

Petra Aaltonen

**UBIKITINAATIOSSA TOIMIVAN
ENTSYYMIN ROOLI ANTIMIKROBIAALI-
SEN PEPTIDIN ILMENTYMISEN
SÄÄTELIJÄNÄ *DROSOPHILA*
MELANOGASTER -KÄRPÄSELLÄ**

Lääketieteen ja Terveysteknologian tiedekunta
Kandidaatintutkielma
Joulukuu 2022

TIIVISTELMÄ

Petra Aaltonen: Ubikitinaatiossa toimivan entsyymin rooli antimikrobiaalisen peptidin ilmentymisen säätelijänä *Drosophila melanogaster* -kärpäsellä
Kandidaatintutkielma
Tampereen yliopisto
Bioteknologian ja Biolääketieteen tekniikan tutkinto-ohjelma
Joulukuu 2022

Banaanikärpäsen (*Drosophila melanogaster*) synnynnäinen immunitetti koostuu humoraalisesta ja soluvälitteisestä vasteesta. Humoraalisen vasteen reittejä ovat Imd- ja Toll-signalointireitit. Kummallakin reitillä vasteena infektiioon tuotetaan antimikrobiaalisia peptidejä. Yksi Toll-reitin tuottama proteiini on Drosomysiini (Drosomycin), joka toimii antifungaalisena peptidinä. Drosomysiiniä ja muita Toll-reitin proteiineja tuotetaan vasteena Gram-positiivisten bakteerien ja sienten aiheuttamiin infektiioihin.

Aiemmissa tutkimuksissa on huomattu, että ubikitinaatiossa tarvittava E2-entsyymi Effete toimii Imd-signalointireitin säätelijänä. Toll-reitin tutkimuksista saadut tulokset eivät kuitenkaan ole yhtä selkeitä, sillä *in vitro* -tutkimuksissa kärpäsen makrofagien kaltaisilla S2-soluilla *effeten* hiljennyksen havaittiin kasvattavan reitin aktivaatiota, kun taas *in vivo* -tutkimuksissa kärpäsen rasvakudoksessa vaikutus ei ollut niin selkeä. Näin ollen vaikuttaa siltä, että Effetellä olisi eri rooli eri kudoksissa.

Tässä työssä tutkittiin *effete*-geenin hiljennyksen vaikutusta Toll-signalointireitin aktiivisuuteen ja siten Drosomysiinin tuotantoon kärpäsen verisoluissa eli hemosyyteissä. Samalla selvitettiin myös hemosyyttien signalointia toisiin kudoksiin. Signalointi muihin kudoksiin olisi ilmennyt fluoresenssi-signaalina muualla kuin hiljennyksen kohdekudoksessa eli hemosyyteissä. Aktiivisuuden havainnointiin käytettiin vihreänä fluoresoivaa proteiinia (GFP), joka ilmenee *Drosomysiinin* promoottorialueen alla. Hiljennys tehtiin hyödyntämällä UAS-GAL4 menetelmää, jossa GAL4-proteiini hiljentää geenin spesifisti halutuissa kudoksissa sitoutumalla UAS-sekvenssiin (Upstream Activating Sequence). Varsinaisen näytteen lisäksi tutkimuksessa oli mukana kontrollilinjaja, joissa *effete* ei ollut hiljennettyä.

Fluoresenssisignaalia havainnoitiin kuvaamalla näytteet, eli toukat ja niiden hemosyytit, fluoresenssimikroskooppilla. Toukkien kuvista voitiin havaita hemosyyttien lisäksi myös muiden kudosten mahdollinen GFP-signaali. Koska hemosyytit ovat hyvin pieniä ja vaikeasti havaittavissa toukkien kuvista, ne kuvattiin vielä erikseen tulosten varmistamiseksi.

Tulokset osoittavat, että *effeten* hiljennyksellä on vaikutusta Toll-signalointireitin toimintaan ja hiljennys saa aikaan Drosomysiinin tuotantoa. Vaikutus näyttää olevan lähes samalla tasolla kuin Toll-reseptorin yliaktivoinnissakin. Toukissa näkyi hemosyyttien lisäksi voimakasta GFP-signaalia hengityspuikissa, mutta ei esimerkiksi rasvakudoksessa, mikä olisi ollut odotetumpi tulos. Tutkimusta voisi edelleen jatkaa selvittämällä kvantitatiivisesti *Drosomysiinin* ilmenemistä *effeten* hiljennyksen jälkeen sekä tutkimalla sitä, mihin Effete Toll-signaloinnissa vaikuttaa.

Avainsanat: Toll-signalointireitti, *effete*-geeni, *Drosophila melanogaster*, banaanikärpänen, synnynnäinen immunitetti

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck –ohjelmalla.

ALKUSANAT

Tämä tutkielma on osa Luonnontieteiden kandidaatin tutkintoani Tampereen yliopiston Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunnassa.

Haluan kiittää ohjaajiani Susanna Valannetta ja Laura Vesalaa kaikesta avusta ja tuesta tätä työtä tehdessäni. Erityiset kiitokset myös Kokeellisen Immunologian ryhmänjohtajalle professori Mika Rämetylle mahdollisuudesta tehdä tämä työ juuri hänen ryhmäänsä. Kiitokset myös perheelleni ja ystävilleni tuesta ja kannustuksesta.

Tampereella, 12.12.2022

Petra Aaltonen

LYHENTEET

AMP	antimikrobiaalinen peptidi
BSA	bovine serum albumin
<i>Drs</i>	<i>Drosomysiini (Drosomycin)</i>
GFP	green fluorescent protein
<i>M. luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
PBS	phosphate buffered saline
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
UAS	upstream activating sequence

SISÄLLYSLUETTELO

LYHENTEET.....	3
1.JOHDANTO.....	5
1.1 Banaanikärpäsen synnynnäinen immunitaatio.....	5
1.2 Ubikitinaatio ja Effete.....	5
1.3 Hemosyytit.....	6
1.4 UAS-GAL4.....	6
1.5 Banaanikärpäsen tutkimuksessa.....	7
1.6 Tutkimuksen tavoitteet.....	7
2.MATERIAALIT JA MENETELMÄT.....	7
2.1 Käytetyt kärpäslinjat ja risteytykset.....	7
2.2 Näytteiden valmistelu.....	9
2.2.1 Hemosyyttien valmistelu.....	9
2.2.2 Toukkien valmistelu.....	10
2.2.3 Infektio.....	10
2.3 Kuvaaminen.....	10
3.TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU.....	11
3.1 Toukat.....	11
3.2 Hemosyytit.....	14
4.YHTEENVETO.....	16
LÄHTEET.....	17

1. JOHDANTO

1.1 Banaanikärpäsen synnynnäinen immunitaatio

Banaanikärpäsen (*Drosophila melanogaster*) immunitaatio infektiolle perustuu monitasoiseen puolustukseen, jossa ensimmäinen este on ulkoinen epiteeli. Jos patogeeni tästä huolimatta pääsee kärpäsen kehoon, aktivoituu synnynnäinen immunitaatio, joka koostuu humoraalisesta ja soluvälitteisestä vasteesta. Humoraalinen vaste perustuu antimikrobiaalisten peptidien (AMP) tuottamiseen ja erittämiseen hemolymfaan, eli kärpäsen avoimen verenkierron nesteeseen. Soluvälitteinen vaste taas perustuu hemosyytteihin eli verisoluihin ja niiden toimintaan muun muassa fagosyytteinä (Leclerc ja Reichhart 2004). Toll- ja Imd-signaalireitit ovat osa humoraalista puolustusta, mutta Toll-reitillä on rooli myös soluvälitteisessä immuunivasteessa. Molemmat reitit tuottavat antimikrobiaalisia peptidejä (AMP) vasteena infektiolle, etenkin kärpäsen rasvakudoksessa (fat body). Toll-reitti aktivoituu kärpäsen altistuessa Gram-positiivisten bakteerien tai sienien aiheuttamalle infektiolle ja Toll-reseptorin aktivaatio vaatii sen ligandin Spätzlen sitoutumista. Imd-reitti puolestaan aktivoituu Gram-negatiivisista bakteereista. Yksi Toll-reitin tuottama proteiini on Drosomysiini (Drosomycin), joka toimii antifungaalisena peptidinä. (Valanne, Wang, ja Rämetsä 2011; Myllymäki, Valanne, ja Rämetsä 2014)

1.2 Ubikitinaatio ja Effete

Ubikitinaatio on proteiinien translaation jälkeinen muokkaus, jossa niihin liitetään yksi tai useampi ubikitini-proteiini. Prosessiin tarvitaan kolmea toiminnaltaan erilaista entsyymiä: aktivoiva entsyymi E1, konjugoiva entsyymi E2 sekä ligaasi E3. Ubikitinaation vaikutus riippuu esimerkiksi siitä, mihin kohtaan kohdeproteiinia liittäminen tapahtuu ja kuinka monta ubikitiniä liitetään. Esimerkiksi K48-polyubikitiniketjut merkkäävät proteiinit hajotettaviksi, kun taas K63-ubikitinaatiolla on monia ei-hajottavia rooleja, kuten signaalireittien aktivointi (Swatek ja Komander 2016).

Effete on ubikitinaatiossa tarvittava konjugoiva E2-entsyymi, jolla on monia tehtäviä useissa *Drosophilan* biologisissa prosesseissa. Näitä ovat esimerkiksi silmän kehittyminen ja apoptoosi. Effeten tiedetään toimivan Imd-signaalireitillä aktivoiden sen toimintaa K63-ubikitinaation kautta, mutta sen roolista Toll-signaalireitillä ei juuri tiedetä. Kärpäsen S2-soluissa tehdyistä *in vitro* kokeista on kuitenkin saatu tulos, jossa *effete*-geenin hiljennys nostaa Toll-reitin aktivaatiota ja muun muassa *Drosomysiinin* ekspressiota. Tämä viittaa siihen, että Effete olisi reitin negatiivinen säät-

lijä. Samaa tulosta ei kuitenkaan saatu *in vivo*, kun *effete*-geenin hiljennys tehtiin kärpäsen rasvakudoksessa (Ciantar 2021), joka on pääasiallinen immuunivasteesta vastaava kudos (Lemaitre ja Hoffmann 2007). Tällöin *Drosomysiinin* ekspressiotaso jopa laski hieman. Koska hiljennys kohdistui rasvakudokseen, tämä voisi viitata *effeten* hiljennyksellä olevan erilainen vaikutus eri kudoksissa. (Ciantar 2021)

1.3 Hemosyytit

Hemosyytit eli verisolut toimivat banaanikärpäsen synnynnäisessä immunitetissä soluvälitteisessä puolustuksessa. Sekä aikuisella kärpäsellä että toukalla nämä solut toimivat muun muassa fagosyytteinä ja tuottavat antimikrobiaalisia peptidejä (Wood ja Jacinto 2007). Hemosyyttejä on eri tyyppisiä, ja ne voivat joko kiertää hemolymfan mukana tai olla kiinnittyneinä kudoksiin tai elimiin (Holz ym. 2003). *Drosophilan* verisolut kuuluvat kolmeen luokkaan: plasmatosyytit, kristallisolut ja lamellosyytit. Plasmatosyytit ovat fagosyyttejä, jotka muistuttavat nisäkkäiden makrofageja. Kristallisolut sisältävät entsyymejä, joita tarvitaan melanisaatioon. Melanisaatiossa syntyy sivutuotteena vapaita radikaaleja, jotka luultavasti osallistuvat patogeenien tappamiseen. Lamellosyytit puolestaan erilaistuvat vasta infektion jälkeen ja ne muodostavat kapselin tunkeutujan ympärille. (Meister ja Lagueux 2003)

1.4 UAS-GAL4

Yksi banaanikärpäsessä yleisesti käytetyistä geenien ilmenemisen muunteluun tarkoitettuista menetelmistä on UAS-GAL4. Sen toimivuus banaanikärpäsellä näytettiin ensimmäisen kerran jo vuonna 1993 (Brand ja Perrimon 1993). Menetelmä perustuu GAL4-transkriptiotekijän sitoutumiseen kohdesekvenssialueelle eli UAS-alueelle (Upstream Activating Sequence), joka sijaitsee geenistä ylävirtaan. GAL4:n sitoutuminen UAS-sekvenssiin saa aikaan transkription alkamisen. Menetelmällä voidaan joko aktivoida tai hiljentää geenejä. Jos UAS-sekvenssi on liitetty geenin koodaavaan sekvenssiin, GAL4:n sitoutuminen saa aikaan geenin transkription ja siten aktivaation. Jos taas UAS-alue on liitetty kaksijuosteista RNA:ta (dsRNA) tuottavaan sekvenssiin, joka vastaa tiettyä geeniä, GAL4:n sitoutuminen saa aikaan dsRNA:n muodostumisen. dsRNA pilkottaa soluissa lyhyemmiksi RNA-molekyyleiksi (small interfering RNA, siRNA), jotka saavat aikaan geenin hiljentymisen (Elbashir ym. 2001). UAS-sekvenssi ja GAL4-transkriptiotekijä ylläpidetään eri kärpäslinjoissa, jolloin menetelmä alkaa toimia vasta näiden keskenään risteytettyjen kärpäslinjojen jälkeläisissä. Menetelmän vaikutus on mahdollista kohdistaa koko kärpäsen sijasta myös vain yhteen tiettyyn kudokseen. (Valanne ja Rämetsä 2011)

1.5 Banaanikärpänen tutkimuksessa

Työssä hyödynnettiin banaanikärpästä, *Drosophila melanogasteria*, joka on erinomainen mallieläin sen kasvattamisen helppouden ja lyhyen sukupolvivälin ansiosta. Banaanikärpäsen geenejä on suhteellisen helppo muokata, koska yhdellä geenillä on harvoin useita päällekkäisiä toimintoja. Näin ollen yksittäisen geenin muutos näkyy yleensä yksilön ilmiössä. Banaanikärpäsellä on myös vastingeeni runsaalle määrälle ihmisen sairausgeenejä, mikä tekeekin sen geenien vaikutusten tutkimisesta mielekäästä. (Valanne ja Rämetsä 2011)

1.6 Tutkimuksen tavoitteet

Työn tarkoituksena oli tarkastella *effete* (*eff*)-geenin hiljentämisen vaikutusta *Drosomysiinin* (*Drs*) ilmentymiseen hemosyyteissä sekä eri kudoksissa, kuten rasvakudoksessa. Tarkastelu tehtiin *Drosomysiini*-geenin promoottorialueen hallinnan alla ilmentyvän vihreän fluoresoivan proteiinin (GFP) avulla. Tämä toteutettiin hiljentämällä ensin *effete* UAS-GAL4 menetelmällä ja kuvaamalla sitten fluoresenssimikroskoopilla sekä kokonaisia toukkia että pelkkiä hemosyyttejä. Käytetyissä kärpäslinjoissa *effeten* hiljennys kohdistui hemosyytteihin, joten muissa kudoksissa mahdollisesti ilmevä *Drs-GFP* kertoisi hemosyyttien signaloinnista eri kudosten kanssa. Kuvaamisen tavoitteena oli saada selvyyttä *effeten* hiljennyksen vaikutuksista *in vivo*. Fluoresenssisignaalin näkyminen niiden toukkien hemosyyteissä, joissa *effete* on hiljennetty, kertoisi siitä, että hiljennys kyseisessä kudoksessa aktivoi Toll-signaalintireittiä ja lisää näin *Drosomysiinin* tuotantoa. Immuunivasteiden tarkka säätely on tärkeää, koska liian heikko tai vahva immuunivaste johtaa ei-toivottuihin seurauksiin. Siksi on tärkeää tutkia, mitkä tekijät osallistuvat näiden vasteiden säätelyyn.

2. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

2.1 Käytetyt kärpäslinjat ja risteytykset

Tätä tutkimusta varten käytettiin kärpäsiä neljästä geneettisesti muokatusta linjasta ja yhdestä kontrollilinjasta. Linjat ovat listattuina taulukossa 1. Taulukossa on lisäksi kerrottu kärpäslinjasta käytettävä lyhenne sekä sen käyttötarkoitus lyhyesti.

Taulukko 1 Käytetyt kärpäslinjat, niiden lyhenteet ja käyttötarkoitus.

Kärpäslinja	Lyhenne	Tehtävä
<i>HmlΔ-GAL4, Hemese-GAL4</i>	<i>HH-GAL4</i>	GAL4-proteiinin tuottaja; ilmenee spesifisti hemosyyteissä
<i>Dipt2.2-lacZ, Drs-GFP</i>	<i>Drs-GFP</i>	GFP on liitetty <i>Drs</i> -geenin promoottorialueelle ja se ilmenee <i>Drosomysiinin</i> mukaisesti: ilmenee kaikissa kudoksissa
<i>Drs-GFP; UAS-eff^R</i>	<i>Drs-GFP; eff^R</i>	Linja, jossa 1) GAL4-proteiinin sitoutuminen kohdesekvenssiinsä saa aikaan <i>effete</i> -geenin hiljentymisen, 2) GFP ilmenee kudoksissa, joissa <i>Drs</i> aktivoituu
<i>Drs-GFP, UAS-Toll^{10b}</i>	<i>Drs-GFP, Toll^{10b}</i>	Linja, jossa 1) GAL4-proteiinin sitoutuminen kohdesekvenssiinsä saa aikaa pysyvästi aktiivisen Toll-reseptorin (Toll ^{10b}) ilmentymisen ja Toll-reitin aktivaation, 2) GFP ilmenee kudoksissa, joissa <i>Drs</i> aktivoituu
<i>w¹¹⁸</i>	-	Ei tuota mitään ajavaa proteiinia risteytykseen

Eff^R (RNAi)-linja on Vienna Drosophila Resource Centerin linja numero 26011GD. Negatiivisia kontrolliristeytyksiä oli kaksi ja positiivisia yksi. Näiden lisäksi oli varsinainen näyte. Kaikki risteytyksissä käytetyt naaraskärpäset kerättiin neitsyinä.

Effeten hiljennys tutkittavassa näytteessä tehtiin UAS-GAL4 menetelmää hyödyntäen. *HH-GAL4*-kärpäslinjasta kerättiin risteytykseen koiraat ja *Drs-GFP; eff^R*-kärpäslinjasta naaraat. *HH-GAL4* x *Drs-GFP; eff^R*-risteytyksen jälkeläisillä GAL4-proteiini ilmenee hemosyyteissä, jolloin *effeten* hiljennys tapahtuu spesifisti niissä. Lisäksi kyseinen GAL4-proteiini saattaa ilmentyä jonkin verran myös toukan sylkirauhasissa (Zettervall ym. 2004).

Negatiivisessa kontrolliristeytyksessä *Drs-GFP; eff^R*-linjan naaraat risteytettiin *w¹¹⁸*-linjan koiraiden kanssa, jolloin hiljennystä ei tapahdu, koska GAL4-proteiini puuttuu. Toinen negatiivinen kontrolli oli *HH-GAL4*-linjan koiraiden ja *Drs-GFP*-linjan naaraiden risteytys. *Drs-GFP*-linjassa ei ole UAS-sekvenssiä, johon GAL4 voisi sitoutua, jolloin se ei myöskään pääse aktivoimaan geeniä.

Positiivisena kontrollina toimi kärpäslinja, joka saatiin risteyttämällä *HH-GAL4*-linjan koiraat *Drs-GFP, Toll^{10b}*-linjan naaraiden kanssa. Toll^{10b} on mutatoitunut muoto Toll-reseptoriproteiinista. Pistemutaatio Toll-sekvenssissä aiheuttaa sen, että geenistä tuotetaan konstitutiivisesti aktiivista

proteiinia eli Toll-reseptori on pysyvästi aktiivinen (Schneider ym. 1991). Koska UAS-GAL4-menetelmä tuottaa jälkeläisille koko ajan aktiivisen Toll-reseptorin, ei aktivoitumiseen tarvita ligandia ja siten Toll-reitti tuottaa jatkuvasti *Drs-GFP*:tä. *UAS-Toll^{10b}*-linja luotiin vuonna 1999 kloonamalla sen sekvenssi pUAST-plasmidiin (Maxton-Küchenmeister ym. 1999).

Risteytyksistä valittiin kuvattavaksi koirastoukkia ja niiden hemosyyttejä, koska koiraiden on havaittu tuottavan enemmän kohdeproteiinia UAS-GAL4 menetelmän kautta (Masukawa ym. 2021). Näin ollen *effeten* hiljennys saattaa olla voimakkaampi koirilla, jolloin sen mahdollinen vaikutus *Drosomyysiiniin* tuotantoon olisi suurempi ja helpommin havaittavissa.

Käytettyjä karpäslinjoja ylläpidettiin +25 asteessa. Risteytyksiä pidettiin myös +25 asteessa ja karpästen annettiin paritella yhdessä putkessa noin vuorokauden ajan. Putket, joissa oli munia, siirrettiin +29 asteeseen, koska UAS-GAL4-menetelmä toimii tehokkaammin korkeammassa lämpötilassa (Duffy 2002). Karpäsiä siirrettiin uusiin putkiin kolmen päivän ajan, jonka jälkeen ne heitettiin pois ja odotettiin, että munista kehittyä toukkia.

2.2 Näytteiden valmistelu

2.2.1 Hemosyyttien valmistelu

Koirastoukat kerättiin toukan kolmannessa kehitysvaiheessa (instar) kasvatusputken seinämiltä pinsettien avulla ja pestiin kolmesti vedessä. Näin päästiin eroon toukkiin mahdollisesti jääneistä ruuanpaloista tai muista roskista, jotka näkyisivät kuvanottohetkellä näytteen joukossa. Hemosyyttien valmistelussa toukkia auottiin pinseteillä 12-kuoppaisen levyn kaivoihin kolme kappaletta per kaivo. Kuhunkin näytekaivoon pipetoitiin ennen toukkien avaamista 20 ul 1 x PBS, jossa oli mukana 1 % BSA:ta. Kun hemosyytit oli saatu valutettua ulos toukista, solujen annettiin kiinnittyä lasille noin 45 minuuttia kosteassa ympäristössä (kannellisessa astiassa, jossa oli vedellä kostutettua paperia pohjalla). Kiinnittymisen jälkeen kuhunkin näytekaivoon pipetoitiin 10 ul 10 % formaliinia ja annettiin olla 10 minuuttia. Tämän vaiheen jälkeen kaivot pestiin kolme kertaa jääkylmällä 1x PBS:llä. Lopuksi hemosyytit kiinnitettiin tipalla (noin 20 ul) ProLong Diamond Antifade Mountant with DAPI -reagenssia (Life Technologies). Näytekaivojen päälle asetettiin peitinlasi ja näytelevy säilytettiin yön yli huoneenlämmössä pimeässä. Seuraavana päivänä hemosyytit kuvattiin.

2.2.2 Toukkien valmistelu

Toukkien valmistelussa hyödynnettiin kylmäkäsitelyä, jolla toukista pyrittiin tekemään liikkumattomia. Näytelasit valmisteltiin kaksipuoleisella teipillä siten, että teippien väliin jäi alue toukille ja että niiden päälle sai asetettua peitinlasin. Näytelasi laitettiin kylmenemään toukkien pesun ajaksi. Toukista valittiin jälleen koiraat ja ne laitettiin hetkeksi jälle pienessä petrimaljassa, jotta niistä tulisi liikkumattomampia. Samassa maljassa toukat myös pestiin. Toukat aseteltiin näytelevylle dorsaalinen eli selkäpuoli ylöspäin. Kun toukat olivat lasilla, niiden päälle pipetoitiin jääkylmää 70 % glyserolia ja asetettiin peitinlasi teippien päälle. Valmistelu pyrittiin tekemään niin, että toukat säilyisivät hengissä seuraavaan päivään. Näytelevyä säilytettiin jääkaapissa yön yli ja seuraavana päivänä toukat kuvattiin.

2.2.3 Infektio

Drs-GFP -konstruktiin toimivuus testattiin infektoimalla *HH-GAL4* x *Drs-GFP* risteytyksen jälkeläisinä tulleita toukkia *Micrococcus luteus* -bakteerilla. Infektion tulisi saada aikaan Toll-reitin aktivaatio ja siten *Drs-GFP*:n ilmeneminen kärpäsen rasvakudoksessa.

M. luteus-bakteeria kasvatettiin Luria-Bertani (LB) agar maljoilla, joihin puhdasviljelmän varmistamiseksi lisättiin antibiootiksi streptomysiiniä, koska käytetyllä *M. luteus*-bakteerikannalla on streptomysiiniresistenssigeeni. Maljalle laitettiin kasvamaan 100 ul *M. luteusta*, ja sitä kasvatettiin kolmen päivän ajan +30 asteessa. Kasvatuksen jälkeen bakteereja kerättiin silmukalla maljalta 1,5 ml koeputken irrotettuun kanteen. Ennen infektion aloittamista bakteerimassan sekaan pipetoitiin glyserolia, jolloin massasta tuli hieman juoksevampaa.

Toukkia infektoitiin pistämällä niitä kylkeen teroitetulla volfram-langasta tehdyllä pistimellä, joka oli käytetty bakteerimassassa. Infektoidut toukat siirrettiin kuudeksi tunniksi ruokaputkeen, jonka jälkeen ne valmisteltiin kuvaamiseen edellä mainitulla tavalla. Toukkia infektoitiin yhteensä kymmenen, joista vain kaksi oli elossa kuuden tunnin jälkeen.

2.3 Kuvaaminen

Kuvaamisessa käytettiin Zeiss Apotome.2 fluoresenssimikroskooppia. Hemosyyttien kuvaamiseen käytettiin Plan-Neofluar 40x/1,3 oil -objektiivia, jonka kokonaissuurennos oli 400x. Toukille käytettiin EC Plan-Neofluar 5x/0.16 -objektiivia, jonka kokonaissuurennos oli 50x. 40x objektiivin kanssa käytettiin Zeissin ImmersolTM 518 F -immersioöljyä, jota laitettiin tippa kuvattavan kaivon päälle.

Kuvaamisessa käytettiin apuna Apotomia. Apotomi luo optisia leikkeitä (sections) fluoresenssinäytteestä ja luo tarkan kuvan paksummastakin näytteestä leikkaamalla/käsittelemällä sironneen valon pois kuvasta. Tämän työn kuvissa Apotomin gridit olivat viidessä eri asennossa.

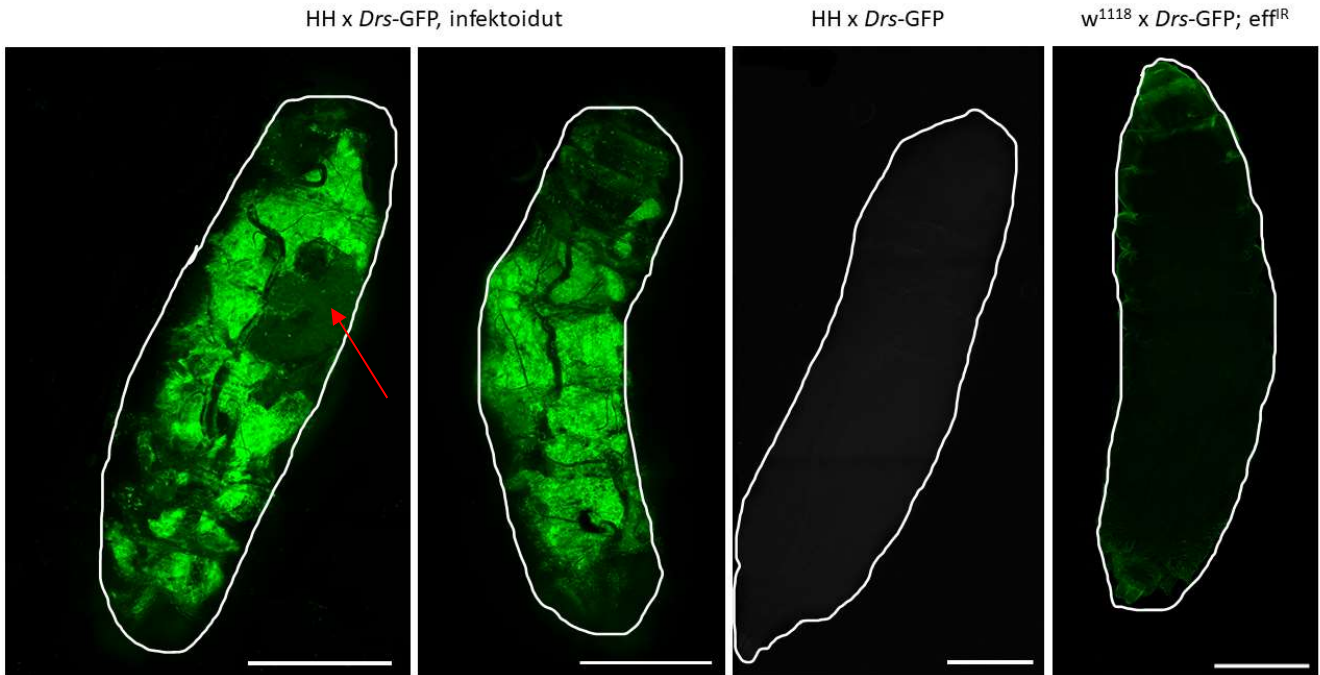
Hemosyyttien kuvaamisessa käytettiin kahta eri kanavaa, toinen DAPI:lle (380 nm) ja toinen GFP:lle (470 nm). Valotusaika DAPI:lle oli 46 ms ja GFP:lle 400 ms. Fluoresenssisignaalin suodattamiseen käytettiin Zeissin High Efficiency (HE) filttareita (38 HE GFP:lle ja 62 HE B/G/HR DAPI:lle). Osa hemosyyttikuvista otettiin myös 680 ms valotusajalla. Näihin valotusaikoihin päädyttiin negatiivisten kontrollien perusteella siten, että näillä valotusajoilla negatiivisissa kontrolleissa ei näkynyt signaalia. Toukkien kuvaamisessa käytettiin ainoastaan GFP-kanavaa ja valotusaika oli 2200 ms.

Kuvat käsiteltiin ImageJ-sovelluksessa (ImageJ 1.53t), jossa kuvien tasot yhdistettiin ja niistä luotiin 8-bittiset versiot. Kuvista säädettiin kirkkautta ja kontrastia negatiivisten kontrollien perusteella. Säädöt pidettiin samoina kaikissa kuvissa.

3. TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

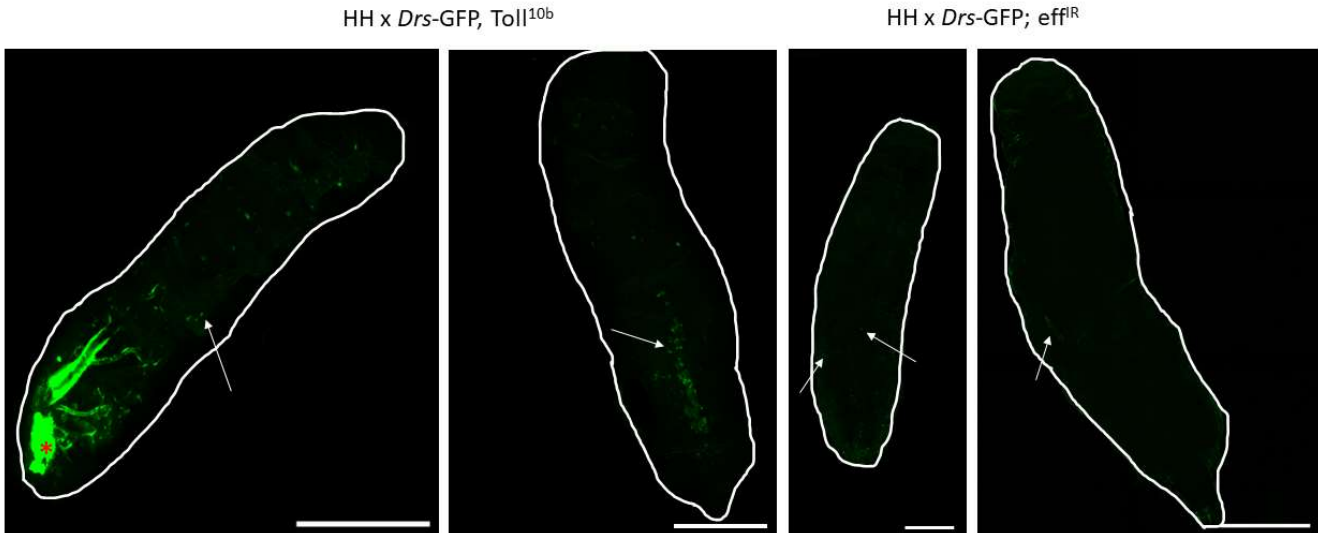
3.1 Toukat

Kuvasta 1 nähdään, että *HH x Drs-GFP* linjan infektoiduilla toukilla (vasemmanpuoleiset toukat) GFP:n ilmeneminen rasvakudoksessa on hyvin selkeää ja vahvaa. Näin ollen käytetty *Drs-GFP*-konstrukti on toimiva. Negatiivisilla kontrolleilla eli *HH x Drs-GFP* ja *w¹¹¹⁸ x Drs-GFP; eff^R*-risteytysten toukilla ei ole näkyvissä ollenkaan GFP-signaalia eli *Drs-GFP* ei ilmene niissä. Vasemmanpuoleisimman toukan rasvakudoksessa näkyy tummentuma (punainen nuoli), joka luultavasti on pistettäessä kudokseen tullut vaurio.

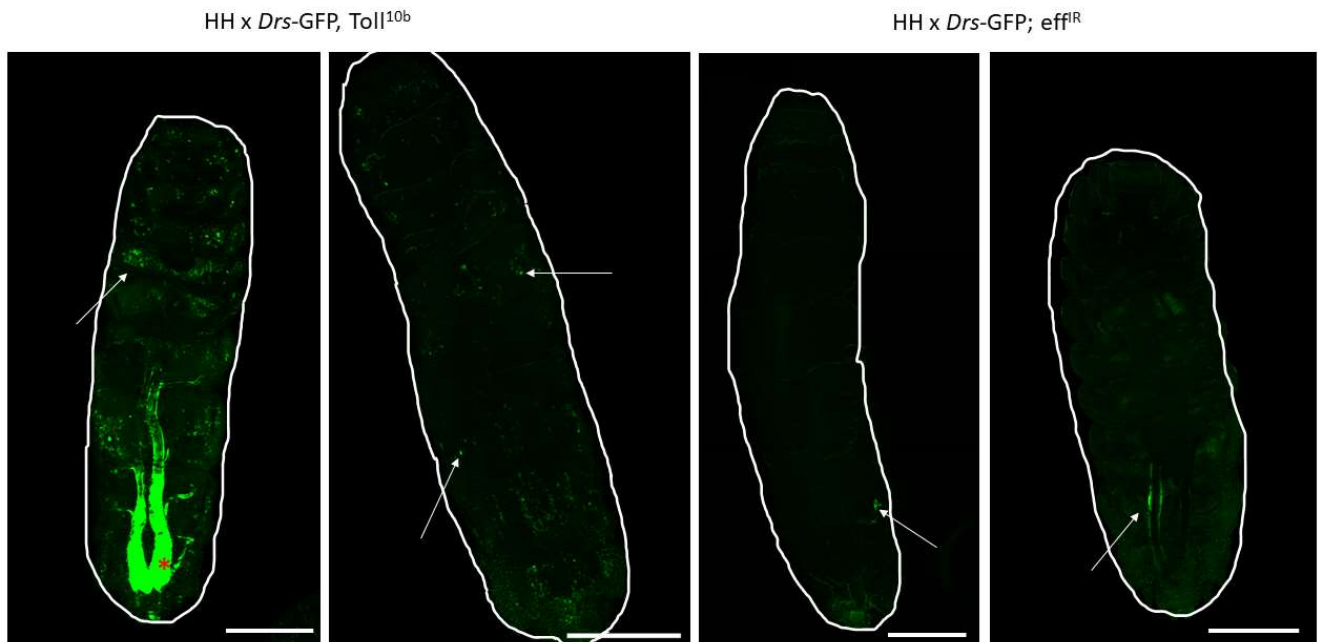


Kuva 1 *HH x Drs-GFP* infektoidut toukat sekä kaksi negatiivista kontrollia, *HH x Drs-GFP* ja *w¹¹¹⁸ x Drs-GFP; eff^R*. Mittaviiva on 500 μ m ja kaikki toukat ovat kuvissa etupää (anteriörinen pää) ylöspäin.

Kuvista 2a ja b näkyy, että *effeten* hiljennys aktivoi jotain kudoksissa kiinni olevia hemosyyttejä, mutta ei ollenkaan rasvakudosta. Tästä voidaan päätellä, että hemosyyttien aktivaatio ei näyttäisi käynnistävän Drosomysiinin tuotantoa esimerkiksi rasvakudoksessa. Toisaalta osalla näistä toukista oli GFP-signaalia hengitysputkissa (trachea), joissa *HH-GAL4:n* ei pitäisi ilmentyä. Myös osalla positiivisen kontrollin eli *HH x Drs-GFP, Toll^{10b}* -risteytyksen toukista oli runsaasti GFP-signaalia putkimaisissa rakenteissaan. *HH-GAL4:n* pitäisi ilmetä spesifisti hemosyyteissä (ja sylkirauhassessa), mutta ei hengitysputkissa. Jokin on kuitenkin saanut runsasta *Drs-GFP:n* aktivaatiota aikaan hengitysputkissa, mutta aiheuttajaa ei kuvien perusteella pysty päättämään. On mahdollista, että hemosyyteissä tapahtuva *effete*-geenin hiljennys saa aikaan muutoksen, joka johtaa Drosomysiinin tuottamiseen hemosyyttien lisäksi myös hengitysputkissa.



Kuva 2a

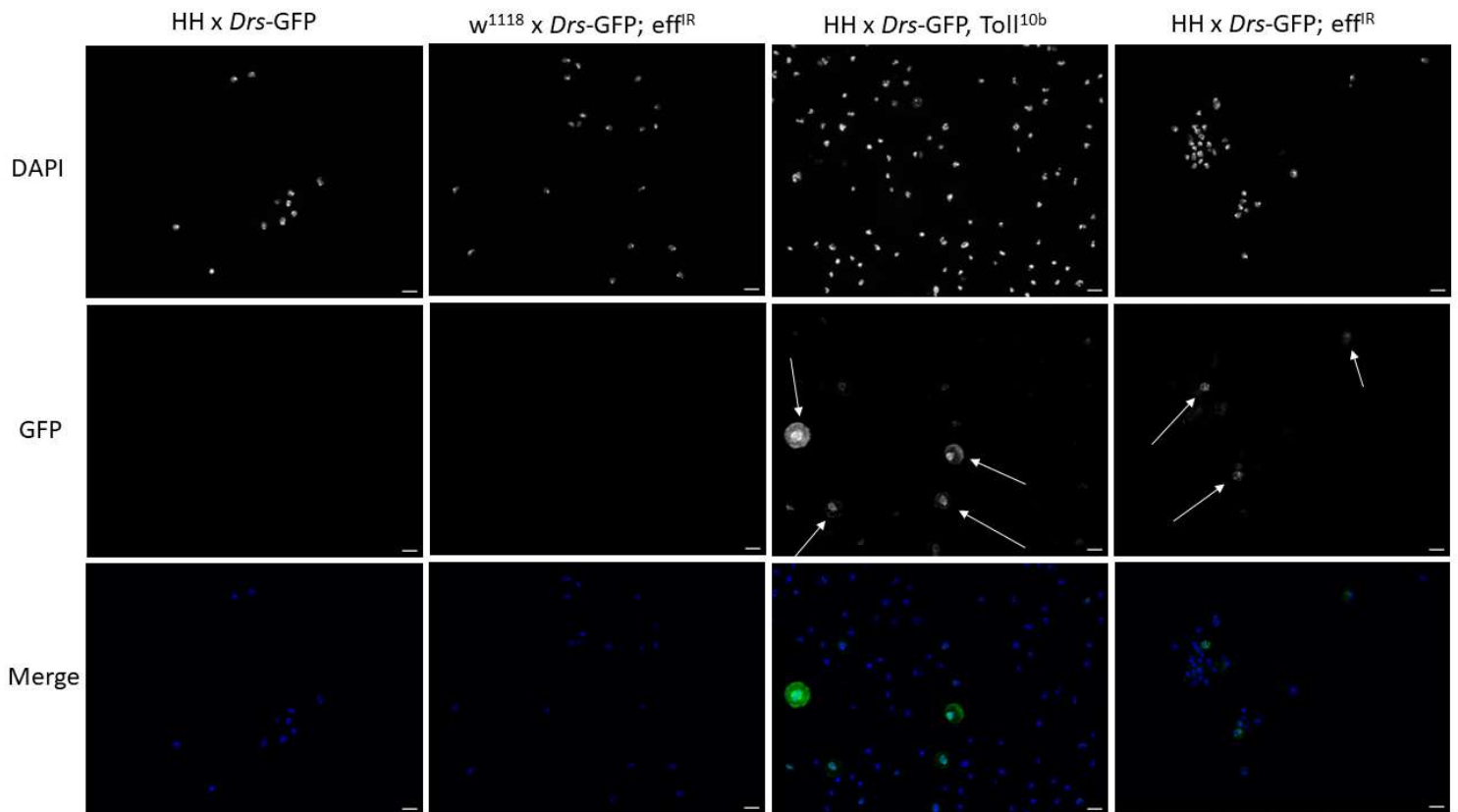


Kuva 2b Positiiviset kontrollit ja varsinainen näyte. Nuolilla on osoitettu esimerkkejä GFP-positiivisista kohdista. Punaisella tähdellä on merkitty voimakas signaali putkimaisessa rakenteessa, joka on toukan hengityspotki. Mittaviiva on 500 μm .

Eff^R-toukissa on joitakin *Drs-GFP*:tä ilmentäviä hemosyyttejä, mutta kuitenkin vähemmän kuin positiivisen kontrollin toukissa. Tämä kuitenkin viittaa siihen, että *effeten* hiljennyksellä on hemosyyttejä aktivoiva vaikutus. Koska toukat eivät ole täysin läpinäkyviä, niiden kuvista on vaikea erottaa GFP-positiivisia hemosyyttejä. Siksi toukkien lisäksi kuvattiin myös niistä valutetut hemosyytit, jotta voitiin varmentaa toukista saatu tulos.

3.2 Hemosyytit

Kuvasta 3 nähdään, että *effeten* hiljennys vaikuttaa Toll-reitin aktivaatioon ja fluoresenssignaalia on havaittavissa. Kuitenkin verrattaessa positiiviseen kontrolliin, signaalin vahvuus ja määrä on alhaisempi. Negatiivisiin kontroleihin verrattuna signaalia kuitenkin selkeästi on, eli *effeten* hiljennys vaikuttaa Toll-reittiin aktivoivasti.



Kuva 3 Kuvapaneeli hemosyyttinäytteistä. Kuvien järjestys vasemmalta lähtien: kaksi negatiivista kontrollia, positiivinen kontrolli ja varsinainen näyte. *HH x Drs-GFP* kuvien valotusaika on 680 ms ja muiden 400 ms. Mittaviiva on 10 μ m.

Koska Effete on ubiquitinaatiossa tarvittava E2-entsyymi, se luultavasti myös Toll-signaalintireitillä toimii ubiquitinoiden jotakin komponenttia. Koska sen puuttuminen aktivoi reittiä, se voisi toimia ubiquitinoiden jotakin reitin tärkeää aktivoivaa komponenttia. Kuitenkin koska saatu signaali on heikompi kuin positiivisessa kontrollissa, ei Effete ehkä aktivoi Toll-reittiä täysin. Vaikka hiljennyksen aktivoiva vaikutus näkyikin kuvissa, ei näiden perusteella pysty kuitenkaan arvioimaan, mihin *effete* reitillä vaikuttaa. *Effeten* mahdollinen toimintamekanismi reitillä voisi olla esimerkiksi K48-polyubikitiiniketjun luominen johonkin Toll-reitille tärkeään aktivoivaan komponenttiin, jolloin komponentti ohjattaisiin hajotukseen. Näin aktivaatio olisi mahdollinen *effeten* hiljennyksen seurauksena myös ilman infektiota. Tämän varmistamiseksi tulisi tehdä lisää tutkimusta aiheesta.

Taulukossa 2 on koottuna solujen lukumäärä *HH x Drs-GFP; eff^R* -linjan näytteissä sekä positiivisen kontrollin eli *HH x Drs-GFP, Toll^{10b}* -linjan näytteissä. Näiden lisäksi on myös GFP-positiivisten solujen osuus sekä lukumääränä että prosenttiosuutena. Kvantitatiivisessa analyysissä käytettiin suuremman valotusajan (680 ms) kuvia. Taulukosta havaitaan, että positiivisen kontrollin (*HH x Drs-GFP, Toll^{10b}*) kuvissa on keskimäärin enemmän GFP-positiivisiä soluja kuin *eff^R*-näytteissä eli Drosomyisiin tuotanto olisi ollut hieman suurempaa. Kuitenkin myös *eff^R*-soluissa *Drs-GFP* tuotantoa selkeästi on, etenkin jos verrataan negatiivisiin näytteisiin, joissa *Drs-GFP*:tä ei tuotu lainkaan.

Taulukko 2 Näytteissä ja positiivissa kontrolleissa olleiden GFP-positiivisten solujen lukumäärä verrattuna kaikkien solujen lukumäärään.

Näyte (680ms)	Solujen lkm	GFP-positiiviset solut	Prosenttiosuus (%)
<i>HH x Drs-GFP; eff^R 1</i>	31	5	16,1
<i>HH x Drs-GFP; eff^R 2</i>	35	2	5,7
<i>HH x Drs-GFP; eff^R 3</i>	25	3	12,0
<i>HH x Drs-GFP; eff^R 4</i>	36	2	5,6
<i>HH x Drs-GFP, Toll^{10b} 1</i>	13	6	46,2
<i>HH x Drs-GFP, Toll^{10b} 2</i>	95	30	31,6
<i>HH x Drs-GFP, Toll^{10b} 3</i>	87	10	11,5

Kuvaajassa 1 on näytetty rinnakkain sekä *effeten* hiljennyksen, että Toll-reitin yliaktiivisuuden vaikutus *Drs-GFP*:n tuotantoon. Kuvaajan piirtoon käytetyt arvot näkyvät taulukossa 2. Palkkien korkeusero on selkeästi havaittavissa, mutta ero ei silti ole tilastollisesti merkitsevä, (Studentin t-testi, kaksisuuntainen jakauma, p-arvo 0,077), vaikkakin hyvin lähellä sitä. Tarkemman tuloksen saamiseksi soluista voitaisiin mitata GFP:n fluoresenssi-intensiteetti.



Kuvaaja 1 Sekä *effeten* hiljennys että Toll^{10b}:n ilmentäminen aiheuttavat *Drs-GFP*:n tuottumista kärpäsen hemosyyteissä, mikä on merkinä Toll-reitin aktivaatiosta.

4. YHTEENVETO

Tässä työssä tutkittiin *effete*-geenin hiljennyksen vaikutusta Toll-signalointireitin aktiivisuuteen hemosyyteissä. Aktiivisuutta havainnoitiin *Drs-GFP* ilmenemisen avulla. Hiljennys saatiin aikaan käyttämällä UAS-GAL4 menetelmää, joka tässä tapauksessa hiljensi *effeten* spesifisti hemosyyteissä. Hiljennyksen jälkeen toukkia ja niiden hemosyyttejä kuvattiin fluoresenssimikroskoopilla, jotta nähtiin, ilmeneekö *Drs-GFP*. Kokonaisista toukista katsottiin samalla, ilmeneekö fluoresenssisignaalia jossakin muissa kudoksissa kuin vain hiljennyksen kohdekudoksissa. Näytteen lisäksi kuvattiin myös yksi positiivinen kontrolli, kaksi negatiivista kontrollia sekä infektoitu kontrolli. Infektiolla varmistettiin *Drs-GFP*:n toimivuus ja aktivaatio kärpäsen rasvakudoksessa Toll-reitin aktivoitumisen seurauksena.

Sekä kokonaisten toukkien että hemosyyttien kuvaamisen tuloksena selvisi, että *effeten* hiljennys aktivoi Toll-reittiä ja aktivaatio on lähes samalla tasolla kuin positiivisessa kontrollissa. Tämä tulos viittaa siihen, että *effete* voisi olla Toll-reitin uusi säätelijä. Tuloksista selvisi myös se, että *effeten* hiljennys hemosyyteissä ei näytä johtavan Toll-reitin aktivaatioon muissa kudoksissa, sillä fluoresenssisignaalia ei havaittu esimerkiksi kärpäsen rasvakudoksessa. Odottamaton tulos oli kuitenkin

se, että *Drs-GFP* signaalia havaittiin hengityspuikissa. Lisätutkimuksia tarvitaan selvittämään, johtaako *effeten* hiljennys hemosyyteissä todella immuunisignaloinnin aktivoitumiseen hengityspuikissa, ja minkä signaalimolekyylin kautta. Tuloksia tulkitessa on hyvä kuitenkin ottaa huomioon se, että *Drosomysiini* saattaa osittain ilmentyä myös Imd-reitin kautta. Vaikka *Drosomysiinin* ilmentymistä käytetäänkin usein merkinä Toll-signaloinnin aktiivisuudesta, on tuloksia myös siitä, että Imd-signalointireitti sitä jossain määrin aktivoi (De Gregorio ym. 2002).

Tutkimusta voisi jatkaa edelleen selvittämällä tarkemmin, mihin Effete Toll-reitillä vaikuttaa. Koska Effete on ubikitinaatiossa tarvittava entsyymi, se luultavasti osallistuu Toll-reitillä jonkin komponentin ubikitinaatioon ja siten esimerkiksi hajotukseen tai inaktivaatioon. Esimerkiksi ubikitinoimalla jotakin reitille tärkeää komponenttia, Effete saattaa normaalisti pitää Toll-reittiä inaktiivisena. Kun *effete* on hiljennettynä, se ei pääse ubikitinoimaan ja inaktivoimaan Toll-reitin komponentteja ja siksi reitti tässä tapauksessa voi aktivoitua myös ilman infektiota. Se, miksi aktivaatio ei kuitenkaan ole täysin samalla tasolla kuin Toll^{10b} -linjan tapauksessa, olisi myös mielenkiintoinen tutkimuksen kohde. *Drs-GFP*:n ilmentymisen eroja voisi edelleen tutkia myös kvantitatiivisilla menetelmillä, kuten qPCR:llä. Näin saataisiin tarkkaa tietoa ilmenemisen määrän eroista ja tulos saataisiin vahvistettua myös toisella menetelmällä.

LÄHTEET

- Brand, A.H., ja N. Perrimon. 1993. "Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes". *Development* 118 (2): 401–15. <https://doi.org/10.1242/dev.118.2.401>.
- Ciantar J. 2021. "Prosalph6 and effete: Characterizing Potential Immune Pathway Regulators in *Drosophila melanogaster*". MSc Thesis. Tampere University
- De Gregorio, Ennio, Paul T. Spellman, Phoebe Tzou, Gerald M. Rubin, ja Bruno Lemaitre. 2002. "The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*". *The EMBO Journal* 21 (11): 2568–79. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.11.2568>.
- Duffy, Joseph B. 2002. "GAL4 System in *Drosophila*: A Fly Geneticist's Swiss Army Knife". *Genesis* 34 (1–2): 1–15. <https://doi.org/10.1002/gene.10150>.
- Elbashir, Sayda M., Javier Martinez, Agnieszka Patkaniowska, Winfried Lendeckel, ja Thomas Tuschl. 2001. "Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate". *The EMBO Journal* 20 (23): 6877–88. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.23.6877>.
- Holz, Anne, Barbara Bossinger, Thomas Strasser, Wilfried Janning, ja Robert Klapper. 2003. "The two origins of hemocytes in *Drosophila*". *Development* 130 (20): 4955–62. <https://doi.org/10.1242/dev.00702>.

- Leclerc, Vincent, ja Jean-Marc Reichhart. 2004. "The Immune Response of *Drosophila Melanogaster*". *Immunological Reviews* 198 (1): 59–71. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0130.x>.
- Lemaitre, Bruno, ja Jules Hoffmann. 2007. "The Host Defense of *Drosophila Melanogaster*". *Annual Review of Immunology* 25: 697–743. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615>.
- Masukawa, Masaki, Yuki Ishizaki, Hiroki Miura, Makoto Hayashi, Ryoma Ota, ja Satoru Kobayashi. 2021. "Male-Biased Protein Expression in Primordial Germ Cells, Identified through a Comparative Study of UAS Vectors in *Drosophila*". *Scientific Reports* 11 (1): 21482. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00729-1>.
- Maxton-Küchenmeister, Jörg, Klaus Handel, Urs Schmidt-Ott, Siegfried Roth, ja Herbert Jäckle. 1999. "Toll Homolog Expression in the Beetle *Tribolium* Suggests a Different Mode of Dorsal-Ventral Patterning than in *Drosophila* Embryos". *Mechanisms of Development* 83 (1): 107–14. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(99\)00041-6](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(99)00041-6).
- Meister, Marie, ja Marie Lagueux. 2003. "*Drosophila* blood cells". *Cellular Microbiology* 5 (9): 573–80. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00302.x>.
- Myllymäki, Henna, Susanna Valanne, ja Mika Rämet. 2014. "The *Drosophila* Imd Signaling Pathway". *The Journal of Immunology* 192 (8): 3455–62. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303309>.
- Schneider, D. S., K. L. Hudson, T. Y. Lin, ja K. V. Anderson. 1991. "Dominant and Recessive Mutations Define Functional Domains of Toll, a Transmembrane Protein Required for Dorsal-Ventral Polarity in the *Drosophila* Embryo." *Genes & Development* 5 (5): 797–807. <https://doi.org/10.1101/gad.5.5.797>.
- Swatek, Kirby N, ja David Komander. 2016. "Ubiquitin modifications". *Cell Research* 26 (4): 399–422. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.39>.
- Valanne, Susanna, ja Mika Rämet. 2011. "Banaanikärpänen - geneettisesti verraton mallieläin tutkimukseen". *Duodecim; lääketieteellinen aikakauskirja* 127 (tammikuuta): 2063–71.
- Valanne, Susanna, Jing-Huan Wang, ja Mika Rämet. 2011. "The *Drosophila* Toll Signaling Pathway". *The Journal of Immunology* 186 (2): 649–56. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002302>.
- Wood, Will, ja Antonio Jacinto. 2007. "*Drosophila* *Melanogaster* Embryonic Haemocytes: Masters of Multitasking". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8 (7): 542–51. <https://doi.org/10.1038/nrm2202>.
- Zettervall, Carl-Johan, Ines Anderl, Michael J. Williams, Ruth Palmer, Eva Kurucz, Istvan Ando, ja Dan Hultmark. 2004. "A Directed Screen for Genes Involved in *Drosophila* Blood Cell Activation". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (39): 14192–97. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403789101>.