteriellt DNA. X-axeln anger de olika fluglinjerna som använts medan Y-axeln anger basparen (bp).

5.3 drICE-kaspaset nedreglerar IMD-signaleringsräckan

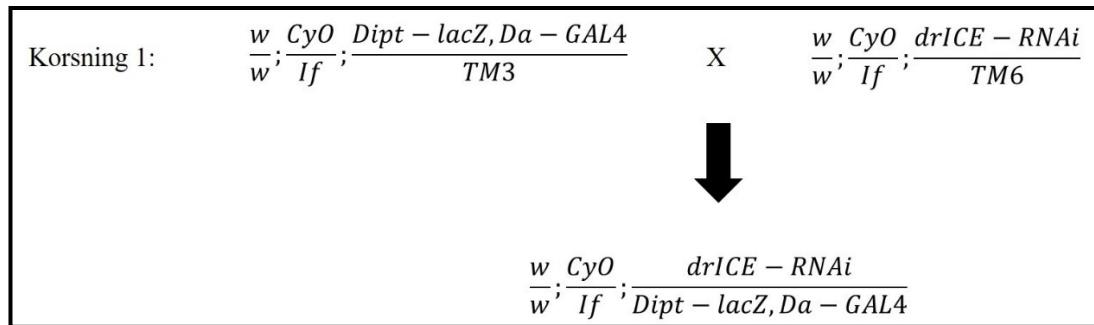
Kaspaset drICE kan binda och klyva E3-ligaset DIAP2 och hindrar således IMD-signaleringsräckan från att framskrida. En av målsättningarna i denna Pro gradu-avhandling var att undersöka rollen av drICE vid tarminflammation. Före drICE-RNAi-flugor användes i experiment, verifierades det att drICE-kaspaset är nedreglerat i dessa flugor. För att undersöka om drICE-RNAi-flugorna saknade drICE-kaspaset, användes Westernblotanalys (Figur 16). Cantons-flugorna innehåller drICE. Hos drICE-RNAi-flugorna kan drICE detekteras svagt vid 37 kDa, vilket indikerar att drICE-RNAi-flugorna inte producerar lika mycket drICE som vildtypsflugan Cantons.



Figur 16. Verifiering att kaspaset drICE är nedreglerat i drICE-RNAi-flugorna. Westernblot av Cantons och drICE-RNAi-flugor. I övre blotten har det undersökts om proven innehåller drICE, medan nedre blotten är en laddningskontroll av aktin.

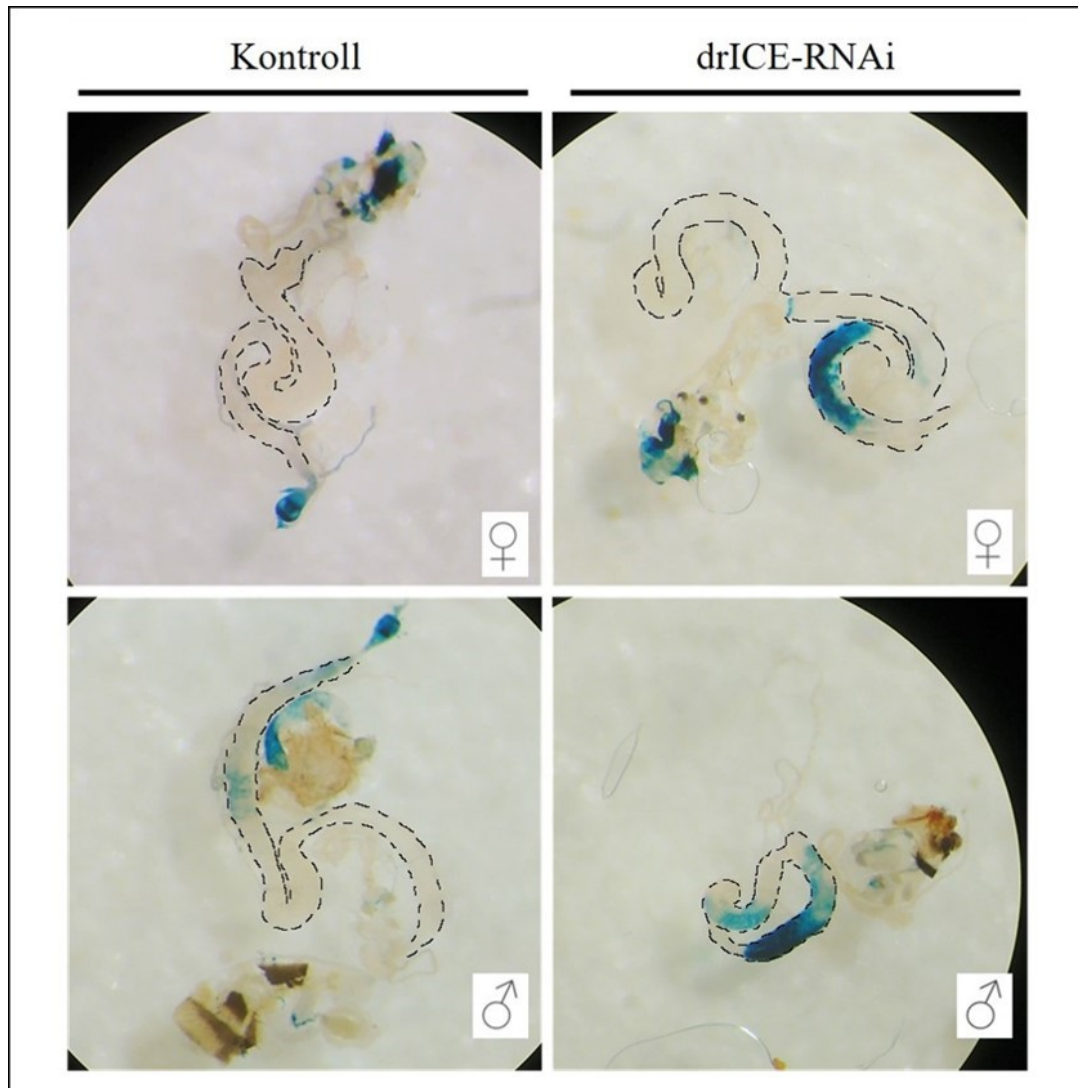
5.3.1 Dipterucin produceras mera aktivt i drICE-RNAi-flugor i jämförelse till kontrollflugor

För att undersöka tarminflammation, studerades dipterucin-promotorns aktivitet i flugornas tarmar med hjälp av X-GAL-analys. Kaspaset drICE i drICE-mutanta flugorna inhiberades med hjälp av RNAi-tekniken. drICE-RNAi-genen är kopplad med en UAS-region, vilket betyder att drICE-RNAi-genen är aktivt enbart med UAS-GAL4-systemet. Flugor som användes för experimentet var kontrollflugor innehållande endast dipterucin-lacZ-genen samt drICE-RNAi-flugor kombinerade med dipterucin-LacZ-genen. För att erhålla en fluga som uttrycker aktivt UAS-drICE-RNAi-, daughterless (Da)-GAL4-och dipterucin-LacZ-genen, korsades en DaGAL4-drivarfluga innehållande dipterucin-LacZ-genen med en fluga innehållande UAS-drICE-RNAi-genen (Figur 17). Från avkomman valdes sedan flugor som uttryckte drICE-RNAi-genen och dipterucin-LacZ-genen.



Figur 17: Korsningsschema för att erhålla flugor som uttrycker både drICE-RNAi-genen och diptericin (dipt)-lacZ-genen. En fluglinje innehållande dipt-LacZ-genen och daughterless (Da)-GAL4-genen korsades med en fluglinje innehållande drICE-RNAi-genen. Da-GAL4-genen fungerar som drivare till drICE-RNAi-genen. Från avkomman valdes flugor som uttryckte både drICE-RNAi-genen och Dipt-LacZ-genen. TM3 (Third multiple), TM6 och CyO (Curly O) balanserar kromosomer medan If (Irregular facets) och w (white) fungerar som markörer.

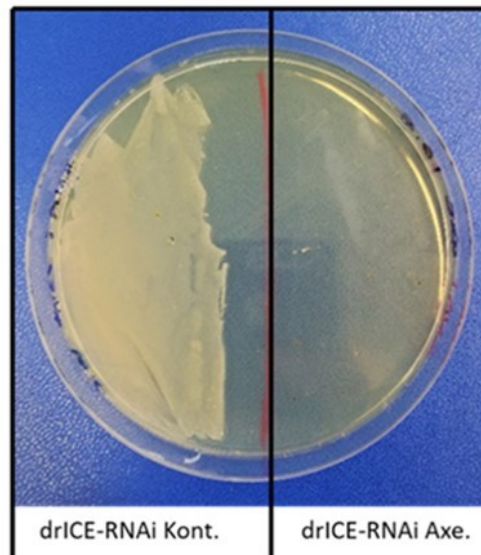
När rätta flugorna erhöles från korsningen, analyserades inflammationsresponsen i flugornas tarmar med X-GAL-analysen. I resultaten erhåller drICE-RNAi-flugorna mera blå färg i tarmarna än kontrollflugorna (Figur 18). Detta indikerar att drICE-RNAi-flugorna uttrycker en större mängd diptericin än kontrollflugorna. Eftersom drICE saknas i drICE-RNAi-flugorna, tyder detta på att IMD-signaleringsräckan är konstant aktiv i dessa flugor och därför produceras det mera diptericin.



Figur 18. Färgning av flugtarmar med hjälp av X-GAL. Flugor innehållande dipteracin-LacZ-genen analyserades med X-GAL för att undersöka aktiviteten av dipteracin-promotorn. Flugor som användes för analysen var kontrollflugor med dipteracin-LacZ-genen och drICE-RNAi-flugor kombinerad med dipteracin-LacZ-genen. En större mängd blå färg i drICE-RNAi-flugornas tarmar indikerar att dessa flugor uttrycker en större mängd dipteracin i jämförelse med kontrollflugorna. Honor och hanar från båda fluglinjerna har jämförts med varandra.

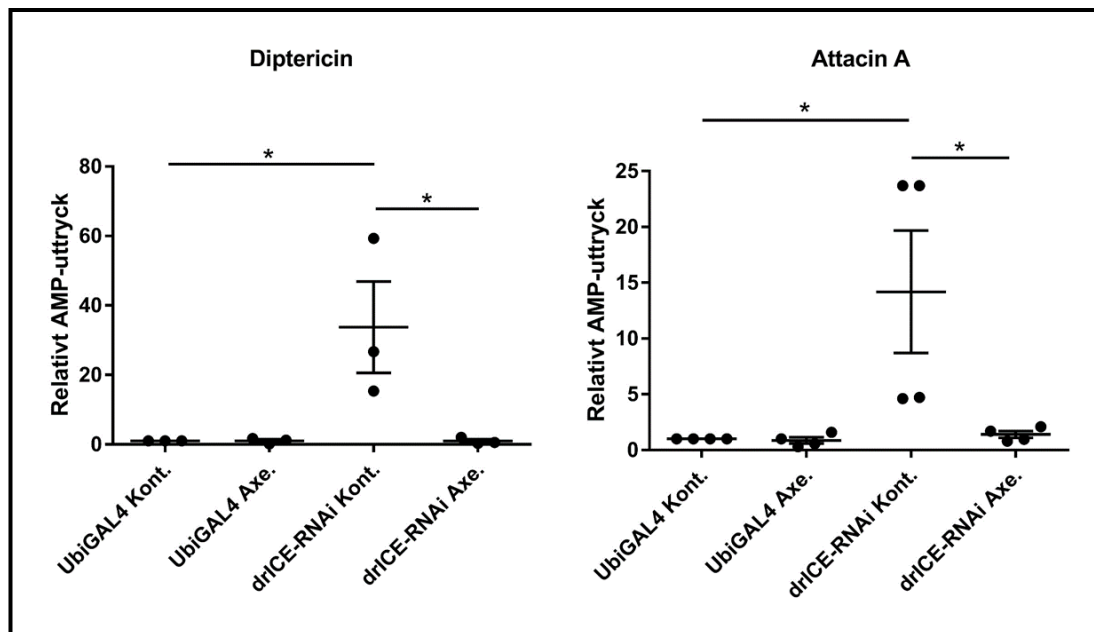
5.3.2 IMD-signaleringsräckan påverkas av kommensala tarmbakterier

Före axeniska drICE-RNAi-flugor användes till experiment, undersöktes bakterietillväxten i dessa flugor med hjälp av LB-plattor (Figur 19). drICE-RNAi-kontrollflugorna utvecklar kolonier som formas av bakterier, medan axeniska drICE-RNAi-flugor inte utvecklar kolonier och kan anses vara bakteriefria.



Figur 19. Verifiering att axeniska drICE-RNAi-flugor inte innehåller bakterier. Undersökning av bakterietillväxten i drICE-RNAi-kontrollflugor (Kont.) och axeniska (Axe.) drICE-RNAi-flugor med hjälp av LB-plattor. Flughomogenatet av drICE-RNAi-kontrollflugorna utvecklade kolonier. Flughomogenatet av de axeniska flugorna utvecklade inga kolonier på LB-plattan och kan anses vara bakteriefria.

Efter att axeniska drICE-RNAi-flugor bevisats bakteriefria, mättes genuttrycket av dipterisin och attacin A med hjälp av qRT-PCR-metoden i axeniska drICE-RNAi-flugor och drICE-RNAi-kontrollflugor (Figur 20). Experimentet gjordes för att studera om drICE inhiberar IMD-signalering förorsakad av kommensaler. Uttrycket av antimikrobiella peptider hos UbiGAL4-kontrollflugor, axeniska UbiGAL4-flugor och axeniska drICE-RNAi-flugor är lägre än hos drICE-RNAi-kontrollflugorna. drICE-RNAi-kontrollflugorna uttrycker en betydligt högre mängd dipterisin och attacin A, eftersom drICE inte produceras i dessa flugor och IMD-signaleringsräckan anses vara konstant aktivt till följd av detta. UbiGAL4-kontrollflugorna producerar drICE normalt och därför hålls uttrycket av antimikrobiella peptider betydligt lägre hos dessa flugor i jämförelse till drICE-RNAi-kontrollflugorna. Detta indikerar att kommensala tarmbakterier förorsakar inflammation vid avsaknad av drICE. När kommensala bakterierna tas bort från drICE-RNAi-flugorna genom att odla flugorna till axeniska, sjunker mängden uttryckt dipterisin och attacin A i jämförelse till drICE-RNAi-kontrollflugorna. Detta indikerar att IMD-signaleringsräckan startar med receptoraktivering av bakterier och inte i mitten av IMD-signaleringsräckan.



Figur 20. Jämförelse av mängden uttryckt diptericin och attacin A i axeniska drICE-RNAi-flugor och drICE-RNAi-kontrollflugor. Med hjälp av qRT-PCR-metoden undersöktes mängden uttryckt diptericin och attacin A i UbiGAL4-kontrollflugor (Kont.), axeniska (Axe.) UbiGAL4 -flugor, drICE-RNAi-kontrollflugor och axeniska drICE-RNAi-flugor. Y-axeln anger det relativa uttrycket av antimikrobiella peptider (AMP) och X-axeln anger fluglinjerna. Statistisk analys: Tvåvägs ANOVA, Bonferroni-test, medelvärde \pm SEM, diptericin-grafen, $n=3$, attacin A-grafen, $n=4$, *, $p<0,05$, is = icke-signifikant. RP49 användes som hushållsigen i dessa experiment.

6 Diskussion

Flugans tarm används för att undersöka hur tarmen bekämpar patogena bakterier och samtidigt tolererar kommensala bakterier. IMD-signaleringsräckan aktiveras av patogena Gramnegativa bakterier i flugans tarm medan DUOX-signaleringsräckan aktiveras av både patogena Gramnegativa bakterier och patogena Grampositiva bakterier samt av svamparter (Charroux & Royet, 2012). IMD-signaleringsräckan dödar bakterier i flugans tarm genom produktionen av antimikrobiella peptider (Myllymäki et al., 2014). DUOX-signaleringsräckan dödar däremot bakterier och svamparter genom att aktivera produktionen av ROS (Kim & Lee, 2013). För att flugan skall kunna både tolerera kommensala bakterier och bekämpa patogena bakterier i tarmen, är det viktigt att IMD-signaleringsräckan och DUOX-signaleringsräckan aktivt regleras. Nedreglering av signaleringsräckorna leder till att kommensala bakterier har en möjlighet att leva i tarmen. En konstant aktivering av IMD- och DUOX-signaleringsräckorna leder till att inte bara de patogena bakterierna dör, utan också de kommensala bakterierna i flugans tarm. En minskning av kommensala bakterier i flugans tarm orsakar inflammation, som kan jämföras med inflammatoriska tarmsjukdomar som utvecklas i människorna (Charroux & Royet, 2012). Målet med denna Pro gradu-avhandling var att lyckas odla bakteriefria flugor och med hjälp av dessa flugor, undersöka om de kommensala bakterierna påverkar nedregleringen av IMD-signaleringsräckan genom kaspaset drICE. Mekanismen hur flugan skiljer mellan kommensala och patogena bakterier i tarmen är tills vidare obesvarat.

6.1 Skillnader i samverkan mellan bakterierna och värden hos *Drosophila melanogaster* och människan

När samverkan mellan värden och bakterier undersöks är det viktigt att uppmärksamma att topologin av tarmepitelet är olika i människan och flugan samt att människans och flugans tarmepitel är koloniserade av olika bakteriearter. Människans tarm innehåller 400–1000 olika bakteriearter medan flugans tarm innehåller 5–20 olika bakteriearter (Lee & Lee, 2014). I flugans tarm är alla kommensala bakteriearter aeroba, medan människans tarm består av både anaeroba och aeroba kommensala bakterier (Wong et al., 2016). Även om de kommensala och patogena bakteriearterna

skiljer sig till en del i människans och flugans tarm, samverkar bakterierna med liknande signaleringsräckor i organismerna. Flugans tarmepitel är platt, medan människans tarm utvecklar höjningar och dalar som kallas för kryptor och villi (Figur 4) (Wong et al., 2016). Kryptorna och villin i människans tarmepitel orsakar att vissa ytor inte är åtkomliga för alla bakterier. Vid kryptornas botten finns det Panethceller som utsöndrar antimikrobiella peptider. Den höga koncentrationen av antimikrobiella peptider i kryptornas botten ändrar kompositionen av bakteriearterna, vilket leder till att villi och kryptorna anses innehålla olika bakteriearter (Wong et al., 2016). Flugans tarmepitel är platt, vilket leder till att bakteriearterna är mera jämt utspridda än hos människan.

Både i människan och flugans tarm får bakterierna näring från födan som värden intar. De kommensala bakterierna kataboliserar födan som värden intar och utvecklar viktiga biprodukter som påverkar metaboliska processer i värdens alla organ (Hooper et al., 2002). Dysbios förorsakar ändringar i kompositionen av bakteriearter och minskning i antalet kommensala bakterier i tarmen. Minskning i antalet kommensala bakterier betyder att biprodukterna som bakterierna katalyserar från födan minskar. Minskning i biprodukterna kan leda till rubbningar i värdens metabolism och till utvecklingen av inflammatoriska tarmsjukdomar. I människans och musens tarm har det identifierats receptorer som binder till biprodukterna producerade av de kommensala bakterierna. Däremot har ingen av receptorerna tills vidare identifierats i flugan (Wong et al., 2016). Eftersom receptorerna inte har identifierats i flugan, är det svårare att förstå samverkan mellan flugan och de kommensala bakterierna. Genom att undersöka och testa med olika metoder kunde receptorerna möjligtvis identifieras i framtiden. Identifieringen av receptorerna i flugan kunde hjälpa att förstå bakteriernas roll i utvecklingen av allvarliga sjukdomar som påverkas av bakteriekompositionen i människans tarm. Exempel på sådana sjukdomar är t.ex. diabetes och fetma som idag har utvecklats till globala epidemier (Min et al., 2005; Wong et al., 2016).

Även om topologin av tarmepitelet och kompositionen av bakteriearter skiljer sig till en del mellan människan och flugan, finns det många likheter i samverkan mellan värden och bakterierna i båda organismerna. Som redan nämnts, innehåller inte flugans tarmepitel kryptor och villi, men cellerna som bygger upp flugans och människans tarmepitel är mycket liknande. Även signaleringsräckorna som tarmens bakterier interagerar med har bevarats från flugan till människan under evolutionens lopp

(Wong et al., 2016). Redan dessa likheter i uppbyggnaden av tarmen samt samverkan mellan tarmens bakterier och värden gör flugan till en viktig modellorganism för att bättre förstå bakteriernas inverkan på hälsan och metabolismen i värden.

6.2 Axeniska flugor ger möjligheten att undersöka samverkan mellan värden och bakterier på en ny nivå

Ett av de mest effektiva sätten att undersöka samverkan mellan värden och bakterier är att utveckla modellorganismer som är bakteriefria, d.v.s. axeniska. Axeniska modellorganismer ger möjligheten att undersöka hur saknandet av bakterier påverkar värdens hälsa. Genom att introducera en specifik bakterieart till en axenisk modellorganism, kan en så kallad gnotobiotisk modellorganism utvecklas. Gnotobiotiska modellorganismer ger möjligheten att undersöka hur en specifik bakterieart påverkar värdens hälsa. Tills vidare är det oetiskt att utveckla axeniska människor, men modellorganismer som t.ex. möss och flugor är möjliga att odla under axeniska förhållanden (Trinder et al., 2017). Problemet med att använda möss som modellorganism är att de ger avkomma långsammare än flugan, tekniken att odla axeniska möss är mera komplicerad och det fås ett mindre antal axeniska individer från odlingarna. Musstammar är även dyrare att upprätthålla i laboratorier än flugor och onödig användning av möss bör undvikas (Trinder et al., 2017). Flugor är däremot billiga forskningsobjekt att upprätthålla. Flugorna ger snabbt en relativt stor avkomma och metoden hur axeniska flugor utvecklas kan genomföras i laboratorier med standardutrustning (Kietz et al., 2018).

År 1969 introducerade Marion Bakula metoden hur axeniska flugor odlas genom att bryta ner korion av äggen med hypoklorit. Efter det har många forskningsgrupper använt samma metod för att odla axeniska flugor (Johnson et al., 2015; Koyle et al., 2016). Många av protokollen beskriver utförligt själva metoden hur axeniska flugor odlas, men själva verifieringen över bakteriefriheten i flugorna är bristfällig. Målsättningen med denna Pro gradu-avhandling var att lyckas optimera en metod att odla axeniska flugor med en stabil kontroll samt att lyckas verifiera bakteriefriheten av flugorna med olika metoder. Bakteriefriheten verifierades med 16S PCR-metoden qRT-PCR-metoden och genom homogenisering av flugor på LB-plattor.

Bakteriekompositionen i flugans tarm kan ändra vid olika årstider när temperaturen ändras. Även andra orsaker som t.ex. fuktighet och ålder kan ändra på flugans bakteriekomposition. När axeniska flugor odlas, är det viktigt att försöka hålla omgivningen steril och jobba med färska reagenser. Steriliteten kan nås med att desinficera alla ytor med etanol, jobba med sterila verktyg samt genom användning av laboratorieutrustning som t.ex. handskar och laboratorierock. Steriliteten kan vara svårare att nå på sommaren när temperaturen höjs, eftersom många bakteriearter växer bättre i högre temperaturer (Jung et al., 2016). För att hindra användningen av kontaminerade axeniska flugor, är det viktigt att verifiera bakteriefriheten i flugorna före varje experiment. När axeniska flugor används till experiment, är det också viktigt att flugorna är av samma ålder eftersom bakteriekompositionen ändras i flugor under deras levnadstid (Ren et al., 2007).

Bakteriefriakontrollen till de axeniska flugorna utvecklades genom att mata flugor med olika koncentrationer av antibiotikan tetracyklin. Även om tetracyklinet lyckas eliminera bakterierna från flugorna, påverkar antibiotikan flugornas utveckling och välmående. När flugorna gjordes axeniska genom att tvätta äggen i 10 % hypoklorit, 70 % etanol och destillerat vatten, utvecklades äggen till fullvuxna individer i ca 14 dagar. När flugornas bakterier eliminerades genom antibiotika-behandling, kunde utvecklingen från ägg till en fullvuxen individ ta upp till 30 dagar. Även om metoden att eliminera bakterier från flugan med hjälp av tetracyklin är enklare, påverkar metoden flugornas utveckling samt välmående betydligt mera än behandlingen av äggen i 10 % hypoklorit, 70 % etanol och destillerat vatten. Antibiotikabehandling kan även påverka tarmen och inflammationskänsligheten.

6.3 drICE-kaspaset nedreglerar IMD-signaleringsräckan och förhindrar inflammation

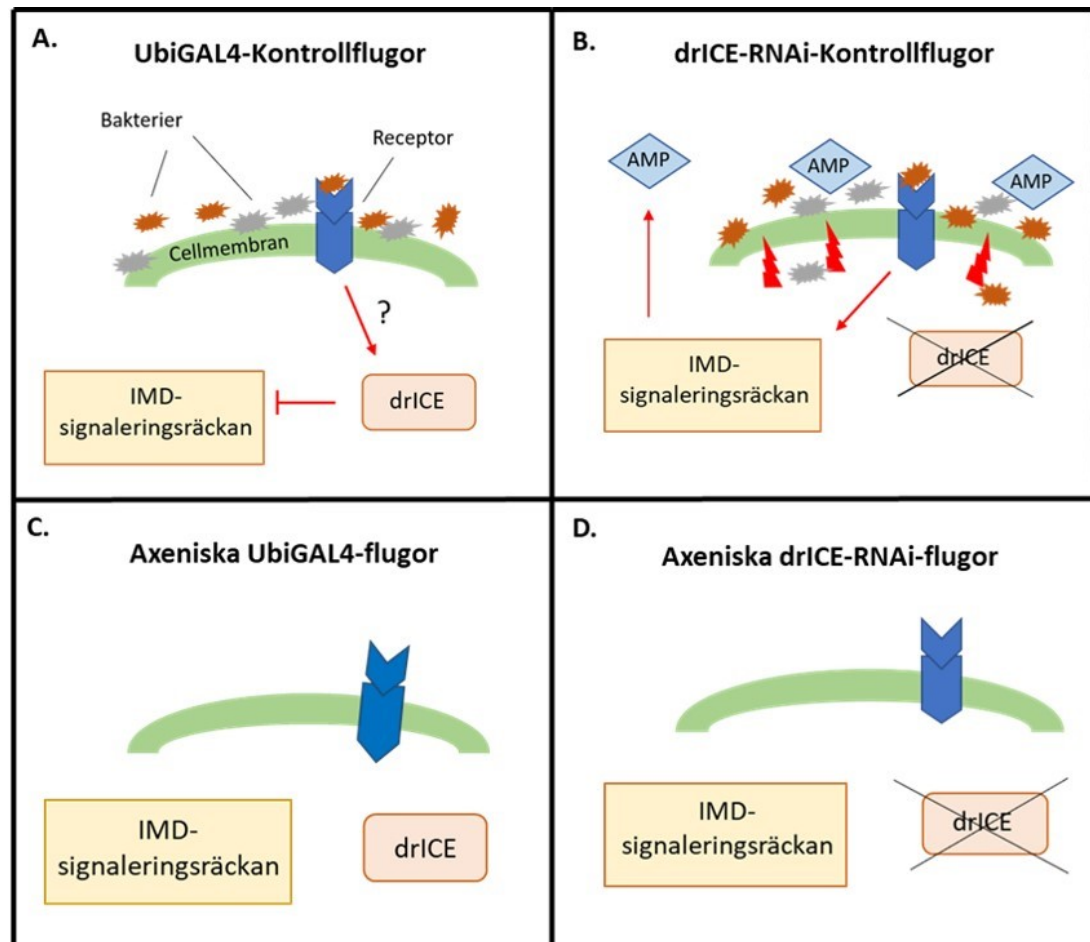
Mina resultat visar att drICE-mutanta flugor har mera inflammation i tarmen än kontrollflugorna. Korrelerande har jag visat att drICE-RNAi-kontrollflugorna uttrycker en betydligt högre mängd antimikrobiella peptider än UbiGAL4-kontrollflugorna. Detta bekräftar att drICE fungerar som en nedreglerare av IMD-signaleringsräckan. Hur drICE aktiveras och inhiberas vid tarminflammation är

tillsvidare oklart. Eftersom drICE inhiberar IMD-signaleringsräckan genom att binda och klyva DIAP2, kan det antas att drICE-aktiviteten regleras genom IMD-proteinkomplexet. För att undersöka om drICE-kaspasets aktivitet påverkas av kommensala eller patogena bakterier, vore det intressant att undersöka uttrycket av antimikrobiella peptider i gnotobiotiska UbiGAL4-och drICE-RNAi-flugor genom att introducera enbart kommensala bakteriearter eller enbart patogena bakteriearter till de axeniska flugorna. Experimentet skulle ge ett mera specifikt resultat hur enbart kommensala eller patogena bakteriearter påverkar aktiviteten av IMD-signaleringsräckan och därmed kaspaset drICE.

6.4 IMD-signaleringsräckan startar genom PGRP-receptoraktivering av bakterier

Enligt undersökningar i vår forskningsgrupp kan produktionen av antimikrobiella peptider från IMD-signaleringsräckan aktiveras i Schneider 2 (S2)-flugceller genom att överuttrycka PGRP-LC eller genom att inducera lipopolysackarider från Gramnegativa bakterier till cellerna. Lipopolysackariderna binder till PGRP-receptorerna i cellerna. Överuttryck av DIAP2 i S2-cellerna leder till DREDD ubikvitinering men det produceras inte antimikrobiella peptider. Resultaten från undersökningarna med cellerna indikerar att IMD-förmedlad transkription kan startas enbart via PGRP-receptoraktivering. Dessa resultat korrelerar med mina resultat. När bakterierna tas bort från drICE-RNAi-kontrollflugorna genom att odla dem axeniska, sjunker uttrycket av antimikrobiella peptider närmare noll. Eftersom uttrycket av diptericin och attacin A sjunker i de axeniska drICE-RNAi-flugorna, betyder det att IMD-signaleringsräckan aktiveras av kommensala bakterier vid normala förhållanden men framskridande av IMD-signaleringsräckan förhindras av drICE (Figur 21). I UbiGAL4-kontrollflugorna hindrar drICE framskridningen av IMD-signaleringsräckan, medan i drICE-RNAi-kontrollflugorna fattas drICE och då kan IMD-signaleringsräckan aktiveras av kommensala tarmbakterier. För att säkra att IMD-signaleringsräckan startar enbart genom PGRP-receptoraktivering, kunde uttrycket av diptericin och attacin A undersökas i axeniska flugor som överuttrycker DIAP2. Om uttrycket av antimikrobiella peptider vore lågt i axeniska flugor som överuttrycker DIAP2, skulle det tyda på att IMD-signaleringsräckan enbart aktiveras

genom PGRP-receptoraktivering. PGRP-receptoraktivering kunde även undersökas i PGRP-mutantflugor. Om IMD-signaleringsräckan enbart aktiveras genom PGRP-receptorerna, borde uttrycket av antimikrobiella peptider vara lågt i PGRP-mutantflugor, oavsett om flugorna skulle vara kontrollflugor eller axeniska flugor.



Figur 21. IMD-signaleringsräckan aktiveras via receptorstimulering från kommensala bakterier. A. Hos UbiGAL4-kontrollflugorna är drICE aktivt, vilket leder till att drICE nedreglerar IMD-signaleringsräckan. B. drICE-RNAi-kontrollflugorna producerar inte drICE, vilket leder till att IMD-signaleringsräckan är konstant aktivt. Eftersom IMD-signaleringsräckan är konstant aktivt, produceras det höga mängder av antimikrobiella peptider (AMP) i flugans tarm. C & D. Axeniska flugorna har en inaktiv IMD-signaleringsräcka eftersom det inte finns bakterier i tarmen som binder till PGRP-receptorerna.

7 Slutsatser

Målsättningarna med denna Pro gradu-avhandling var att lyckas odla axeniska flugor samt med hjälp av dessa axeniska flugor undersöka om kommensala bakterier i flugans tarm påverkar aktiviteten av IMD-signaleringsräckan. Jag ville även undersöka drICE-kaspasetts roll vid tarminflammation i flugan.

Metoden att odla upp axeniska flugor optimerades relativt snabbt, men det var svårt att hitta en stabil kontroll. Även om optimeringen av kontrollflugorna till de axeniska flugorna var tidskrävande, lyckades odlingen av en stabil kontroll med en bakteriekomposition som påminde normala förhållanden. När flugorna behandlades med tetracyklin, dödades flugans bakterier. Dessa tetracyklin-behandlade flugor kunde användas som negativ kontroll till de axeniska flugorna. Bakteriefriheten i de axeniska flugorna verifierades med tre olika metoder: qRT-PCR-metoden av diptericin och attacin A, 16S PCR-metoden och undersökning av bakterietillväxt på LB-plattor. Resultaten från alla metoderna verifierade att de axeniska flugorna var bakteriefria, vilket ledde till att de axeniska flugorna användes för vidare experiment.

Med hjälp av de axeniska flugorna undersöktes det om bakterier behövs för drICE-RNAi-inducerad aktivering av IMD-signaleringsräckan. Eftersom uttrycket av diptericin och attacin A var lågt i axeniska drICE-RNAi-flugor, kan det konstateras att IMD-signaleringsräckan aktiveras av kommensala bakterier under normala förhållanden. Från resultaten kan det även bekräftas att kaspaset drICE fungerar som nedreglerare av IMD-signaleringsräckan i flugans tarm.

Referenser

- Aggarwal, B. B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature Reviews Immunology*, 3, 745. Hämtad från <http://dx.doi.org/10.1038/nri1184>
- Ave, P., Colucci-Guyon, E., Babinet, C., & Huerre, M.-R. (1997). An improved method to detect β -galactosidase activity in transgenic mice: a post-staining procedure on paraffin embedded tissue sections. *Transgenic Research*, 6(1), 37–40.
- Amcheslavsky A., Jiang J. & Ip Y. T. (2009) Tissue damage-induced intestinal stem cell division in *Drosophila*. *Cell Stem Cell* 4(1), 49-61.
- Aquilante, C. L., Zineh, I., Beitelshes, A. L., & Langae, T. Y. (2006). Common laboratory methods in pharmacogenomics studies. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 63(21), 2101 LP-2110. Hämtad från <http://www.ajhp.org/content/63/21/2101.abstract>
- Bakula, M. (1969). The persistence of a microbial flora during postembryogenesis of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 14(3), 365–374.
- Basbous, N., Coste, F., Leone, P., Vincentelli, R., Royet, J., Kellenberger, C., & Roussel, A. (2011). The *Drosophila* peptidoglycan-recognition protein LF interacts with peptidoglycan-recognition protein LC to downregulate the Imd pathway. *EMBO reports*, 12(4), 327 LP-333. Hämtad från <http://embor.embopress.org/content/12/4/327.abstract>
- Basset A., Khush R. S., Braun A., Gardan L., Boccard F., Hoffmann J. & Lemaitre B. (2000) The phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* infects *Drosophila* and activates an immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97(7), 3376-3381.
- Birchenough G., Johansson M., Gustafsson J., Bergström J. & Hansson G. (2015) New developments in goblet cell mucus secretion and function. *Mucosal Immunology* 8(4), 712-719.
- Broderick, N. A., & Lemaitre, B. (2012). Gut-associated microbes of *Drosophila melanogaster*. *Gut Microbes*, 3(4), 307–321.
- Buchon, N., Broderick, N. A., & Lemaitre, B. (2013). Gut homeostasis in a microbial world: insights from *Drosophila melanogaster*. *Nature Reviews Microbiology*, 11, 615. Hämtad från <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3074>.
- Charroux, B., & Royet, J. (2012). Gut-microbiota interactions in non-mammals: what can we learn from *Drosophila*? *Seminars in immunology*, 24(1), 17-24.
- Chu, F.-F., Esworthy, R. S., Doroshov, J. H., Grasberger, H., Donko, A., Leto, T. L., Shen, B. (2017). Deficiency in Duox2 activity alleviates ileitis in GPx1- and GPx2-knockout mice without affecting apoptosis incidence in the crypt epithelium. *Redox Biology*, 11, 144–156.
- Clevers H. C. & Bevins C. L. (2013) Paneth cells: maestros of the small intestinal crypts. *Annual Review of Physiology* 75, 289-311. Hämtad från <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23398152>

- Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., & Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(26), 11971–11975.
- Duffy J. (2002) GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis*, 34(1-2), 1-15.
- Dupuy, C., Ohayon, R., Valent, A., Noel-Hudson, M.-S., Dème, D., & Virion, A. (1999). Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cDNAs. *The Journal of biological chemistry* (Vol. 274).
- Erkosar, B., & Leulier, F. (2014). Transient adult microbiota, gut homeostasis and longevity: Novel insights from the *Drosophila* model. *FEBS Letters*, 588(22), 4250–4257.
- Falschlehner, C., & Boutros, M. (2012). Innate immunity: regulation of caspases by IAP-dependent ubiquitylation. *The EMBO Journal*, 31(12), 2750 LP-2752. Hämtad från <http://emboj.embopress.org/content/31/12/2750.abstract>
- Foley, E., & O'Farrell, P. H. (2004). Functional Dissection of an Innate Immune Response by a Genome-Wide RNAi Screen. *PLOS Biology*, 2(8), e203. Hämtad från <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020203>
- Georgel, P., Naitza, S., Kappler, C., Ferrandon, D., Zachary, D., Swimmer, C., 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.
- Girardin S. E., Boneca I. G., Viala J., Chamaillard M., Labigne A., Thomas G., Philpott D. J. & Sansonetti P. J. (2003) Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem*, 278(11), 8869–8872.
- Grasberger, H., Gao, J., Nagao-Kitamoto, H., Kitamoto, S., Zhang, M., Kamada, N., Kao, J. Y. (2015). Increased Expression of DUOX2 is an Epithelial Response to Mucosal Dysbiosis Required for Immune Homeostasis in Mouse Intestine. *Gastroenterology*, 149(7), 1849–1859.
- Gribble F. M. & Reimann F. (2016) Enteroendocrine Cells: Chemosensors in the Intestinal Epithelium. *Annu Rev Physiol* 78, 277-299.
- Guntermann, S., Primrose, D. A., & Foley, E. (2009). Dnr1-dependent regulation of the *Drosophila* immune deficiency signaling pathway. *Developmental & Comparative Immunology*, 33(1), 127–134.
- Ha E. M., Lee K. A., Park S. H., Nam H. J., Lee H. Y., Kang D. & Lee W. J. (2009a) Regulation of DUOX by the Galphaq-phospholipase Cbeta-Ca²⁺ pathway in *Drosophila* gut immunity. *Developmental Cell* 16(3), 386-397.

- He E. M., Lee K. A., Seo Y. Y., Kim S. H., Lim J. H., Oh B. H., Kim J. & Lee W. J. (2009b) Coordination of multiple dual oxidase-regulatory pathways in responses to commensal and infectious microbes in drosophila gut. *Nature Immunology* 10(9), 949-957.
- Ha E. M., Oh C. T., Bae Y. S. & Lee W. J. (2015) A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science* 310(5749), 847-850.
- Hooper, L. V, Midtvedt, T., & Gordon, J. I. (2002). HOW HOST-MICROBIAL INTERACTIONS SHAPE THE NUTRIENT ENVIRONMENT OF THE MAMMALIAN INTESTINE. *Annual Review of Nutrition*, 22(1), 283–307.
- Jennings B. H. (2011) *Drosophila* – a versatile model in biology and medicine. *Materials today*, 14 (5), 190-195.
- Johnson, E. M. (2015). A Protocol to Generate Germ Free *Drosophila* for Microbial Interaction Studies. (A. Abhinay, Red.), *Advanced Techniques in Biology & Medicine*. OMICS International., <https://doi.org/10.4172/2379-1764.S1-001>
- Jung J. Y., Lee H. J., Chun B. H. & Jeon C. K. (2016) Effects of Temperature on Bacterial Communities and Metabolites during Fermentation of Myeolchi-Aekjeot, a Traditional Korean Fermented Anchovy Sauce. *PLoS One* 11(3), e0151351.
- Kanazawa, N., Okafuji, I., Kambe, N., Nishikomori, R., Nakata-Hizume, M., Nagai, S., ... Miyachi, Y. (2005). Early-onset sarcoidosis and CARD15 mutations with constitutive nuclear factor- κ B activation: common genetic etiology with Blau syndrome. *Blood*, 105(3), 1195 LP-1197. Hämtad från <http://www.bloodjournal.org/content/105/3/1195.abstract>
- Kaneko T., Goldman W. E., Mellroth P., Steiner H., Fukase K., Kusumoto S., Harley W., Fox A., Golenbock D. & Silverman N. (2004) Monomeric and polymeric gram-negative peptidoglycan but not purified LPS stimulate the *Drosophila* IMD pathway. *Immunity* 20(5), 637-649.
- Kaneko T., Yano T., Aggarwal K., Lim J. H., Ueda K., Oshima Y., Peach C., Erturk-Hasdemir D., Goldman W. E., Oh B. H., Kurata S. & Silverman N. (2006) PGRP-LC and PGRP-LE have essential yet distinct functions in the *drosophila* immune response to monomeric DAP-type peptidoglycan. *Nature Immunology* 7(7), 715-723.
- Kawai, T., & Akira, S. (2009). The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition *Int Immunol.* 21:313. *International Immunology*, 21(4), 317–337.
- Kietz, C., Pollari, V., & Meinander, A. (2018). Generating Germ-Free *Drosophila* to Study Gut-Microbe Interactions: Protocol to Rear *Drosophila* Under Axenic Conditions. *Current Protocols in Toxicology*, 77(1), e52.
- Kim, M., Lee, J. H., Lee, S. Y., Kim, E., & Chung, J. (2006). Caspar, a suppressor of antibacterial immunity in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(44), 16358–16363.

- Kim, S.-H., & Lee, W.-J. (2013). Role of DUOX in gut inflammation: lessons from *Drosophila* model of gut-microbiota interactions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, 116.
- Kleino, A., & Silverman, N. (2014). The *Drosophila* IMD pathway in the activation of the humoral immune response. *Developmental and Comparative Immunology*, 42(1), 10.1016/j.dci.2013.05.014.
- Kostic, A. D., Howitt, M. R., & Garrett, W. S. (2013). Exploring host–microbiota interactions in animal models and humans. *Genes & Development*, 27(7), 701–718.
- Koyle, M. L., Veloz, M., Judd, A. M., Wong, A. C.-N., Newell, P. D., Douglas, A. E., & Chaston, J. M. (2016). Rearing the Fruit Fly *Drosophila melanogaster* Under Axenic and Gnotobiotic Conditions. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (113), 54219.
- Kuraishi, T., Hori, A., & Kurata, S. (2013). Host-microbe interactions in the gut of *Drosophila melanogaster*. *Frontiers in Physiology*, 4, 375.
- Lee, K.-A., Kim, S.-H., Kim, E.-K., Ha, E.-M., You, H., Kim, B., Lee, W.-J. (2013). Bacterial-Derived Uracil as a Modulator of Mucosal Immunity and Gut-Microbe Homeostasis in *Drosophila*. *Cell*, 153(4), 797–811.
- Lee, K.-A., & Lee, W.-J. (2014). *Drosophila* as a model for intestinal dysbiosis and chronic inflammatory diseases. *Developmental & Comparative Immunology*, 42(1), 102–110.
- 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 LP-358. Hämtad från <http://embor.embopress.org/content/1/4/353.abstract>
- Leulier F., Parquet C., Pili-Floury S., Ryu J., Caroff M., Lee W. J., Mengin-Lecreux D. & Lemaitre B. (2003) *Nature Immunology* 4(5), 478-484.
- Lim J.H., Kim M.S., Kim H.E., Yano T., Oshima Y., Aggarwal K., Goldman W.E., Silverman N., Kurata S., Oh B.H. (2006) Structural basis for preferential recognition of diaminopimelic acid-type peptidoglycan by a subset of peptidoglycan recognition proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 281(12), 8286-95.
- Liu C., Gelius E., Liu G., Steiner H. & Dziarski R. (2000) Mammalian Peptidoglycan Recognition Protein Binds Peptidoglycan with High Affinity, Is Expressed in Neutrophils, and Inhibits Bacterial Growth. *Journal of biological chemistry* 275(32), Hämtad från <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10827080>.
- Lhocine, N., Ribeiro, P. S., Buchon, N., Wepf, A., Wilson, R., Tenev, T., Leulier, F. (2008). PIRK Modulates Immune Tolerance by Negatively Regulating *Drosophila* Innate Immune Signaling. *Cell Host & Microbe*, 4(2), 147–158.
- MacFie, T. S., Poulosom, R., Parker, A., Warnes, G., Boitsova, T., Nijhuis, A., Silver, A. (2014). DUOX2 and DUOXA2 Form the Predominant Enzyme System Capable of Producing the Reactive Oxygen

- Species H₂O₂ in Active Ulcerative Colitis and are modulated by 5-Aminosalicylic Acid. *Inflammatory Bowel Diseases*, 20(3), 514–524. Hämtad från <http://dx.doi.org/10.1097/01.MIB.0000442012.45038.0e>
- Marianes A. & Spradling A. C. (2013) Physiological and stem cell compartmentalization within the *Drosophila* midgut. *Elife*. Hämtad från <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23991285/>.
- Meinander, A., Runchel, C., Tenev, T., Chen, L., Kim, C.-H., Ribeiro, P. S., Meier, P. (2012). Ubiquitylation of the initiator caspase DREDD is required for innate immune signalling. *The EMBO Journal*, 31(12), 2770–2783.
- Mellroth, P., Karlsson, J., Håkansson, J., Schultz, N., Goldman, W. E., & Steiner, H. (2005). Ligand-induced dimerization of *Drosophila* peptidoglycan recognition proteins in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(18), 6455 LP-6460. Hämtad från <http://www.pnas.org/content/102/18/6455.abstract>
- Min, Y. W., & Rhee, P.-L. (2015). The Role of Microbiota on the Gut Immunology. *Clinical Therapeutics*, 37(5), 968–975.
- Myllymäki, H., Valanne, S., & Rämet, M. (2014). The *Drosophila* Imd Signaling Pathway. *The Journal of Immunology*, 192(8), 3455 LP-3462. Hämtad från <http://www.jimmunol.org/content/192/8/3455.abstract>
- Naitza, S., Rossé, C., Kappler, C., Georgel, P., Belvin, M., Gubb, D., Reichhart, J.-M. (2002). The *Drosophila* Immune Defense against Gram-Negative Infection Requires the Death Protein dFADD. *Immunity*, 17(5), 575–581.
- Negroni, A., Pierdomenico, M., Cucchiara, S., & Stronati, L. (2018). NOD2 and inflammation: current insights. *Journal of Inflammation Research*, 11, 49–60.
- Nehme, N. T., Liégeois, S., Kele, B., Giammarinaro, P., Pradel, E., Hoffmann, J. A., Ferrandon, D. (2007). A Model of Bacterial Intestinal Infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Pathogens*, 3(11), e173.
- Neyen C., Poidevin M., Roussel A. & Lemaitre B. (2012) Tissue- and Ligand-Specific Sensing of Gram-Negative Infection in *Drosophila* by PGRP-LC Isoforms and PGRP-LE. *The Journal of Immunology* 189(4), 1886-1897.
- Ogura, Y., Bonen, D. K., Inohara, N., Nicolae, D. L., Chen, F. F., Ramos, R., Cho, J. H. (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411, 603. Hämtad från <http://dx.doi.org/10.1038/35079114>
- Pandey, U. B., & Nichols, C. D. (2011). Human Disease Models in *Drosophila melanogaster* and the Role of the Fly in Therapeutic Drug Discovery. *Pharmacological Reviews*, 63(2), 411–436.
- Paquette, N., Broemer, M., Aggarwal, K., Chen, L., Husson, M., Ertürk-Hasdemir, D., Silverman, N. (2010). Caspase Mediated Cleavage, IAP Binding and Ubiquitination: Linking Three Mechanisms Crucial for *Drosophila* NF-κB Signaling. *Molecular cell*, 37(2), 172.

- Park, M., Jang, H. D., Lee, S., Y., Lee, K. & Kim, E. (2004) Fas-associated Factor-1 Inhibits Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) Activity by Interfering with Nuclear Translocation of the RelA (p65) Subunit of NF- κ B. *Journal of Biological chemistry*, 279(4), 2544–2549.
- Park J. H. & Kwon J. H. Heterogeneous expression of *Drosophila* gustatory receptors in enteroendocrine cells. *Public Library of Science* (6)12, e29022. Hämtad från: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22194978?dopt=Abstract>
- Park M., Moon, J., Lee, K., Choi, H., Chung, J., Hong H. J. and Kim E. (2007) FAF1 Suppresses I κ B Kinase (IKK) Activation by Disrupting the IKK Complex Assembly. *Journal of Biological chemistry* 282(38), 27572-27577.
- Qilin, P., John, M., Colleen, F., V., K. V., Jean, D. S. C., M., H. H., ... J., U. R. (2007). MDP-induced interleukin-1 β processing requires Nod2 and CIAS1/NALP3. *Journal of Leukocyte Biology*, 82(1), 177–183.
- Ren, C., Webster, P., Finkel, S. and Tower, J. 2007. Increased internal and external bacterial load during *Drosophila* aging without life-span trade-off. *Cell Metabolism* 6: 144-152.
- Ribeiro, P. S., Kuranaga, E., Tenev, T., Leulier, F., Miura, M., & Meier, P. (2007). DIAP2 functions as a mechanism-based regulator of drICE that contributes to the caspase activity threshold in living cells. *The Journal of Cell Biology*, 179(7), 1467–1480.
- Ridley, E. V, Wong, A. C.-N., Westmiller, S., & Douglas, A. E. (2012). Impact of the Resident Microbiota on the Nutritional Phenotype of *Drosophila melanogaster*. *PLOS ONE*, 7(5), e36765. Hämtad från <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036765>.
- Rinas, U., Hellmuth, K., Kang, R., Seeger, A., & Schlieker, H. (1995). Entry of *Escherichia coli* into stationary phase is indicated by endogenous and exogenous accumulation of nucleobases. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(12), 4147–4151.
- Ryu, J.-H., Kim, S.-H., Lee, H.-Y., Bai, J. Y., Nam, Y.-D., Bae, J.-W., Lee, W.-J. (2008). Innate Immune Homeostasis by the Homeobox Gene Caudal and Commensal-Gut Mutualism in *Drosophila*. *Science*, 319(5864), 777 LP-782. Hämtad från <http://science.sciencemag.org/content/319/5864/777.abstract>
- Ryu, J.-H., Ha, E.-M., & Lee, W.-J. (2010). Innate immunity and gut–microbe mutualism in *Drosophila*. *Developmental & Comparative Immunology*, 34(4), 369–376.
- Samakovlis, C., Kimbrell, D. A., Kylsten, P., Engström, A., & Hultmark, D. (1990). The immune response in *Drosophila*: pattern of cecropin expression and biological activity. *The EMBO Journal*, 9(9), 2969–2976. Hämtad från <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC552014/>
- Silverman, N., Zhou, R., Stöven, S., Pandey, N., Hultmark, D., & Maniatis, T. (2000). A *Drosophila* I κ B kinase complex required for Relish cleavage and antibacterial immunity. *Genes & Development*, 14(19), 2461–2471. Hämtad från <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC316979/>

- Staubach, F., Baines, J. F., Künzel, S., Bik, E. M., & Petrov, D. A. (2013). Host Species and Environmental Effects on Bacterial Communities Associated with *Drosophila* in the Laboratory and in the Natural Environment. *PLoS ONE*, 8(8), e70749.
- Stephenson R. & Metcalfe N. H. (2013) *Drosophila melanogaster*: a fly through its history and current use. *The Journal of the Royal College of Physicians Edinburg*, 43 (1), 70-75.
- Stöven, S., Ando, I., Kadalayil, L., Engström, Y., & Hultmark, D. (2000). Activation of the *Drosophila* NF- κ B factor Relish by rapid endoproteolytic cleavage. *EMBO Reports*, 1(4), 347–352.
- Stöven, S., Silverman, N., Junell, A., Hedengren-Olcott, M., Erturk, D., Engström, Y., ... Hultmark, D. (2003). Caspase-mediated processing of the *Drosophila* NF- κ B factor Relish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(10), 5991–5996.
- Takehana, A., Katsuyama, T., Yano, T., Oshima, Y., Takada, H., Aigaki, T., & Kurata, S. (2002). Overexpression of a pattern-recognition receptor, peptidoglycan-recognition protein-LE, activates imd/relish-mediated antibacterial defense and the prophenoloxidase cascade in *Drosophila* larvae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(21), 13705–13710.
- Thompson G. D. & Malagelada J. R. (1981) Guts and their motions (gastrointestinal motility in health and disease). *Supplement 3(1)*, 81-87.
- Ting, J. P. Y., Duncan, J. A., & Lei, Y. (2010). How the non-inflammasome NLRs function in the innate immune system. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5963), 286–290.
- Trinder, M., Daisley, B. A., Dube, J. S., & Reid, G. (2017). *Drosophila melanogaster* as a High-Throughput Model for Host–Microbiota Interactions. *Frontiers in Microbiology*, 8, 751.
- Umar S. (2010) Intestinal Stem Cells. *Current Gastroenterology Reports* 12(5), 340-348.
- Valanne S. & Rämetsä M. (2011) Banaanikärpänen: geneettisesti verraton mallieläin tutkimukseen. *Duodecim*, 127(19), 2063-2071.
- Vodovar, N., Vinals, M., Liehl, P., Basset, A., Degrouard, J., Spellman, P., Lemaitre, B. (2005). *Drosophila* host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(32), 11414–11419.
- Wang C., Deng L., Hong M., Akkaraju G. R., Inoue J. & Chen Z. J. (2001) TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412(6844), 346-351.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703.
- Werner T., Liu G., Kang D., Ekengren S., Steiner H. & Hultmark D. A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(25), 13772-13777.

Wiklund, M.-L., Steinert, S., Junell, A., Hultmark, D., & Stöven, S. (2009). The N-terminal half of the *Drosophila* Rel/NF- κ B factor Relish, REL-68, constitutively activates transcription of specific Relish target genes. *Developmental & Comparative Immunology*, 33(5), 690–696.

Wong, A. C. N., Vanhove, A. S., & Watnick, P. I. (2016). The interplay between intestinal bacteria and host metabolism in health and disease: lessons from *Drosophila melanogaster*. *Disease Models & Mechanisms*, 9(3), 271–281.

Zaidman-Rémy, A., Hervé, M., Poidevin, M., Pili-Floury, S., Kim, M.-S., Blanot, D., Lemaitre, B. (2006). The *Drosophila* Amidase PGRP-LB Modulates the Immune Response to Bacterial Infection. *Immunity*, 24(4), 463–473.

Zhuang Z. H., Sun L., Kong L., Hu J. H., Yu M. C., Reinach P., Zang J. W. & Ge B. X. (2006) *Drosophila* TAB2 is required for the immune activation of JNK and NF-kappaB. *Cell Signal* 18(7), 964-970.

Bilaga 1 – Kemikalier och ämnen

Agar	Merck, Darmstad, Tyskland
Agaros	BioLine, London, Storbritannien
Akrylamid 30 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Tyskland
APS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Tyskland
Bacto-jästextrakt	Becton Dickinson Oy, Vanda, Finland
Bacto-tryptonei	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Tyskland
Bromfenolblått	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Tyskland
dimetylsulfoxid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Tyskland
6x DNA laddningsfärg	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
ECL	GE Healthcare, Helsingfors, Finland
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Tyskland
EtOH	Etax Altia Oyj, Rajamäki, Finland
GelRed	Biotium, Fremont, USA
1 kB Gene ruler DNA	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Tyskland
Glycerol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Tyskland
Glycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Tyskland
iScript	Bio-Rad, Kalifornien, USA
Isättika	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Tyskland
Jazz-mix	Fisher Scientific, Waltham, USA
Kaliumferrocyanid kristallin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Tyskland
Kaliumferrocyanid trihydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Tyskland
KAPA	Biosystems, Massachusetts, USA
Klorilli	Farmos Oy, Turku, Finland
LB-tabletter	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Tyskland
β -merkaptoetanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Tyskland
Metanol	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
MgCl ₂	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Tyskland

Mowiol	Merck, Darmstadt, Tyskland
NaCl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Tyskland
Nonidet p-40	TERGITOL™ solution, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Tyskland
Nutri-Fly	Dutscher Scientific, Essex, Storbritannien
PBS	Medicago AB, Uppsala, Sverige
Phire Hot Start II	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
Precision Plus Protein™	Bio-Rad, Kalifornien, USA
Propansyra	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Tyskland
Proteasinhämbare	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Tyskland
20 % SDS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Tyskland
Svartvinbärsfruktsaft	Valio, Helsingfors, Finland
Tegosept	Apex™ BioResearch, Diamed, Fribourg, Schweiz
TEMED	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
Tetracyklin hydroklorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Tyskland
Trizma® base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Tyskland
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Tyskland
X-GAL	Thermo Scientific, Massachusetts, USA

Bilaga 2 – Receptbilaga

Agar-saft-plattor

70 ml	dH ₂ O
3 g	Agar
30 ml	Svartvinbärsfruktsaft
0,5 ml	10 % Tegosept utspädd i etanol
3 g	Socker

Autoklavera agarn och vattnet. Blanda sockret med saften och värm tills det kokar. Blanda saftblandningen med Agarlösningen och tillsätt tegosept. Häll blandningen i plattorna och låt stelna i 20 minuter.

4 x Laemmlibuffert

20 ml	100 % Glycerol
10 ml	20 % SDS
8,3 ml	1,5 M Tris, pH 6,8
0,1 ml	10 % Bromfenolblått (Utspädd i 100% EtOH)
11,6 ml	dH ₂ O

Tillsätt 3 % β -merkaptoetanol till blandningen före användning

LB-medium

20	LB-tabletter
1 l	dH ₂ O

Autoklavera blandningen.

LB-plattor

250 ml	dH ₂ O
5 g	Agar
5	LB-tabletter

Blanda alla ingredienser och autoklavera. Efter autoklaveringen kan blandningen hällas i plattorna. Låt stelna i 20 minuter.

Polyakrylamidgel 10 % (nedre delen)

För 10 ml:

4,2 ml	dH ₂ O
2,5 ml	1,5 M Tris, pH 8,8
50 µl	SDS 20 %
3,3 ml	Akrylamid 30 %
50 µl	10 % Ammoniumpersulfat (APS)
5 µl	TEMED

APS och TEMED blandas till sist eftersom de orsakar stelning av gelen. Låt nedregelen stelna i 30 minuter.

Polyakrylamidgel (övre delen)

För 5 ml:

3,752 ml	dH ₂ O
625 µl	0,5 M Tris, pH 6,8
20 µl	APS 10 %
10 µl	TEMED

APS och TEMED blandas till sist eftersom de orsakar stelning av gelen. Låt nedregelen stelna i 20 minuter.

10 x SDS-PAGE körbuffert

För 1 l:

250 mM	Tris-Base
2 M	Glycin

Före användning tillsätt 0,1 % SDS.

S2-lyseringsbuffert

25 ml	1 M Tris, pH 7,5
30 ml	5 M NaCl
5 ml	Triton X-100
50 ml	Glycerol
909 ml	dH ₂ O

Förvaras i 4 °C.

TE-buffert

0,1 mM	etylendiamintetraättiksyra (EDTA)
10 mM	Tris, pH 8,0

Förvaras i 4 °C.

50 x Tris-acetat buffert

2,0 M	Trizma® base
1,0 M	Isättika
0,5 M	EDTA

Lös Trizma® base i dH₂O. Om Trizma® base inte löser sig, tillsätt isättika. Tillsätt EDTA till lösningen. Tillför den slutliga volymen till 1 med att tillsätta dH₂O.

Tvättbuffert för Westernblott

1 x	PBS
0,2 %	Tween

X-GAL-fixativ

För 1 ml:

16 µl	25 % Glutaraldehyd
1 µl	1 M MgCl ₂ i PBS
983 µl	dH ₂ O

X-GAL-färgningsbuffert

5 mM Kaliumferrocyanid trihydrat

5 mM Kaliumferrocyanid kristallin

2 mM MgCl₂ i PBS

Ljuskänslig, förvaras i 4 °C och värms till 37 °C före användning.

X-GAL-lösning (100 mg/ml)

Tillsätt 5 ml dimetylsulfoxid i en 500 mg flaska av X-GAL (5-bromo-4-kloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid).

Förvaras i -20 °C.

5 x överförningsbuffert

48 mM Tris-Base

39 mM Glycin

Före användning tillsätt 20 % metanol i blandningen.