

*Undersøgelse af kandidatgener for
Attention Deficit Hyperactivity
Disorder gennem adfærdsstudier
med *Drosophila melanogaster* som
modelorganisme*



AALBORG UNIVERSITY



**Kandidatspeciale i
biologi ved School of
Engineering and
Science (SES),
Teknisk-
Naturvidenskabelige
Fakultet, Aalborg
Universitet**

Lisbeth Strøm Madsen
& Sandra Marie
Neumann Arvidson

April 2015



Projekttitle:

Dansk: Undersøgelse af kandidatgener for Attention Deficit Hyperactivity Disorder gennem adfærdsstudier med *Drosophila melanogaster* som modelorganisme

English: Investigation of candidate genes for Attention Deficit Hyperactivity Disorder through behavioral studies using *Drosophila melanogaster* as a model organism

Projekttype:

Kandidatspeciale i biologi ved School of Engineering and Science (SES), Teknisk-Naturvidenskabelige Fakultet, Aalborg Universitet

Projektperiode:

1. maj 2014 – 7. april 2015

Forfattere:

Lisbeth Strøm Madsen, Studie nr. 20082727

Sandra Marie Neumann Arvidson, Studie nr. 20082729

Vejledere:

Torsten Nygaard Kristensen, Professor MSO, AAU

Palle Jensen, Ph.d.-studerende, AU

Ditte Demontis, Lektor, AU

Oplagsantal: 5

Sideantal: 58

Appendiksantal: 8

Forside foto: Martin Helmstädter, Fischbach Lab. Freiburg (Foghsgaard, 2014)

Rapportens indhold er frit tilgængeligt, men offentliggørelse (med kildeangivelse) må kun ske efter aftale med forfatterne.

Forord

Dette specialeprojekt er udarbejdet i perioden den 1. maj 2014 til den 7. april 2015 i forbindelse med afslutningen af en kandidatgrad i biologi ved Aalborg Universitet. Projektet omhandler den genetiske baggrund for sygdomme Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD). Vi håber med projektet at kunne bidrage til forskningen i og forståelsen af den genetiske baggrund med henblik på i fremtiden bedre at kunne diagnosticere og behandle patienter med ADHD. Projektet er rettet mod alle med interesse i dette emne.

Figurer og tabeller i projektet er nummeret fortløbende med forklarende tekst over tabellerne og under eller ved siden af figurerne. Kildehenvisninger er angivet efter Harvard-metoden og kildelisten findes bagerst i projektet. Appendiks A-G er vedlagt projektet, mens Appendiks H kan rekvireres ved henvendelse til forfatterne.

Der rettes en stor tak til Palle Jensen, Ditte Demontis og Torsten Nygård Kristensen for kyndig råd og vejledning i hele projektperioden, hvem foruden statistik stadig ville være en by i Rusland. Der rettes endvidere en tak til Helle Blendstrup, Henriette Casper Jensen og Jonas Kiis for den store hjælp i laboratoriet både med materialer, men også når fire hænder ikke har været nok til at klare ærterne. En sidste tak rettes til Susan Hansen for utrætteligt at vaske anselige mængder skumpropper for os og endda med et smil.

Abstract

Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) is the most common psychiatric disease in children, with an average prevalence of 2-3 % in school aged children in Denmark. ADHD is characterized by hyperactivity, inattention and impulsivity. Research has shown that the heritability of ADHD in humans is high, but so far the genetic background of the disease has not been clarified. This project intends to investigate 14 candidate genes that previous studies have associated with ADHD. We identify these genes through a literature survey of genome-wide association studies. The genes were investigated through behavioral studies using the model organism *Drosophila melanogaster*. *D. melanogaster* minos lines, which each had an inactivated version of one of the candidate genes and a control line with the same genetic background, was obtained from Bloomington Stock Center. The effect of inactivating the investigated genes on the flies' phenotypes was observed through two different experimental set ups. First we observed behavior in an arena with 36 small wells, each containing a fly of either the minos or the control line. Flies in the arena were video recorded for five minutes. The activity level of the flies was tracked using a computer program, EthoVision XT 10 base from Noldus. The total distance moved, the total distance to the center-point and the frequency of rotations were recorded. The other experimental set up was a stress/distraction test in a maze. The maze was placed on computer screens displaying either a homologous or a heterologous video. The ability and speed by which minos and control lines' completed the maze was observed. Results showed that six minos lines had a significantly different behavior compared to the control lines indicating an effect of the inactivated gene on behavior in *D. melanogaster*. The human ortholog genes that significantly effected behavior in *D. melanogaster* were SLC6A2, SLC6A3, CHRNA7, NOS1, DDC and PRKG1. We discuss the implications of our results, and the perspectives of using *D. melanogaster* as a model organism in studying human psychiatric diseases.

Indhold

Forord	iii
Abstract	v
Introduktion.....	1
Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD)	2
<i>Drosophila melanogaster</i>	4
Genmanipulation i <i>D. melanogaster</i>	7
Formålet med projektet	9
Metoder.....	11
ADHD Kandidatgener.....	11
Opdræt af <i>D. melanogaster</i> til forsøg	18
Forsøg	18
Arena	18
Labyrint.....	19
Statistiske analyser	21
Arena	21
Labyrint.....	21
Bonferroni.....	21
Resultater	23
Opdræt af <i>D. melanogaster</i> til forsøg	23
Arena	24
Labyrint.....	34
Opsummering af resultater	48
Diskussion.....	51
Bibliografi.....	55
Appendiks A Kandidatgener	III
Kandidatgener ud fra litteraturstudie og databasesøgninger	VI
Appendiks B Protokol for fremstilling af <i>D. melanogaster</i> medie.....	VII
Appendiks C <i>D. melanogaster</i>	IX
Crowding hos <i>D. melanogaster</i>	IX
Vægt for <i>D. melanogaster</i>	IX
Klækningsprocent for <i>D. melanogaster</i>	X
Appendiks D Protokol for Arenaforsøg.....	XIII

Appendiks E Tracking af <i>D. melanogaster</i> med EthoVision XT 10 base	XV
Appendiks F Protokol for Labyrintforsøg.....	XXV
Indtastningsskemaer til labyrintforsøg.....	XXVII
Appendiks G Temperaturdata	XXIX
Appendiks H Diverse datasæt.....	XXXIII

Introduktion

Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) er en forholdsvis almindelig sygdom, som i Danmark ses hos 2-3 % af alle børn i skolealderen, hvor den typisk er mest fremtrædende. ADHD karakteriseres ved uopmærksomhed, hyperaktivitet og impulsivitet (Damm & Thomsen, 2012). Sygdommen aftager med alderen, men forsvinder ikke helt og kan have store konsekvenser for patienten, idet der med ADHD ofte følger indlæringsvanskeligheder, søvnforstyrrelser og motoriske vanskeligheder og senere angst og depression. I ungdoms- og voksenlivet ses en øget tendens til misbrug og kriminalitet (Bilenberg, 2014). Forskning viser, at ADHD er en sygdom med en høj arvelig komponent i mennesker (Faraone, et al., 2005). Den genetiske baggrund for sygdommen er dog endnu ikke endeligt fastlagt. Nye Genome-Wide Association Studies (GWAS) giver bud på kandidatgener, der indvirker på, hvorvidt mennesker udvikler sygdommen, som kan være interessenter for videre forskning. Til studierne af den genetiske baggrund for en række humane sygdomme anvendes bananfluen (*Drosophila melanogaster*) ofte som modelorganisme (Venken & Bellen, 2005), idet cirka 75 % af generne associeret med humane sygdomme findes i en lignende version hos *D. melanogaster* (Reiter, et al., 2001). *D. melanogaster* er desuden billig og nem at håndtere i laboratoriet og derfor er den også velegnet til studier af kandidatgener for ADHD (Venken & Bellen, 2005). En større indsigt i genetikken bag sygdommen vil øge forståelsen af de biologiske mekanismer, der ligger til grund for lidelsen og dermed skabe muligheder for bedre diagnosticering og behandling af patienter i fremtiden.

Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD)

ADHD er blandt de mest almindelige psykiske lidelser blandt børn (Faraone, et al., 2005). Den kommer til udtryk i barndommen og kan fortsætte med at give problemer for nogle som voksne (American Psychiatric Association, 2013). ADHD er karakteriseret ved tre kernesymptomer: uopmærksomhed, hyperaktivitet og impulsivitet (Damm & Thomsen, 2012). I barndommen er det især hyperaktivitet er fremtrædende, i løbet af den tidlige skolegang begynder opmærksomhedsvanskeligheder at være mere fremtrædende og i puberteten aftager den motoriske hyperaktivt typisk. Som voksen kan opmærksomhedsvanskeligheder, rastløshed og impulsivitet forblive problematiske. ADHD aftager med alderen, men forsvinder ikke ved en specifik alder (American Psychiatric Association, 2013).

Igennem flere tvillingestudier er arveligheden for ADHD blevet undersøgt og estimeret og det gennemsnitlige estimat er 76 % (Faraone, et al., 2005). I en systematisk udredning er prævalensen for ADHD på verdensplan estimeret til 5,29 %. Prævalensen for voksne med ADHD er estimeret til at være cirka 2-2,5 gange mindre end prævalensen for børn med ADHD. Prævalensen for drenge med ADHD er cirka to gange større end prævalensen for piger (Polanczyk, et al., 2007). En meta-analyse, af hvorvidt ADHD varer ved ind i voksenlivet, viser at ADHD aftager med alderen (Faraone, et al., 2006).

Table 1 Symptoms for Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD), fra diagnosemanualen Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders fifth edition (DSM-5), (American Psychiatric Association, 2013).

Inattention symptoms	Hyperactivity and impulsivity symptoms
<i>Often fails to give close attention to details or makes careless mistakes in schoolwork, at work, or during other activities</i>	<i>Often fidgets with or taps hands or feet or squirms in seat</i>
<i>Often has difficulty sustaining attention in tasks or play activities</i>	<i>Often leaves seat in situations when remaining seated is expected</i>
<i>Often does not seem to listen when spoken to directly</i>	<i>Often runs about or climbs in situations where it is inappropriate</i>
<i>Often does not follow through on instructions and fails to finish schoolwork, chores, or duties in the workplace</i>	<i>Often unable to play or engage in leisure activities quietly</i>
<i>Often has difficulty organizing tasks and activities</i>	<i>Is often "on the go," acting as if "driven by a motor"</i>
<i>Often avoids, dislikes, or is reluctant to engage in tasks that require sustained mental effort</i>	<i>Often talks excessively</i>
<i>Often loses things necessary for tasks or activities</i>	<i>Often blurts out an answer before a question has been completed</i>
<i>Is often easily distracted by extraneous stimuli</i>	<i>Often has difficulty waiting his or her turn</i>
<i>Is often forgetful in daily activities</i>	<i>Often interrupts or intrudes on others</i>

Diagnosen ADHD stilles på baggrund af diverse spørgeskemaer og samtaler med barnet, forældre og andre der er tilknyttet barnet, en somatisk og funktionsneurologisk undersøgelse, direkte observationer og en

psykologisk undersøgelse (Damm & Thomsen, 2012). I Danmark benyttes diagnosemanualen International Classification of Diseases 10th revision (ICD-10), som er udarbejdet af WHO (World Health Organization), imens mange andre lande benytter diagnosemanualen Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders fifth edition (DSM-5), som er udarbejdet af den amerikanske psykiatriforening (American Psychiatric Association) (Damm & Thomsen, 2012) (Socialstyrelsen, 2015). DMS-5 opdeler symptomer for ADHD i to kategorier; "inattention" og "hyperactivity and impulsivity". Hver kategori har ni symptomer, hvor børn og unge under 17 år, minimum skal have seks "inattention" symptomer og/eller minimum seks "hyperactivity and impulsivity" symptomer for at blive ADHD diagnosticeret (Tabel 1). Symptomerne skal have været vedvarende i mindst seks måneder, de skal være til stede i mindst to af barnets miljøer og flere af symptomerne skal have været til stede før barnet fylder 12 år. Unge og voksne over 17 år skal have minimum fem "inattention" symptomer og/eller minimum fem "hyperactivity and impulsivity" symptomer for at blive ADHD diagnosticeret. Der kan stilles tre forskellige diagnosetyper af ADHD; "predominantly inattentive presentation", "predominantly hyperactive/impulsive presentation" og "combined presentation", og tre grader af ADHD; mild, moderat og svær (American Psychiatric Association, 2013).

Til behandling af ADHD benyttes medicinsk behandling og psykologisk, adfærdsmæssig og pædagogisk rådgivning og intervention (Houmann, et al., 2015). Der findes forskellige typer medicin (Tabel 2), som har den effekt, at koncentrationen af dopamin og noradrenalin forøges i synapserne (Bilenberg, 2014).

Tabel 2 Oversigt over medicinprodukter, det virksomme stof og dets virkemåde (Bilenberg, 2014).

Produktnavn	Stof	Virkemåde
Bl.a. Ritalin Eqvasym Medikinet Concerta	Methylphenidat	- centralstimulerende - blokerer reabsorptionen af dopamin og i mindre grad noradrenalin - øger aktiviteten i pandelappen Effekt: koncentrationen af dopamin (og noradrenalin) forøges uden for cellerne
Elvanse	Lisdexamfetamin (dexamfetamin)	- centralstimulerende - lisdexamfetamin (et inaktivt prodrug) omdannes efter indtagelse til dexamfetamin - blokerer reabsorptionen af dopamin og i mindre grad noradrenalin - frigør dopamin og noradrenalin fra vesikler i neuronerne - direkte virkning på dopaminreceptoren Effekt: koncentrationen af dopamin (og noradrenalin) forøges uden for cellerne
Strattera	Atomoxetin	- antidepressiv - blokerer reabsorptionen af noradrenalin - forhøjer niveauet af noradrenalin og dopamin i pandelappen Effekt: koncentrationen af noradrenalin og dopamin forøges uden for cellerne

Drosophila melanogaster

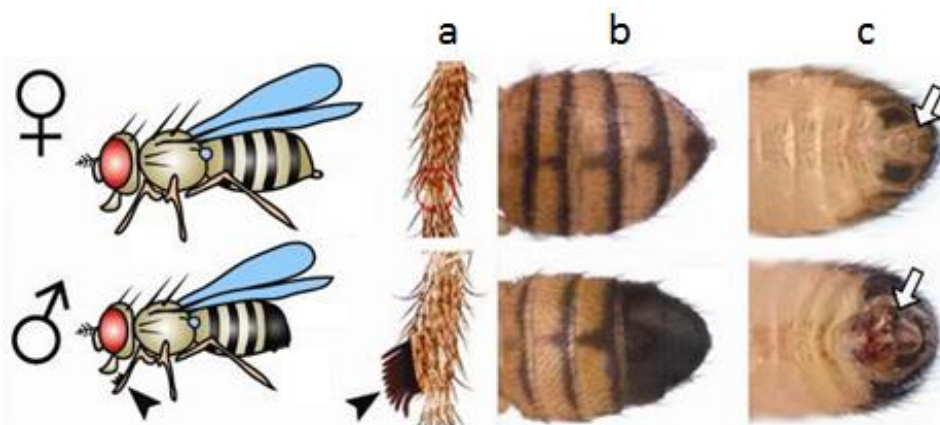
Bananfluen *Drosophila melanogaster* er en meget anvendt modelorganisme i studier af den genetiske baggrund for en række sygdomme hos mennesker (Venken & Bellen, 2005). Cirka 75 % af generne associeret med humane sygdomme findes i en lignende version hos *D. melanogaster* (Reiter, et al., 2001). Muligheden for at undersøge specifikke gener er yderligere blevet styrket af, at det komplette genom for *D. melanogaster* er blevet sekventeret (Adams, et al., 2000). Derudover er *D. melanogaster* billig, nem at håndtere i laboratoriet og har en kort generationstid. Samlet gør disse karakteristika, at *D. melanogaster* er velegnet til studier af kandidatgener for ADHD (Venken & Bellen, 2005).

Taksonomisk klassifikation

Klasse:	Insecta - insekter
Orden:	Diptera - tovinger
Familie:	Drosophilidae - Eddikefluer/bananfluer
Slægt:	<i>Drosophila</i> - bananfluer
Art:	<i>Drosophila melanogaster</i>

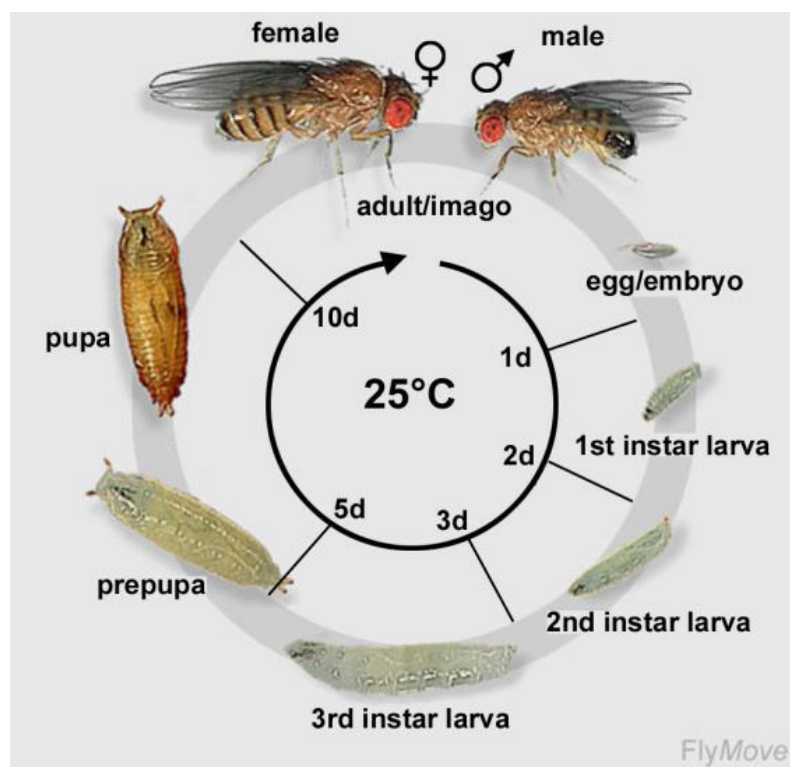
Figur 1 Taksonomisk klassifikation for *Drosophila melanogaster* (Miller, 2000).

D. melanogaster hører til familien Drosophilidae (Figur 1) og er naturligt hjemmehørende i tropiske områder, men er vidt udbredt i hele verden, introduceret af mennesker og er kun begrænset af kolde temperaturer og lav fugtighed (Miller, 2000) (Markow & O'Grady, 2006) (Ashburner, 2008). *D. melanogaster* findes ofte i forbindelse med mennesker, hvor der er en nem adgang til føde for eksempel frugtlagre. *D. melanogaster* lever af de mikroorganismer (gær og bakterier), der fermenterer frugter og andet rådne plantemateriale og tiltrækkes af lugten af en hvilken som helst lignende fødekilde (Miller, 2000) (Ashburner, 2008). *D. melanogaster* lægger sine æg i moden frugt lige før det rådner, således at frugten kan forsyne larverne med føde i hele deres levetid (Miller, 2000). *D. melanogaster* er 3-4 mm lang og cirka 2 mm bred, gulbrun med sorte striber og røde facetøjne. Hunnerne er typisk større end hannerne og de kendes nemt fra hinanden. Hannernes sorte striber er mørkere og tættere i enden, hvor hannens kønsorganer også syner mørkere og mere komplekse og hvor hunnens bagkrop ender i en læggebrod. På forbenene har hannen en kam af sorte hår (Figur 2), (Miller, 2000) (Markow & O'Grady, 2006) (Flagg, 2005).



Figur 2 Han (nederst) og hun (øverst) *Drosophila melanogaster*. På forbenene (a) har kun hannen en kam af sorte hår (sorte pile). Hannens bagende (b) er mørkere og striberne er tætstillede. På undersiden af bagkroppen (c) syner hannens kønsorganer mørkere og er mere komplekse og hunnens anus danner en lille spids (hvide pile), kilde fra (Roote & Prokop, 2013).

D. melanogaster kan reproducere sig ved 13-30 °C med varierende tidsspænd (Ashburner, et al., 2005). Ved 25 °C og høj luftfugtighed har *D. melanogaster* en livscyklus på cirka 10 dage med tre larvestadier før *D. melanogaster* undergår fuld metamorfose i puppestadiet forud for voksenstadiet (Figur 3). Æggene klækker cirka 24 timer efter, de er blevet lagt. Det første og andet larvestadie varer hver cirka 24 timer og det tredje larvestadie cirka 48 timer. Puppestadiet varer 4-5 dage og cirka 8-12 timer efter *D. melanogaster* er kommet ud af puppen er hannerne kønsmodne og efter 12-14 timer er hunnerne kønsmodne. Efter parring kan hunnen lægge op til 100 befrugtede æg per dag. Den maksimale levealder ved 25 °C er cirka 110 dage (Ashburner, et al., 2005) (Roote & Prokop, 2013) (Ashburner, 2008).

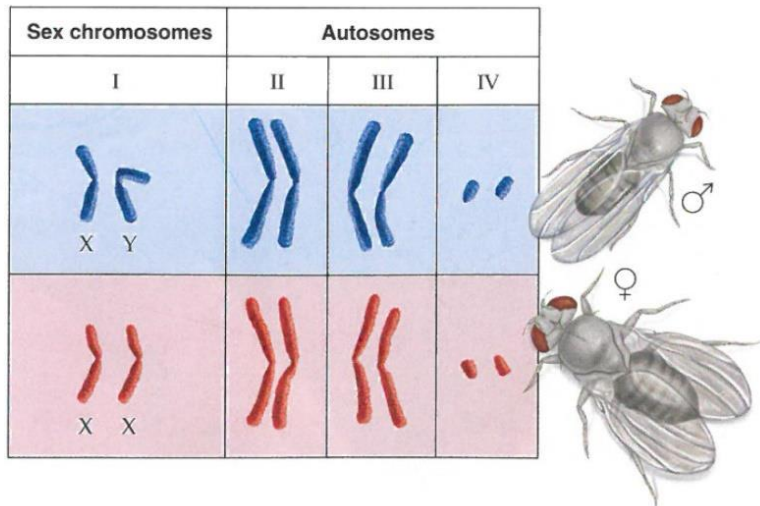


Figur 3 Livscyklus for *Drosophila melanogaster* ved 25 °C varer cirka 10 dage. Efter parring lægger hunnen æg, som klækker efter 24 timer. 1. og 2. larvestadie varer hver cirka 24 timer og det 3. cirka 48 timer. På femtedagen forpupper larven sig og puppestadiet varer 4-5 dage, hvor larven undergår fuld metamorfose (Roote & Prokop, 2013).

D. melanogaster har omkring 17.000 gener fordelt på fire kromosompar (NCBI, 2014). Et par sexkromosomer, kromosompar nr. 1, og tre autosomer, hvoraf det fjerde er meget lille og "dot-like", kromosompar nr. 4 (Figur 4),

(Ashburner, et al., 2005) (Greenspan, 2004). Sexkromosomparret består under normale omstændigheder af to X-kromosomer eller et X- og et Y-kromosom. X-kromosomerne er afgørende for kønnet, hvor Y-kromosomet kun er afgørende for hannernes fertilitet, men ikke kønnet. Ratioen af X-kromosomer til autosomer bestemmer kønnet (X:A), hvor kromosompar nr. 4 ikke medregnes for eksempel vil 2X:2A være

en hun, mens 1X:2A vil være en han, idet en ratio ≥ 1 resulterer i en hun og en ratio < 1 resulterer i en han (Gilbert, 2000) (Sadava, et al., 2008) (Greenspan, 2004).



Figur 4 *Drosophila melanogaster* har fire kromosompar, der udgøres af et sexkromosom, som er forskelligt for hunnen og hannen, og tre autosomer, hvoraf det fjerde kromosom er meget lille (Mader, 2007).

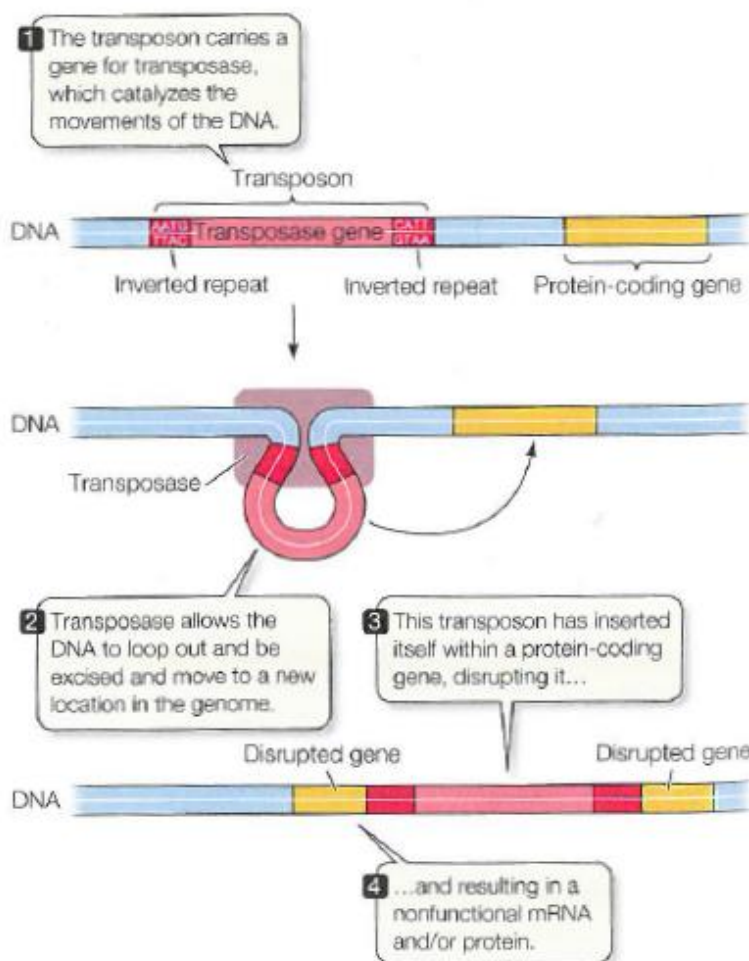
Genmanipulation i *D. melanogaster*

Genmanipulation i *D. melanogaster* er især muliggjort af, at det fulde genom er sekventeret og publiceret, men også den lave redundans i genomet og den kendsgerning, at kun et eller få gener, modsat højere organismer, koder for medlemmer af samme proteinklasse, er medvirkende til den store succes (Roote & Prokop, 2013) (Venken & Bellen, 2005). En af de meget anvendte metoder er at slå et eller flere specifikke gener ud med henblik på at undersøge funktionen af disse. Et stort projekt sat i gang i 1991 har til formål at finde forskellige transposoner, der kan bruges til netop at slå specifikke gener ud, til brug for hvert gen i *D. melanogaster* genomet. Det er indtil nu muligt for to tredjedele af genomet (Bellen, et al., 2011) (Venken & Bellen, 2005) (Pavlopoulos, et al., 2007).

Transposable elements eller transposoner er sekvenser, der kan flytte sig fra sted til sted på genomet (Sadava, et al., 2008). Transposoner menes at være en slags cellulære parasitter og



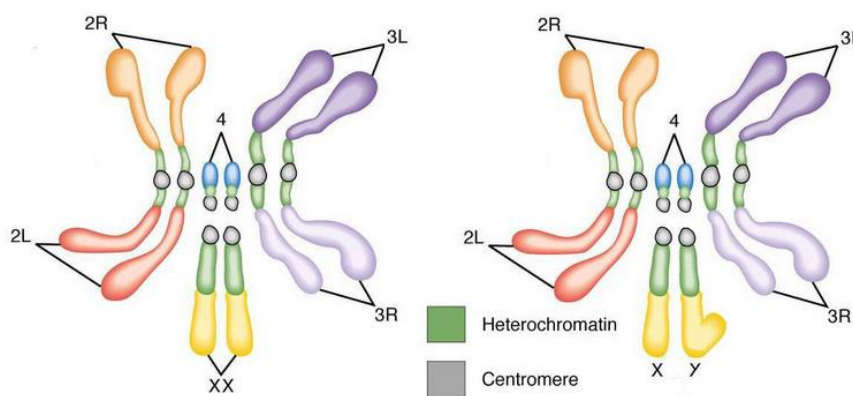
Figur 5 *Drosophila melanogaster* wild type med røde øjne (nederst) og mutant med hvide øjne (øverst) med en mutation i genet *white*¹¹¹⁸ (*w*¹¹¹⁸), (Ringertz, 1995).



kan, hvis de sætter sig ind midt i en protein-kodende region (exons), forårsage mutationer. Hos *D. melanogaster* skyldes en mutation, der forårsager hvide øjne netop en transposon i et gen lokaliseret på X-kromosomet, som koder for et pigmentproducerende enzym, som slår genet ud (Figur 5 og Figur 7), (Mader, 2007) (Sadava, et al., 2008).

Figur 6 DNA transposoner starter og slutter med inverted repeats og flytter sig fra sted til sted på genomet ved hjælp af enzymet transposase. Hvis transposonet sætter sig midt i en protein-kodende region, kan denne ødelægges (Sadava, et al., 2008).

Transposoner menes også at være involveret i transskriptionskontrol, idet de blokerer transskriptionen (Mader, 2007). De kan i nogle tilfælde bære andre gener med sig for eksempel gener for antibiotikaresistens og resultere i nye gener og dermed bidrage til den genetiske variation. Transposoner udnyttes som metode til genetisk manipulation i mange organismer også udover *D. melanogaster* (Sadava, et al., 2008) (Howe, 2007) (Mader, 2007). Der findes fire hovedtyper af transposoner hos eukaryoter; Short Interspersed Elements (*SINEs*), Long Interspersed Elements (*LINES*), Retrotransposoner og DNA transposoner (Sadava, et al., 2008) (Howe, 2007). De grupperes i to grupper Class I og Class II. Alle undtaget DNA transposonerne hører til Class I og benytter en "copy-paste" mekanisme, hvor de laver en RNA kopi af sig selv, som template til en ny DNA sekvens, der sætter sig et andet sted på genomet. DNA transposonerne derimod tilhører Class II og flytter sig fra sted til sted på genomet uden replikation med hjælp fra enzymet transposase, altså en "cut-and-paste" mekanisme (Figur 6), (Sadava, et al., 2008).

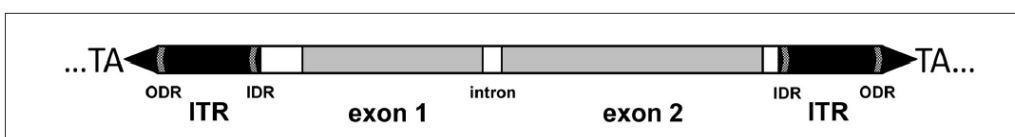


***Drosophila* chromosomes**

Figur 7 *Drosophila melanogaster* kromosomer for en han (XY) og en hun (XX). De tre kromosompar er centreret omkring et chromocenter med venstre og højre kromosomarme ud fra centromererne. På kromosom fire og på kønskromosomerne er centromererne placeret i enderne (Carr, 2006).

Minos er et DNA transposon (Class II) af familien

Tc1/mariner, som oprindeligt stammer fra *Drosophila hydei* og som blev isoleret i 1995. *Minos* kan integreres stabilt i mange andre organismer både insekter, mus og menneskeceller og kan integreres i *D. melanogaster* med meget lidt site specificitet (Metaxakis, et al., 2005) (Pavlopoulos, et al., 2007) (Bellen, et al., 2011). *Minos*-lignende elementer er vidt udbredt i *Drosophila*-slægten og er formegentligt overført via horisontal gentransfer (Pavlopoulos, et al., 2007). *Minos* er 1,8 kilobaser langt og bærer et enkelt transposase gen fordelt på to exons brudt af en 60 bp lang intron og starter og slutter med 255 bp lange inverted terminal repeats (Figur 8), (Metaxakis, et al., 2005) (Pavlopoulos, et al., 2007) (Bellen, et al., 2011).



Figur 8 Strukturen af det naturligt forekommende *Minos* transposon fra *Drosophila hydei*. Transposonet består af transposase genet, fordelt på to exoner på hver side af en intron, og ITR, inverted terminal repeats i enderne underinddelt i IDR, inner direct repeat og ODR, outer direct repeat (Pavlopoulos, et al., 2007).

Formålet med projektet

At udvælge og undersøge humane kandidatgener for ADHD i modelorganismen *Drosophila melanogaster*.

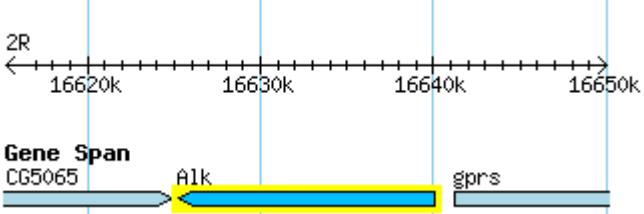
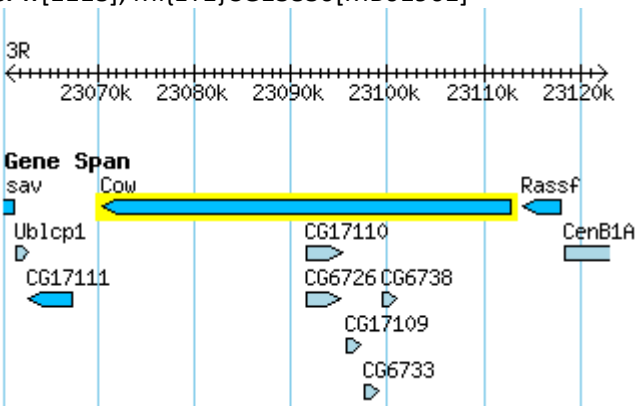
Dette projekt vil tage udgangspunkt i formodede risiko-gener for ADHD identificeret på baggrund af humane data. Disse vil blive udvalgt via litteratur- og databasestudier. Den funktionelle effekt af generne undersøges gennem adfærdsstudier med *D. melanogaster* som modelorganisme. Der hjemkøbes *D. melanogaster*-minoslinjer fra Bloomington stock center (NIH P40OD018537), som hver har en inaktiveret version af et af de potentielle risiko-gener. De udvalgte ADHD risiko-geners effekt på fluernes adfærd observeres gennem to forskellige forsøg; et forsøg hvor fluernes aktivitet undersøges i en arena og en stress/distractionstest i en labyrint.

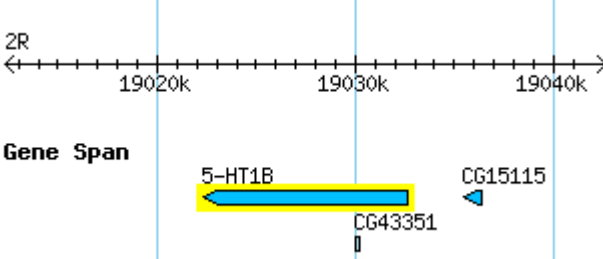
Metoder

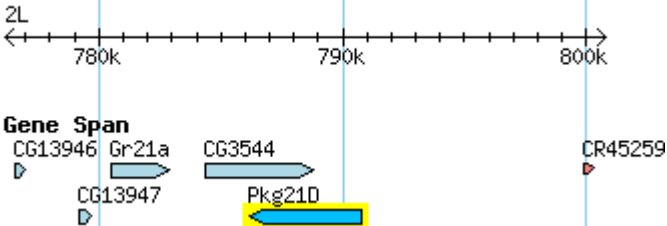
ADHD Kandidatgener

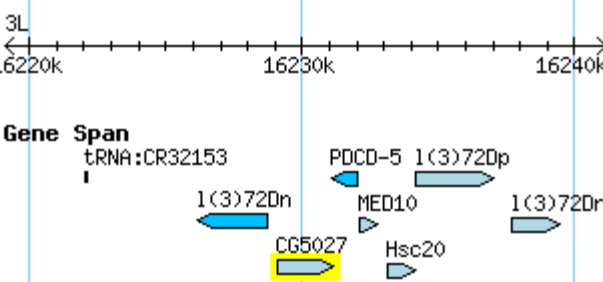
Ved diverse litteraturstudier blev der fundet humane kandidatgener for ADHD. Ved brug af Drosophila RNAi Screening Center (DRSC) (http://www.flyrnai.org/cgi-bin/DRSC_orthologs.pl) undersøgte, om der fandtes orthologe *D. melanogaster* gener for disse humane ADHD kandidatgener. Der blev udvalgt orthologe *D. melanogaster* gener med højeste Weighted Score og med genotype w[1118]; Mi{ET1} (Appendiks A, s. III). Beskrivelser af disse udvalgte ADHD kandidatgener, deres loci og de orthologe *D. melanogaster* genes loci, Flybase stock numre og genotyper (Tabel 3).

Tabel 3 Oversigt over Attention Deficit Hyperactivity Disorder kandidatgener anvendt til forsøgene, udvalgt efter tilgængeligheden af orthologe *Drosophila melanogaster* gener.

<i>H. sapiens</i>	<i>D. melanogaster</i>
<p>Gennavn: Anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase (ALK)</p> <p>Kromosom: 2p23.2-23.1</p> <p>ALK er udtrykt i det centrale og perifere nervesystem (Souttou, et al., 2001) og koder for enzymet anaplastic lymphoma kinase (GBG-UCSC, 2013) (Souttou, et al., 2001). ALK er impliceret i udvikling af hjernen (GBG-UCSC, 2013) (Mick, et al., 2011).</p>	<p>Gennavn: Anaplastic lymphoma kinase (Alk)</p> <p>Kromosom: 2R:16,625,293..16,640,011 [-]</p> <p>Flybase stock nr: 25509</p> <p>Genotype: w[1118]; Mi{ET1}Alk[MB06458]</p>  <p>Reference: http://flybase.org/reports/FBgn0040505.html</p>
<p>Gennavn: spar/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan 3 (SPOCK3)</p> <p>Kromosom: 4q32.3</p> <p>SPOCK3 er udtrykt i hjernen (GBG-UCSC, 2013), og koder for et ekstracellulært matrixkomponent (Yang, et al., 2013) og er sandsynligvis involveret i neurogenesen (GBG-UCSC, 2013).</p>	<p>Gennavn: Carrier of Wingless (CG13830)/(Cow)</p> <p>Kromosom: 3R:23,070,516..23,112,730 [-]</p> <p>Flybase stock nr: 23767</p> <p>Genotype: w[1118]; Mi{ET1}CG13830[MB01961]</p>  <p>Reference: http://flybase.org/reports/FBgn0039054.html</p>

<i>H. sapiens</i>	<i>D. melanogaster</i>
<p>Gennavn: 5-hydroxytryptamine receptor 1B (HTR1B)</p> <p>Kromosom: 6q14.1 (ncbi:6q13)</p> <p>HTR1B er udtrykt i flere af hjernens regioner og koder for en serotonin receptor (Gizer, et al., 2009). Den er forbundet til et G-protein, et enzym, der hæmmer dannelsen af cyklisk AMP, et intracellulært signalmolekyle, der åbner ionkanaler og aktiverer andre intracellulære enzymer (GBG-UCSC, 2013) (Gizer, et al., 2009) (Martini & Nath, 2009).</p>	<p>Gennavn: 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B (5-HT1B)</p> <p>Kromosom: 2R:19,022,325..19,032,642 [-]</p> <p>Flybase stock nr: 24240</p> <p>Genotype: w[1118]; Mi{ET1}5-HT1B[MB05181]</p>  <p>Reference: http://flybase.org/reports/FBgn0263116.html</p>

<i>H. sapiens</i>	<i>D. melanogaster</i>
<p>Gennavn: protein kinase, cGMP-dependent, type I (PRKG1)</p> <p>Kromosom: 10q11.23-21.1</p> <p>PRKG1 er udtrykt i flere af hjernens regioner, glatte muskler og blodplader og koder for et enzym af typen cyklisk GMP-afhængig proteinkinase (GBG-UCSC, 2013), der bl.a. er involveret i regulering af udvikling af forhjernen og dendritter, signaltransduktion og neuronal migration (Neale, et al., 2010).</p>	<p>Gennavn: cGMP-dependent protein kinase 21D (Pkg21D)</p> <p>Kromosom: 2L:786,153..790,798 [-]</p> <p>Flybase stock nr: 24228</p> <p>Genotype: w[1118]; Mi{ET1}Pkg21D[MB04805]</p>  <p>Reference: http://flybase.org/reports/FBgn0000442.html</p>

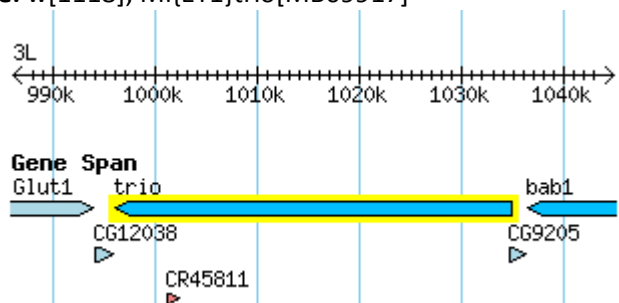
<i>H. sapiens</i>	<i>D. melanogaster</i>
<p>Gennavn: thioredoxin-related transmembrane protein 3 (TMX3)</p> <p>Kromosom: 18q.22.1</p> <p>TMX3 er vidt udtrykt i hjernen, muskler, knogler, huden, øjne, lunger, lever, mave, nyre, prostata, testikler, livmoder og moderkage. TMX3 koder for et membranprotein i det endoplasmatiske reticulum og fungerer sandsynligvis som katalytiske enzymer (GBG-UCSC, 2013).</p>	<p>Gennavn: NONE (CG5027)</p> <p>Kromosom: 3L:16,229,100..16,231,139 [+]</p> <p>Flybase stock nr: 24687</p> <p>Genotype: w[1118]; Mi{ET1}CG5027[MB04280]/TM6C, cu[1] Sb[1]</p>  <p>Reference: http://flybase.org/reports/FBgn0036579.html</p>

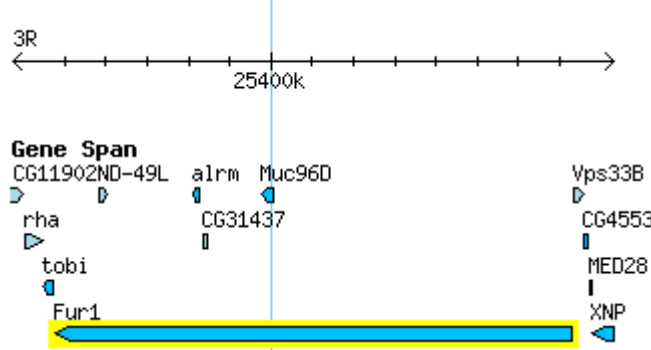
<i>H. sapiens</i>	<i>D. melanogaster</i>
<p>Gennavn: dopa decarboxylase (aromatic L-amino acid decarboxylase) (DDC)</p> <p>Kromosom: 7p12.1</p> <p>DDC er udtrykt i det centrale og perifere nervesystem (Scherer, et al., 1992), og koder for en proteinkatalysator og er involveret i syntesen af dopamin og serotonin (GBG-UCSC, 2013) (Banaschewski, et al., 2010) (Gizer, et al., 2009).</p>	<p>Gennavn: Tyrosine decarboxylase 1(Tdc1)</p> <p>Kromosom: 2R:6,677,001..6,680,391 [-]</p> <p>Flybase stock nr: 24213</p> <p>Genotype: w[1118]; Mi{ET1}Tdc1[MB04664] CG9422[MB04664]</p> <p>Reference: http://flybase.org/reports/FBgn0259977.html</p>

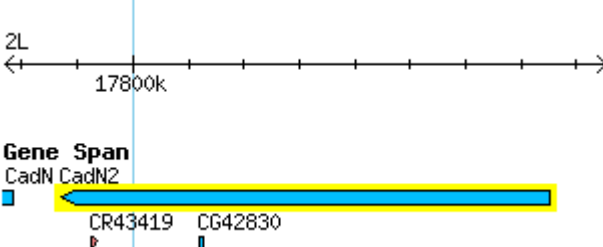
<i>H. sapiens</i>	<i>D. melanogaster</i>
<p>Gennavn: cholinergic receptor, nicotinic, alpha 7 (CHRNA7)</p> <p>Kromosom: 15q13.3</p> <p>CHRNA7 er vidt udtrykt i hjernen og er involveret i hurtig synaptisk transmission (Stergiakouli, et al., 2012). CHRNA7 koder for et protein, der folder sig som en lukket ionkanal (permeabel for Ca²⁺ ioner) igennem plasmamembraner. Hvis acetylcholin bindes til proteinets receptor åbnes ionkanalen og transport af Ca²⁺ over plasmamembranen er mulig (GBG-UCSC, 2013).</p>	<p>Gennavn: nicotinic Acetylcholine Receptor α6 (nAcRalpha-30D)/(nAChRa6)</p> <p>Kromosom: 2L:9,793,317..9,886,250 [-]</p> <p>Flybase stock nr: 25519</p> <p>Genotype: w[1118]; Mi{ET1}nAChRalpha6[MB06675]</p> <p>Reference: http://flybase.org/reports/FBgn0032151.html</p>

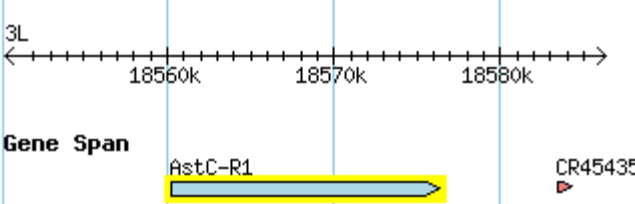
<i>H. sapiens</i>	<i>D. melanogaster</i>
<p>Gennavn: neurotrimin (NTM)</p> <p>Kromosom: 11q25</p> <p>NTM er udtrykt i hjernen og koder for proteinet neurotrimin, som sandsynligvis fremmer udvikling og sammenkobling af neuroner (GBG-UCSC, 2013) (Yang, et al., 2013).</p>	<p>Gennavn: (DIP-θ) Dpr-interacting protein θ (CG31646)</p> <p>Kromosom: 2L:5,626,291..5,658,560 [-]</p> <p>Flybase stock nr: 27790</p> <p>Genotype: w[1118]; Mi{ET1}CG31646[MB09592]</p> <p>Reference: http://flybase.org/reports/FBgn0051646.html</p>

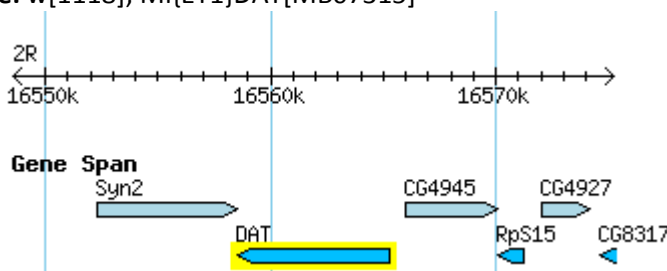
<i>H. sapiens</i>	<i>D. melanogaster</i>
<p>Gennavn: nitric oxide synthase 1 (NOS1)</p> <p>Kromosom: 12q24.22</p> <p>NOS1 er vidt udtrykt, bl.a. i hjernen og skeletmusklerne og koder for enzymet nitrogenoxid syntase, som katalyserer syntesen af nitrogenoxid. Nitrogenoxid er et signalmolekyle, som i hjernen og det perifere nervesystem fungerer som en neurotransmitter (GBG-UCSC, 2013). Da nitrogenoxid er en lipid-opløselig gas, kan den diffundere over cellemembranen og binde sig til intracellulære enzymer som aktiveres og producerer sekundære signaler (Martini & Nath, 2009).</p>	<p>Gennavn: Nitric oxide synthase (Nos)</p> <p>Kromosom: 2L:10,804,274..10,837,511 [-]</p> <p>Flybase stock nr: 24283</p> <p>Genotype: w[1118]; Mi{ET1}Nos[MB04018]</p> <p>Reference: http://flybase.org/reports/FBgn0011676.html</p>

<i>H. sapiens</i>	<i>D. melanogaster</i>
<p>Gennavn: kalirin, RhoGEF kinase (KALRN)</p> <p>Kromosom: 3q21.2</p> <p>KALRN er udtrykt i hjernen og koder for et protein, som bl.a. regulerer nervevækst, udviklingen af axoner (Chakrabarti, et al., 2005) og dendritter og strukturel og funktionel plasticitet (Lesch, et al., 2008).</p>	<p>Gennavn: trio (trio)</p> <p>Kromosom: 3L:995,982..1,034,875 [-]</p> <p>Flybase stock nr: 29073</p> <p>Genotype: w[1118]; Mi{ET1}trio[MB09917]</p>  <p>Reference: http://flybase.org/reports/FBgn0024277.html</p>

<i>H. sapiens</i>	<i>D. melanogaster</i>
<p>Gennavn: furin (FURIN)</p> <p>Kromosom: 15p26.1</p> <p>Furin er udtrykt i bl.a. hjernen, leveren og tarmen. Furin koder for membranbundet protease enzym og virker til at udføre allestedsnærværende endoprotease aktivitet i det endokrine system (GBG-UCSC, 2013).</p>	<p>Gennavn: Furin 1(Fur1)</p> <p>Kromosom: 3R:25,347,431..25,473,058 [-]</p> <p>Flybase stock nr: 25518</p> <p>Genotype: w[1118]; Mi{ET1}Fur1[MB06661]</p>  <p>Reference: http://flybase.org/reports/FBgn0004509.html</p>

<i>H. sapiens</i>	<i>D. melanogaster</i>
<p>Gennavn: cadherin 13, H-cadherin (CDH13)</p> <p>Kromosom: 16q23.3</p> <p>CDH13 er bl.a. vidt udtrykt i hjernen (Lesch, et al., 2008), og koder for proteinet cadherin 13 (GBG-UCSC, 2013) (Banaschewski, et al., 2010). Cadherin 13 sidder på cellemembranens overflade (GBG-UCSC, 2013), regulerer bl.a. cellemigration og kommunikation imellem celler (Banaschewski, et al., 2010) og er en negativ regulator i forbindelse med udvikling og differencering af axoner (GBG-UCSC, 2013).</p>	<p>Gennavn: Cadherin-N2(CadN2)</p> <p>Kromosom: 2L:17,786,971..17,875,247 [-]</p> <p>Flybase stock nr: 26103</p> <p>Genotype: w[1118]; Mi{ET1}CadN2[MB08260]</p>  <p>Reference: http://flybase.org/reports/FBgn0262018.html</p>

<i>H. sapiens</i>	<i>D. melanogaster</i>
<p>Gennavn: somatostatin receptor 1 (SSTR1)</p> <p>Kromosom: 14q21.1</p> <p>SSTR1 er udtryk i bl.a. hjernen, lunger, mave og tyndtarm, og koder for G-proteinforbundet somatostatinreceptor. Receptoren binder somatostatin, et peptidhormon involveret i regulering af neurotransmission, cellevækst, endokrin signalering og inhibering af mange hormoner og andre sekretoriske proteiner (GBG-UCSC, 2013).</p>	<p>Gennavn: Allatostatin C receptor 1(star1)/(AstC-R1)</p> <p>Kromosom: 3L:18,560,258..18,576,326 [+]</p> <p>Flybase stock nr: 29924</p> <p>Genotype: w[1118]; Mi{ET1}AstC-R1[MB11579]</p>  <p>Reference: http://flybase.org/reports/FBgn0036790.html</p>

<i>H. sapiens</i>	<i>D. melanogaster</i>
<p>Gennavn: solute carrier family 6, member 2 (SLC6A2/NET1)</p> <p>Kromosom: 16q12.2</p> <p>SLC6A2 er vidt udtrykt i hjernen og bl.a. i lunger, sædleder, moderkage og binyre (Ramamoorthy, et al., 2011) (Gizer, et al., 2009) (Torres, et al., 2003). SLC6A2 koder for noradrenalintransporter, som er membranproteiner i den præsynaptiske nervecelle, der reabsorberer noradrenalin og stopper neurotransmissionen (GBG-UCSC, 2013). SLC6A2 er ligeledes involveret i reabsorption af dopamin i præsynaptiske nerveceller (Ramamoorthy, et al., 2011) (Gizer, et al., 2009).</p>	<p>Gennavn: Dopamine transporter (DAT)</p> <p>Kromosom: 2R:16,558,567..16,565,238 [-]</p> <p>Flybase stock nr: 25547</p> <p>Genotype: w[1118]; Mi{ET1}DAT[MB07315]</p>  <p>Link: Reference: http://flybase.org/reports/FBgn0034136.html</p>
<p>Gennavn: solute carrier family 6, member 3 (SLC6A3/DAT1)</p> <p>Kromosom: 5p15.3</p> <p>SLC6A3 er vidt udtrykt i hjernen (Ramamoorthy, et al., 2011) (Gizer, et al., 2009) (Torres, et al., 2003), og bl.a. maven, nyre, bugspytkirtel (Torres, et al., 2003) og lymfocytter (Ramamoorthy, et al., 2011). SLC6A3 koder for dopamintransporter, som er membranproteiner i den præsynaptiske nervecelle, der reabsorberer dopamin og stopper neurotransmissionen (GBG-UCSC, 2013).</p>	

Opdræt af *D. melanogaster* til forsøg

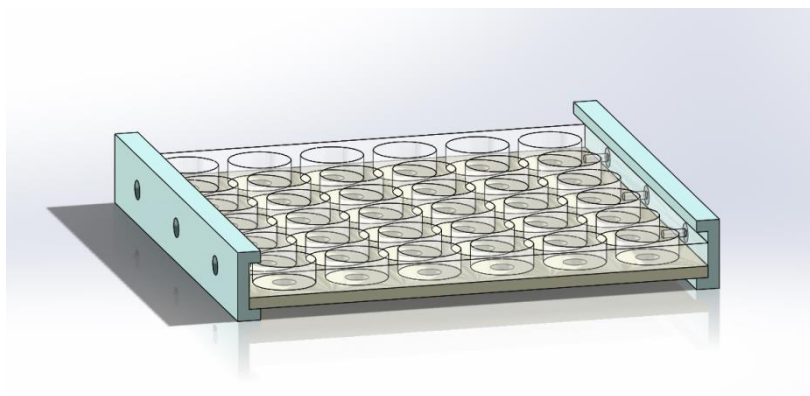
D. melanogaster blev holdt i et klimarum med lyscyklus 16:8 med lys fra kl. 23 til 07 og cirka 27 °C i perioden med lys og cirka 24 °C i perioden med mørke. Den relative luftfugtighed i klimarummet svingede mellem 39 % og 63 % (Appendiks H, s. XXXIII). *D. melanogaster* blev holdt på medie jf. opskrift (Appendiks B, s. VII). For at undgå crowding foregik æglægning af *D. melanogaster* til forsøg under kontrollerede forhold. Der benyttedes 50 *D. melanogaster* med en aldersspredning på 2-5 dage gamle, hvoraf det antages, at kønsfordelingen er 50/50 ved tilfældig udtagning. Disse *D. melanogaster* hanner og hunner blev overført til 175 ml rør med 35-36 gram medie, hvor de lagde æg i 14-18 timer. Derefter blev *D. melanogaster* slået ud og rørene blev forsynet med et stykke foldet bordpapir (Elefantpapir) cirka 50x60 mm for at øge overfladen, hvorpå *D. melanogaster* larver kunne forpuppe sig. Hanner og hunner blev separeret indenfor 24 timer efter klækningen fra puppe. Til arena- og labyrinthforsøgene benyttedes udelukkende *D. melanogaster* hanner i en alder af 2-4 dage med en maksimal aldersspredning på 24 timer. Efter klækning og indtil forsøg blev hannerne holdt på 68 ml rør med 14-15 gram medie med 25-35 *D. melanogaster* i hver.

Under opdræt af *D. melanogaster* i 175 ml rør til forsøg, blev der ligeledes udtaget *D. melanogaster* til vejning. Der blev sideløbende opdrættet *D. melanogaster* under samme forhold til bestemmelse af tæthed, samt klækningsprocent fra æg til adult (Appendiks C, s. IX).

Forsøg

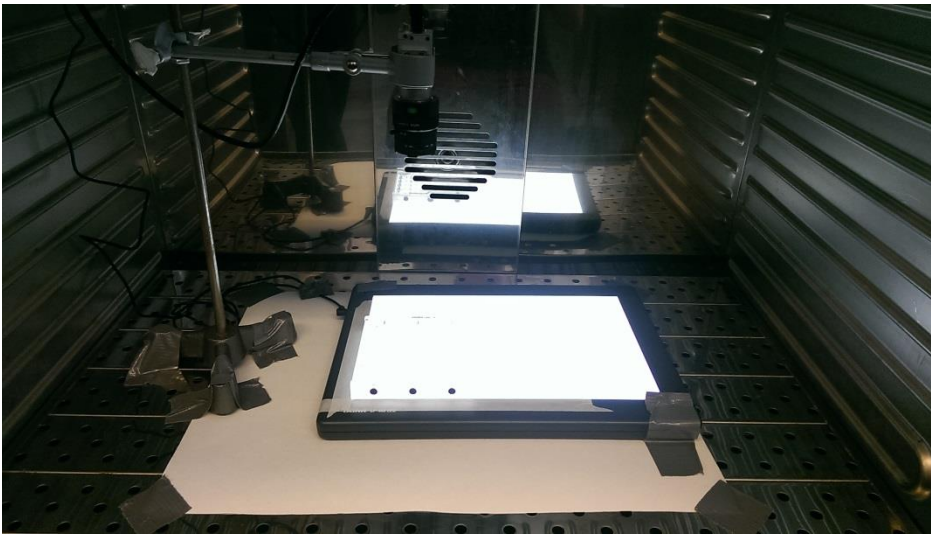
Arena

Formålet med forsøget var at undersøge aktiviteten hos *D. melanogaster* med forskellige potentielle ADHD risikogener slået ud ved at videoptage deres adfærd i arenaen (Figur 9) (Appendiks D, s. XIII).



Figur 9 Arena med 36 brønde til aktivitetmåling af *Drosophila melanogaster*.

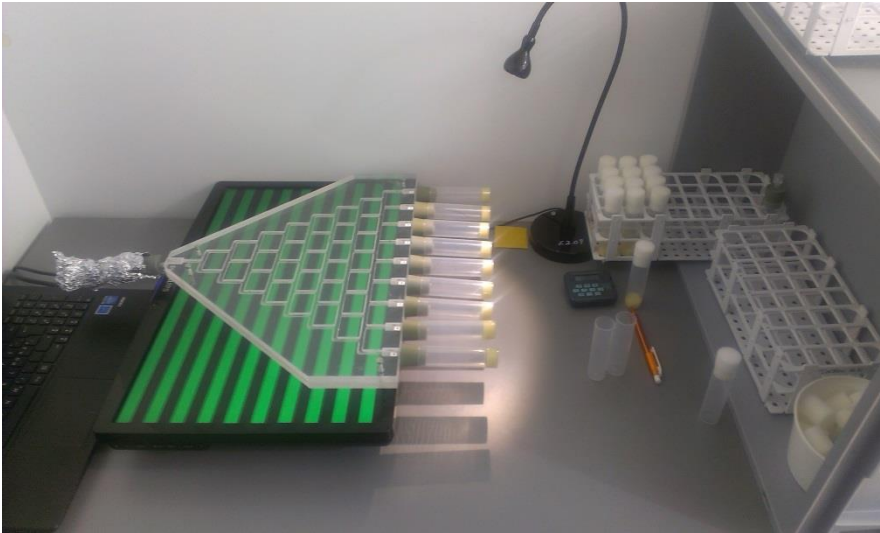
Der blev testet 14 forskellige *D. melanogaster* minuslinjer med Flybase stock nr. 23767, 24213, 24228, 24283, 24240, 24687, 25509, 25518, 25519, 25547, 26103, 27790, 29073, 29924 mod *D. melanogaster* minuslinje med Flybase stock nr. 5905 som kontrol. Der blev testet 54 kontrol *D. melanogaster* hanner og 54 mutant *D. melanogaster* hanner for hver minuslinje fordelt på tre replikater. Hver *D. melanogaster* blev overført til hver sin brønd i arenaen hvorefter aktiviteten i arenaen blev målt ved videooptagelse i fem minutter med to samples registreret per sekund (Figur 10). Forsøgene forløb ved 25 °C i et varmeskab. Videokameraet var tilkoblet en computer med programmet EthoVision XT 10 base fra Noldus (Appendiks E, s. XV), som registrerede tilbagelagt distance, distance til centerpunkt og rotation.



Figur 10 Forsøgsopstilling til arenaforsøg i varmeskab ved 25 °C.

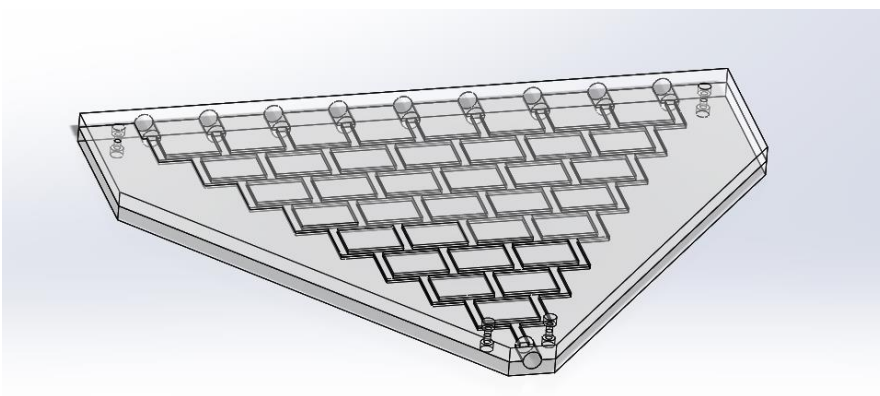
Labyrint

Formålet med forsøget var at undersøge koncentrationsevnen hos *D. melanogaster* med forskellige potentielle ADHD risikogener slået ud ved at teste, hvor hurtigt de fandt igennem en labyrint med en heterogen forstyrrelse sammenholdt med en labyrint med en homogen forstyrrelse (Appendiks F, s. XXV). Den homogene forstyrrelse var et grønt skærbillede og den heterogene forstyrrelse var en video med rullende sorte og grønne striber.



Figur 11 Forsøgsopstilling til labyrintforsøg uden spejl. På skærbilledet er den heterogene forstyrrelse vist.

Der blev testet 14 forskellige *D. melanogaster* minoslinjer med Flybase stock nr. 23767, 24213, 24228, 24283, 24240, 24687, 25509, 25518, 25519, 25547, 26103, 27790, 29073, 29924 mod *D. melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 5905 som kontrol. Forud for forsøget blev *D. melanogaster* hannerne overført til rør med agar og sultet i cirka to timer, hvorefter de blev farvet med to forskellige fluorescerende mikrostøvfårver, for at kunne skelne imellem kontrol og minoslinje i labyrinten. Der blev testet 180 ± 11 kontrol *D. melanogaster* hanner og 180 ± 8 mutant *D. melanogaster* hanner for hver minoslinje. Forsøget udgjorde tre replikater, der hver forløb i 60 minutter. Der blev hvert andet minut registreret, hvor mange *D. melanogaster* der var kommet igennem de to labyrinter (Figur 12). Forsøgene forløb i et 25 °C klimarum. Temperaturen i labyrinterne under forsøgsperioden formodedes at ligge på minimum 24,1 °C og maksimum 29,1 °C i replikat 1, minimum 25,6 °C og maksimum 30,6 °C i replikat 2 og minimum 26,1 °C og maksimum 30,6 °C i replikat 3 (Appendiks G, s. XXIX).



Figur 12 Arbejdsstegning af labyrinten, designet er inspireret af (van Swinderen & Flores, 2007) (Toma, et al., 2002).

Statistiske analyser

Arena

Data for total tilbagelagt distance i mm, total distance til center i mm og frekvensen af rotationer lagt sammen for både med og imod uret blev eksporteret fra EthoVision til Excel. For hvert replikat blev gennemsnittet beregnet for både kontrol *D. melanogaster* og mutant *D. melanogaster*, samt standardafvigelse og standardfejl. Forskellen på gennemsnittet for kontrol *D. melanogaster* og gennemsnittet for mutant *D. melanogaster* blev for hvert replikat testet ved en two-tailed paired *t*-test.

Labyrint

Antallet af kontrol *D. melanogaster* og mutant *D. melanogaster*, der var kommet igennem labyrinten for hver kørsel, i alt 30 registreringer en for hvert andet minut, blev puljet til tre intervaller af hver ti registreringer fra 0-20, 20-40 og 40-60 minutter. Værdien til hvert interval blev omregnet til en ratio for fluer ud:ind. For at korrigere for tilbageløbne *D. melanogaster* fra slutrør til labyrinten blev alle værdier for fluer ind adderet med 1. For to minuslinjer i et replikat var det nødvendigt at korrigere ved at addere 2 og 3 for hhv. 24240 mutant *D. melanogaster*, 1. replikat, stribet skærm og for 25547 kontrol *D. melanogaster*, 2. replikat, grøn skærm. Forskellen på kontrol og mutant (effekten af genetikken) på tværs af skærmene blev testet for hvert tidsinterval på gennemsnittet af ratioen fluer ud:ind for kontrol *D. melanogaster* og for mutant *D. melanogaster* ved en two-tailed Welch's *t*-test. Forskellen på kontrol og mutant inden for skærmtypene blev testet på de to gennemsnit for ratioen kontrol:mutant for hver skærm for hvert tidsinterval ved en two-tailed Welch's *t*-test.

Bonferroni

For at korrigere for resultater, der ved tilfældigheder viste signifikante resultater pga. af den store mængde *t*-tests, der blev udført på datasættet, blev dataene korrigeret ved hjælp af en Bonferroni korrektion, hvorved en ny grænseværdi (α^*) for hvornår *p*-værdien antages at vise, at forskellen er signifikant, blev beregnet, hvor α er det nuværende værdi på 0,05 og *n* er antallet af tests (Rice, 1989) (Whitlock & Schluter, 2009):

$$\alpha^* = \frac{\alpha}{n}$$

Resultater

Opdræt af *D. melanogaster* til forsøg

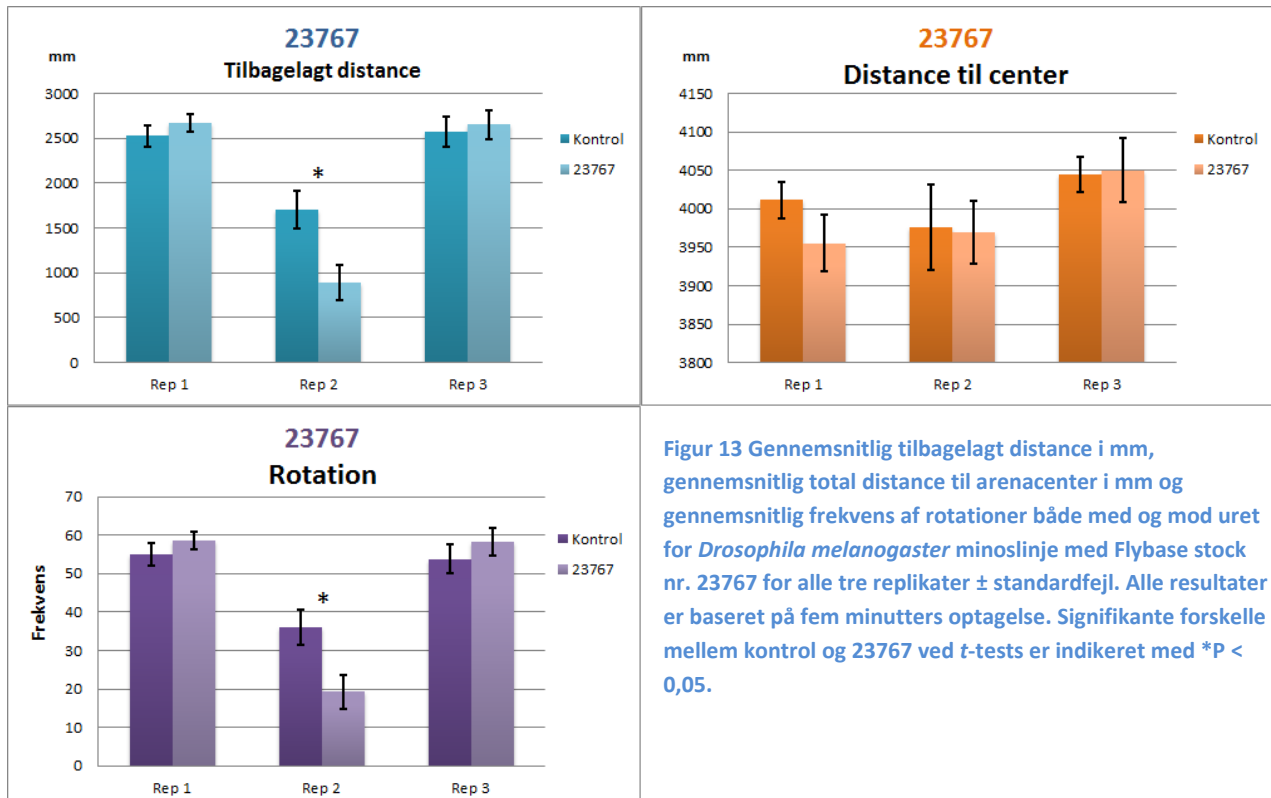
Minoslinjer med Flybase stock nr. 24240, 24687 og 25519 havde en signifikant lavere vægt end kontrollen, hvoraf de to førstnævnte minoslinjer havde en p -værdi mindre end 0,05 og sidstnævnte havde en p -værdi mindre end 0,001. Minoslinjer med Flybase stock nr. 25509, 25518 og 29073 havde en signifikant højere vægt end kontrollen med en p -værdi mindre end 0,05. Minoslinjer med Flybase stock nr. 23767 og 25547 havde en signifikant højere klækningsprocent end kontrollen med en p -værdi mindre end 0,05 (Tabel 4). Der var ingen signifikante forskelle mellem minoslinjer og kontroller for tætheden (Appendiks C, s. IX).

Tabel 4 Oversigt over signifikante forskelle mellem kontrol og minoslinje for vægt og klækningsprocent fra æg til adult.
* $p < 0,05$ og *** $p < 0,001$.

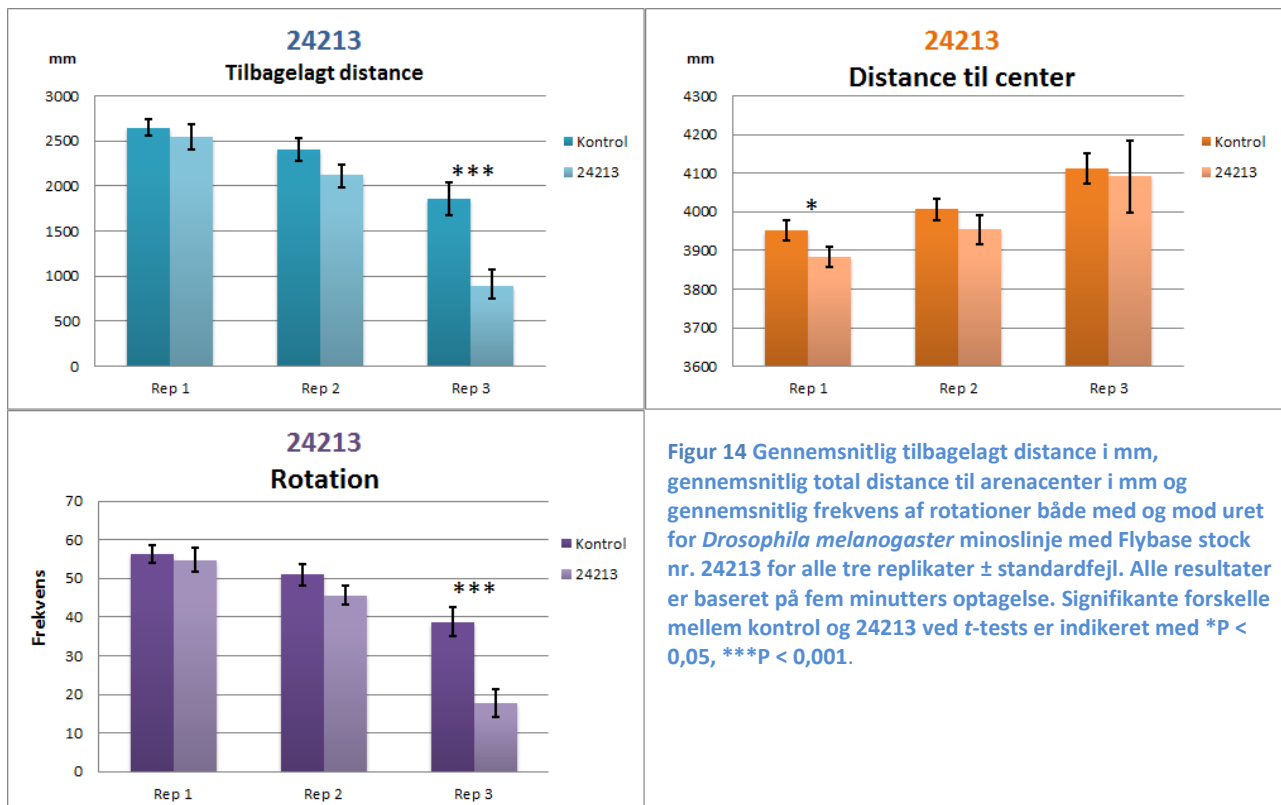
Flybase stock nr.	Vægt	Klækningsprocent fra æg til adult
25519	***	
24240	*	
24687	*	
25509	*	
25518	*	
29073	*	
23767		*
25547		*

Arena

D. melanogaster minoslinje med Flybase stock nr. 23767 svarende til det humane kandidatgen SPOCK3 var signifikant lavere end kontrollen i andet replikat for den totale tilbagelagte distance og for frekvensen af rotationer. Der var ingen signifikant forskel i de resterende replikater eller for den totale distance til arenaens center. Der var ingen øvrig tendens i, hvorvidt kontrollen eller minoslinjen havde tilbagelagt den længste distance, roteret flest gange eller havde bevæget sig mest henover midten (Figur 13).



D. melanogaster minoslinje med Flybase stock nr. 24213 svarende til det humane kandidatgen DDC var signifikant lavere end kontrollen i det tredje replikat for den totale tilbagelagte distance og for frekvensen af rotationer med en p -værdi under 0,001. Der var signifikant forskel i første replikat for den totale afstand til arenaens center, hvor minoslinjen var signifikant lavere end kontrollen. For alle variabler havde kontrollen en højere værdi end minoslinjen i alle øvrige replikater. Den tilbagelagte distance og frekvensen af rotationer er faldende for hvert replikat, mens den totale distance til arenaens center var stigende for hvert replikat (Figur 14).

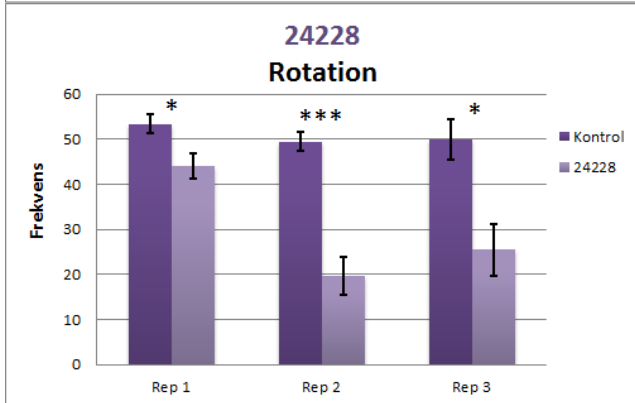
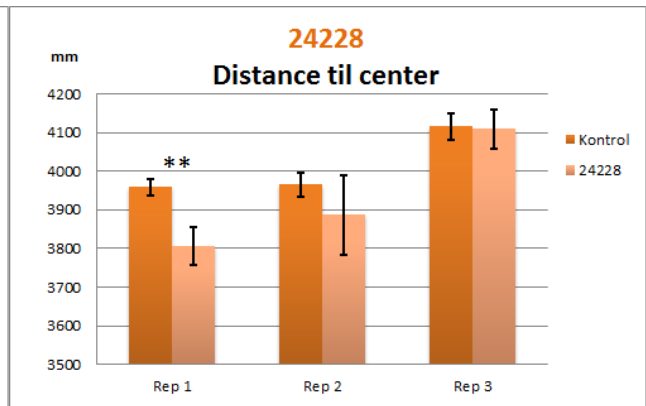
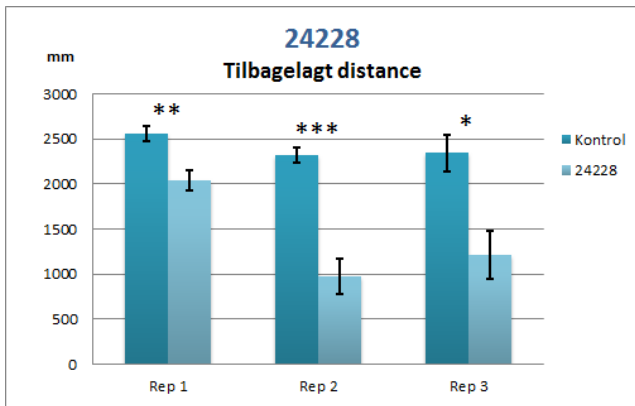


Figur 14 Gennemsnitlig tilbagelagt distance i mm, gennemsnitlig total distance til arenacenter i mm og gennemsnitlig frekvens af rotationer både med og mod uret for *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 24213 for alle tre replikater \pm standardfejl. Alle resultater er baseret på fem minutters optagelse. Signifikante forskelle mellem kontrol og 24213 ved *t*-tests er indikeret med * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$.

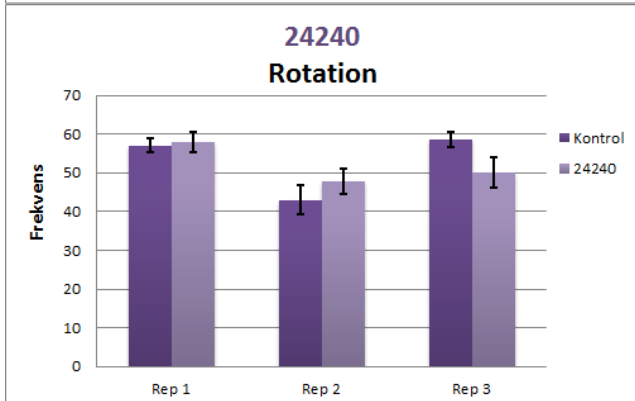
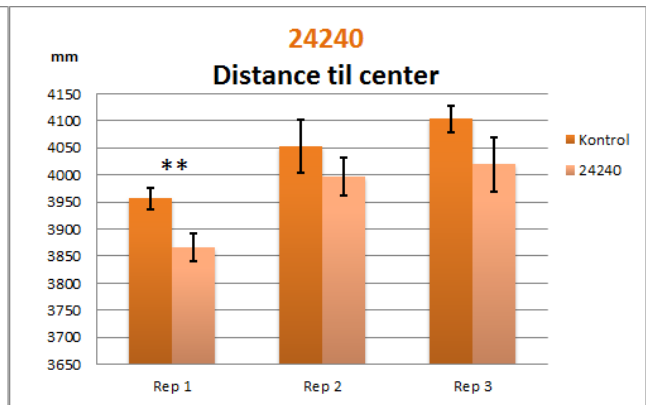
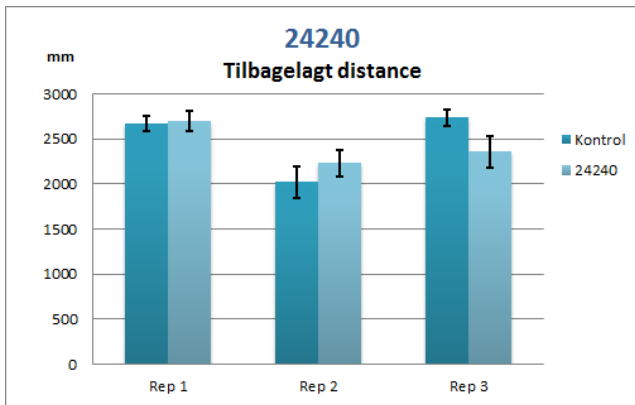
D. melanogaster minoslinje med Flybase stock nr. 24228 svarende til det humane kandidatgen PRKG1 var signifikant lavere end kontrollen i alle tre replikater for den totale tilbagelagte distance og frekvensen af rotationer. Det andet replikat for begge disse variabler havde en *p*-værdi under 0,001 og det første replikat havde en *p*-værdi for tilbagelagt distance under 0,01. For den totale distance til arenaens center var minoslinjen signifikant lavere end kontrollen i det første replikat med en *p*-værdi under 0,01 (Figur 15).

D. melanogaster minoslinje med Flybase stock nr. 24240 svarende til det humane kandidatgen HTR1B var signifikant lavere end kontrollen i første replikat for den totale distance til arenaens center og for alle øvrige replikater havde minoslinjen ligeledes en lavere værdi end kontrollen. For de øvrige variabler var der ingen tendens replikaterne imellem eller signifikans i forskellen mellem minoslinje og kontrol (Figur 16).

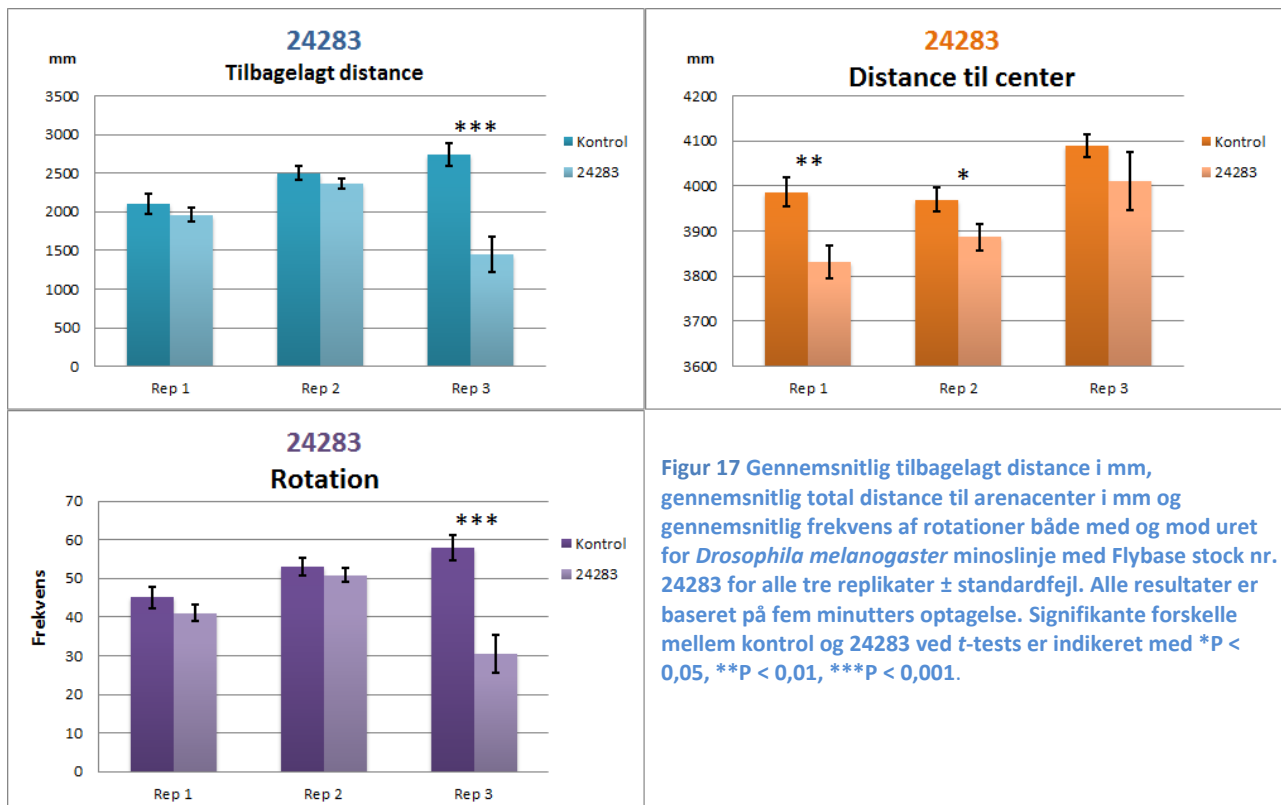
D. melanogaster minoslinje med Flybase stock nr. 24283 svarende til det humane kandidatgen NOS1 var signifikant lavere end kontrollen i tredje replikat for den totale tilbagelagte distance og for frekvensen af rotationer med en *p*-værdi under 0,001. For den totale distance til arenaens center var der signifikante forskelle i første og andet replikat med en *p*-værdi på under hhv. 0,01 og 0,05, hvor minoslinjen var lavere. For alle øvrige variabler og replikater havde minoslinjen en lavere værdi end kontrollen (Figur 17).



Figur 15 Gennemsnitlig tilbagelagt distance i mm, gennemsnitlig total distance til arencenter i mm og gennemsnitlig frekvens af rotationer både med og mod uret for *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 24228 for alle tre replikater ± standardfejl. Alle resultater er baseret på fem minutters optagelse. Signifikante forskelle mellem kontrol og 24228 ved t-tests er indikeret med *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.



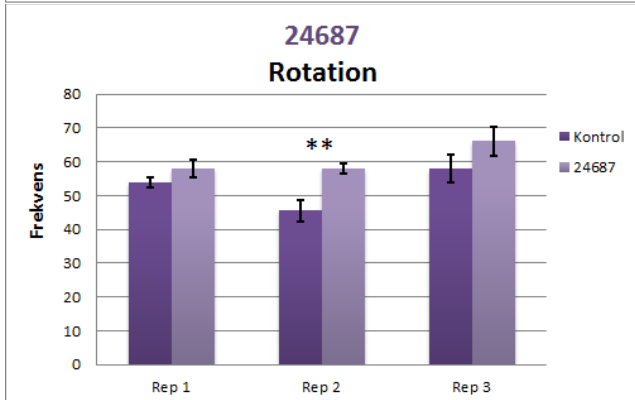
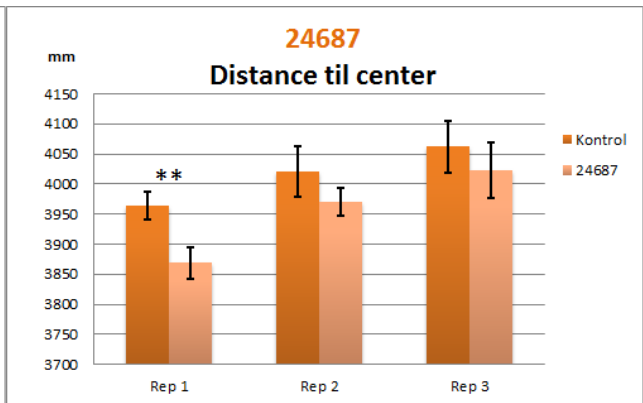
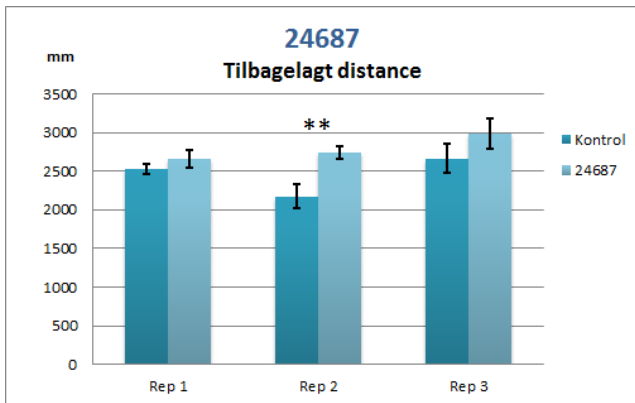
Figur 16 Gennemsnitlig tilbagelagt distance i mm, gennemsnitlig total distance til arencenter i mm og gennemsnitlig frekvens af rotationer både med og mod uret for *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 24240 for alle tre replikater ± standardfejl. Alle resultater er baseret på fem minutters optagelse. Signifikante forskelle mellem kontrol og 24240 ved t-tests er indikeret med **P < 0,01.



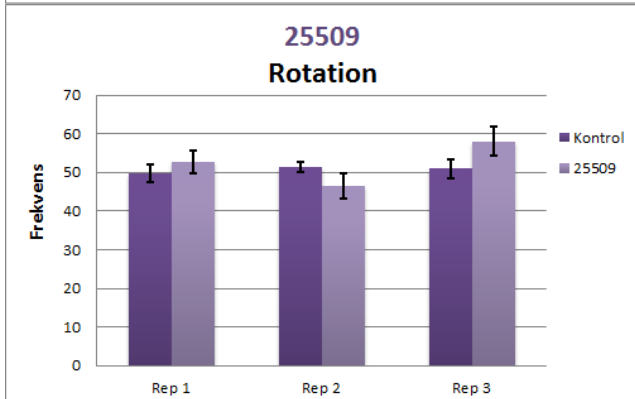
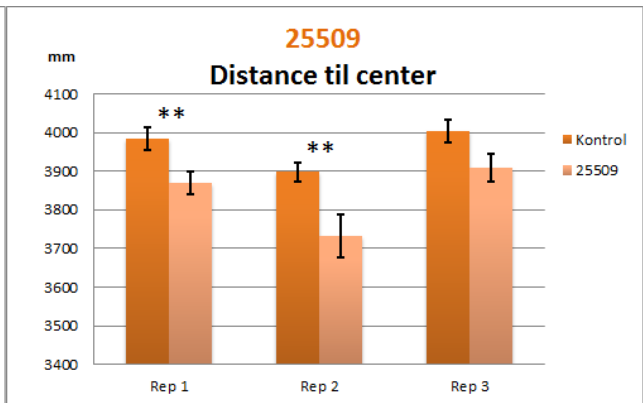
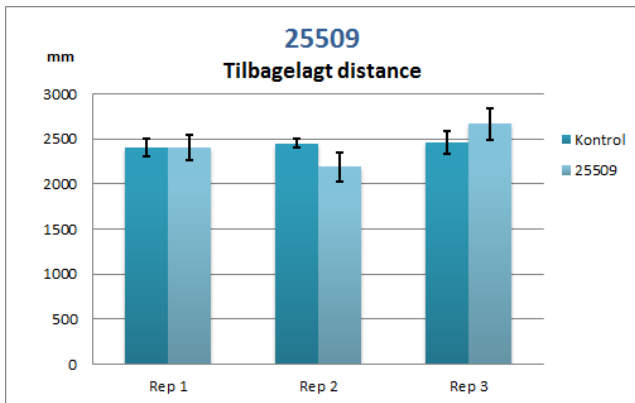
Figur 17 Gennemsnitlig tilbagelagt distance i mm, gennemsnitlig total distance til arenacenter i mm og gennemsnitlig frekvens af rotationer både med og mod uret for *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 24283 for alle tre replikater \pm standardfejl. Alle resultater er baseret på fem minutters optagelse. Signifikante forskelle mellem kontrol og 24283 ved t-tests er indikeret med * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

D. melanogaster minoslinje med Flybase stock nr. 24687 svarende til det humane kandidatgen TMX3 og kontrollen var signifikant forskellige i et replikat i for hver variabel med en p -værdi under 0,01. For den totale tilbagelagte distance og frekvensen af rotationer havde minoslinjen i alle replikater en højere værdi end kontrollen, men det omvendte gjorde sig gældende for den totale distance til arenaens center (Figur 18).

D. melanogaster minoslinje med Flybase stock nr. 25509 svarende til det humane kandidatgen ALK var signifikant lavere end kontrollen i første og andet replikat for den totale distance til arenaens center med en p -værdi under 0,01 og for tredje replikat var minoslinjen ligeledes lavere end kontrollen. For den totale tilbagelagte distance og frekvensen af rotationer var der hverken signifikans eller tendens i forskellen mellem kontrol og linje replikaterne imellem (Figur 19).

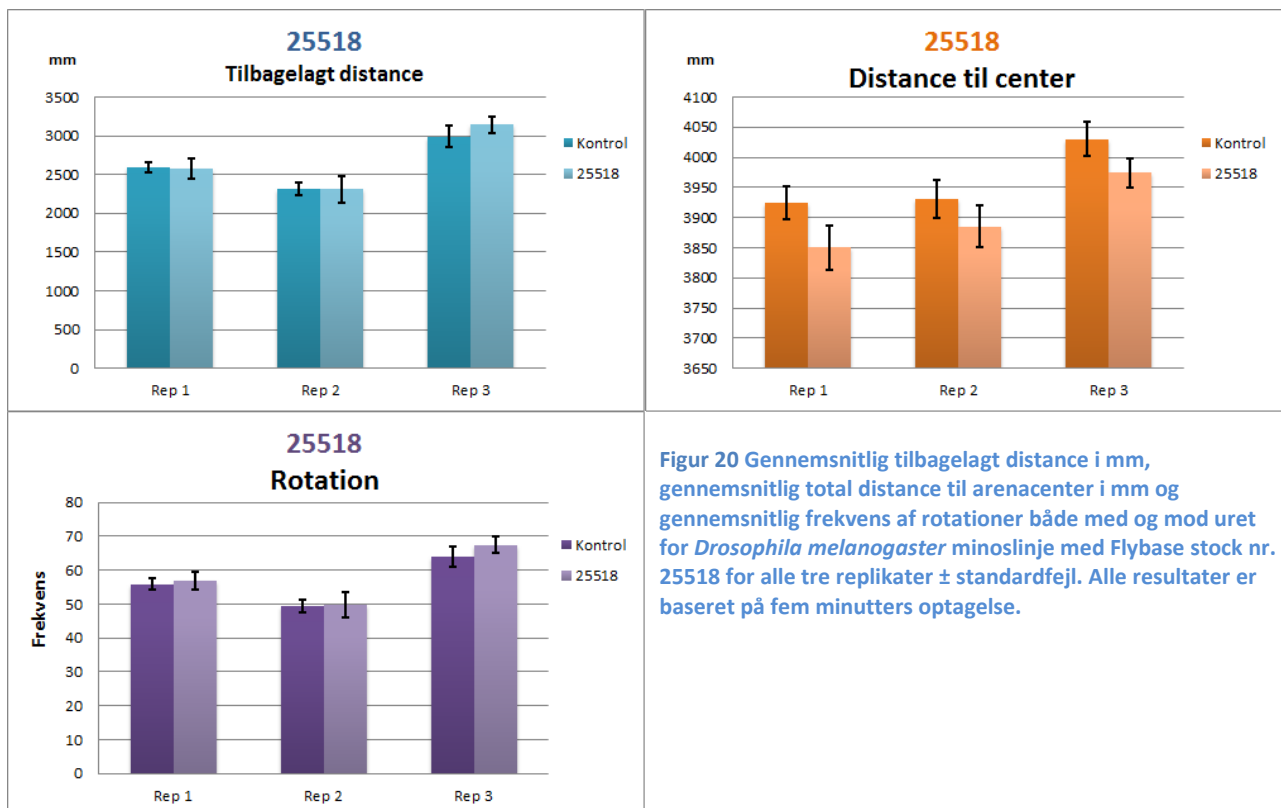


Figur 18 Gennemsnitlig tilbagelagt distance i mm, gennemsnitlig total distance til arenacenter i mm og gennemsnitlig frekvens af rotationer både med og mod uret for *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 24687 for alle tre replikater \pm standardfejl. Alle resultater er baseret på fem minutters optagelse. Signifikante forskelle mellem kontrol og 24687 ved t-tests er indikeret med $**P < 0,01$.



Figur 19 Gennemsnitlig tilbagelagt distance i mm, gennemsnitlig total distance til arenacenter i mm og gennemsnitlig frekvens af rotationer både med og mod uret for *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 25509 for alle tre replikater \pm standardfejl. Alle resultater er baseret på fem minutters optagelse. Signifikante forskelle mellem kontrol og 25509 ved t-tests er indikeret med $**P < 0,01$.

D. melanogaster minoslinje med Flybase stock nr. 25518 svarende til humane kandidatgen *FURIN* og kontrollen var ikke signifikant forskellige i nogen af replikaterne for hverken den totale tilbagelagte distance, den totale distance til arenaens center eller frekvensen af rotationer (Figur 20).



Figur 20 Gennemsnitlig tilbagelagt distance i mm, gennemsnitlig total distance til arenacenter i mm og gennemsnitlig frekvens af rotationer både med og mod uret for *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 25518 for alle tre replikater ± standardfejl. Alle resultater er baseret på fem minutters optagelse.

D. melanogaster minoslinje med Flybase stock nr. 25519 svarende til det humane kandidatgen *CHRNA7* var signifikant lavere end kontrollen i første og andet replikat for den totale tilbagelagte distance og for frekvensen af rotationer med en p -værdi under 0,001 og i tredje replikat var minoslinjen ligeledes lavere end kontrollen. For den totale distance til arenaens center var der ingen tendens replikaterne imellem eller signifikans i forskellen mellem kontrol og minoslinje (Figur 21).

D. melanogaster minoslinje med Flybase stock nr. 25547, svarende til de humane kandidatgener *SLC6A2* og *SLC6A3* var signifikant lavere end kontrollen i alle replikater for den totale tilbagelagte distance og for frekvensen af rotationer med en p -værdi under 0,001. For den totale distance til arenaens center var kontrollen signifikant lavere end minoslinjen i det første replikat med en p -værdi under 0,01 og for de to øvrige replikater var kontrollen ligeledes lavere end minoslinjen (Figur 22).



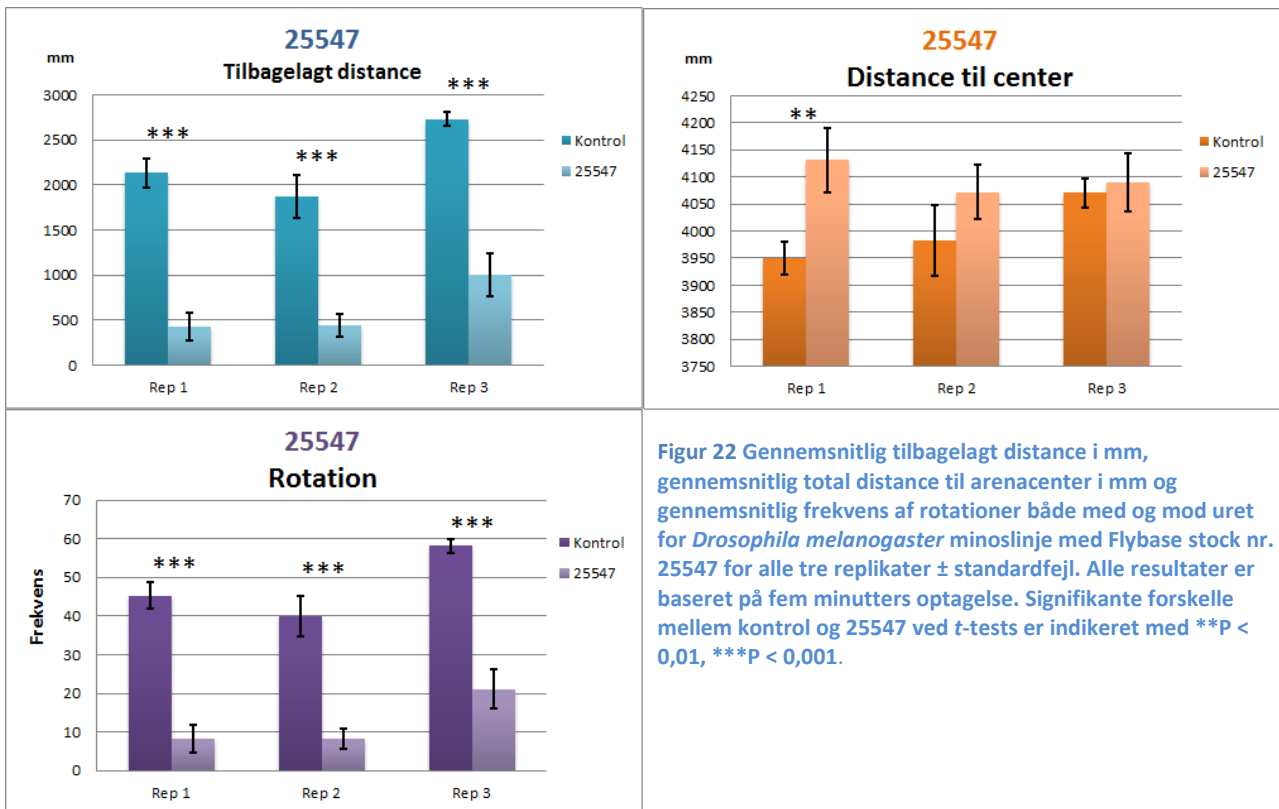
Figur 21 Gennemsnitlig tilbagelagt distance i mm, gennemsnitlig total distance til arenacenter i mm og gennemsnitlig frekvens af rotationer både med og mod uret for *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 25519 for alle tre replikater \pm standardfejl. Alle resultater er baseret på fem minutters optagelse. Signifikante forskelle mellem kontrol og 25519 ved t-tests er indikeret med *** $P < 0,001$.

D. melanogaster minoslinje med Flybase stock nr. 26103 svarende til det humane kandidatgen CDH13 var signifikant lavere end kontrollen i andet replikat for den totale tilbagelagte distance og for frekvensen af rotationer med en p -værdi under hhv. 0,01 og 0,05. For den totale distance til arenaens center var der signifikant forskel i første replikat, hvor minoslinjen var lavere end kontrollen. For de øvrige værdier var der ingen tendens replikaterne imellem eller signifikans i forskellen mellem kontrol og minoslinje (Figur 23).

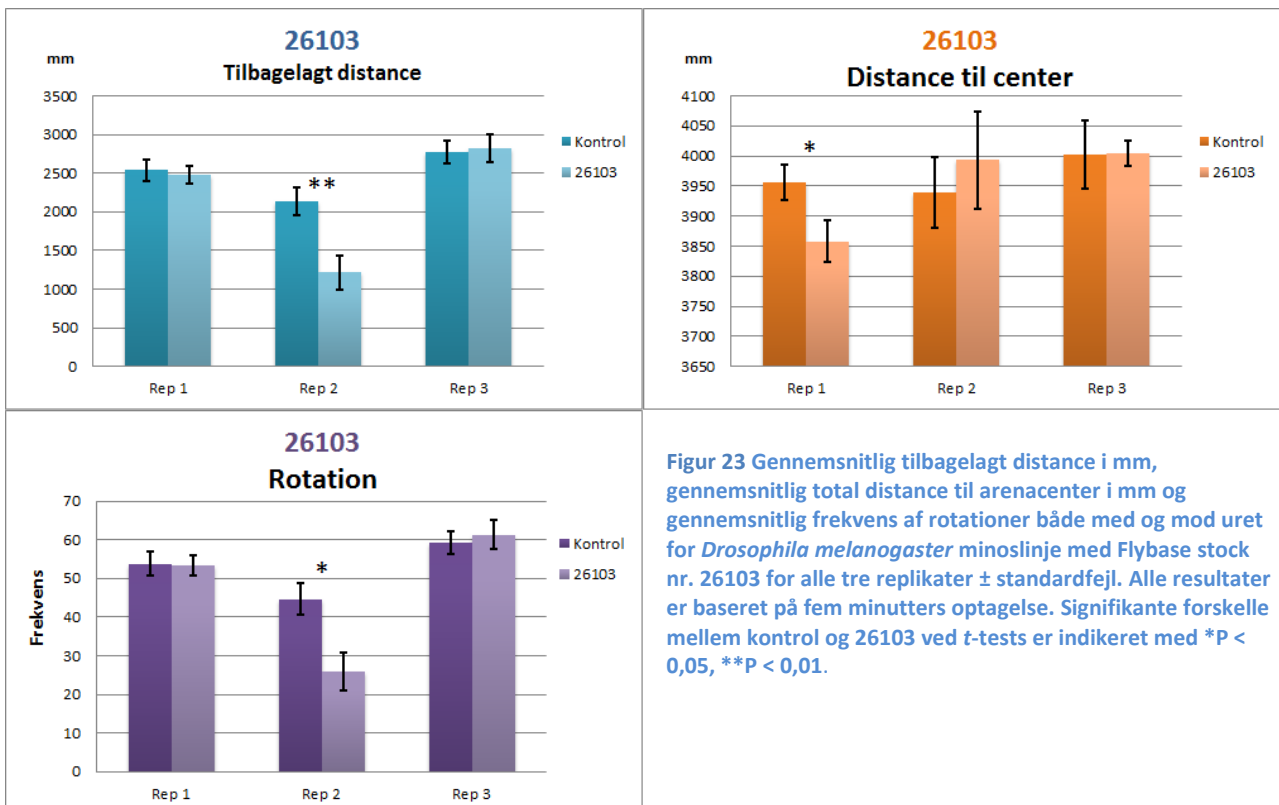
D. melanogaster minoslinje med Flybase stock nr. 27790 svarende til det humane kandidatgen NTM var signifikant lavere end kontrollen i første replikat for den totale tilbagelagte distance og for frekvensen af rotationer med en p -værdi under hhv. 0,01 og 0,05 og i tredje replikat for den totale distance til arenaens center med en p -værdi under 0,05. For alle øvrige variabler og replikater var minoslinjen ligeledes lavere end kontrollen (Figur 25).

D. melanogaster minoslinje med Flybase stock nr. 29073 svarende til det humane kandidatgen KALRN var signifikant lavere end kontrollen i første replikat for den totale distance til arenaens center med en p -værdi under 0,05 og for de to øvrige replikater var minoslinjen ligeledes lavere end kontrollen. I det tredje replikat for den totale tilbagelagte distance og for frekvensen af rotationer var minoslinjen signifikant højere end

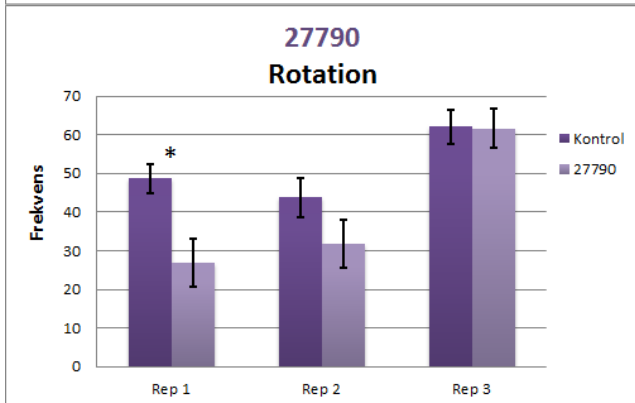
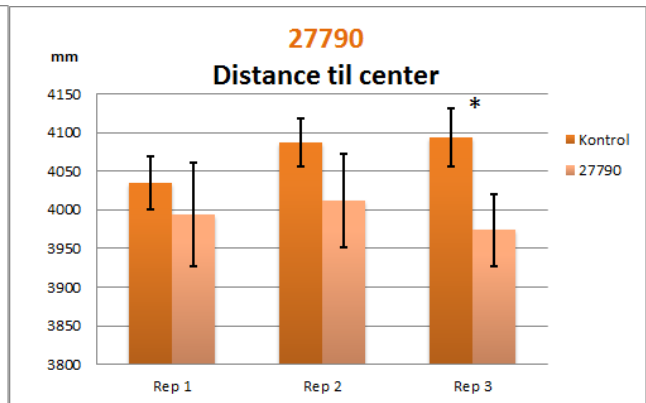
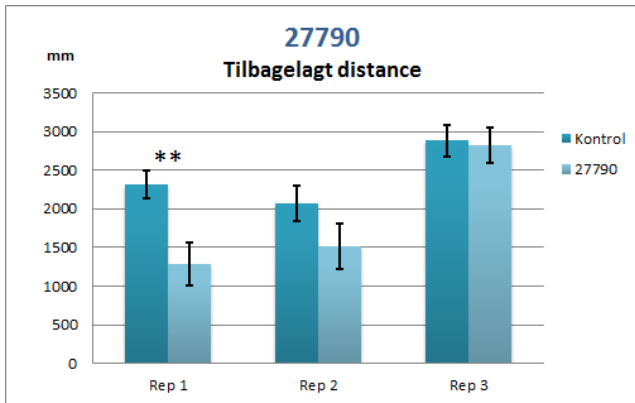
kontrollen med en p -værdi under hhv. 0,05 og 0,01. For den totale tilbagelagte distance var der ingen tendens replikaterne imellem i forskellen mellem kontrol og minoslinje (Figur 24).



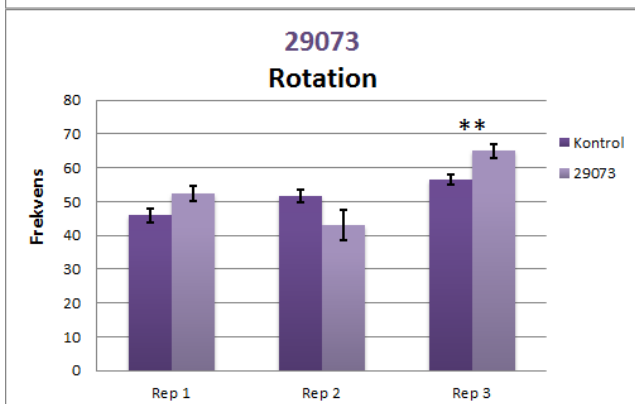
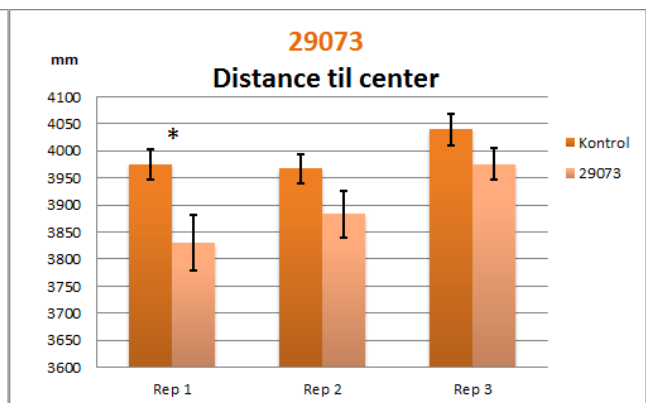
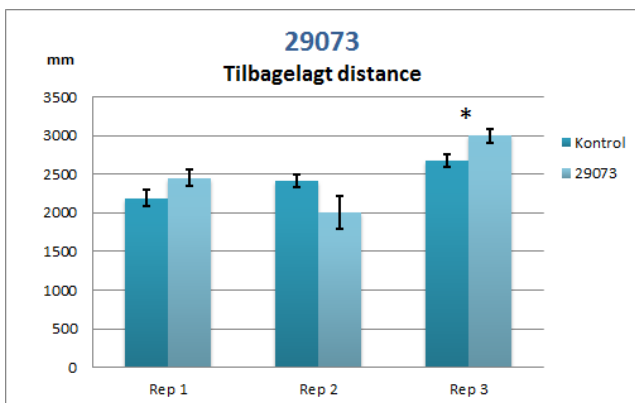
Figur 22 Gennemsnitlig tilbagelagt distance i mm, gennemsnitlig total distance til arenacenter i mm og gennemsnitlig frekvens af rotationer både med og mod uret for *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 25547 for alle tre replikater \pm standardfejl. Alle resultater er baseret på fem minutters optagelse. Signifikante forskelle mellem kontrol og 25547 ved t -tests er indikeret med ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.



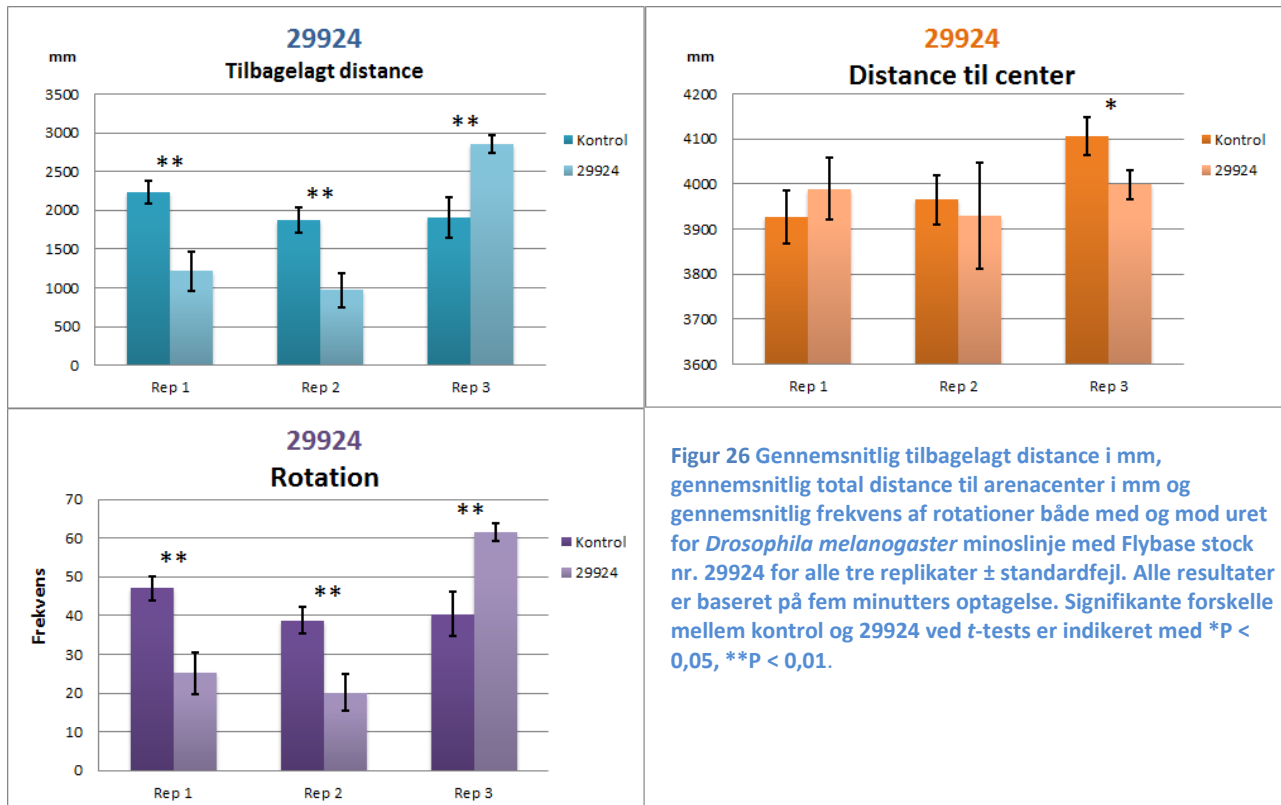
Figur 23 Gennemsnitlig tilbagelagt distance i mm, gennemsnitlig total distance til arenacenter i mm og gennemsnitlig frekvens af rotationer både med og mod uret for *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 26103 for alle tre replikater \pm standardfejl. Alle resultater er baseret på fem minutters optagelse. Signifikante forskelle mellem kontrol og 26103 ved t -tests er indikeret med * $P < 0,05$, *** $P < 0,01$.



Figur 24 Gennemsnitlig tilbagelagt distance i mm, gennemsnitlig total distance til arenacenter i mm og gennemsnitlig frekvens af rotationer både med og mod uret for *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 27790 for alle tre replikater ± standardfejl. Alle resultater er baseret på fem minutters optagelse. Signifikante forskelle mellem kontrol og 27790 ved t-tests er indikeret med *P < 0,05, **P < 0,01.



Figur 25 Gennemsnitlig tilbagelagt distance i mm, gennemsnitlig total distance til arenacenter i mm og gennemsnitlig frekvens af rotationer både med og mod uret for *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 29073 for alle tre replikater ± standardfejl. Alle resultater er baseret på fem minutters optagelse. Signifikante forskelle mellem kontrol og 29073 ved t-tests er indikeret med *P < 0,05, **P < 0,01.

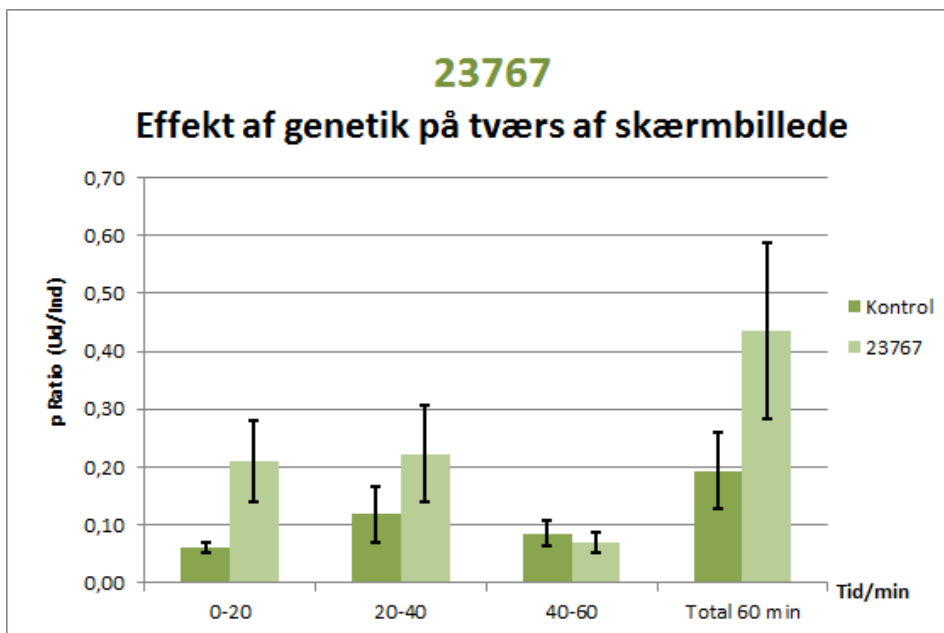


Figur 26 Gennemsnitlig tilbagelagt distance i mm, gennemsnitlig total distance til arenacenter i mm og gennemsnitlig frekvens af rotationer både med og mod uret for *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 29924 for alle tre replikater \pm standardfejl. Alle resultater er baseret på fem minutters optagelse. Signifikante forskelle mellem kontrol og 29924 ved t-tests er indikeret med *P < 0,05, **P < 0,01.

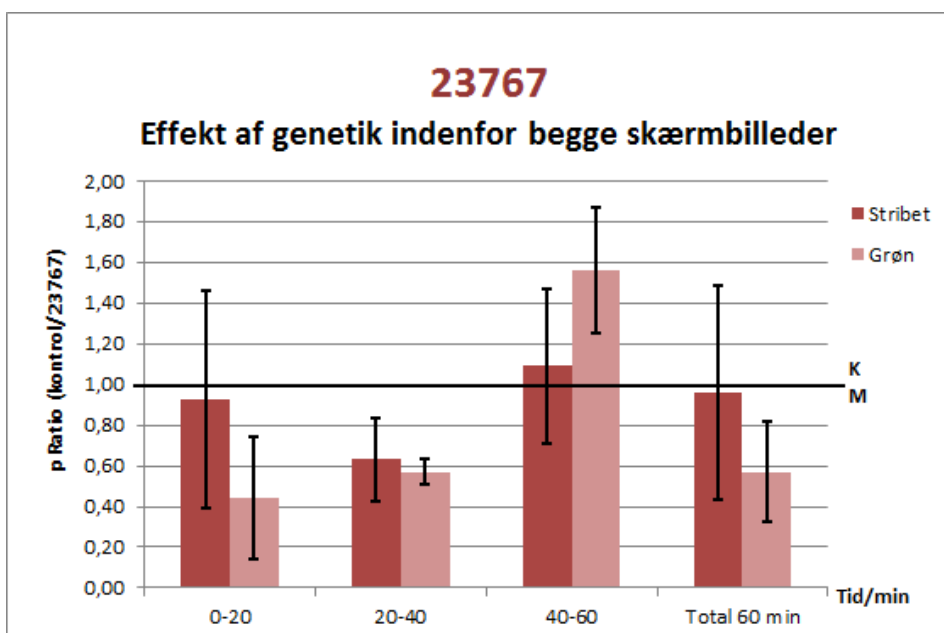
D. melanogaster minoslinje med Flybase stock nr. 29924 svarende til det humane kandidatgen SSTR1 og kontrollen var signifikant forskellige i alle replikater for den totale tilbagelagte distance og for frekvensen af rotationer med en p -værdi under 0,01. I de to første replikater var minoslinjen signifikant lavere end kontrollen og i det sidste replikat var minoslinjen signifikant højere end kontrollen. For den totale distance til arenaens center, var minoslinjen signifikant lavere end kontrollen i det tredje replikat med en p -værdi under 0,05. Der var ingen tendens replikaterne imellem eller forskellen mellem kontrol og minoslinje (Figur 26).

Labyrint

D. melanogaster minoslinje med Flybase stock nr. 23767 svarende til det humane kandidatgen SPOCK3 udviste ikke nogen signifikante forskelle fra kontrollen, hverken på tværs af skærmene (Figur 27) eller inden for begge skærbilleder (Figur 28), inden for nogen af tidsintervallerne. Flest *D. melanogaster* af minoslinje 23767 gennemførte labyrinten i de totale 60 minutter og for begge skærbilleder, hvor det stribede skærbillede havde den højeste ratio. For både kontrol og minoslinje gennemførte under halvdelen af *D. melanogaster* labyrinten.

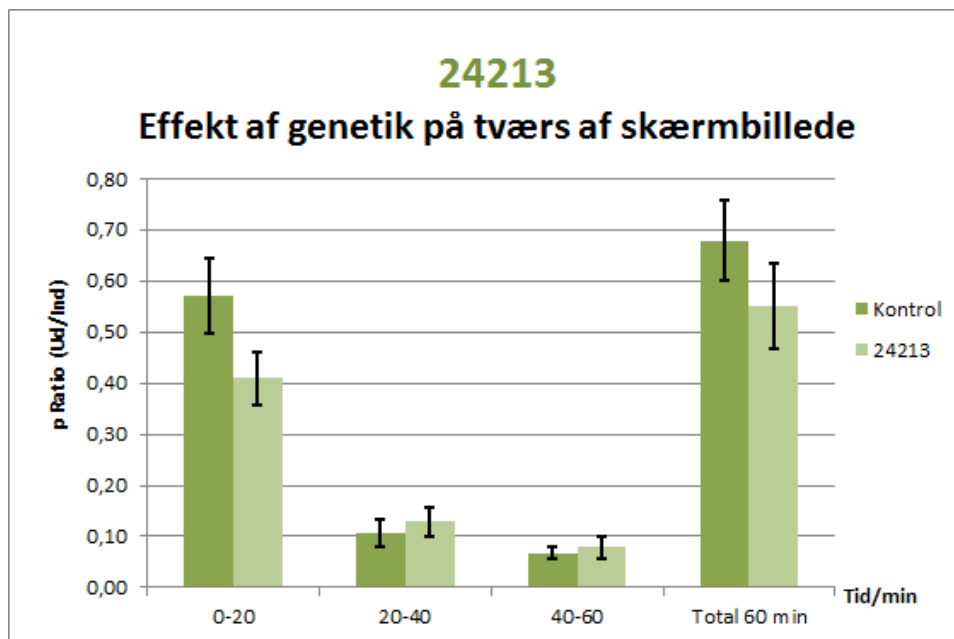


Figur 27 Gennemsnitlig ratio \pm standardfejl af *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 23767, der gennemførte labyrinten i de tre tidsintervaller 0-20, 20-40 og 40-60 min, samt total antal *Drosophila melanogaster*, der nåede igennem labyrinten på 60 min for begge skærbilleder.

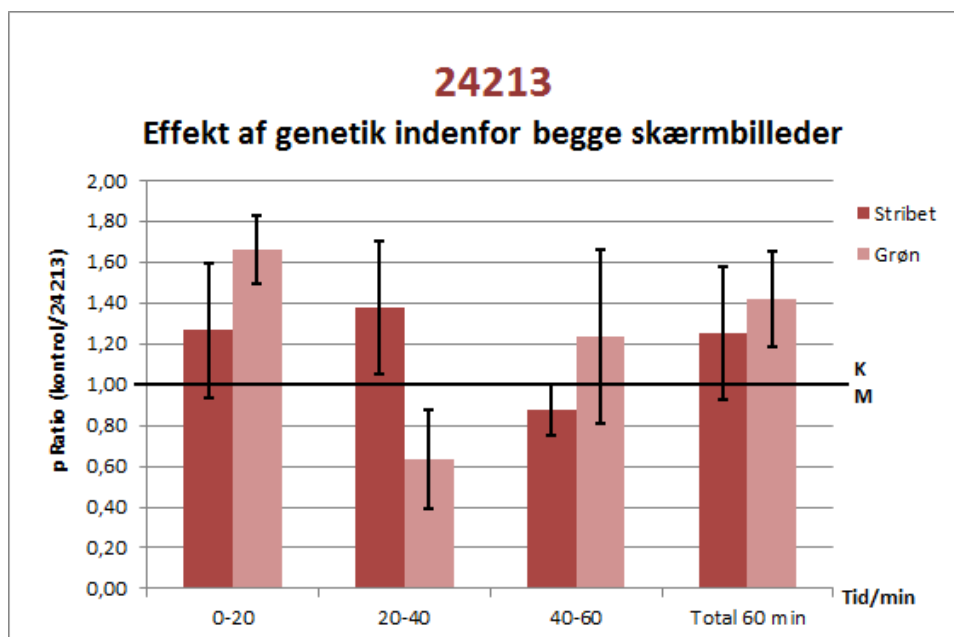


Figur 28 Gennemsnitlig ratio af kontrol relativt til 23767 \pm standardfejl for *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 23767, der gennemførte labyrinten i de tre tidsintervaller 0-20, 20-40 og 40-60 min, samt total antal *Drosophila melanogaster*, der nåede igennem labyrinten på 60 min for det stribede skærbillede og for det grønne skærbillede. Ratioen 1,00 er synliggjort med en fed linje. Hvis ratioen er over et har flest kontroller (K) gennemført labyrinten og hvis ratioen er under et har flest mutanter (M) gennemført labyrinten.

D. melanogaster minoslinje med Flybase stock nr. 24213 svarende til det humane kandidatgen DDC udviste ikke nogen signifikante forskelle fra kontrollen, hverken på tværs af skærmene (Figur 29) eller inden for begge skærbilleder (Figur 30), inden for nogen af tidsintervallerne. Flest kontroller gennemførte labyrinten i de totale 60 minutter og for både kontrol og minoslinje gennemførte flest labyrinten i det første tidsinterval. For begge skærbilleder gennemførte flest kontroller, hvor det grønne skærbillede havde den højeste ratio.

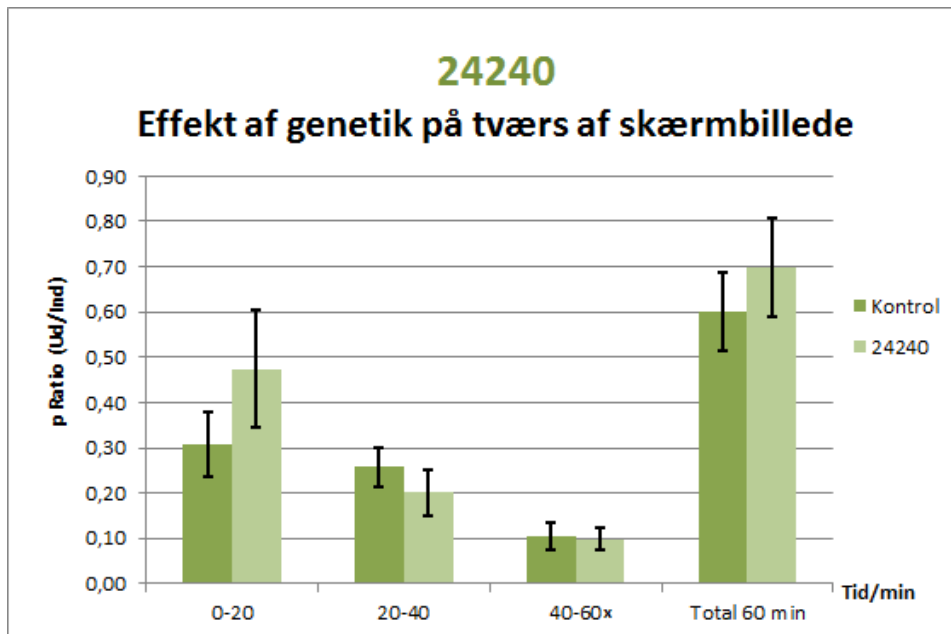


Figur 29 Gennemsnitlig ratio \pm standardfejl af *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 24213, der gennemførte labyrinten i de tre tidsintervaller 0-20, 20-40 og 40-60 min, samt total antal *Drosophila melanogaster*, der nåede igennem labyrinten på 60 min for begge skærbilleder.

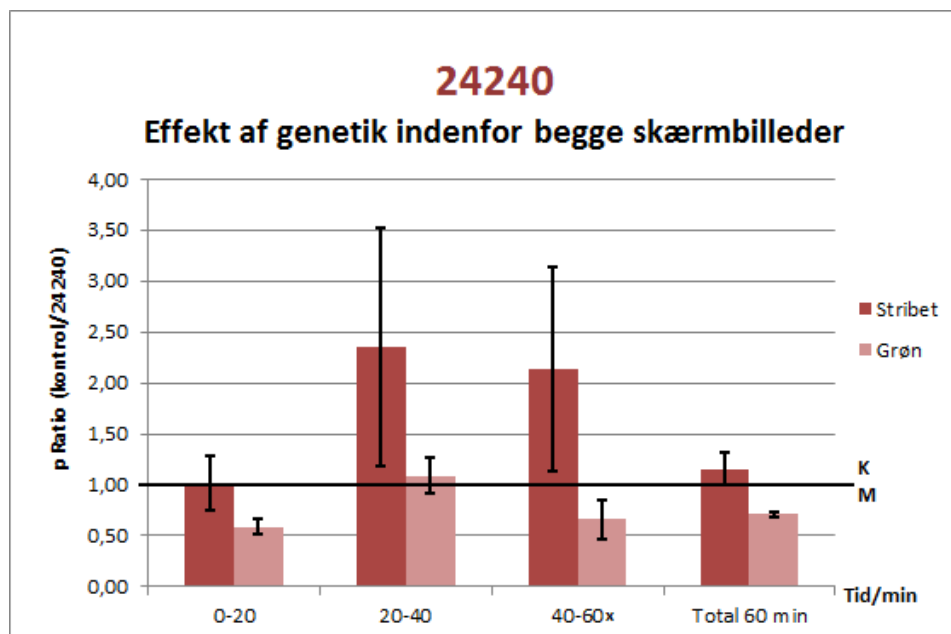


Figur 30 Gennemsnitlig ratio af kontrol relativt til 24213 \pm standardfejl for *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 24213, der gennemførte labyrinten i de tre tidsintervaller 0-20, 20-40 og 40-60 min, samt total antal *Drosophila melanogaster*, der nåede igennem labyrinten på 60 min for det sribede skærbillede og for det grønne skærbillede. Ratioen 1,00 er synliggjort med en fed linje. Hvis ratioen er over et har flest kontroller (K) gennemført labyrinten og hvis ratioen er under et har flest mutanter (M) gennemført labyrinten.

D. melanogaster minoslinje med Flybase stock nr. 24240 svarende til det humane kandidatgen HTR1B udviste ikke nogen signifikante forskelle fra kontrollen, hverken på tværs af skærmene (Figur 31) eller inden for begge skærbilleder (Figur 32), inden for nogen af tidsintervallerne. Flest *D. melanogaster* af minoslinje 24240 gennemførte labyrinten i de totale 60 minutter. Flest *D. melanogaster* af minoslinje 24240 i forhold til kontrollen gennemførte labyrinten med det grønne skærbillede og flest kontroller i forhold til minoslinjen gennemførte labyrinten med det sribede skærbillede.

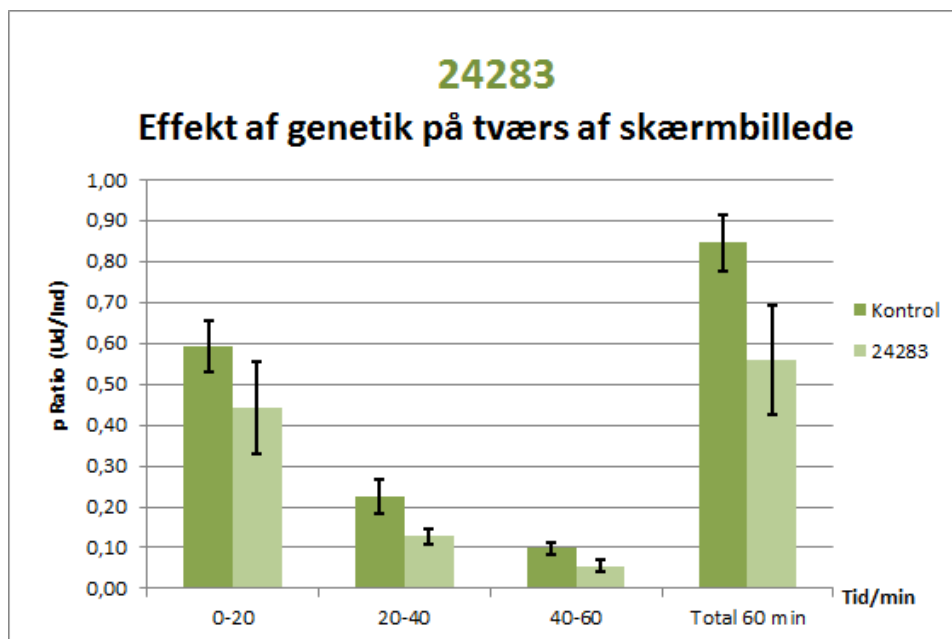


Figur 31 Gennemsnitlig ratio \pm standardfejl af *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 24240, der gennemførte labyrinten i de tre tidsintervaller 0-20, 20-40 og 40-60 min, samt total antal *Drosophila melanogaster*, der nåede igennem labyrinten på 60 min for begge skærbilleder. x: 1. replikat, sribet skærm – 24240 er korrigeret med +2.

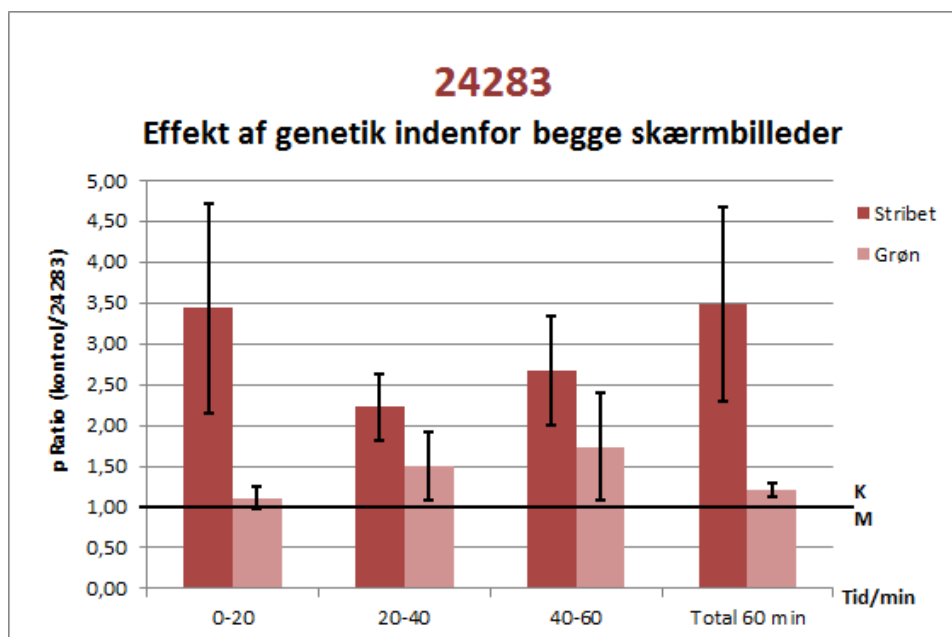


Figur 32 Gennemsnitlig ratio af kontrol relativt til 24240 \pm standardfejl for *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 24240, der gennemførte labyrinten i de tre tidsintervaller 0-20, 20-40 og 40-60 min, samt total antal *Drosophila melanogaster*, der nåede igennem labyrinten på 60 min for det sribede skærbillede og for det grønne skærbillede. Ratioen 1,00 er synliggjort med en fed linje. Hvis ratioen er over et har flest kontroller (K) gennemført labyrinten og hvis ratioen er under et har flest mutanter (M) gennemført labyrinten. x: 1. replikat, sribet skærm – 24240 er korrigeret med +2.

D. melanogaster minoslinje med Flybase stock nr. 24283 svarende til det humane kandidatgen NOS1 udviste ikke nogen signifikante forskelle fra kontrollen, hverken på tværs af skærmene (Figur 33) eller inden for begge skærbilleder (Figur 34), inden for nogen af tidsintervallerne. Flest kontroller gennemførte labyrinten i de totale 60 minutter og i samtlige kørsler både med det sribede og det grønne skærbillede, hvor det sribede skærbillede havde den højeste ratio. Flest *D. melanogaster* gennemførte labyrinten i det første tidsinterval.

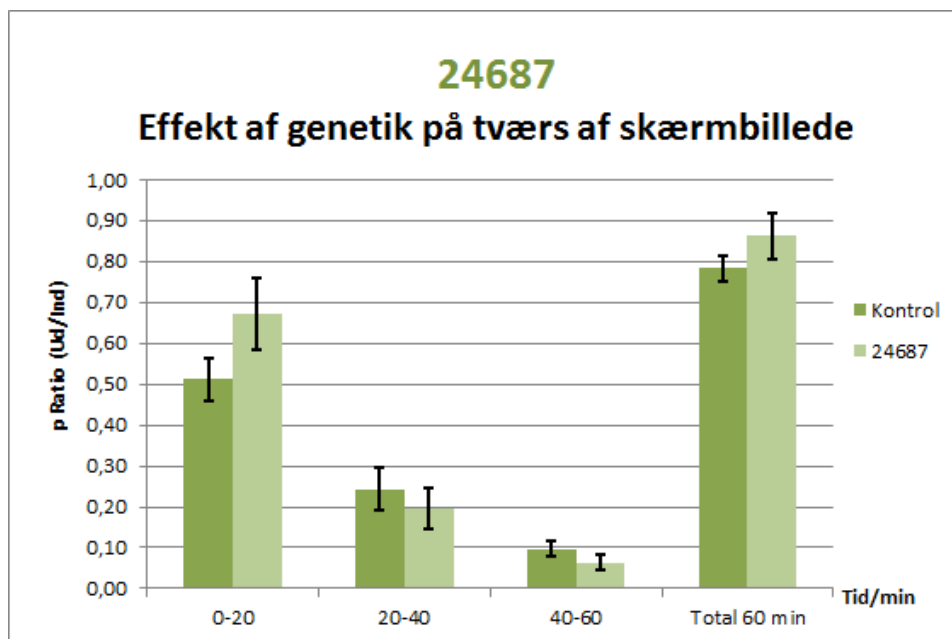


Figur 33 Gennemsnitlig ratio \pm standardfejl af *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 24283, der gennemførte labyrinten i de tre tidsintervaller 0-20, 20-40 og 40-60 min, samt total antal *Drosophila melanogaster*, der nåede igennem labyrinten på 60 min for begge skærbilleder.

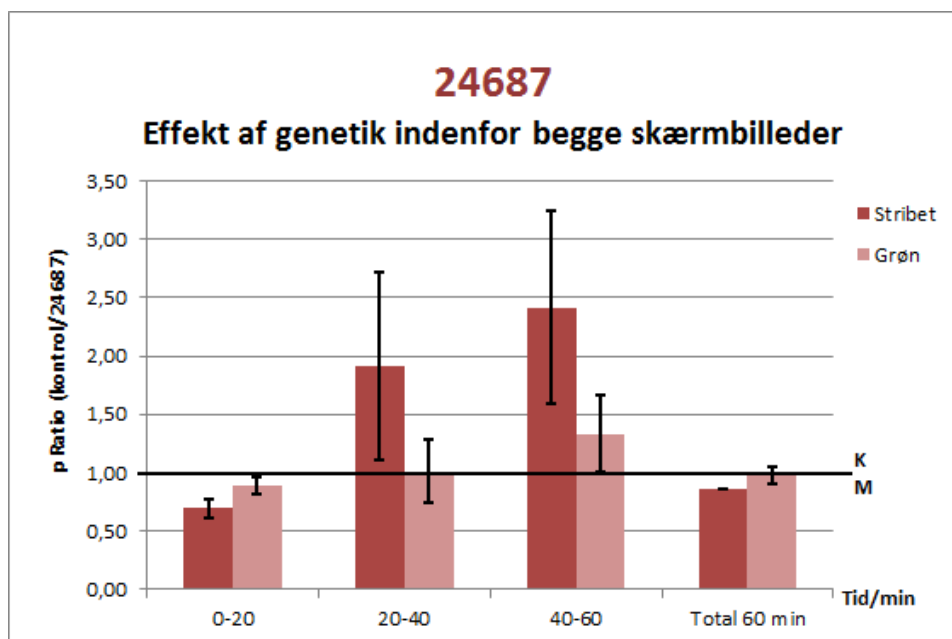


Figur 34 Gennemsnitlig ratio af kontrol relativt til 24283 \pm standardfejl for *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 24283, der gennemførte labyrinten i de tre tidsintervaller 0-20, 20-40 og 40-60 min, samt total antal *Drosophila melanogaster*, der nåede igennem labyrinten på 60 min for det sribede skærbillede og for det grønne skærbillede. Ratioen 1,00 er synliggjort med en fed linje. Hvis ratioen er over et har flest kontroller (K) gennemført labyrinten og hvis ratioen er under et har flest mutanter (M) gennemført labyrinten.

D. melanogaster minoslinje med Flybase stock nr. 24687 svarende til det humane kandidatgen TMX3 udviste ikke nogen signifikante forskelle fra kontrollen, hverken på tværs af skærmene (Figur 35) eller inden for begge skærbilleder (Figur 36), inden for nogen af tidsintervallerne. Flest *D. melanogaster* gennemførte labyrinten i det første tidsinterval og flest *D. melanogaster* af minoslinje 24687 gennemførte labyrinten i de totale 60 minutter og for begge skærbilleder.

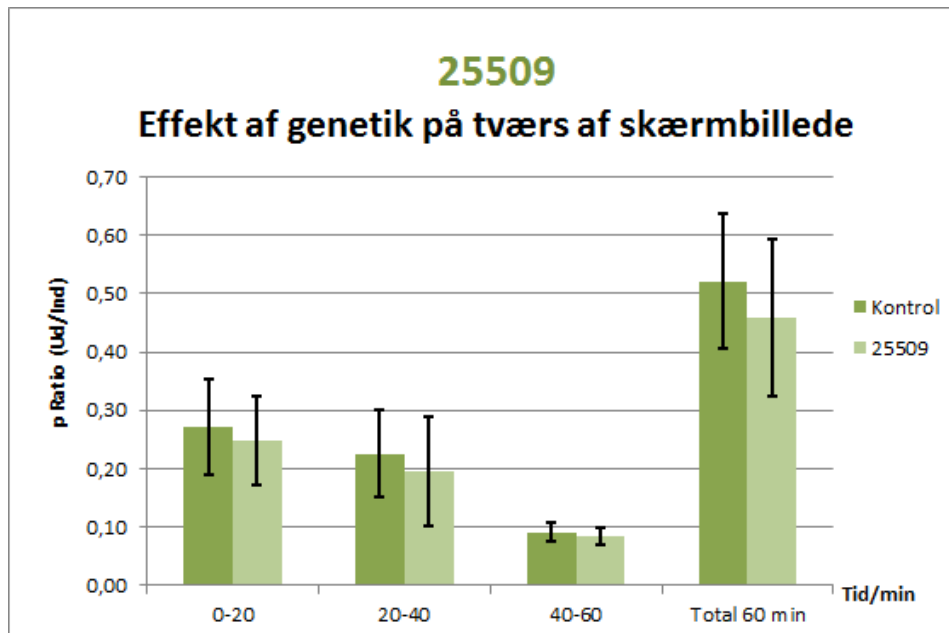


Figur 35 Gennemsnitlig ratio \pm standardfejl af *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 24687, der gennemførte labyrinten i de tre tidsintervaller 0-20, 20-40 og 40-60 min, samt total antal *Drosophila melanogaster*, der nåede igennem labyrinten på 60 min for begge skærbilleder.

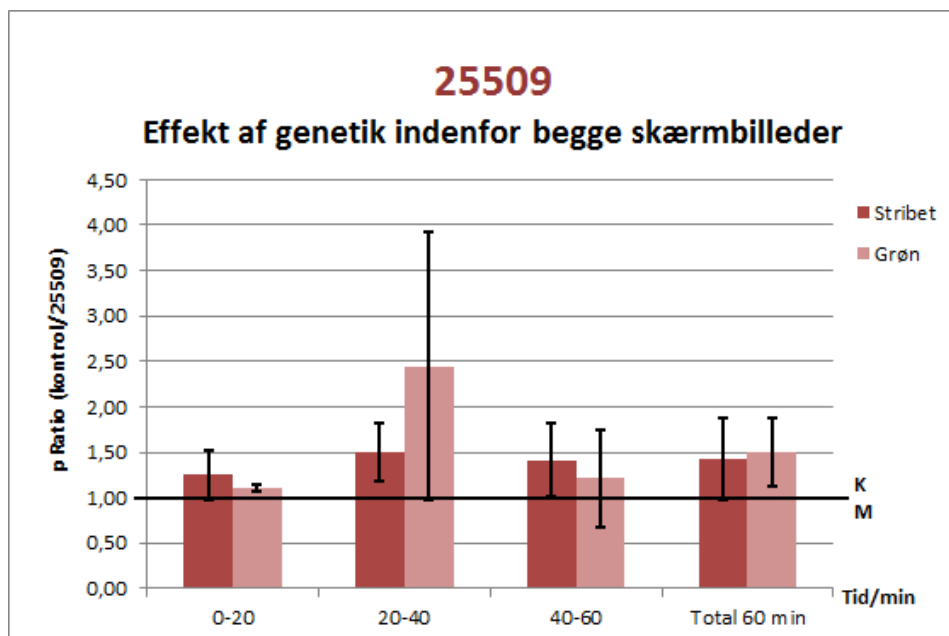


Figur 36 Gennemsnitlig ratio af kontrol relativt til 24687 \pm standardfejl for *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 24687, der gennemførte labyrinten i de tre tidsintervaller 0-20, 20-40 og 40-60 min, samt total antal *Drosophila melanogaster*, der nåede igennem labyrinten på 60 min for det sribede skærbillede og for det grønne skærbillede. Ratioen 1,00 er synliggjort med en fed linje. Hvis ratioen er over et har flest kontroller (K) gennemført labyrinten og hvis ratioen er under et har flest mutanter (M) gennemført labyrinten.

D. melanogaster minoslinje med Flybase stock nr. 25509 svarende til det humane kandidatgen ALK udviste ikke nogen signifikante forskelle fra kontrollen, hverken på tværs af skærmene (Figur 37) eller inden for begge skærbilleder (Figur 38), inden for nogen af tidsintervallerne. Flest kontroller gennemførte labyrinten i de totale 60 minutter og i samtlige kørsler både med det sribede og det grønne skærbillede.

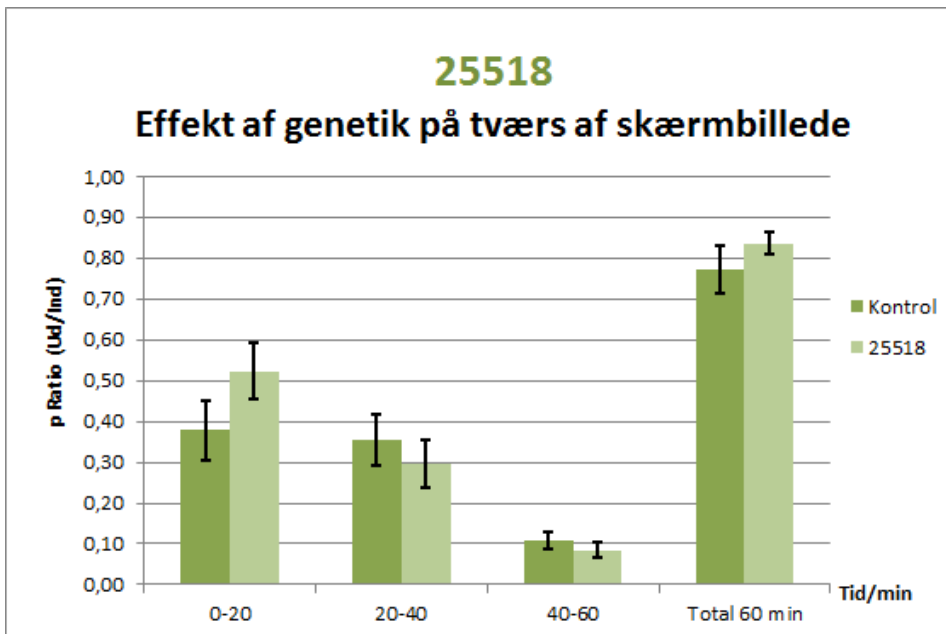


Figur 37 Gennemsnitlig ratio \pm standardfejl af *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 25509, der gennemførte labyrinten i de tre tidsintervaller 0-20, 20-40 og 40-60 min, samt total antal *Drosophila melanogaster*, der nåede igennem labyrinten på 60 min for begge skærbilleder.

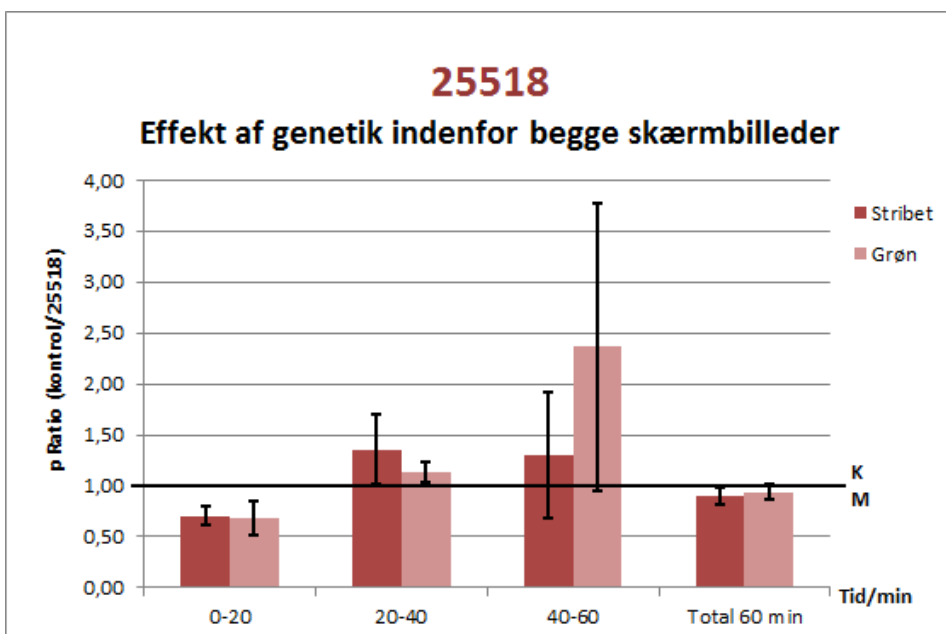


Figur 38 Gennemsnitlig ratio af kontrol relativt til 25509 \pm standardfejl for *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 25509, der gennemførte labyrinten i de tre tidsintervaller 0-20, 20-40 og 40-60 min, samt total antal *Drosophila melanogaster*, der nåede igennem labyrinten på 60 min for det sribede skærbillede og for det grønne skærbillede. Ratioen 1,00 er synliggjort med en fed linje. Hvis ratioen er over et har flest kontroller (K) gennemført labyrinten og hvis ratioen er under et har flest mutanter (M) gennemført labyrinten.

D. melanogaster minoslinje med Flybase stock nr. 25518 svarende til humane kandidatgen *FURIN* udviste ikke nogen signifikante forskelle fra kontrollen, hverken på tværs af skærmene (Figur 39) eller inden for begge skærbilleder (Figur 40), inden for nogen af tidsintervallerne. Flest *D. melanogaster* af minoslinjen 25518 gennemførte labyrinten i de totale 60 minutter og for begge skærbilleder.

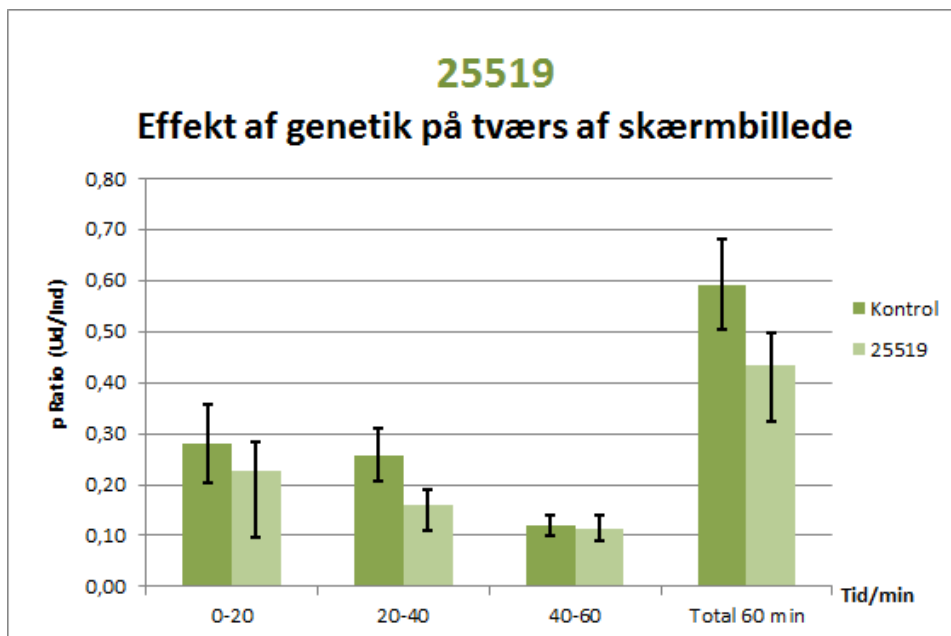


Figur 39 Gennemsnitlig ratio \pm standardfejl af *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 25518, der gennemførte labyrinten i de tre tidsintervaller 0-20, 20-40 og 40-60 min, samt total antal *Drosophila melanogaster*, der nåede igennem labyrinten på 60 min for begge skærbilleder.

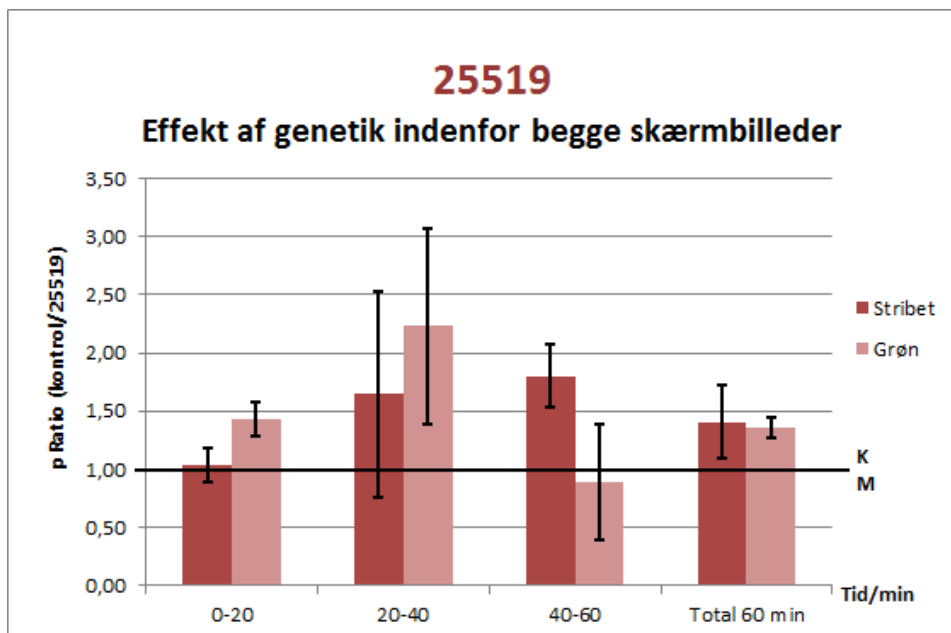


Figur 40 Gennemsnitlig ratio af kontrol relativt til 25518 \pm standardfejl for *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 25518, der gennemførte labyrinten i de tre tidsintervaller 0-20, 20-40 og 40-60 min, samt total antal *Drosophila melanogaster*, der nåede igennem labyrinten på 60 min for det sribede skærbillede og for det grønne skærbillede. Ratioen 1,00 er synliggjort med en fed linje. Hvis ratioen er over et har flest kontroller (K) gennemført labyrinten og hvis ratioen er under et har flest mutanter (M) gennemført labyrinten.

D. melanogaster minoslinje med Flybase stock nr. 25519 svarende til det humane kandidatgen CHRNA7 udviste ikke nogen signifikante forskelle fra kontrollen, hverken på tværs af skærmene (Figur 41) eller inden for begge skærbilleder (Figur 42), inden for nogen af tidsintervallerne. Flest kontroller gennemførte labyrinten i de totale 60 minutter og for begge skærbilleder.

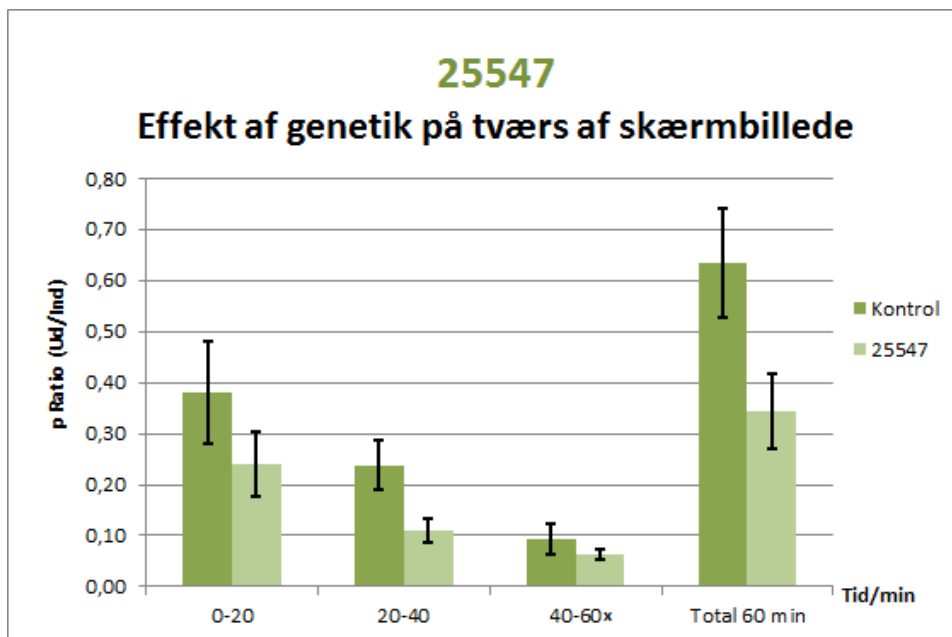


Figur 41 Gennemsnitlig ratio \pm standardfejl af *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 25519, der gennemførte labyrinten i de tre tidsintervaller 0-20, 20-40 og 40-60 min, samt total antal *Drosophila melanogaster*, der nåede igennem labyrinten på 60 min for begge skærbilleder.

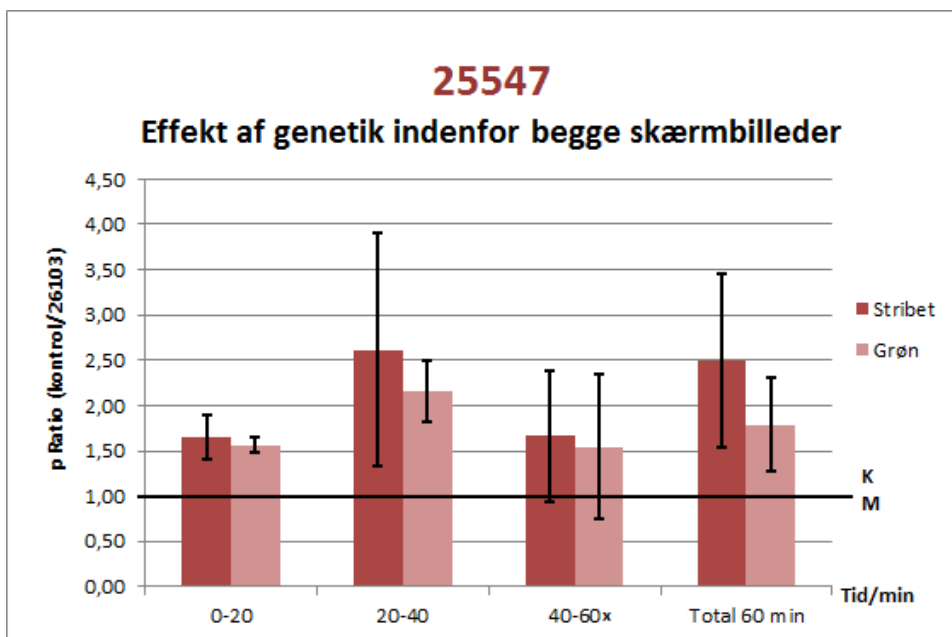


Figur 42 Gennemsnitlig ratio af kontrol relativt til 25519 \pm standardfejl for *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 25519, der gennemførte labyrinten i de tre tidsintervaller 0-20, 20-40 og 40-60 min, samt total antal *Drosophila melanogaster*, der nåede igennem labyrinten på 60 min for det sribede skærbillede og for det grønne skærbillede. Ratioen 1,00 er synliggjort med en fed linje. Hvis ratioen er over et har flest kontroller (K) gennemført labyrinten og hvis ratioen er under et har flest mutanter (M) gennemført labyrinten.

D. melanogaster minoslinje med Flybase stock nr. 25547, svarende til de humane kandidatgener SLC6A2 og SLC6A3 udviste ikke nogen signifikante forskelle fra kontrollen, hverken på tværs af skærmene (Figur 43) eller inden for begge skærbilleder (Figur 44), inden for nogen af tidsintervallerne. Flest kontroller gennemførte labyrinten i de totale 60 minutter og i samtlige kørsler både med det sribede og det grønne skærbillede, hvor det sribede skærbillede havde den højeste ratio. Flest *D. melanogaster* gennemførte labyrinten i det første tidsinterval.

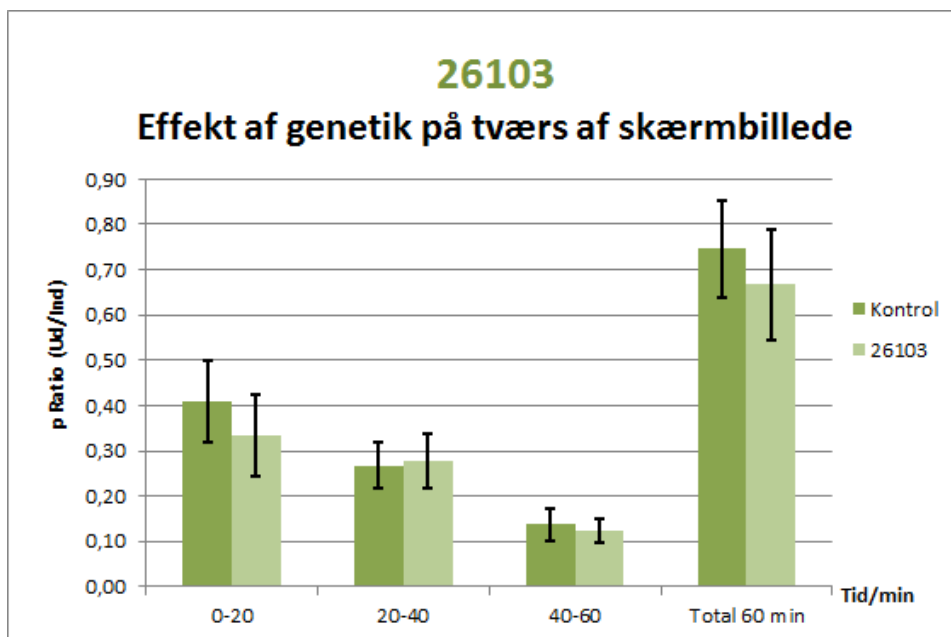


Figur 43 Gennemsnitlig ratio \pm standardfejl af *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 25547, der gennemførte labyrinten i de tre tidsintervaller 0-20, 20-40 og 40-60 min, samt total antal *Drosophila melanogaster*, der nåede igennem labyrinten på 60 min for begge skærbilleder. x: 2. replikat, grøn skærm – kontrollen er korrigeret med +3.

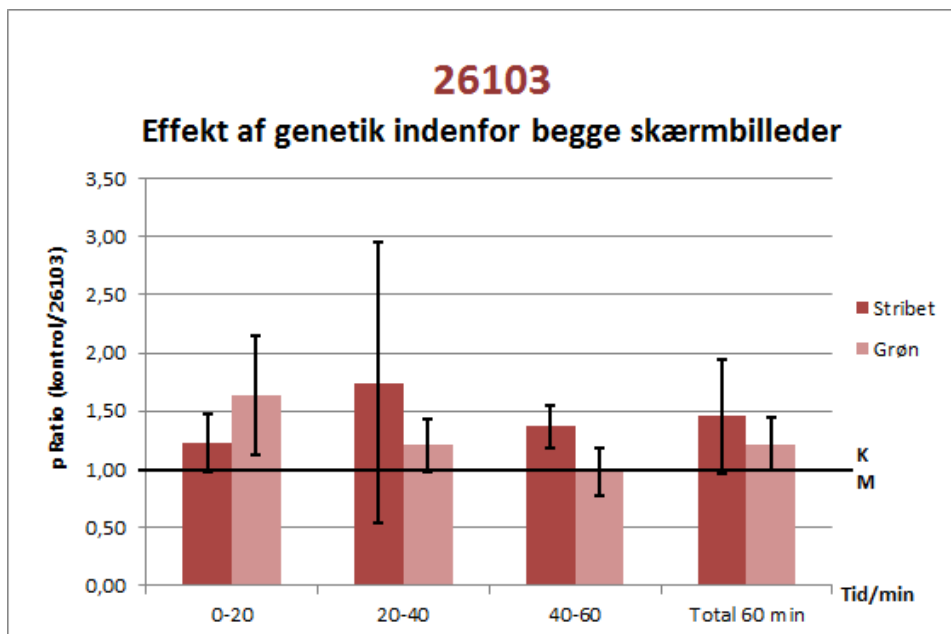


Figur 44 Gennemsnitlig ratio af kontrol relativt til 25547 \pm standardfejl for *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 25547, der gennemførte labyrinten i de tre tidsintervaller 0-20, 20-40 og 40-60 min, samt total antal *Drosophila melanogaster*, der nåede igennem labyrinten på 60 min for det sribede skærbillede og for det grønne skærbillede. Ratioen 1,00 er synliggjort med en fed linje. Hvis ratioen er over et har flest kontroller (K) gennemført labyrinten og hvis ratioen er under et har flest mutanter (M) gennemført labyrinten. x: 2. replikat, grøn skærm – kontrollen er korrigeret med +3.

D. melanogaster minoslinje med Flybase stock nr. 26103 svarende til det humane kandidatgen CDH13 udviste ikke nogen signifikante forskelle fra kontrollen, hverken på tværs af skærmene (Figur 45) eller inden for begge skærbilleder (Figur 46), inden for nogen af tidsintervallerne. Flest kontroller gennemførte labyrinten i de totale 60 minutter og for begge skærbilleder, hvor det stribede skærbillede havde den højeste ratio.



Figur 45 Gennemsnitlig ratio \pm standardfejl af *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 26103, der gennemførte labyrinten i de tre tidsintervaller 0-20, 20-40 og 40-60 min, samt total antal *Drosophila melanogaster*, der nåede igennem labyrinten på 60 min for begge skærbilleder.

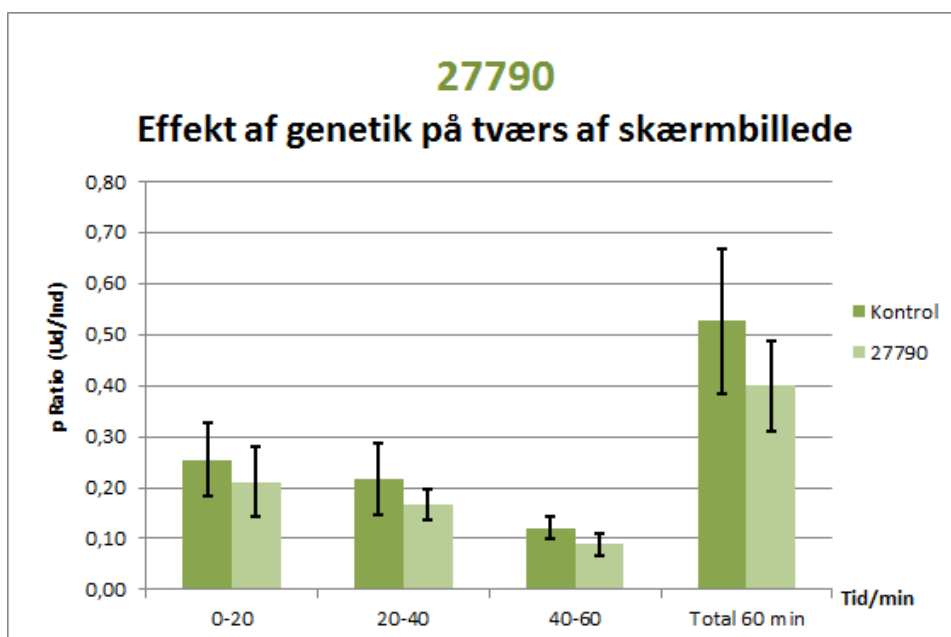


Figur 46 Gennemsnitlig ratio af kontrol relativt til 26103 \pm standardfejl for *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 26103, der gennemførte labyrinten i de tre tidsintervaller 0-20, 20-40 og 40-60 min, samt total antal *Drosophila melanogaster*, der nåede igennem labyrinten på 60 min for det stribede skærbillede og for det grønne skærbillede. Ratioen 1,00 er synliggjort med en fed linje. Hvis ratioen er over et har flest kontroller (K) gennemført labyrinten og hvis ratioen er under et har flest mutanter (M) gennemført labyrinten.

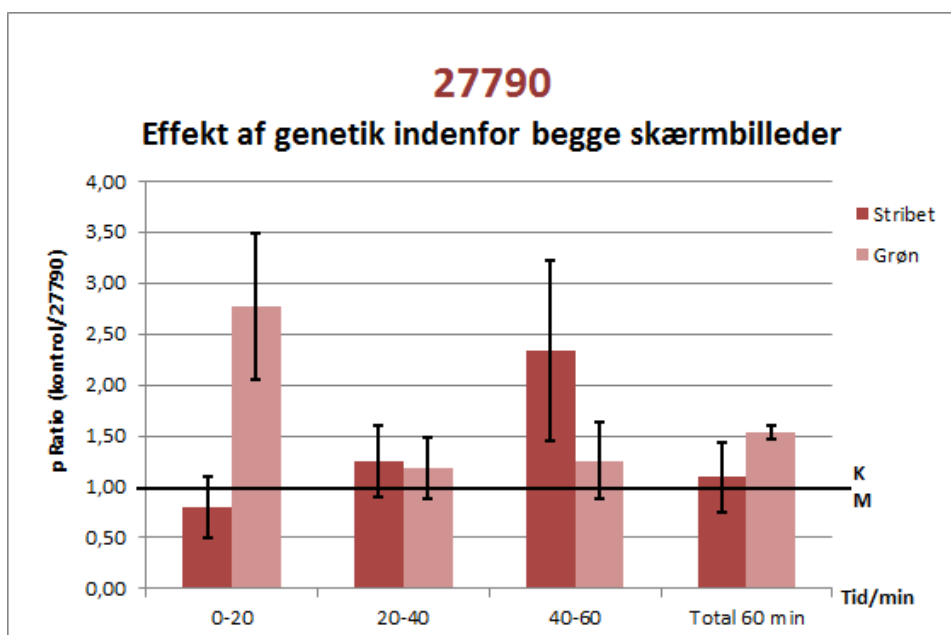
D. melanogaster minoslinje med Flybase stock nr. 27790 svarende til det humane kandidatgen NTM udviste ikke nogen signifikante forskelle fra kontrollen, hverken på tværs af skærmene (

Figur 47) eller inden for begge skærbilleder (Figur 48), inden for nogen af tidsintervallerne. Flest kontroller gennemførte labyrinten i de totale 60 minutter og i hvert tidsinterval på tværs af skærmene. Der var en tidsforskydning mellem skærbillederne i forholdet kontrol:27790, hvor ratioen var højest for det grønne skærbillede i det første tidsinterval og for den sribede skærm i det sidste tidsinterval. Flest kontroller i forhold til minoslinjen gennemførte labyrinten for begge skærbilleder i de totale 60 minutter,

hvor det grønne skærbillede havde den højeste ratio.



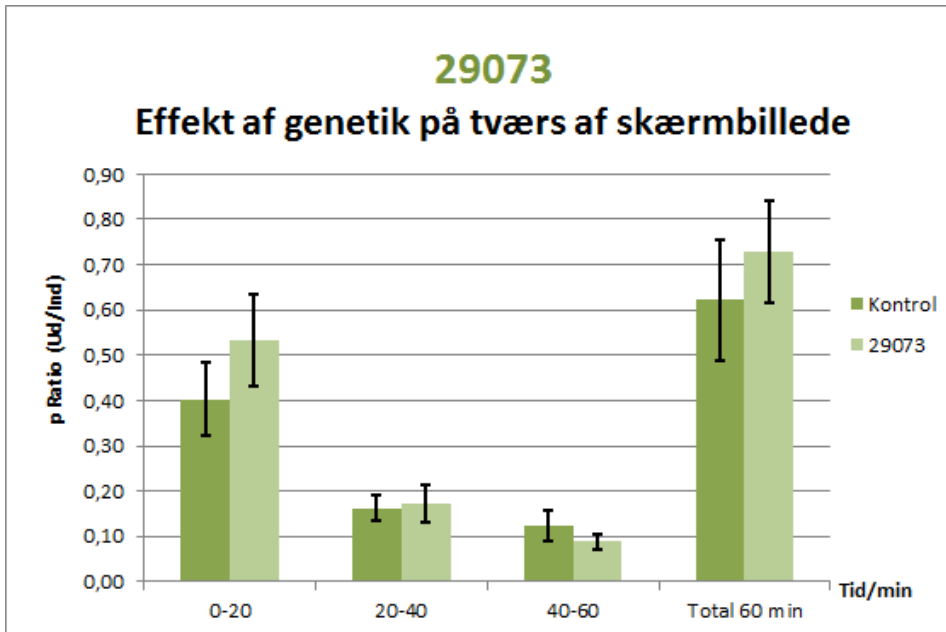
Figur 47 Gennemsnitlig ratio \pm standardfejl af *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 27790, der gennemførte labyrinten i de tre tidsintervaller 0-20, 20-40 og 40-60 min, samt total antal *Drosophila melanogaster*, der nåede igennem labyrinten på 60 min for begge skærbilleder.



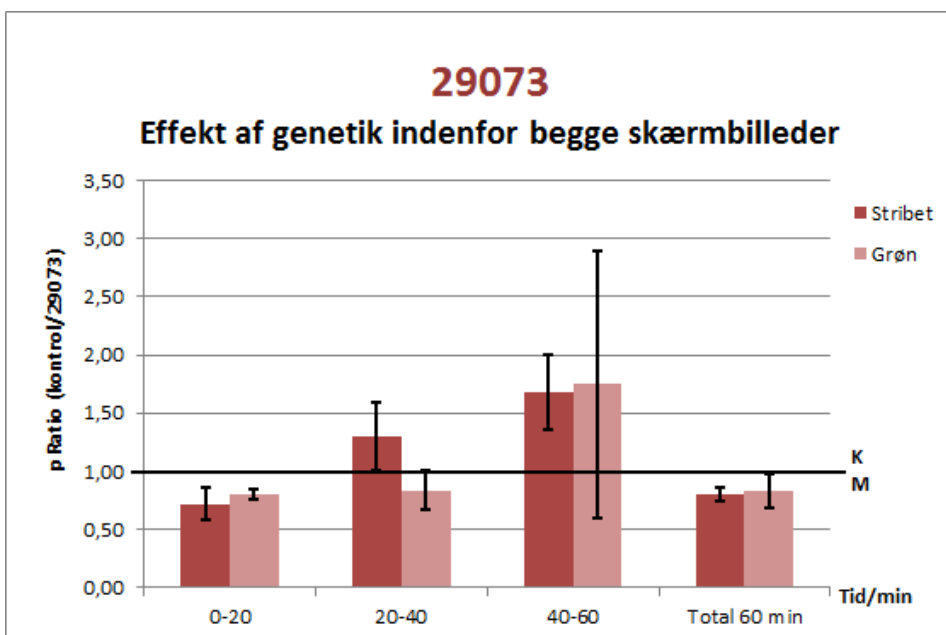
Figur 48 Gennemsnitlig ratio af kontrol relativt til 27790 \pm standardfejl for *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 27790, der gennemførte labyrinten i de tre tidsintervaller 0-20, 20-40 og 40-60 min, samt total antal *Drosophila melanogaster*, der nåede igennem labyrinten på 60 min for det sribede skærbillede og for det grønne skærbillede. Ratioen 1,00 er synliggjort med en fed linje. Hvis ratioen er over et har flest kontroller (K) gennemført labyrinten og hvis

ratioen er under et har flest mutanter (M) gennemført labyrinten.

D. melanogaster minoslinje med Flybase stock nr. 29073 svarende til det humane kandidatgen KALRN udviste ikke nogen signifikante forskelle fra kontrollen, hverken på tværs af skærmene (Figur 49) eller inden for begge skærbilleder (Figur 50), inden for nogen af tidsintervallerne. Flest *D. melanogaster* af minoslinje 29073 gennemførte labyrinten i de totale 60 minutter og for begge skærbilleder. Flest *D. melanogaster* gennemførte i det første tidsinterval.

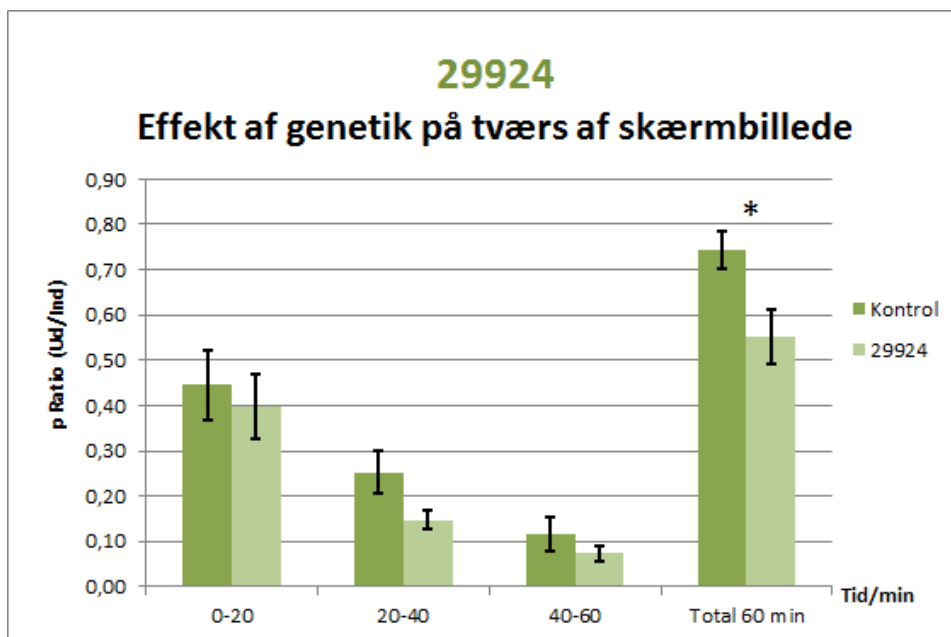


Figur 49 Gennemsnitlig ratio \pm standardfejl af *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 29073, der gennemførte labyrinten i de tre tidsintervaller 0-20, 20-40 og 40-60 min, samt total antal *Drosophila melanogaster*, der nåede igennem labyrinten på 60 min for begge skærbilleder.

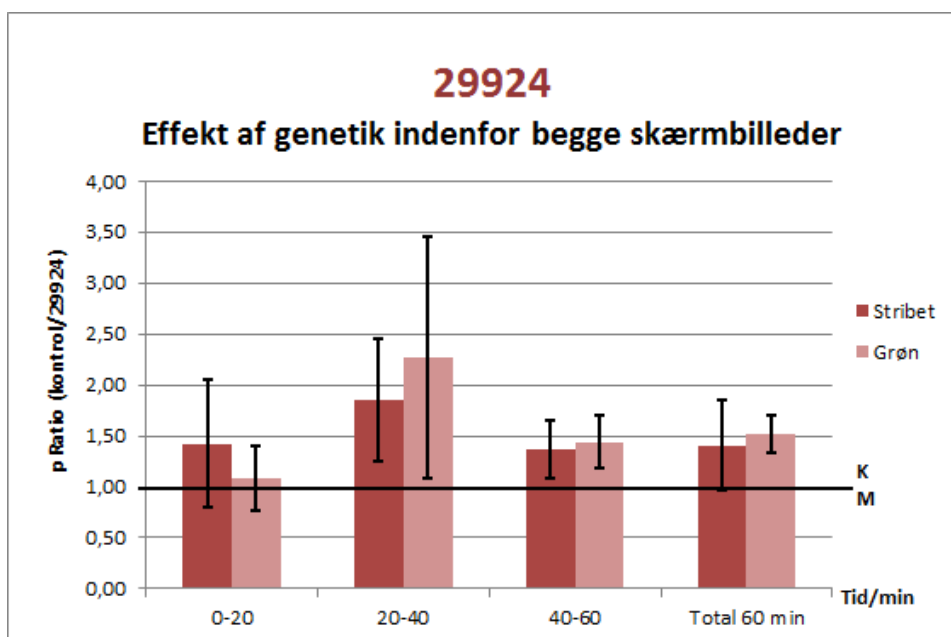


Figur 50 Gennemsnitlig ratio af kontrol relativt til 29073 \pm standardfejl for *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 29073, der gennemførte labyrinten i de tre tidsintervaller 0-20, 20-40 og 40-60 min, samt total antal *Drosophila melanogaster*, der nåede igennem labyrinten på 60 min for det sribede skærbillede og for det grønne skærbillede. Ratioen 1,00 er synliggjort med en fed linje. Hvis ratioen er over et har flest kontroller (K) gennemført labyrinten og hvis ratioen er under et har flest mutanter (M) gennemført labyrinten.

D. melanogaster minoslinje med Flybase stock nr. 29924 svarende til det humane kandidatgen SSTR1 og kontrollen havde en signifikant forskellig ratio for gennemførelse i de totale 60 minutter, hvor flest kontroller gennemførte labyrinten. Der var ikke signifikante forskelle for de enkelte tidsintervaller, men for alle tidsintervaller gennemførte flest kontroller og flest *D. melanogaster* gennemførte i første tidsinterval (Figur 51). Flest kontroller i forhold til 29924 gennemførte for begge skærbilleder i alle tidsintervaller (Figur 52).

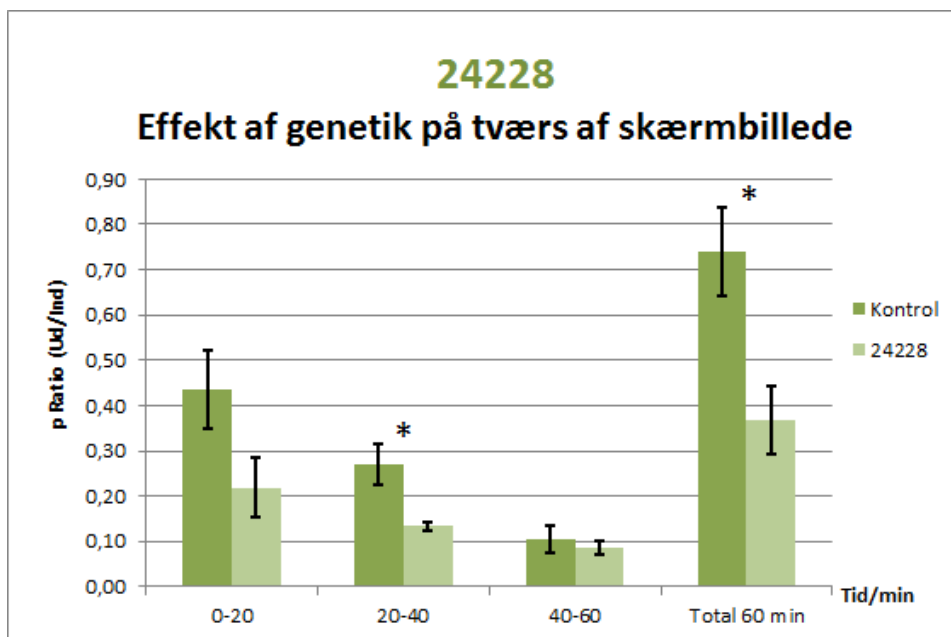


Figur 51 Gennemsnitlig ratio \pm standardfejl af *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 29924, der gennemførte labyrinten i de tre tidsintervaller 0-20, 20-40 og 40-60 min, samt total antal *Drosophila melanogaster*, der nåede igennem labyrinten på 60 min for begge skærbilleder. Signifikante forskelle mellem kontrol og 29924 ved t-tests er indikeret med *P < 0,05.

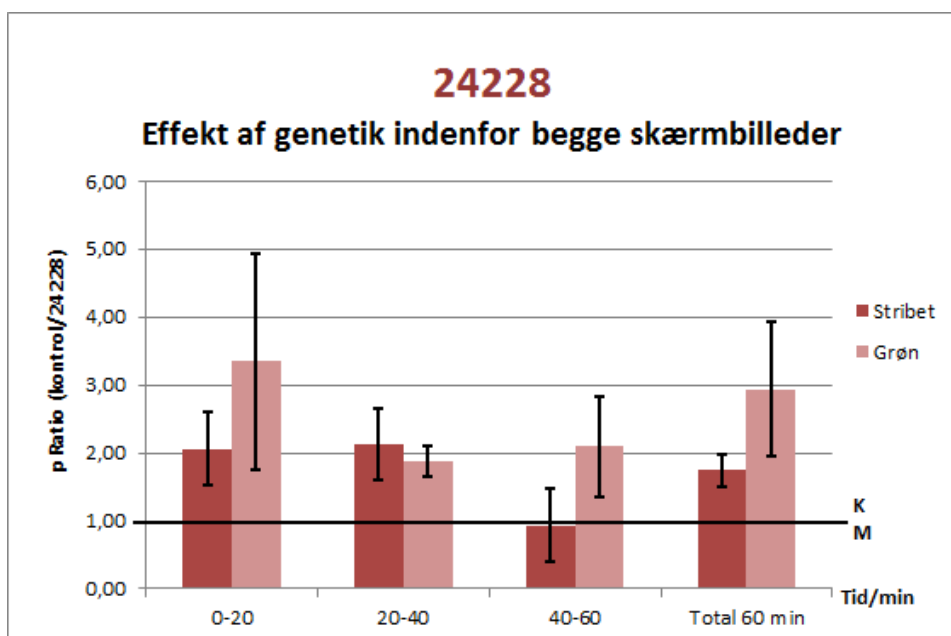


Figur 52 Gennemsnitlig ratio af kontrol relativt til 29924 \pm standardfejl for *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 29924, der gennemførte labyrinten i de tre tidsintervaller 0-20, 20-40 og 40-60 min, samt total antal *Drosophila melanogaster*, der nåede igennem labyrinten på 60 min for det sribede skærbillede og for det grønne skærbillede. Ratioen 1,00 er synliggjort med en fed linje. Hvis ratioen er over et har flest kontroller (K) gennemført labyrinten og hvis ratioen er under et har flest mutanter (M) gennemført labyrinten.

D. melanogaster mionslinje med Flybase stock nr. 24228 svarende til det humane kandidatgen PRKG1 og kontrollen havde en signifikant forskellig ratio for gennemførelse i de totale 60 minutter, hvor flest kontroller gennemførte labyrinten. Der var også en signifikant forskel for tidsintervallet 20-40 minutter. Der var ikke signifikante forskelle for de to resterende tidsintervaller. I alle intervaller gennemførte flest kontroller (Figur 53). For begge skærbilleder gennemførte flest kontroller labyrinten i forhold til 24228 i de totale 60 minutter, hvor det grønne skærbillede havde den højeste ratio (Figur 54).



Figur 53 Gennemsnitlig ratio \pm standardfejl af *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 24228, der gennemførte labyrinten i de tre tidsintervaller 0-20, 20-40 og 40-60 min, samt total antal *Drosophila melanogaster*, der nåede igennem labyrinten på 60 min for begge skærbilleder. Signifikante forskelle mellem kontrol og 24228 ved *t*-tests er indikeret med * $P < 0,05$.



Figur 54 Gennemsnitlig ratio af kontrol relativt til 24228 \pm standardfejl for *Drosophila melanogaster* minoslinje med Flybase stock nr. 24228, der gennemførte labyrinten i de tre tidsintervaller 0-20, 20-40 og 40-60 min, samt total antal *Drosophila melanogaster*, der nåede igennem labyrinten på 60 min for det sribede skærbillede og for det grønne skærbillede. Ratioen 1,00 er synliggjort med en fed linje. Hvis ratioen er over et har flest kontroller (K) gennemført labyrinten og hvis ratioen er under et har flest mutanter (M) gennemført labyrinten.

Opsummering af resultater

Der blev lavet *t*-tests for egenskaberne vægt, klækningsprocent og tæthed i alt tre tests, for tre replikater gange tre egenskaber for arenaen, i alt ni tests og for tre replikater og totalen gange to egenskaber for labyrinten, i alt otte tests, således at der totalt udførtes $n = 20$ *t*-tests per minoslinje. Bonferroni korrektionen blev derfor beregnet til $0,05/20 = 0,0025$ (α^*), hvorefter kun resultater med en *p*-værdi under dette blev accepteret som signifikant forskellige kontrol og minoslinje imellem. Efter korrektion var der ingen signifikante forskelle for nogen af minoslinjerne i labyrintforsøget, for tætheden og klækningsprocenten. I arenaforsøget havde seks minoslinjer replikater med *p*-værdier under α^* i forskellen mellem kontrollinje og minoslinje (Tabel 5).

Tabel 5 Signifikante resultater for *t*-tests efter Bonferroni korrektion i arenaforsøget. Tabellen viser minoslinjer (angivet med Flybase stock nr. og deres orthologe humane gener i parentes) med *p*-værdier under 0,0025 (α^*) for forskellen mellem kontrol og minoslinje for den totale tilbagelagte distance, antallet af rotationer og den totale distance til centeret. Antallet af signifikante replikater for hver egenskab er listet efter signifikansniveau, hvor ** er $P < \alpha^*$ og * er $P < 0,001$. I parenteserne er angivet, hvilke replikater, der gør sig gældende.**

Flybase stock nr. (humant gen)	Antal signifikante replikater (replikant nr.)		
	Tilbagelagt distance ***	Rotation ***	Distance til center **
25547 (SLC6A2, SLC6A3)	3	3	
25519 (CHRNA7)	2 (1.+2.)	2 (1.+2.)	
24283 (NOS1)	1 (3.)	1 (3.)	1 (1.)
24213 (DDC)	1 (3.)	1 (3.)	
24228 (PRKG1)	1 (2.)	1 (2.)	

Minoslinje med Flybase stock nr. 25547 var signifikant forskellige i alle tre replikater for egenskaberne tilbagelagt distance og for antallet af rotationer, men der blev ikke observeret signifikante replikater for egenskaben distancen til centrum, hvor kontrollen havde den højeste værdi for alle replikater (Figur 22).

Minoslinje med Flybase stock nr. 25519 havde to replikater med signifikante forskelle for egenskaberne tilbagelagt distance og antallet af rotationer hhv. første og andet replikat, hvor kontrollen havde en højeste værdi for både disse to og det tredje ikke signifikante replikat. Der var ingen signifikans for egenskaben distancen til centrum (Figur 21). Minoslinjen vejede signifikant mindre end kontrollen (Tabel 4).

Minoslinje med Flybase stock nr. 24283 var signifikant forskellig fra kontrollen i første replikat for egenskaben distance til centrum og i tredje replikat for både egenskaberne tilbagelagt distance og antallet af rotationer. Det andet replikat viste ingen signifikans (Figur 17).

Minoslinje med Flybase stock nr. 24213 havde et replikat, det tredje, med to signifikante forskelle hhv. for egenskaberne tilbagelagt distance og antallet af rotationer (Figur 14).

Minoslinje med Flybase stock nr. 24228 var signifikant forskellig fra kontrollen for egenskaberne tilbagelagt distance og antallet af rotationer i andet replikat. Det første og det tredje replikat viste ingen signifikans (Figur 15).

Diskussion

I arenaforsøget blev *D. melanogaster* minoslinjer testet for hhv. tilbagelagt distance, distancen til centrum af arenaen og antallet af rotationer foretaget i brønden. Symptomer for ADHD er blandt andet hyperaktivitet, impulsivitet, koncentrationsbesvær og opmærksomhedsvanskeligheder (American Psychiatric Association, 2013) og derfor formodes det, at *D. melanogaster* minoslinjer med et gen slået ud, der associeres til ADHD, vil udvise enten ændring i symptomer af samme type. Hyperaktivitet kan formodentlig udtrykkes som en længere tilbagelagt distance med flere rotationer, hvorimod koncentrationsbesvær og opmærksomhedsvanskeligheder eventuelt kan have modsatrettet effekt på den tilbagelagt distance. Impulsivitet kan måske udtrykkes ved en kortere distance til centrum af arenaen. Da det ikke vides på forhånd, hvorvidt genet over- eller underudtrykkes i tilfælde af ADHD, kendes det heller ikke på forhånd, hvilken effekt det udslåede gen har på adfærden for *D. melanogaster*. Det antages, at der både kan forekomme en reduktion eller en forøgelse af symptomerne.

I labyrintforsøget blev *D. melanogaster* minoslinjer testet for deres evne til, at gennemføre labyrinten hhv. med og uden forstyrrende elementer i form af den sribede skærm. Det formodedes at *D. melanogaster* minoslinjer med et gen slået ud, der associeres med ADHD, vil udvise en forskel fra kontrollen i evnen til at koncentrere sig udtrykt ved en forskel i hastigheden, hvormed de er i stand til at gennemføre labyrinten hhv. med og uden det forstyrrende element. *D. melanogaster* med en bedre koncentrationsevne vil ikke udvise en ligeså stor effekt af forstyrrelsen, som en *D. melanogaster* med en nedsat koncentrationsevne. Ligeledes formodes det at et øget aktivitetsniveau vil kunne udtrykkes ved, at *D. melanogaster* hurtigere gennemfører labyrinten.

Ingen af de 14 minoslinjer var signifikant forskellige fra kontrollen i labyrintforsøget. Det formodes, at den væsentligste grund til dette, var at minoslinjen og kontrollen påvirkede hinanden i labyrinten, idet der tegnede sig et billede af at de fulgte hinanden i de forskellige labyrintkørsler. Ved fremtidige undersøgelser bør disse forsøg eventuelt køres med kontrol og minoslinje i hver sin labyrint.

Fem ud af de 14 minoslinjer viste en signifikant højere eller lavere aktivitet i arenaforsøget (Figur 14, Figur 15, Figur 17, Figur 21 og Figur 22). Minoslinjerne med Flybase stock nr. 25547, 25519, 24283, 24213 og 24228 er listet med faldende signifikansniveau (Tabel 5). Minoslinjernes orthologe humane gener til deres udslåede gener er (hvoraf 25547 er ortholog for to gener) SLC6A2, SLC6A3, CHRNA7, NOS1, DDC og PRKG1.

Minoslinje 25547, hvor SLC6A2 og SLC6A3 er ortholog til det udslåede DAT, havde et signifikant lavere aktivitetsniveau end kontrollen udtrykt ved en kortere tilbagelagt distance og med færre rotationer. I alle replikater var forskellen signifikant. Der var ikke nogen signifikant forskel i resultaterne for den totale

distance til centeret, men alle indikerede at kontrollen havde opholdt sig mere i midten end i periferien af cirklen end minuslinjen. Effekten af at slå genet ud var følgelig, at *D. melanogaster* udviste reducerede ADHD symptomer. SLC6A3 koder for en dopamintransporter. Ved ADHD ses der en positiv effekt med nedsatte symptomer ved hæmning af dopaminreabsorptionen med for eksempel Ritalin, hvor dopaminaktiviteten øges (Bilenberg, 2014). Da dopamintransportere tager del i reabsorptionen (Martini & Nath, 2009) vil en lignende øgning formodentligt forekomme, når DAT er slået ud hos *D. melanogaster*. Mutationer i SLC6A3 associeres allerede med ADHD. Lignende kan gøre sig gældende for SLC6A2, der koder en for en noradrenalintransporter (GBG-UCSC, 2013) (Banaschewski, et al., 2010).

Minuslinje 25519, hvor CHRNA7 er ortholog til det udslåede nAChR α 6 og blandt andet spiller en rolle for signaltransporten i synapserne i hjernen (Stergiakouli, et al., 2012), havde et signifikant lavere aktivitetsniveau end kontrollen for første og andet replikat udtrykt ved en kortere tilbagelagt distance og færre rotationer. Tredje replikat var ikke signifikant, men også her havde minuslinjen et lavere aktivitetsniveau end kontrollen. Det indikerer at *D. melanogaster* udviste en ændring i ADHD symptomer med nAChR α 6 slået ud, men da vægten for *D. melanogaster* var signifikant lavere end kontrollen, kunne det tyde på at minuslinjen enten var crowded eller havde nedsat fitness. Da CHRNA7 koder for et protein, der er med til at genere aktionspotentialer i dendritter, vil aktionspotentialer ikke blive genereret, hvis CHRNA7 genet ikke fungerer og derved vil videresignaleringen i nervesystemet være hæmmet (Martini & Nath, 2009). Dette kunne sandsynligvis medføre netop nedsat fitness, der også kunne komme til udtryk som nedsat aktivitetsniveau. Derfor vil yderligere undersøgelser af genet være interessant.

Minuslinje 24283, hvor NOS1 er ortholog til det udslåede Nos og fungerer som en neurotransmitter (GBG-UCSC, 2013), havde et signifikant lavere aktivitetsniveau end kontrollen i det tredje replikat udtrykt ved en kortere tilbagelagt distance og med færre rotationer. I første og andet replikat var forskellen ikke signifikant, men de indikerede også, at minuslinjen havde et lavere aktivitetsniveau. Dette antages at svare til en ændring i ADHD symptomer. Der var signifikant forskel på, hvor tæt *D. melanogaster* havde opholdt sig på midten i forhold til kontrollen i første replikat, men ikke i det andet og tredje replikat. Resultaterne for alle replikater indikerede, at minuslinjen havde en kortere distance til midten end kontrollen, hvilket antages at svare til en øgning i ADHD symptomer som for eksempel impulsivitet. Dette kan være både modstridende med de øvrige resultater eller bekræfte dem og derfor er der ikke nogen klar indikation af effekten af Nos1 slået ud hos *D. melanogaster*.

Minuslinje 24213, hvor DDC er ortholog til det udslåede Tdc1 og katalyser syntesen af dopamin og serotonin (Banaschewski, et al., 2010) (Gizer, et al., 2009), var signifikant mindre aktiv end kontrollen i et enkelt replikat udtrykt ved tilbagelagt distance og antallet af rotationer, de resterende replikater for disse

to egenskaber indikerede samme tendens, svarende til en ændring i ADHD symptomer med genet slået ud, men uden signifikante forskelle eller klar indikation af, hvorvidt gener over- eller underudtrykkes i tilfælde af ADHD. Der var ikke signifikante forskelle i hvorvidt kontrollen eller minoslinjen havde opholdt sig tættest på midten, men alle replikater indikerede, at minoslinjen havde en kortere distance til midten end kontrollen, hvilket antages at svare til øgede ADHD symptomer. Dette kan være både modstridende med de øvrige resultater eller bekræfte dem og heller ikke dette giver anledning til nogen klar indikation af effekten af Tdc1 slået ud hos *D. melanogaster*. Dette bekræftes yderligere at DDC genets funktion, som katalysator for syntesen af blandt andet dopamin, idet forskning viser, at for lidt dopamin både associeres til Parkinson (Martini & Nath, 2009), som formodentligt kunne udtrykkes ved reduceret aktivitetsniveau, men også til ADHD (Bilenberg, 2014), som antages at kunne udtrykkes som både reduceret og øget aktivitetsniveau.

Minoslinje 24228, hvor PRKG1 er ortholog til det udslåede Pkg21D og blandt andet har indvirkning på udviklingen af nervesystemet (Neale, et al., 2010), havde et signifikant lavere aktivitetsniveau end kontrollen i andet replikat udtrykt ved en kortere tilbagelagt distance og med færre rotationer. Der var ingen signifikant forskel i første og tredje replikat, men alle replikater indikerede at minoslinjen havde et lavere aktivitetsniveau, hvorved *D. melanogaster* antages at udvise en ændring i ADHD symptomer med Pkg21D slået ud, men uden nogen klar indikation af, hvorvidt genet over- eller underudtrykkes i tilfælde af ADHD.

Generne, der var slået ud hos *D. melanogaster*, var ikke kun slået ud i centralnervesystemet, men i alle *D. melanogaster* celler. Da flere af generne hos mennesker er udtrykt andre steder end blot i centralnervesystemet og ligeledes de orthologe i *D. melanogaster*, kan effekten af generne på fluens aktivitetsniveau være påvirket af andre faktorer i kroppen. PRKG1 og CHRNA7 er hos mennesker for eksempel også udtrykt i musklerne (GBG-UCSC, 2013) (Stergiakouli, et al., 2012) og NOS1 er vidt udtrykt (GBG-UCSC, 2013). Derfor er flere af de undersøgte gener, der ikke havde en klar indikation af effekten af de udslåede gener, alligevel af interesse for videre forskning, ligeså vel som dem, der havde sammenstemmende signifikante resultater. Vi fandt at kandidatgenerne SLC6A2, SLC6A3, CHRNA7, NOS1 og DDC og i mindre grad også PRKG1 kvalificerer sig som interessenter for videre undersøgelser.

Der udgives fortløbende flere GWAS studier for ADHD, som giver bud på kandidatgener for ADHD på baggrund af gensekvenssammenligning. Ved brug af *D. melanogaster* som modelorganisme, kan der gives et mere visuelt billede af hvilke fænotyper, der er tilknyttet disse kandidatgener og eventuelt i fremtiden be- eller afkræfte, hvorvidt disse kandidatgener er ADHD relaterede. Når der er fundet signifikante kandidatgener for ADHD, kan *D. melanogaster*, med disse gener slået ud, benyttes til at teste ny medicin og få et billede af, hvilken virkning denne medicin har på ADHD. Der kan også være mulighed for at benytte

andre mere specifikke teknikker til at slå specifikke kandidatgener ud i bestemte områder i modelorganismen, som er associeret til ADHD og derved opnå en højere forståelse af genet.

Bibliografi

Adams, M. D. et al., 2000. The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, Marts, 287(5461), pp. 2185-2195.

American Psychiatric Association, 2013. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. Fifth Edition red. Arlington, VA: American Psychiatric Association.

Ashburner, M., 2008. *Encyclopedia of Life*. [Online]
Available at: http://eol.org/data_objects/466725
[Senest hentet eller vist den 24 Februar 2015].

Ashburner, M., Golic, K. G. & Hawley, R. S., 2005. *Drosophila A Laboratory Handbook*. 2. red. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Banaschewski, T. et al., 2010. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder: an overview. *Eur Child Adolesc Psychiatry*, marts, 19(3), pp. 237-257.

Bellen, H. J. et al., 2011. The *Drosophila* Gene Disruption Project: Progress Using Transposons With Distinctive Site Specificities. *Genetics*, Juli, Issue 188, pp. 731-743.

Bilenberg, N., 2014. *pro.medicin.dk*. [Online]
Available at: <http://pro.medicin.dk/Laegemiddelgrupper/grupper/317916>
[Senest hentet eller vist den 2 april 2015].

Bloomington *Drosophila* Stock Center at Indiana University, 2014. *Current Bloomington Recipe for Drosophila Medium*. [Online]
Available at: http://flystocks.bio.indiana.edu/Fly_Work/media-recipes/bloomfood.htm
[Senest hentet eller vist den 1 Juli 2014].

Carr, S. M., 2006. *Drosophila Chromosomes*. [Online]
Available at: <http://www.mun.ca/biology/scarr/MGA2-02-35a.html>
[Senest hentet eller vist den 13 Marts 2015].

Chakrabarti, K. et al., 2005. Critical Role for Kalirin in Nerve Growth Factor Signaling through TrkA. *Molecular and Cellular Biology*, juni, 12(5), p. 5106–5118.

Damm, D. & Thomsen, P. H., 2012. *Børneliv i kaos - Om børn og unge med ADHD*. 2. red. København K: Hans Reitzels Forlag.

Faraone, S. V., Biederman, J. & Mick, E., 2006. The age-dependent decline of attention deficit hyperactivity disorder: a meta-analysis of follow-up studies. *Psychological Medicine*, Februar, 36(2), pp. 159-165.

Faraone, S. V. et al., 2005. Molecular Genetics of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *BIOL PSYCHIATRY*, 57(11), pp. 1313-1323.

Flagg, R. O., 2005. *Carolina Drosophila Manual*. Burlington, North Carolina: Carolina Biological Supply Company.

- Foghsgaard, L., 2014. *Bananfluen er det mest studerede forsøgsdyr på vores planet*. [Online]
Available at: <http://politiken.dk/viden/ECE2276722/bananfluen-er-det-mest-studerede-forsogedyr-paa-vores-planet/>
[Senest hentet eller vist den 13. marts 2015].
- GBG-UCSC, G. B. G. . U. o. C. S. C., 2013. *UCSC Genome Bioinformatics*. [Online]
Available at: <http://genome-euro.ucsc.edu/index.html>
[Senest hentet eller vist den 1. april 2015].
- Gilbert, S. F., 2000. Chromosomal Sex Determination in *Drosophila*. I: *Developmental Biology*. 6. red. Sunderland(MA): Sinauer Associates.
- Gizer, I. R., Ficks, C. & Waldman, I. D., 2009. Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum Genet*, juli, 126(1), p. 51–90.
- Greenspan, R. J., 2004. *Fly Pushing - The Theory and Practice of Drosophila Genetics*. 2. red. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Houmann, T. et al., 2015. *BUP-DK (Børne- og ungdomspsykiatrisk selskab i Danmark)*. [Online]
Available at: http://www.bupnet.dk/media/ADHD_faglige_retningslinier_revideret_26.06.12.pdf
[Senest hentet eller vist den 2 april 2015].
- Howe, C., 2007. *Gene Cloning and Manipulation*. 2. red. New York: Cambridge University Press.
- Lasky-Su, J. et al., 2008. Genome-Wide Association Scan of Quantitative Traits for Attention Deficit Hyperactivity Disorder Identifies Novel Associations and Confirms Candidate Gene Associations. *American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics)*, Årgang 147B, pp. 1345-1354.
- Lesch, K.-P. et al., 2008. Molecular genetics of adult ADHD: converging evidence from genome-wide association and extended pedigree linkage studies. *J Neural Transm*, 115(11), p. 1573–1585.
- Mader, S. S., 2007. *Biology*. 9. red. New York: McGraw-Hill.
- Markow, T. A. & O'Grady, P. M., 2006. *Drosophila A guide to species identification and use*. s.l.:Academic Press.
- Martini, F. H. & Nath, J. L., 2009. *Fundamentals of Anatomy & Physiology*. 8 red. s.l.:Pearson Benjamin Cummings.
- Metaxakis, A., Oehler, S., Apostolos, K. & Savakis, C., 2005. Minos as a Genetic and Genomic Tool in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, Oktober, Issue 171, pp. 571-581.
- Mick, E. et al., 2011. Genome-Wide Association Study of the Child Behavior Checklist Dysregulation Profile. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, august, 50(8), p. 807–817.e8.
- Miller, C., 2000. *Animal Diversity Web*. [Online]
Available at:

http://animaldiversity.org/accounts/Drosophila_melanogaster/#7b268401342c1418f5fa226a6a05a9bc
[Senest hentet eller vist den 19 Februar 2015].

NCBI, N. C. f. B. I., 2014. *Genome Assembly and Annotation report - Drosophila melanogaster*. [Online]
Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/47>
[Senest hentet eller vist den 10 Marts 2015].

Neale, B. M. et al., 2010. Meta-Analysis of Genome-Wide Association Studies of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 49(9), pp. 884-897.

Neale, B. M. et al., 2010 . Case-Control Genome-Wide Association Study of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, september, 49(9), p. 906–920.

Neale, B. M. et al., 2008. Genome-wide Association Scan of Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 5 December, 147B(8), pp. 1337-1344.

Pavlopoulos, A., Oehler, S., Kapetanaki, M. G. & Savakis, C., 2007. The DNA transposon Minos as a tool for transgenesis and functional genomic analysis in vertebrates and invertebrates. *Genome Biology*, 8(1), pp. 2.1-2.7.

Polanczyk, G. et al., 2007. The Worldwide Prevalence of ADHD: A Systematic Review and Meta-regression Analysis. *The American Journal of Psychiatry*, Juni, 164(6), pp. 942-948.

Ramamoorthy, S., Shippenberg, T. S. & Jayanthi, L. D., 2011. Regulation of Monoamine Transporters: Role of Transporter Phosphorylation. *Pharmacol Ther.*, februar, 129(2), p. 220–238.

Reiter, L. T. et al., 2001. A Systematic Analysis of Human Disease-Associated Gene Sequences In *Drosophila melanogaster*. *Genome Research*, Issue 11, pp. 1114-1125.

Rice, W. R., 1989. Analyzing Tables of Statistical Tests. *Evolution*, 43(1), pp. 223-225.

Ringertz, N., 1995. *Nobelprize.org*. [Online]
Available at: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1933/morgan-article.html
[Senest hentet eller vist den 3 April 2015].

Roote, J. & Prokop, A., 2013. *How to design a genetic mating scheme: a basic training package for Drosophila genetics*. [Online]
Available at: <http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.106631>
[Senest hentet eller vist den 24 Februar 2015].

Sadava, D., Heller, G. H., Orians, G. H. & Purves, D. M., 2008. *Life The Science of Biology*. 8. red. Sunderland(MA): Sinauer Associates, Inc..

Sadava, D., Heller, G. H., Orians, G. H. & Purves, D. M., 2008. *Life The Science of Biology*. 8. red. Sunderland(MA): Sinauer Associates, Inc..

Scherer, L. J., McPherson, J. D., Wasmuth, J. J. & Marsh, J., 1992. Human Dopa Decarboxylase: Localization to Human Chromosome 7p11 and Characterization of Hepatic cDNAs. *Genomics*, 13(2), pp. 469-471.

Socialstyrelsen, 2015. *Socialstyrelsen - Viden til gavn*. [Online]
Available at: <http://www.socialstyrelsen.dk/handicap/adhd/om-adhd>
[Senest hentet eller vist den 2. april 2015].

Souttou, B., Carvalho, N. B.-D., Raulais, D. & Vigny, M., 2001. Activation of Anaplastic Lymphoma Kinase Receptor Tyrosine Kinase Induces Neuronal Differentiation through the Mitogen-activated Protein Kinase Pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, marts, 276(12), p. 9526–9531.

Stergiakouli, E. et al., 2012. Investigating the Contribution of Common Genetic Variants to the Risk and Pathogenesis of ADHD. *Am J Psychiatry*, februar, 169(2), pp. 186-194.

Toma, D. P., White, K. P., Hirsch, J. & Greenspan, R. J., 2002. Identification of genes involved in *Drosophila melanogaster* geotaxis, a complex behavioral trait. *Nature genetics*, Juni, 31(4), pp. 349-353.

Torres, G. E., Gainetdinov, R. R. & Caron, M. G., 2003. PLASMA MEMBRANE MONOAMINE TRANSPORTERS: STRUCTURE, REGULATION AND FUNCTION. *Nature Reviews Neuroscience*, januar, 4(1), pp. 13-25.

van Swinderen, B. & Flores, K. A., 2007. Attention-Like Processes Underlying Optomotor Performance in a *Drosophila* Choice Maze. *Developmental Neurobiology*, Februar, 67(2), pp. 129-145.

Venken, K. J. T. & Bellen, H. J., 2005. Emerging Technologies for Gene Manipulation in *Drosophila melanogaster*. *Nature Reviews, Genetics*, Marts, Issue 6, pp. 167-178.

Whitlock, M. C. & Schluter, D., 2009. *The Analysis of Biological Data*. 1 red. Greenwood Village(Colorado): Roberts and Company Publishers.

Yang, L. et al., 2013. Polygenic Transmission and Complex Neuro developmental Network for Attention Deficit Hyperactivity Disorder: Genome-Wide Association Study of Both Common and Rare Variants. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, juli, 162(5), pp. 419-430.

Appendiks

Appendiks A Kandidatgener

Formålet er at bruge DRSC Integrative Ortholog Prediction Tool (DIOPT) til at undersøge, hvorvidt der findes orthologe *D. melanogaster* gener til de fundne humane ADHD kandidatgener og eventuelt finde *D. melanogaster* minoslinjer med genotype w[1118]; Mi{ET1}.

- Åben hjemmesiden Drosophila RNAi Screening Center (DRSC), http://www.flyrnai.org/cgi-bin/DRSC_orthologs.pl (Figur 55).

Figur 55 DRSC Integrative Ortholog Prediction Tool (DIOPT). Vælg Input species: *Homo sapiens* (human), Output species: *Drosophila melanogaster* (fly), gen eksempel: PRKG1, afvig Exclude low scores (score > 2, unless only match score is 1 or 2), tryk Submit.

- Select species
 - o Input species, vælg: *Homo sapiens* (human)
 - o Output species, vælg: *Drosophila melanogaster* (fly)
- Enter Genes and/or Proteins
 - o Indsæt de udvalgte humane kandidatgener (sørg for at lave linjeskift efter hvert gennavn)
Eksempel: PRKG1
- Additional Filter
 - o Afvig Exclude low scores (score > 2, unless only match score is 1 or 2)
- Tryk Submit
(Her kommer en liste over det humane kandidatgen, der har flere orthologe *D. melanogaster* gener (Figur 56))

DRSC
Drosophila RNAi Screening Center at Harvard Medical School

new: CRISPR gRNA + donor construct services
click here for DRSC home -> more tools and services

ABOUT ASSAYS REAGENTS PROTOCOLS APPLY PUBLICATIONS ONLINE TOOLS TRIP ENTER

DIOPT - DRSC Integrative Ortholog Prediction Tool

Details of this tool are published in [Hu, et. al.](#)

Your 1 query symbols mapped to 1 genes.

Find RNAi Reagents Download the Results (as a tab-delimited text file, named as ".xls").

Search Term	Human Gene ID	HGNC	Human Symbol	Fly Gene ID	FlyBase	Fly Symbol	Score	Weighted Score	Prediction Derived From	Alignment & Scores
PRKG1	5592	9414	PRKG1	44817	FBgn0000721	for	10	9.669	Compara, Homologene, Inparanoid, Isobase, OMA, OrthoDB, orthoMCL, Phylome, RoundUp, TreeFam	View
PRKG1	5592	9414	PRKG1	33253	FBgn0000442	Pkg21D	4	3.834	Compara, OrthoDB, orthoMCL, RoundUp	View
PRKG1	5592	9414	PRKG1	34348	FBgn0032187	CG4839	4	3.781	Compara, Isobase, OrthoDB, orthoMCL	View

3 results.

Find RNAi Reagents Download the Results (as a tab-delimited text file, named as ".xls").

[Submit another query.](#)

Figur 56 Det humane ADHD kandidatgen PRKG1, har tre orthologe *Drosophila melanogaster* gener med Fly symbols; for (Weighted Score: 9,669 og FlyBase: FBgn0000721), Pkg21D (Weighted Score: 3,834 og FlyBase: FBgn0000442) og CG4839 (Weighted Score: 3,781 og FlyBase: FBgn0032187).

- Tjek om de orthologe *D. melanogaster* gener har en minoslinje med genotype w[1118]; Mi{ET1} og udvælg de orthologe *D. melanogaster* gener der har højst Weighted Score med genotype w[1118]; Mi{ET1}

Eksempel

- o Tryk på FlyBase (FBgn0000442), da øverste match ikke har en minoslinje med genotype w[1118]; Mi{ET1}

(Her kommer en oversigt over det orthologe *D. melanogaster* gen (Figur 57))

FB2014_06, released November 12th, 2014

FlyBase

Gene Dmel\Pkg21D

Home Tools Files Species Documents Resources News Help Archives

General Information			
Symbol	Dmel\Pkg21D	Species	<i>D. melanogaster</i>
Name	cGMP-dependent protein kinase 21D	Annotation symbol	CG3324
Feature type	protein_coding_gene	FlyBase ID	FBgn0000442
Gene Model Status	Current	Stock availability	6 publicly available
Also Known As	dg1, PKG		
Genomic Location			
Cytogenetic map	21E2-21E2	Sequence location	2L:786,153..790,798 [-]
Genomic Maps			Decorated FASTA <input type="button" value="Get genome region"/> Gene region <input type="text" value="v"/> <input type="button" value="Get FastA"/>
<input type="button" value="GBrowse"/>			
Families, Domains and Molecular Function			

Figur 57 Oversigt over det orthologe *Drosophila melanogaster* gen Pkg21D. Tryk på Stock availability (6 publicly available).

- Tryk på Stock availability (6 publicly available)
(Her kommer en liste over forskellige tilgængelige *D. melanogaster* linjer (Figur 58))

FB2014_06, released November 12th, 2014

FlyBase

Stocks

Home Tools Files Species Documents Resources News Help Archives

6 matches Convert to

		Results Analysis/Refinement		HitList Conversion Tools
<input checked="" type="checkbox"/>	#Collection↑	↓Stock No.↑	↓Genotype↑	↓Species↑
<input checked="" type="checkbox"/>	1 Bloomington Drosophila Stock Center	24228	w[1118]; Mi{ET1};Pkg21D[MB04805]	Dmel
<input checked="" type="checkbox"/>	2 Bloomington Drosophila Stock Center	27686	y[1] v[1]; P{y{+t7.7} v{+t1.8}=TRIP.JF02766}attP2	Dmel
<input checked="" type="checkbox"/>	3 Vienna Drosophila RNAi Center	v34594	w[1118]; P{GD10936}v34594	Dmel
<input checked="" type="checkbox"/>	4 Vienna Drosophila RNAi Center	v34595	w[1118]; P{GD10936}v34595	Dmel
<input checked="" type="checkbox"/>	5 Vienna Drosophila RNAi Center	v103513	P{KK112484}VIE-260B	Dmel
<input checked="" type="checkbox"/>	6 Exelixis at Harvard Medical School	-	PBac{WH}Pkg21D[f05504]	Dmel

version FB2014_06, released November 12, 2014
[Contact FlyBase](#) [Cite FlyBase](#)

Figur 58 Oversigt over tilgængelige *Drosophila melanogaster* linjer. Øverste match har den ønskede genotype w[1118]; Mi{ET1}.

- Øverste match har genotype w[1118]; Mi{ET1}.
Det vil sige PRKG1 har et ortholog *D. melanogaster* gen med genotype w[1118]; Mi{ET1}Pkg21D[MB04805] med Flybase stock nr. 24228 og en Weighted Score på 3,834.

Kandidatgener ud fra litteraturstudie og databasesøgninger

Candidate Genes					
a. Search Term b. Human Symbol c. Fly Symbol	Fly Base Stock no	a. DIOPT Score b. Weighted Score	Reference	Method	Sample Size
a. SPOCK3 b. SPOCK3 c. CG13830	23767	a. 5 b. 3.793	(Neale, et al., 2008)	GWAS of ADHD	909 family trios: 2727 individuals, 2370 males, 357 females (438.784 SNPs)
a. DDC b. DDC c. Tdc1	24213	a. 3 b. 2.851	(Neale, et al., 2010)	Meta-Analysis of GWAS	2.064 trios, 896 cases, and 2.455 controls (1.206.462 SNPs)
a. PRKG1 b. PRKG1 c. Pkg21D	24228	a. 4 b. 3.834	(Neale, et al., 2010) (Yang, et al., 2013)	Case-Control GWAS GWAS of ADHD in Han Chinese Case-Control Sample	2.064 trios, 896 cases, and 2.455 controls (1.033.244 SNPs) 1040 ADHD cases and 963 controls (656,051 SNP's)
a. HTR1B b. HTR1B c. 5-HT1B	24240	a. 4 b. 3.844	(Banaschewski, et al., 2010)	Overview	
a. NOS1 b. NOS1 c. Nos	24283	a. 9 b. 7.706	(Banaschewski, et al., 2010)	Overview	
a. TMX3 b. TMX3 c. CG5027	24687	a. 10 b. 8.709	(Yang, et al., 2013)	GWAS of ADHD in Han Chinese Case-Control Sample	1040 ADHD cases and 963 controls (656,051 SNP's)
a. ALK b. ALK c. Alk	25509	a. 9 b. 7.759	(Mick, et al., 2011)	GWAS of the CBCL-DP	735 DSM-IV-TR ADHD trios from 732 families (835,136 SNPs)
a. FURIN b. FURIN c. Fur1	25518	a. 6 b. 4.764	(Neale, et al., 2010)	Meta-Analysis of GWAS	2.064 trios, 896 cases, and 2.455 controls (1.206.462 SNPs)
a. CHRNA7 b. CHRNA7 c. nAcRalpha-30D	25519	a. 8 b. 6.709	(Stergiakouli, et al., 2012)	GWAS of ADHD in children combined with rare CNVs in the children with ADHD	727 ADHD cases and 5.081 controls (502.702 SNPs)
a. SLC6A2/NET1 b. SLC6A2 c. DAT	25547	a. 8 b. 6.698	(Banaschewski, et al., 2010)	Overview	
a. SLC6A3/DAT1 b. SLC6A3 c. DAT	25547	a. 5 b. 3.745	(Banaschewski, et al., 2010)	Overview	
a. CDH13 b. CDH13 c. CadN2	26103	a. 1 b. 0.91	(Neale, et al., 2008) (Lesch, et al., 2008) (Neale, et al., 2010) (Neale, et al., 2010) (Banaschewski, et al., 2010) (Lasky-Su, et al., 2008)	GWAS of ADHD GWAS of ADHD in adults Case-Control GWAS Meta-Analysis of GWAS Overview GWAS scan	909 family trios: 2727 individuals, 2370 males, 357 females (438.784 SNPs) 343 ADHD-affected adults and 304 controls (504.219 SNPs) 2.064 trios, 896 cases, and 2.455 controls (1.033.244 SNPs) 2.064 trios, 896 cases, and 2.455 controls (1.206.462 SNPs) 909 trios, (429.981 SNPs)
a. NTM b. NTM c. CG31646	27790	a. 6 b. 5.698	(Yang, et al., 2013)	GWAS of ADHD in Han Chinese Case-Control Sample	1040 ADHD cases and 963 controls (656,051 SNP's)
a. KALRN b. KALRN c. trio	29073	a. 7 b. 5.829	(Lesch, et al., 2008)	GWAS of ADHD in adults	343 ADHD-affected adults and 304 controls (504.219 SNPs)
a. SSTR1 b. SSTR1 c. star1	29924	a. 4 b. 3.919	(Yang, et al., 2013)	GWAS of ADHD in Han Chinese Case-Control Sample	1040 ADHD cases and 963 controls (656,051 SNP's)

Appendiks B Protokol for fremstilling af *D. melanogaster* medie

Opskriften er en modificeret udgave af den anvendt ved Bloomington, (Bloomington Drosophila Stock Center at Indiana University, 2014).

Ingredienser for cirka 3 l *D. melanogaster* medie

- 2,8 l vand
- 48 g tørgær
- 28 g sojamel
- 200 g majs mel
- 16 g agar
- 300 g glukosesirup
- 28 ml Nipagen
- 3 ml 80 % eddikesyre

Fremgangsmåde

- Bland gær og sojamel med 200 ml vand
- Bland majs mel og agar med 450 ml vand
- Bring resten af vandet (2150 ml) i kog
- Når vandet kun lige koger, hæld majsblandingen forsigtigt i under kraftig omrøring for at undgå klumper
- Slå luften ud af gærblandingen og vend den i og rør det godt sammen
- Rør glukosen i og lad blandingen koge i 5 minutter under omrøring
- Tag gryden af blusset og lad det køle en anelse af
- Sæt gryden i stinkskab og tilsæt derefter Nipagen og eddikesyre
 - Nipagen: til 1 liter blandes 95 g Methyl-4-hydroxybenzoate, 700 ml ethanol og 250 ml demineraliseret vand.
- Hæld blandingen på rør med det samme, mens den stadig er varm
 - 35-36 gram i 175 ml rør, 14-15 gram i 68 ml rør og 5-6 g i 35 ml rør
- Opbevar rørene ved 10 °C med skumpropper på.

Noter til ingredienser

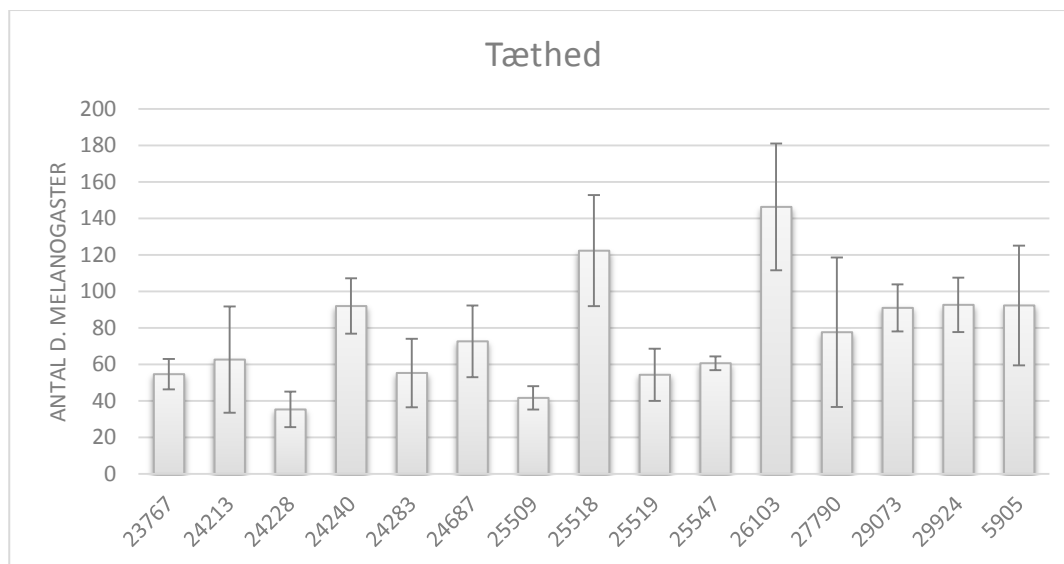
- Tørgær, Instaferm® RED Instant Dry Baker's Yeast
- Sojamel fuldfed, KRYTA Krydderier, varenr. 2009
- Majs mel, AB CATERING – Aalborg
- Glukosesirup, 84 %, IGOS, vare nr. 6008.0015
- Agar, ash 3,0-4,5 %, SIGMA-ALDRICH, A7002-1KG, CAS 9002-18-0
- Eddikesyre 99,8 %, SIGMA-ALDRICH, CAS 64-19-7
- Ethanol 99,9 %, CCS Healthcare AB, CAS 64-17-5
- Methyl-4-hydroxybenzoate, Fluka analytical, CAS: 99-76-3

Appendiks C *D. melanogaster*

Crowding hos *D. melanogaster*

Under opdræt af *D. melanogaster* til forsøg blev der yderligere vedligeholdt 3x175 ml rør med kontrol *D. melanogaster* og 3x175 ml rør med mutant *D. melanogaster* til crowding undersøgelse. Disse blev holdt under samme forhold som de *D. melanogaster*, der skulle benyttes til forsøg. Ved forsøgets afslutning, blev *D. melanogaster* fra de 6x175 ml rør separat lagt på frys, for senere at kunne bestemme det gennemsnitlige antal *D. melanogaster* for hver minoslinje med tilhørende kontrol.

Det gennemsnitlige antal *D. melanogaster* for minoslinjerne varierede fra 35 *D. melanogaster* til 146 *D. melanogaster*. Antallet af *D. melanogaster* for kontrollen var gennemsnitlig 92 *D. melanogaster* (Figur 59). *t*-tests baseret på forskellen mellem de gennemsnitlige antal mutant *D. melanogaster* og kontrol, viste ingen signifikante forskelle mellem antal mutant *D. melanogaster* og antal kontrol *D. melanogaster*, gældende for alle 14 minoslinjer. *t*-tests var baseret på tre replikater (Appendiks H, s. XXXIII).



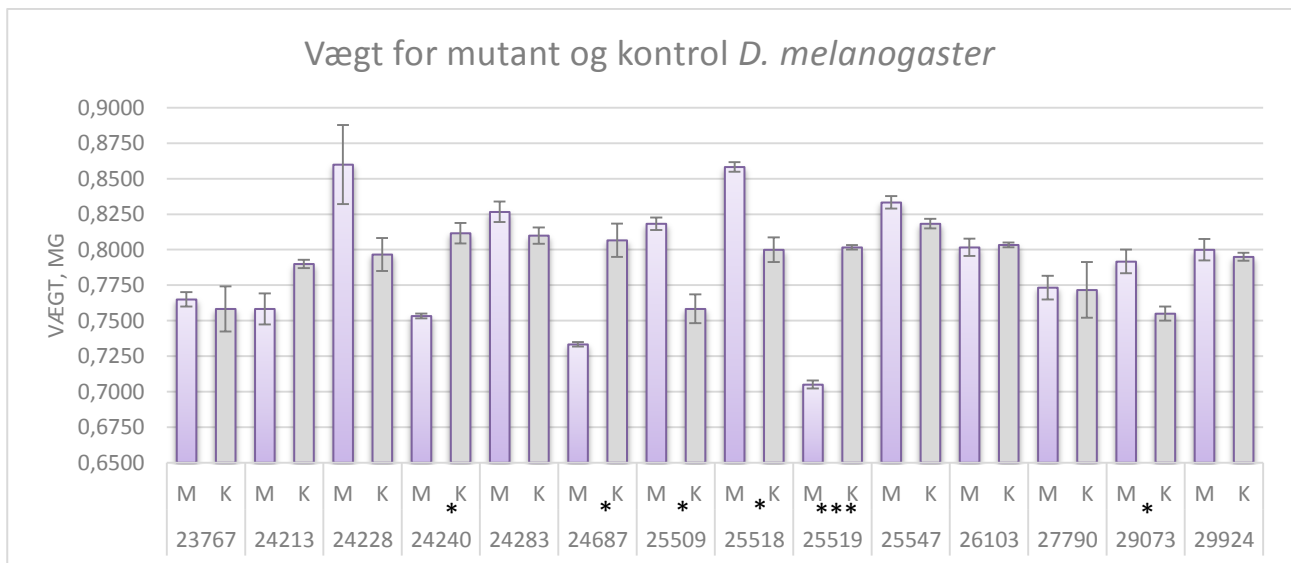
Figur 59 Gennemsnitlige antal \pm standardfejl af *Drosophila melanogaster* for hver minoslinje samt kontrol i 175 ml rør med 34-35 g *Drosophila melanogaster* medie.

Vægt for *D. melanogaster*

Ved udførsel af labyrintforsøg, blev der under kønssorteringen yderligere udtaget 3x20 *D. melanogaster* hanner til senere vejning. Disse blev holdt under samme forhold som de *D. melanogaster* hanner, der skulle benyttes til forsøg. Ved forsøgets afslutning, blev de 3x20 *D. melanogaster* hanner lagt på frys, for senere at kunne bestemme den gennemsnitlige vægt for hver minoslinje med tilhørende kontrol.

Den gennemsnitlige vægt for en *D. melanogaster* han for hver minoslinje og kontrol var baseret på tre replikater af hver 20 *D. melanogaster* hanner (Appendiks H, s. XXXIII). Den gennemsnitlige vægt for en *D. melanogaster* han varierede fra 0,7550 milligram til 0,8183 milligram. *t*-tests baseret på gennemsnitlige vægtforskelle mellem mutant *D. melanogaster* og kontrol, viste at minoslinjer 24240, 24687, 25509, 25518 og 29073 var signifikant forskellige fra tilhørende kontrol med *p*-værdier mindre end 0,05, indikeret med *.

Minoslinje 25519 var signifikant forskellig fra kontrollen med en p -værdi mindre end 0,001, indikeret med *** (Figur 60). t -tests var baseret på tre replikater (Appendiks H, s. XXXIII).



Figur 60 Gennemsnitlig vægt \pm standardfejl for en *Drosophila melanogaster* han for hver minoslinje og kontrol, baseret på tre replikater af hver 20 *Drosophila melanogaster* hanner. Signifikante forskelle mellem minoslinje og kontrol ved t -tests er indikeret med * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Klækningsprocent for *D. melanogaster*

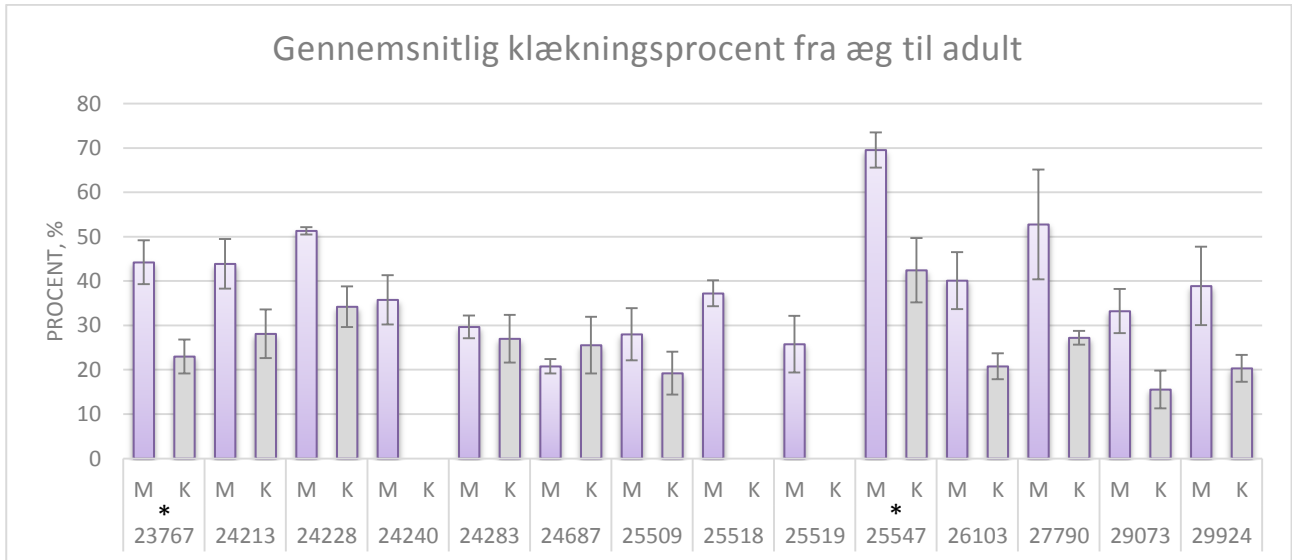
I fem 35 ml rør med en teske med *D. melanogaster* medie og en knivspids tørgær, blev der overført cirka ti kønsmodne *D. melanogaster* hanner og hunner (Figur 61). Over tre dage udskiftedes teskeerne til nye og 300 æg fra de udskiftede teske (cirka 60 fra hver teske) blev overført til tre 175 ml rør med 34-35 gram fluemedie, i alt ni rør per minoslinje. Til hver minoslinje følger tre kontrolrør per dag, i alt ni kontrolrør.



Figur 61 Til venstre, reagensglasstativ med *Drosophila melanogaster* i 35 ml rør med *Drosophila melanogaster* medie og tørgær på teske. Til højre, 175 ml rør med 34-35 gram *Drosophila melanogaster* medie til de udtaget æg.

De gennemsnitlige klækningsprocenter for mutant *D. melanogaster* varierede fra 21 % til 70 % og for kontrollen varierede de gennemsnitlige klækningsprocenter fra 16 % til 42 %. De gennemsnitlige klækningsprocenter var baseret på tre replikater. t -tests baseret på forskellen mellem de gennemsnitlige klækningsprocenter for en minoslinje og kontrol, viste at minoslinjer 23767 og 25547 var signifikant

forskellige fra tilhørende kontrol med en p -værdi mindre end 0,05, indikeret med * (Figur 62). t -tests var baseret på tre replikater (Appendiks H, s. XXXIII).



Figur 62 Gennemsnitlig klækningsprocent \pm standardfejl for *Drosophila melanogaster* for hver minoslinje og hver kontrol, baseret på tre replikater. Signifikante forskelle mellem minoslinje og kontrol ved t -tests er indikeret med * $P < 0,05$. Både minoslinje 23767 og 25547 er signifikant forskellig fra tilhørende kontrol med $P < 0,05$.

Appendiks D Protokol for Arenaforsøg

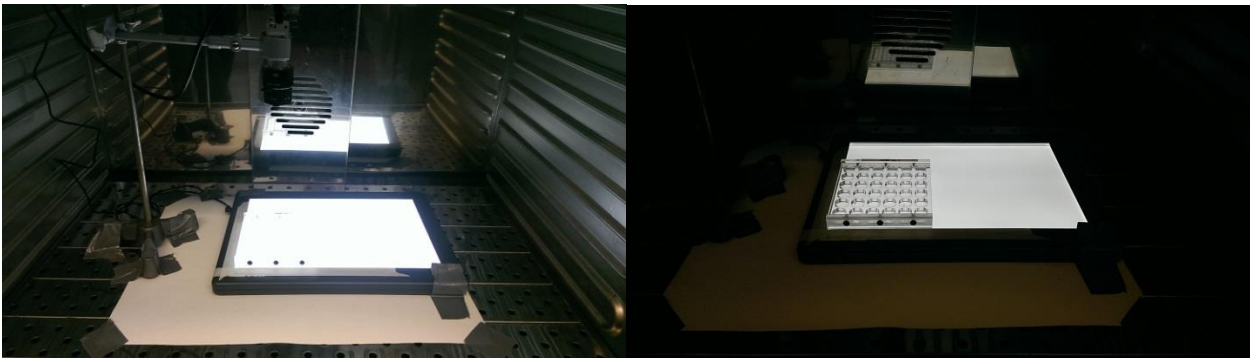
Formålet med forsøget er at undersøge adfærd og aktivitet hos to forskellige *D. melanogaster* minuslinjer sammenholdt med en *D. melanogaster* minuskontrollinje ved 25 °C.

Metode

Håndtering af *D. melanogaster* op til forsøg (Metoder).

Dag 1

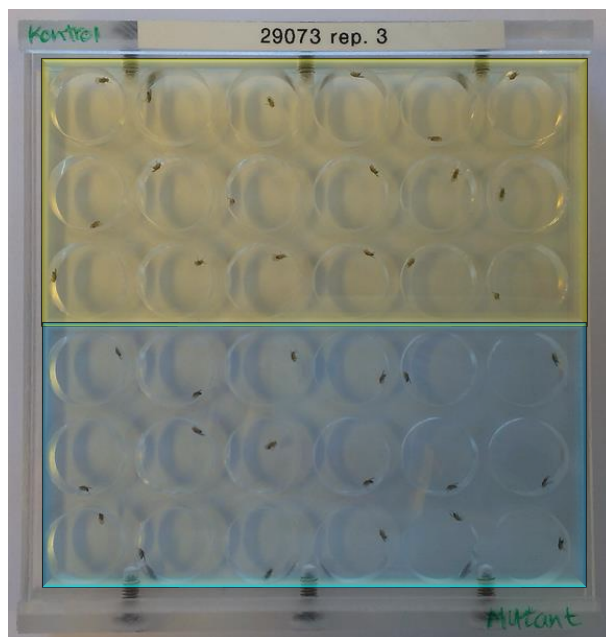
- Klargør forsøgsopstillingen i varmeskab (Memmert ICP 600). Forsøgsopstillingen skal bestå af et lysbord (DÖRR LP-400 LED), en trefod med muffe, et videokamera (BASLER og COMPUTAR) og arena (Figur 63)
- Tilkoble videokamera til en computer med program Noldus EthoVision XT
- Opret en fil i Noldus EthoVision XT (Appendiks E, s. XV) for opsætning af programmet
- Tænd varmeskabet på 25 °C. Lad varmeskabet være tændt natten over for at stabilisere temperaturen



Figur 63 Forsøgsopstilling i varmeskab.

Dag 2

- Tænd computer, kamera og start filen i Noldus EthoVision
- Påbegynd overførslen af *D. melanogaster* (Figur 64)
 - o Arena 1, linje 1, replikat 1: Overfør en kontrol *D. melanogaster* til brønd 1-18 og dernæst en mutant *D. melanogaster* (linje 1) til brønd 19-36
 - o Arena 2, linje 2, replikat 1: Overfør en kontrol *D. melanogaster* til brønd 1-18 og dernæst en mutant *D. melanogaster* (linje 2) til brønd 19-36 i Arena 2
 - o Gentag fremgangsmåden med Arena 3 (linje 1, replikat 2), 4 (linje 2, replikat 2), 5 (linje 1, replikat 3) og 6 (linje 2, replikat 3)



Figur 64 Arena med 18 kontrol *Drosophila melanogaster* (gult felt) og 18 mutant *Drosophila melanogaster* (blåt felt).

- Påbegynd forsøget, se forsøgstider (Figur 65)
 - o Bank Arena 1 i bordet tre gange og sæt den direkte ind på lysbordet i varmeskabet, luk varmeskabet og påbegynd videooptagelse 1
 - o Efter endt videooptagelse, bank Arena 2 i bordet tre gange og udskift Arena 2 med Arena 1 i varmeskabet, luk varmeskabet og påbegynd videooptagelse 2
 - o Gentag med Arena 3, 4, 5 og 6
- Tøm arenaerne i en fire liters plasticpose og mas *D. melanogaster*

Vigtigt! Undgå at åbne venstre låge i varmeskabet både pga. varmetab og kameraets lysfølsomhed. Sæt arenaerne i varmeskabet, når *D. melanogaster* er overført, for at undgå mindst mulig temperaturvariation. Noter varmeskabets temperaturvariation under hver videooptagelse. Vask arenaerne efter brug.

Model – Arenaforsøg		
Overførsel af <i>D. melanogaster</i> til arenaer start		
kl. 8:10-8:25	Arena 1: linje 1, replikat 1	
Kl. 8:25-8:40	Arena 2: linje 2, replikat 1	
Kl. 8:40-8:55	Arena 3: linje 1, replikat 2	
Kl. 8:55-9:10	Arena 4: linje 2, replikat 2	Forsøg start
		kl. 9:00-9:05 Arena 1: linje 1, replikat 1
		kl. 9:05-9:10 Arena skift
Kl. 9:10-9:25	Arena 5, linje 1, replikat 3	kl. 9:10-9:15 Arena 2: linje 2, replikat 1
		kl. 9:15-9:20 Arena skift
		kl. 9:20-9:25 Arena 3: linje 1, replikat 2
Kl. 9:25-9:40	Arena 6: linje 2, replikat 3	kl. 9:25-9:30 Arena skift
		kl. 9:30-9:35 Arena 4: linje 2, replikat 2
		kl. 9:35-9:40 Arena skift
		kl. 9:40-9:45 Arena 5, linje 1, replikat 3
		kl. 9:45-9:50 Arena skift
		kl. 9:50-9:55 Arena 6: linje 2, replikat 3

Figur 65 Tidsoversigt af Arenaforsøg.

Materialeliste

Seks arenaer med topplader og overførselsplader

Suger

Labelmaskine (Brother, PT-1280)

Varmeskab (Memmert, ICP 600)

Lysbord (DÖRR, LP-400 LED)

Trefod med muffe

Kamerahus (BASLER, acA 1300 – 60gmNIR, ID: 106202-05, S/N: 21425467)

Objektiv (COMPUTAR, 4-8 mm, 1:1,4 1/2" C MP)

Computer med program (Noldus, EthoVision XT)

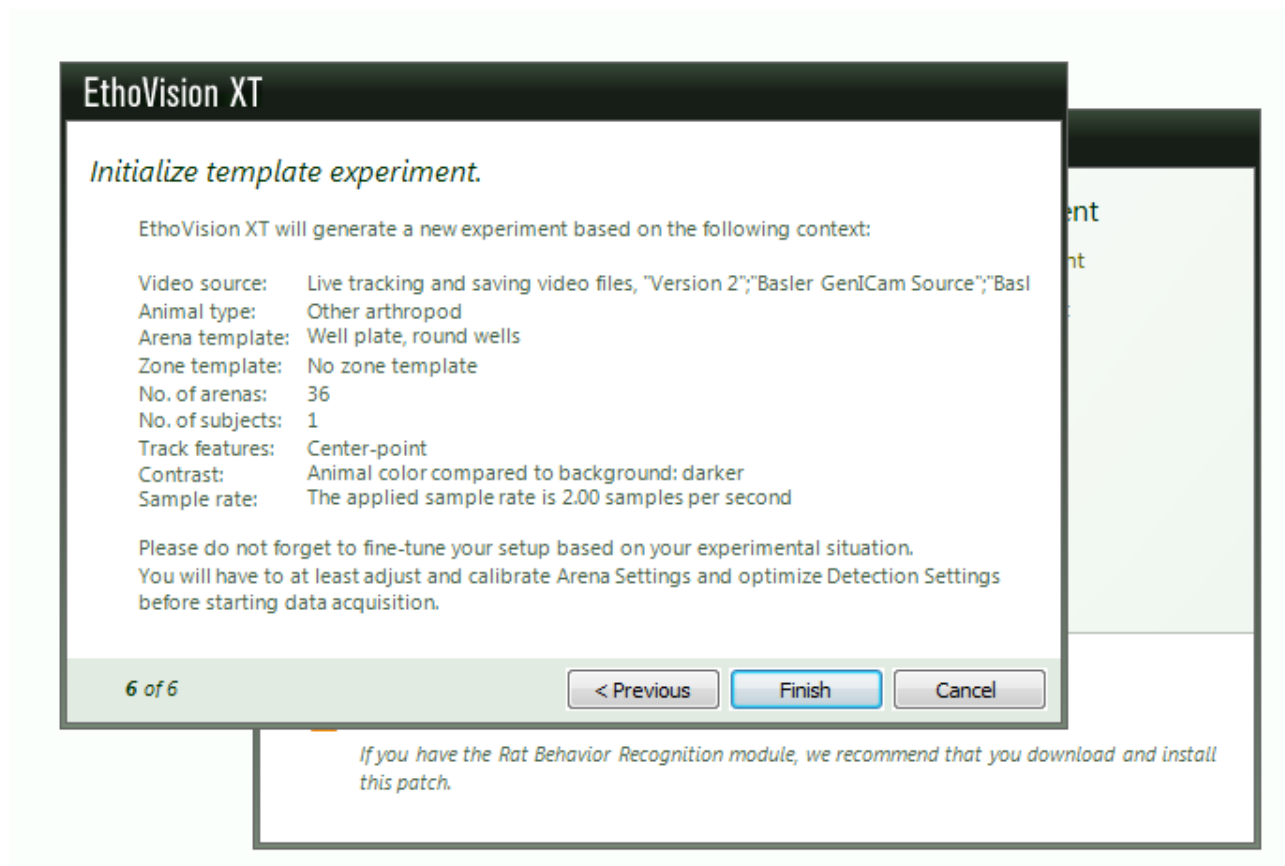
3x68 ml rør med *D. melanogaster* (minoslinje 1)

3x68 ml rør med *D. melanogaster* (minoslinje 2)

6x68 ml rør med *D. melanogaster* (minoskontrollinje)

Appendiks E Tracking af *D. melanogaster* med EthoVision XT 10 base

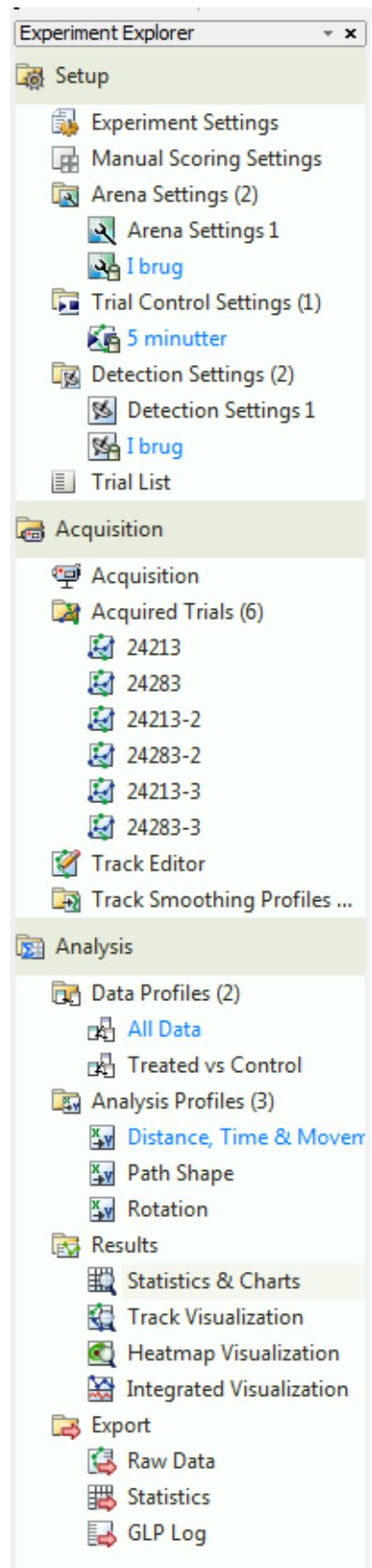
Til tracking af *D. melanogaster* i arenaerne er bruges softwaren EthoVision XT 10 base fra Noldus. Før forsøget sættes programmet op. Først justeres kameraet. I dette tilfælde benyttes et Basler GenICam (Basler acA1300-60). Kameraet stilles skarpt og blænden justeres til det optimale billede af arenaen i den forsøgsopstilling der ønskes. Resolution sættes til 1280x1024 og frame rate er 30. Disse kan justeres under startmenuen, som fremkommer, når der startes et helt nyt eksperiment eller under menuen **Experiment Settings**, som findes i værktøjsvinduet **Experiment Explorer** (Figur 67). Under startmenuen kan der også indtastes, hvilken modelorganisme, der benyttes og arenaens design, programmet foreslår selv en arenaopsætning mm., som kan passe til forsøget (Figur 66). Under **Experiment Settings** kan unit of time, distance og rotation også justeres til det ønskede.



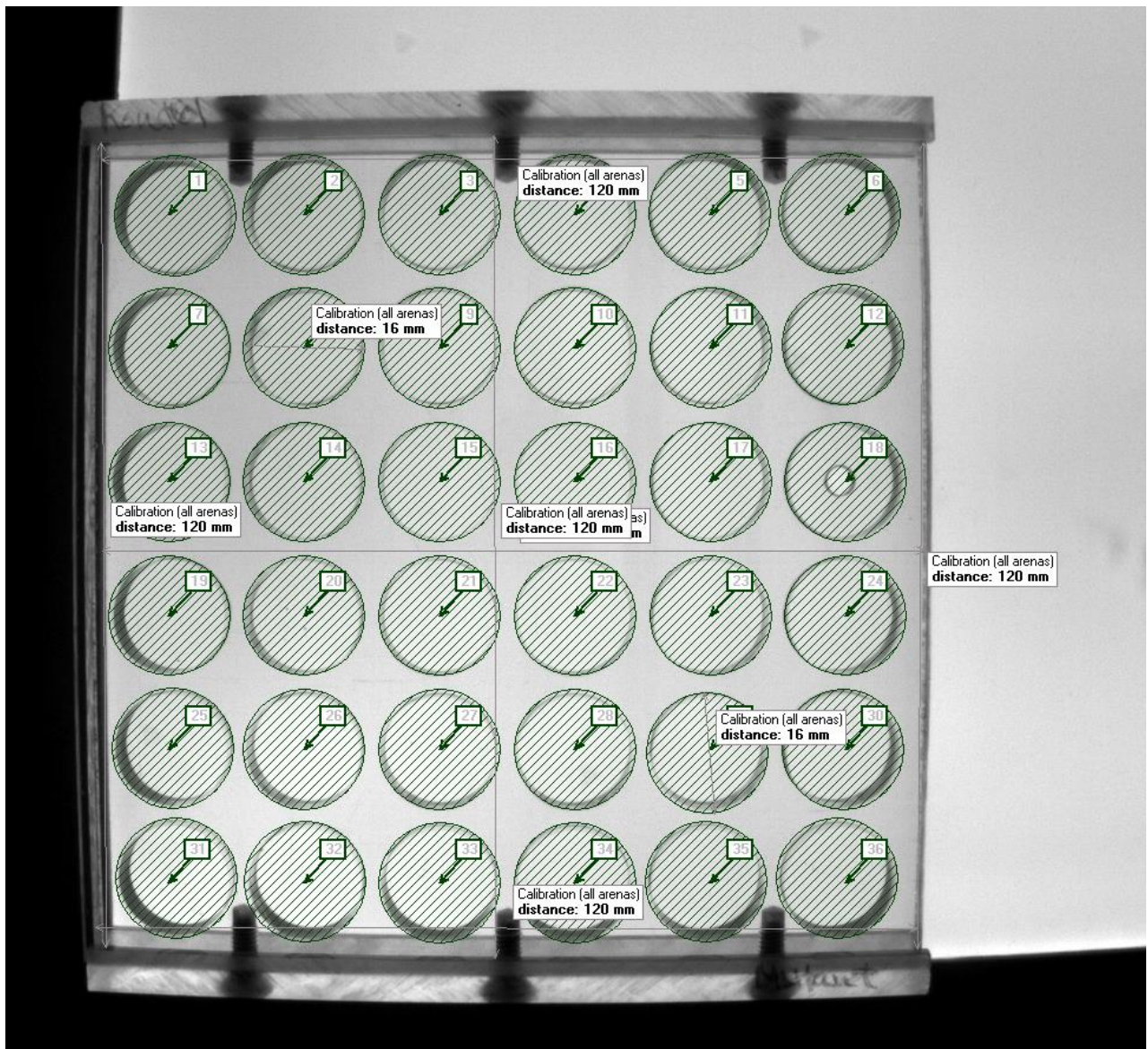
Figur 66 Menu ved opstart af et nyt eksperiment. Genvej til Experiment Settings. Arenaens design og hvilken modelorganisme, der benyttes indtastes og programmet foreslår en opsætning, der kan passe til forsøget.

Der tages et billede med kameraet og arenaens dimensioner og områder, der ønskes tracked angives under menuen **Arena Settings**. Arenaen inddeles i zoner fra 1- 36 svarende til brøndene i arenaen (i programmet angivet som arena 1-36). Zonerne sættes op ved hjælp af værktøjet **Multiple Arena Setup**, da alle brøndene er samme størrelse. Zonerne placeres så de dækker brøndene så vidt muligt (Figur 68). Til hver zone angives desuden et center. Dernæst kalibreres arenaen ved at angive kendte mål for længde og bredde, samt brøndenes diameter.

Derefter sættes trials op under **Trial Control Settings**. Den sættes op til at køre i fem minutter efter start, hvorefter kørslen automatisk stopper (Figur 69).

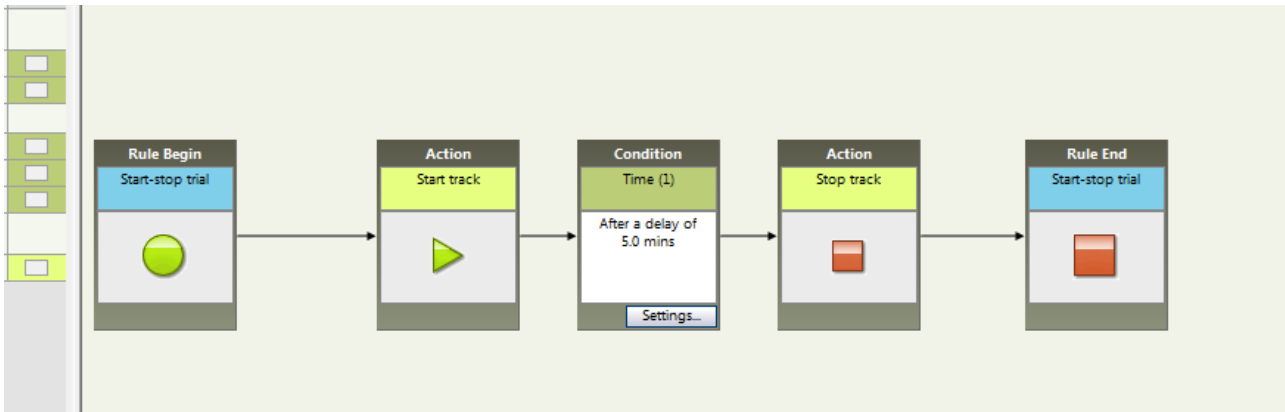


Figur 67 Værktøjsvinduet Experiment Explorer, hvor indstillinger for Setup, Acquisition og analysis findes.

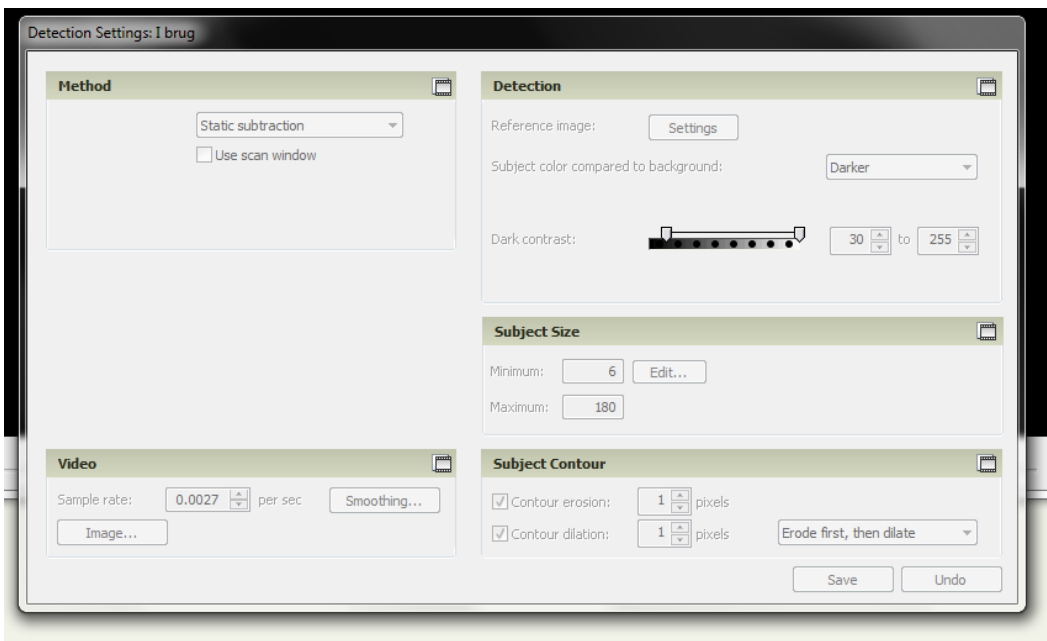


Figur 68 Arena Settings. Arenaen er inddelt i cirkulære zoner fra 1-36 svarende til arenaens brønde. For hver brønd er angivet et center point. Kalibreringen af arenaen er også angivet. Længde og bredde er angivet til 120 mm og brøndenes diameter er 16 mm.

For at kunne tracke *D. melanogaster*, skal **Detection Settings** være korrekt sat op. Dette gøres med *D. melanogaster* i arenaen. Det foregående billede brugt til **Arena Settings** angives som referencebillede. Til denne forsøgsopstilling vælges **Static subtraction**, da baggrunden og lysætningen forbliver den samme under forsøget, men modelorganismen kan godt ramme den samme gråtone som baggrunden. Sample rate sættes til to samples per sekund. I subject color vælges mørkere end baggrunden og kontrasten angives ud fra billedet. I dette forsøg bruges 30 til 255. Subject størrelse angives ved hjælp af værktøjet, der kommer frem, når der trykkes edit. I dette tilfælde er den angivet til minimum seks og maksimum 180. Subject contour sættes til 1 for både erosion og dilation (Figur 70).



Figur 69 Trial Control Settings. Efter start varer en kørsel fem minutter, hvorefter trial automatisk stopper.



Figur 70 Detection Settings. Til referencebillede benyttes billedet fra Arena Settings og kontrast og subject size angives efterfølgende. Til forsøget benyttes Static subtraction.

I øverste højre hjørne klikkes **Show/Hide** og **Arena Features** vælges, dermed kan der angives farverne for Center-point, Body fill og Noise, imens videokameraet kører. Indstillingerne i **Detection Settings** bør finjusteres for at eliminere Noise og så Center-point og Body fill følger modelorganismen konstant. Dernæst kan kørslerne planlægges under **Trial List**. Der addes det antal trials, der ønskes kørt og disse sættes op så, der er valgt de ønskede **Arena Settings**, **Detection Settings** og **Trial Settings**. Desuden kan der addes variables som Trial name, Treatment eller Subject not found, for at skabe overblik (Figur 71).

Trial List							
Add Trials...		Add Variable					
	System	System	System	System	System	User-defined	System
Label	Start time	Acquisition status	Arena settings	Trial name	Detection settings	Treatment	Subject not found
Description	The start time of the trial	The current status of acquisition per arena	The arena settings used for acquisition	The name of the trial	The detection settings used for acquisition	(Exemplary)	Proportion samples not found
Type	Time stamp			Text		Text	Numerical
Format	dd/MM/yyyy H						x,x %
Predefined Values						Control; Treated; 2421	
Scope	Trial	Arena	Trial	Trial	Trial	Subject	Subject
Trial	Arena	Subject	No.				
1	Subject 1	1		Acquired		Control	0.0 %
2	Subject 1	2		Acquired		Control	0.0 %
3	Subject 1	3		Acquired		Control	0.0 %
4	Subject 1	4		Acquired		Control	0.0 %
5	Subject 1	5		Acquired		Control	0.0 %
6	Subject 1	6		Acquired		Control	0.0 %
7	Subject 1	7		Acquired		Control	0.0 %
8	Subject 1	8		Acquired		Control	0.0 %
9	Subject 1	9		Acquired		Control	0.0 %
10	Subject 1	10		Acquired		Control	0.0 %
11	Subject 1	11		Acquired		Control	0.0 %
12	Subject 1	12		Acquired		Control	0.0 %
13	Subject 1	13		Acquired		Control	0.0 %
14	Subject 1	14		Acquired		Control	0.0 %
15	Subject 1	15		Acquired		Control	0.0 %

Figur 71 Trial List. Der kan addes så mange trial, der ønskes kørt og der kan angives hvilke settings, der ønskes benyttet for den enkelte trial. Desuden kan der addes variable som Trial name, Treatment eller Subject not found, for at skabe overblik over sine trials.

Under menuen **Acquisition** kan kørslerne startes, når forsøget ønskes kørt. I vinduet **Acquisition Settings** vælges hvilken trial, af de allerede angivne under **Trial List**, der ønskes kørt (Figur 72). Kørslen startes i vinduet **Acquisition Control**. Under kørslen er brøndene 1-36 i tabellen synlige og for hver brønd er status for brøndens starttid, varighed, missed samples og subject not found mulig at finde, for den pågældende kørsel. For de to sidste værdier kan angives et treshold, hvor de skifter til en rød farve, for at synliggøre, hvis en tracking ikke er optimal. I dette forsøg angives en grænse ved 10 %.

Video Window

No trial planned

Acquisition Settings

Method

- Track next planned trial Save video
- Track all planned trials 0 planned trials
- Inter-trial interval: 0:00:00
- Save video only, track later
- Track next saved video file
- Track all saved video files 0 postponed trials

Settings

Trial: No trial planned

Video: No video to track

Arena settings: 1 brug

Trial Control settings: 5 minutter

Detection settings: 1 brug

Options

Clear and redo a trial:

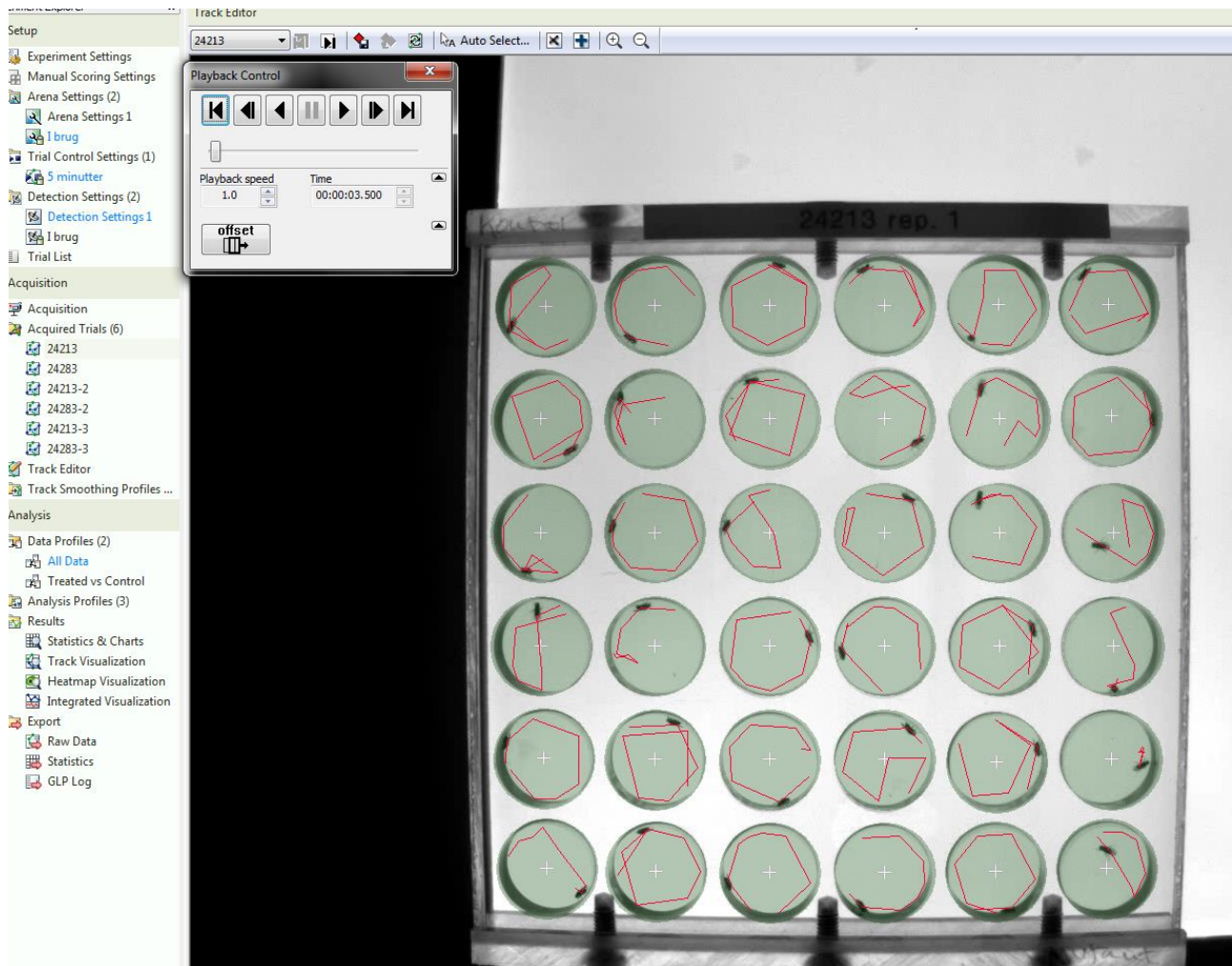
Auto-start data analysis Active profiles only All profile combinations

Acquisition Control

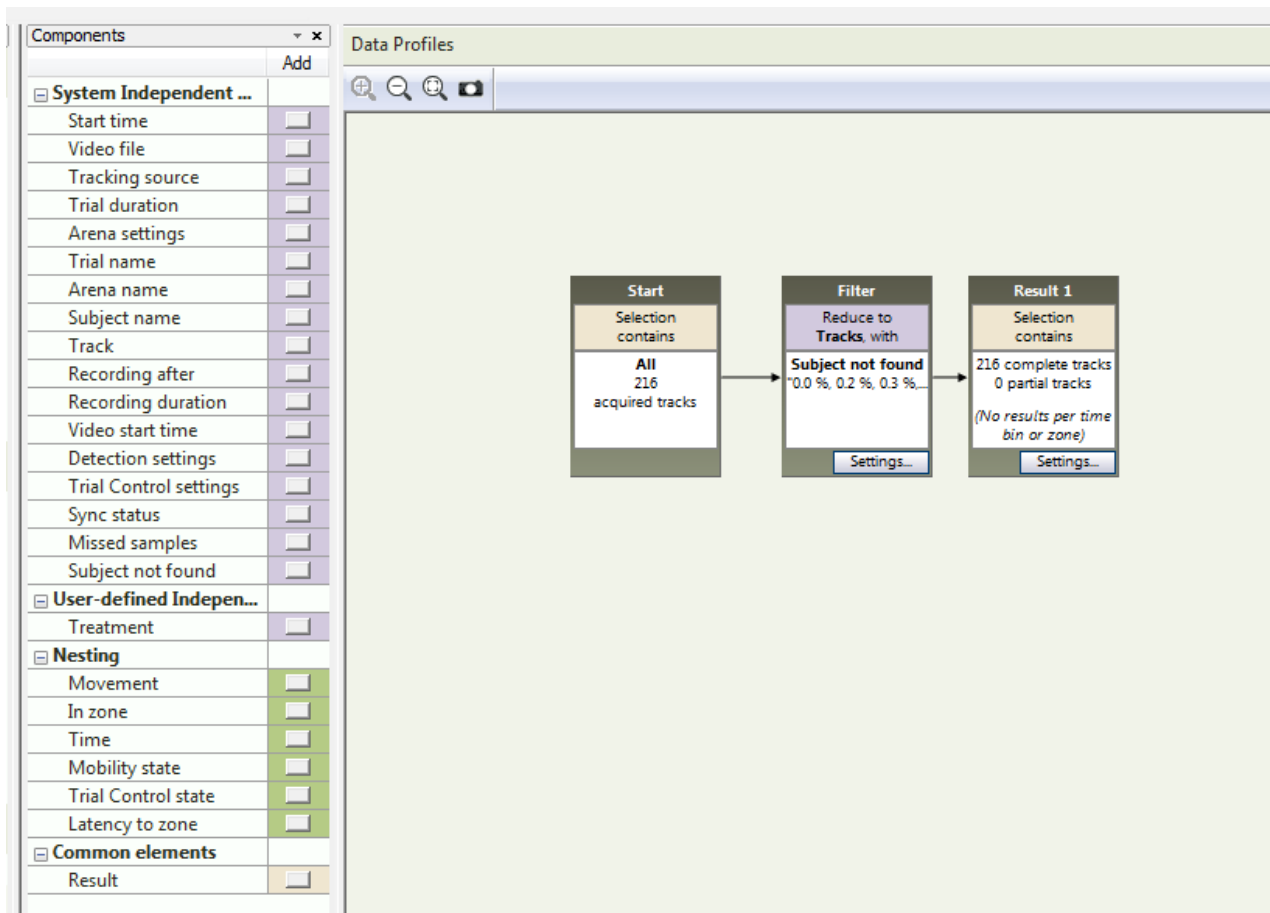
Trial	Arena	Trial start	Acquisition start	Time acquiring	Missed samples	Subject not found
1			00:00:00	00:00:00	0.0% (0 samples)	0.0% (0 samples)
2			00:00:00	00:00:00	0.0% (0 samples)	0.0% (0 samples)
3			00:00:00	00:00:00	0.0% (0 samples)	0.0% (0 samples)
4			00:00:00	00:00:00	0.0% (0 samples)	0.0% (0 samples)
5			00:00:00	00:00:00	0.0% (0 samples)	0.0% (0 samples)
6			00:00:00	00:00:00	0.0% (0 samples)	0.0% (0 samples)
7			00:00:00	00:00:00	0.0% (0 samples)	0.0% (0 samples)
8			00:00:00	00:00:00	0.0% (0 samples)	0.0% (0 samples)
9			00:00:00	00:00:00	0.0% (0 samples)	0.0% (0 samples)
10			00:00:00	00:00:00	0.0% (0 samples)	0.0% (0 samples)
11			00:00:00	00:00:00	0.0% (0 samples)	0.0% (0 samples)
12			00:00:00	00:00:00	0.0% (0 samples)	0.0% (0 samples)
13			00:00:00	00:00:00	0.0% (0 samples)	0.0% (0 samples)
14			00:00:00	00:00:00	0.0% (0 samples)	0.0% (0 samples)
15			00:00:00	00:00:00	0.0% (0 samples)	0.0% (0 samples)
16			00:00:00	00:00:00	0.0% (0 samples)	0.0% (0 samples)

Figur 72 Acquisition. De røde linjer på videobilledet er trackingen af *Drosophila melanogaster* i hver brønd og nedenfor billedet en tabel med data for hver brønd. Under kørsel fremhæves missed samples og subject not found. Begge tal bliver røde, hvis de kommer over en angivet procendel. I vinduet Acquisition Settings vælges, hvilken Trial, der ønskes kørt, og under Acquisition Control startes kørslen.

Efter alle trials er kørt vælges hvilke data, der ønskes analyseret under **Data Profiles**. I dette forsøg opstilles kriterierne til kun at omfatte brønde, hvor der ikke er mere end 10 % af samples, hvor *D. melanogaster* ikke er fundet. Det angives under reduce to tracks with subject not found $\leq 10\%$. Efter kørslen af de ønskede trials fremkommer de under **Acquired Trials**, hvor de også kan afspilles igen (Figur 73).

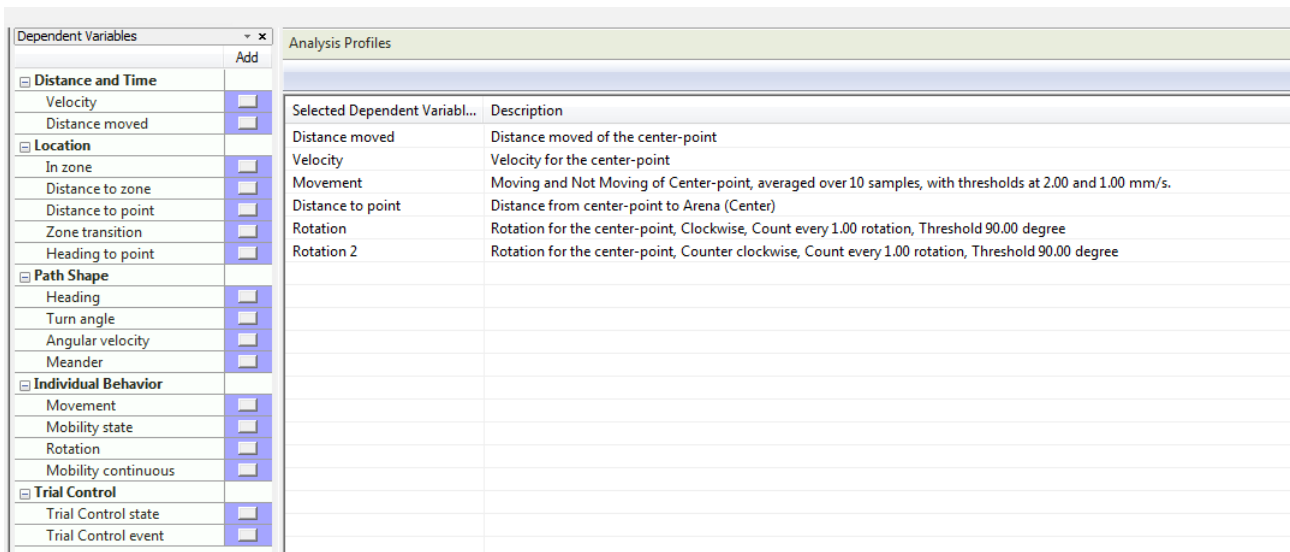


Figur 73 De kørte trials kan findes under Acquired Trials, hvor de kan afspilles igen og data for hver enkelt sample i de forskellige brønde kan findes.



Figur 74 Under Data Profiles kan der selekteres for hvilke data, der ønskes analyseret. For eksempel kan data fra brønde, hvor modelorganismen ikke er fundet i mere end 10 % af tiden frasorteres. Dette gøres ved at vælge Reduce to Tracks, with subject not found $\leq 10\%$.

Under menuen **Analysis Profiles** vælges hvilke værdier, der ønskes beregnet og eksporteret. I dette forsøg er valgt **Distance moved**, **Velocity**, **Movement**, **Distance to point** og **Rotation** (Figur 75). Distance to point er angivet som distancen fra *D. melanogaster* til centrum af brønden. For movement er angivet averaged over ti samples og thresholds sættes til 2 mm/s for start velocity og 1 mm/s for stop velocity. Rotation angives for både clockwise og counter clockwise til at tælle en rotation ved en 90 graders vending, efter 2 mm.



Figur 75 Analysis Profile. Værdierne, der ønskes beregnet kan vælges. I forsøget er valgt Distance moved, Velocity, Movement, Distance to point og Rotation clockwise og counter clockwise.

Efterfølgende kan programmet beregne, de valgte værdier og data kan eksporteres som Excel fil under **Statistics & Charts** under **Results** (Figur 76).

	Treatment	Distance moved	Velocity	Movement						Distance to point	
		Center-point	Center-point	Moving / Center-point			Not Moving / Center-point			Minimum	Maximum
		Total	Mean	Mean	Frequency	Cumulative Duration	Mean	Frequency	Cumulative Duration	mm	mm
1	Control	2988.6261	9.9456	73.1243	4	292.4971	2.6666	3	7.9999	0.7691	6.5
2	Control	2478.7702	8.2489	98.1657	3	294.4971	3.0000	2	5.9999	1.3173	6.6
3	Control	3259.6519	10.8475	300.4970	1	300.4970	-	0	0.0000	1.0064	6.7
4	Control	2523.8000	8.3988	146.9985	2	293.9971	6.4999	1	6.4999	1.4351	6.7
5	Control	1951.7042	6.4949	148.2485	2	296.4970	4.0000	1	4.0000	0.8399	6.6
6	Control	2626.0740	8.7391	300.4970	1	300.4970	-	0	0.0000	0.1994	6.4
7	Control	3169.0627	10.5461	94.9990	3	284.9971	7.7499	2	15.4998	1.0524	6.5
8	Control	2103.0021	6.9984	96.4990	3	289.4971	5.4999	2	10.9999	0.8606	6.2
9	Control	2732.6716	9.0938	300.4970	1	300.4970	-	0	0.0000	0.6377	6.5
10	Control	2751.5901	9.1568	149.2485	2	298.4970	2.0000	1	2.0000	0.5571	6.5
11	Control	2538.6926	8.4483	148.4985	2	296.9970	3.5000	1	3.5000	0.3659	6.3
12	Control	2564.3389	8.5337	96.9990	3	290.9971	4.7500	2	9.4999	0.8210	6.5
13	Control	2738.6288	9.1137	148.2485	2	296.4970	4.0000	1	4.0000	0.5899	6.2
14	Control	1921.5018	6.3944	147.2485	2	294.4971	5.9999	1	5.9999	1.4090	6.8
15	Control	2838.1922	9.4450	300.4970	1	300.4970	-	0	0.0000	0.5569	6.5
16	Control	2878.9150	9.5805	300.4970	1	300.4970	-	0	0.0000	0.9026	6.8
17	Control	3073.9245	10.2295	96.8324	3	290.4971	5.0000	2	9.9999	0.8528	6.7
18	Control	2491.7797	8.2922	300.4970	1	300.4970	-	0	0.0000	0.3969	6.2
19	24213	2475.1857	8.2370	141.7486	2	283.4972	16.9998	1	16.9998	0.8113	6.3

Figur 76 Statistics & Charts. Her kan de valgte værdier beregnes ved at trykke Calculate. Efterfølgende kan data eksporteres til Excel med ved hjælp af Export Data.

Appendiks F Protokol for Labyrintforsøg

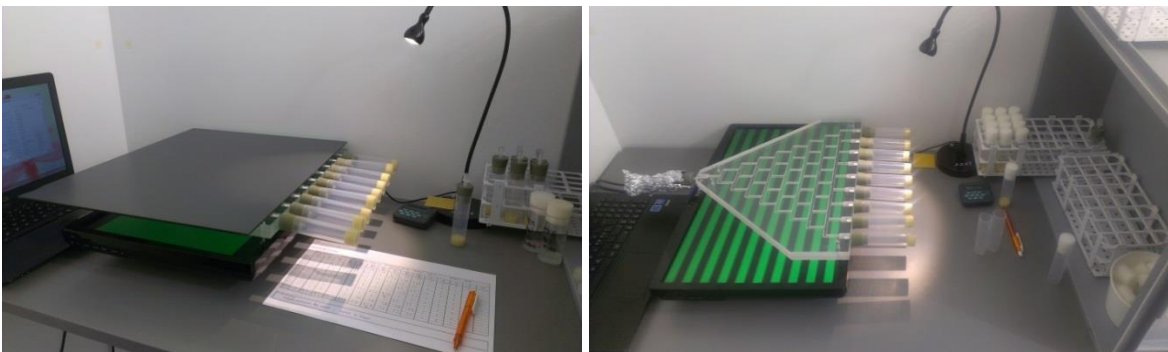
Formålet med forsøget er at undersøge koncentrationsevnen hos en *D. melanogaster* minoslinje sammenholdt med en *D. melanogaster* minoskontrollinje ved 25 °C.

Metode

Håndtering af *D. melanogaster* op til forsøg (Metoder).

Dag 1

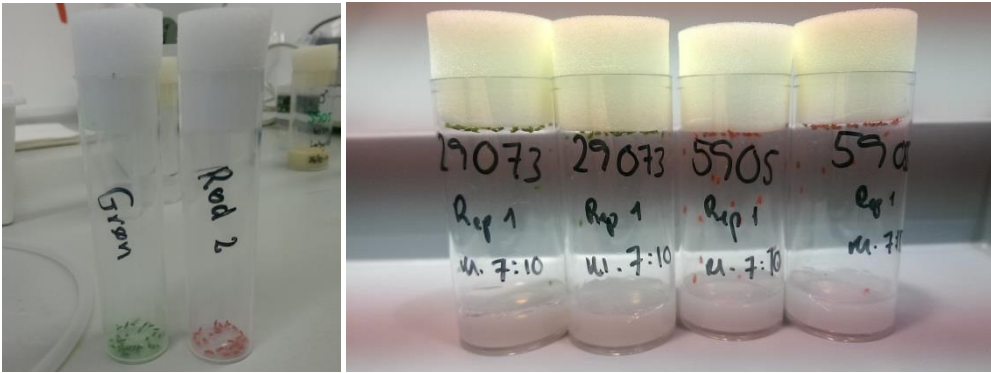
- Klargør forsøgsopstillingen i klimarum (Figur 77)
- Afvej $0,0005 \pm 0,0002$ gram farve til hvert 35 ml farvningsrør (6 stk med rød farve og 6 stk med grøn farve)
- Lav rør med agar
 - o Afvej 1,5 gram agar og tilsæt 100 gram demineraliseret vand
 - o Kog op i mikrobølgeovn
 - o Overfør cirka 8 gram agar i hvert 68 ml rør
 - o Lad stå natten over



Figur 77 Til venstre: Forsøgsopstilling med spejl (grønt skærbillede). Til højre: Forsøgsopstilling uden spejl for at synliggøre labyrinten og startløret (stribet skærbillede).

Dag 2

- Tænd de bærbare computere, de flade skærme og lamperne (sæt videofilm med grønne og sorte striber på den ene skærm og grøn skærm den anden skærm)
- Farveprocedure
 - o Påbegynd farvning af *D. melanogaster*, replikat 1 kl. 7:00
 - o Overfør to 68 ml rør med *D. melanogaster* (kontrol) til to grønne/røde farvningsrør
 - o Ryst omhyggeligt
 - o Overfør de farvede *D. melanogaster* til hvert deres agarrør
 - o Overfør to 68 ml rør med *D. melanogaster* (mutant) til to røde/grønne farvningsrør
 - o Ryst omhyggeligt
 - o Overfør de farvede *D. melanogaster* til hvert deres agarrør (Figur 78)
- Lad dem sulte i to timer
- Påbegynd farvning af *D. melanogaster*, replikat 2 kl. 8:45
 - o Gentag farveproceduren, men farv *D. melanogaster* modsat af replikat 1



Figur 78 Til højre: Farvede *Drosophila melanogaster*. Til venstre: Argarrør med Farvede mutant *Drosophila melanogaster* (grøn) og kontrol *Drosophila melanogaster* (rød).

- Forsøgsprocedure
 - o Start videofilmen
 - o Overfør et rør med sultede *D. melanogaster* (mutant) og et rør med sultede *D. melanogaster* (kontrol) til et labyrintstartrør
 - o Overfør det andet rør med sultede *D. melanogaster* (mutant) og det andet rør med sultede *D. melanogaster* (kontrol) til et labyrintstartrør
 - o Sæt startprop i begge starttrør, bank de to rør i bordet, sæt dem i hver sin labyrint, put sølvpapir omkring starttrørene, start stopurene og læg spejlene oven på labyrinterne (Figur 79)



Figur 79 Til venstre: Labyrintstartgummiprop og starttrør med farvede *D. melanogaster*. Til højre: Nederst, den flade skærm med grønt skærbillede, midterst, labyrinten med starttrør pakket ind i sølvpapir og sluttrør med fluemiedie og øverst spejlet.

- o Noter i forsøgsskemaet hvert andet minut hvor mange *D. melanogaster* (kontrol og mutant) der er kommet ud i hver af de ni sluttrør og tøm disse når nødvendigt
- o Kør forsøget i 60 minutter
- Efter endt tidskørsel tæl antal *D. melanogaster* (kontrol og mutant) i labyrinterne og i starttrørene
- Påbegynd farvning af *D. melanogaster*, replikat 3 kl. 10:30
 - o Gentag farveproceduren, men farv *D. melanogaster* modsat af replikat 2
- Gentag forsøgsproceduren med replikat 2 og replikat 3, se forsøgstider (Figur 80)

Vigtigt! Husk at notere tidspunkt for overførsel af *D. melanogaster* til agarrør og navngiv agarrør, rep 1/2/3 + mutant/kontrol + tidspunkt. Skift baggrund på computerskærmene ved hvert replikat og ligeledes farven

på mutant/kontrol. Striberne på filmen skal løbe mod labyrintens startrør. Efter hvert replikat skal labyrinterne skilles ad og rengøres med trykluft og ethanol.

Model – Labyrintforsøg			
Farvning og på agar start			
kl. 7:00-7:05	Replikat 1		
kl. 8:45-8:50	Replikat 2		
		Forsøg start	
		kl. 9:05-10:05	Replikat 1
kl. 10:30-10:35	Replikat 3	kl. 10:05-10:50	Rengør labyrinter
		kl. 10:50-11:50	Replikat 2
		kl. 11:50-12:50	Rengør labyrinter
		kl. 12:35-13:35	Replikat 3

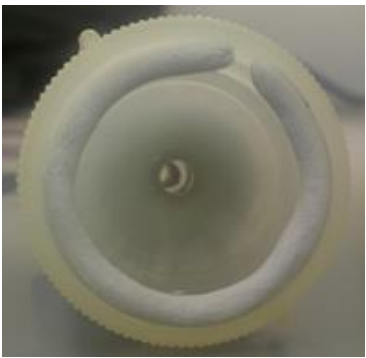
Figur 80 Tidsoversigt af Labyrintforsøg.

Materialeliste

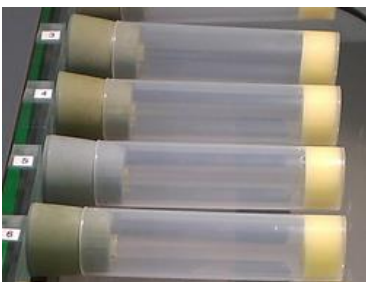
Labyrinter x2



Startrør (35 ml rør med skumprop, tomme) (2x3 stk. til forsøg)



Labyrintstartgummiprop med toppen af en Swinnex 25 Filter Holder og klæbegummi (Bantex Tack-All) x2



Slutrør (35 ml rør med skumprop, med fluemedie) (ca. 2x20 stk.)

Labyrintslutgummiprop (2x10 stk.)

Flade computerskærme x2 (30 cm x 47,5 cm) og (29,5 cm x 51,5 cm)

Bærbare computere x2

Spejle (40 cm x 60 cm) x2

Anslagsdæmpere

LED arbejdslamper (JANSJÖ) x2

Rako kasser (40 cm x 60 cm) x2 til afskærmning

Borde x2

Stole x2

Stopur x2



Suger x2

Reagensglasstativ (PP 26 mm) x 4

Sølvpapir



Fluorescerende mikrostøvfårve (grøn og rød)

35 ml rør med skumprop til farvning (2x6 stk. til farvning)

Analysevægt (METTLER, AE200)

Engangshandsker

68 ml rør til agar (2x6 stk.)

Agar

Demineraliseret vand

6x68 ml rør med 30 *D. melanogaster* (minoslinje, mutant)

6x68 ml rør med 30 *D. melanogaster* (minoslinje, kontrol)

Klimarum

Indtastningskemaer til labyrintforsøg

Labyrint forsøg - grøn skærm

	Linje:		Replikat:		Dato:		Starttidspunkt:						Kontrol:		Mutant:					
	Tid/minutter																			
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30					
	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn
Rør 1																				
tømt																				
Rør 2																				
tømt																				
Rør 3																				
tømt																				
Rør 4																				
tømt																				
Rør 5																				
tømt																				
Rør 6																				
tømt																				
Rør 7																				
tømt																				
Rør 8																				
tømt																				
Rør 9																				
tømt																				

Evt. kommentarer:

Labyrint forsøg - grøn skærm

	Tid/minutter																			
	32	34	36	38	40	42	44	46	48	50	52	54	56	58	60					
	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn				
Rør 1																				
tømt																				
Rør 2																				
tømt																				
Rør 3																				
tømt																				
Rør 4																				
tømt																				
Rør 5																				
tømt																				
Rør 6																				
tømt																				
Rør 7																				
tømt																				
Rør 8																				
tømt																				
Rør 9																				
tømt																				

Rest i labyrint: Grøn: Rød: Rest i starttrør: Grøn: Rød: Døde: Grøn: Rød:

Evt. kommentarer:

Labyrintforsøg - stribet skæm

	Linje:		Replikat:		Dato:		Starttidspunkt:		Kontrol:		Mutant:		Tid/minutter																
													2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30		
	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn	
Rør 1																													
tømt																													
Rør 2																													
tømt																													
Rør 3																													
tømt																													
Rør 4																													
tømt																													
Rør 5																													
tømt																													
Rør 6																													
tømt																													
Rør 7																													
tømt																													
Rør 8																													
tømt																													
Rør 9																													
tømt																													

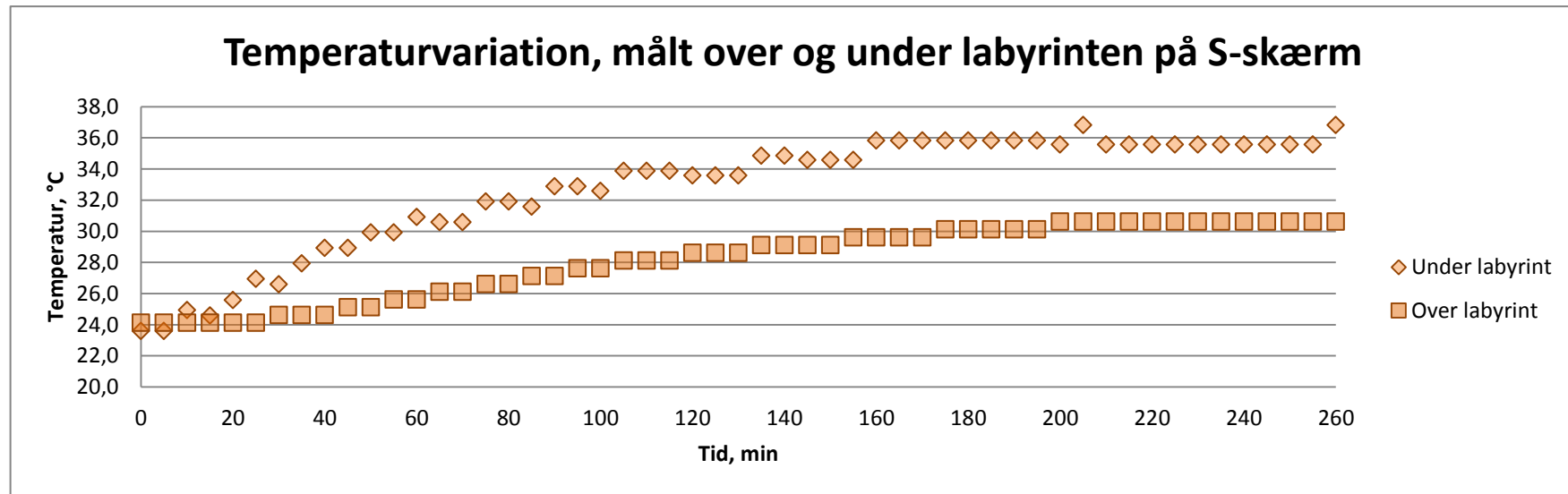
Evt. kommentarer:

Labyrintforsøg - stribet skæm

	Tid/minutter																														
	32		34		36		38		40		42		44		46		48		50		52		54		56		58		60		
	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn	rød	grøn	
Rør 1																															
tømt																															
Rør 2																															
tømt																															
Rør 3																															
tømt																															
Rør 4																															
tømt																															
Rør 5																															
tømt																															
Rør 6																															
tømt																															
Rør 7																															
tømt																															
Rør 8																															
tømt																															
Rør 9																															
tømt																															
	Rest i labyrint:		Grøn:		Rød:		Rest i starttrør:		Grøn:		Rød:		Døde:		Grøn:		Rød:														

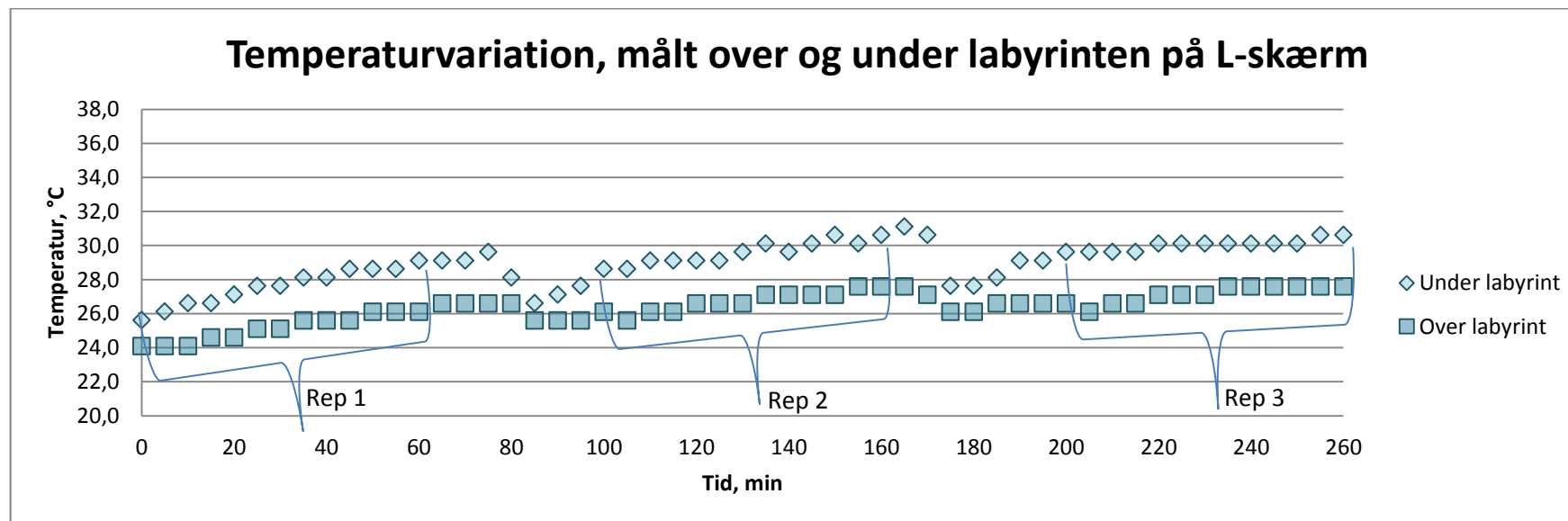
Evt. kommentarer:

Appendiks G Temperaturdata



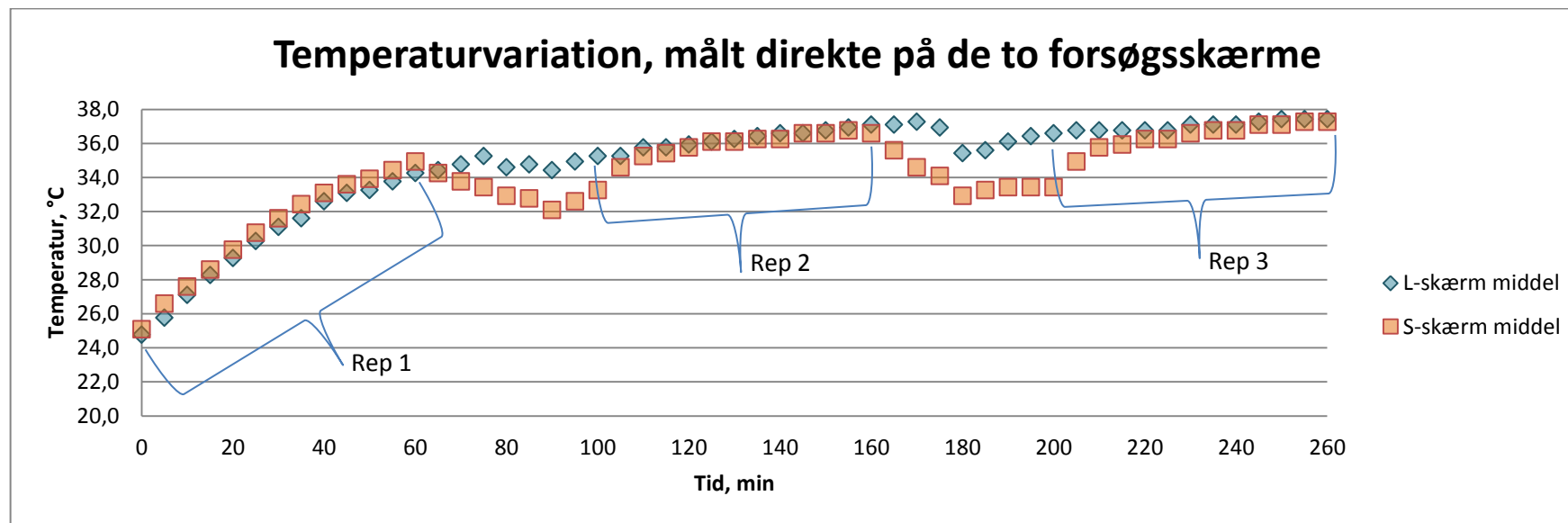
Figur 81 Temperaturvariation målt over og under labyrinten på S-skærmen.

Forsøget med S-skærmen forløb over 260 minutter, hvor temperaturen under labyrinten steg fra 23,6 °C ved forsøgets start til 36,8 °C ved forsøgets afslutning, en temperaturvariation på 13,2 °C. Temperaturen over labyrinten steg fra 24,1 °C til 30,6 °C som gav en temperaturvariation på 6,5 °C. Temperaturen var over labyrinten langsommere stigende igennem forsøgsperioden end temperaturen under labyrinten (Figur 81). Labyrinten blev ikke taget ud af klimarummet og rengjort efter hvert replikat under forsøget, men skærbilledet på S-skærmen blev ændret efter hvert replikat.



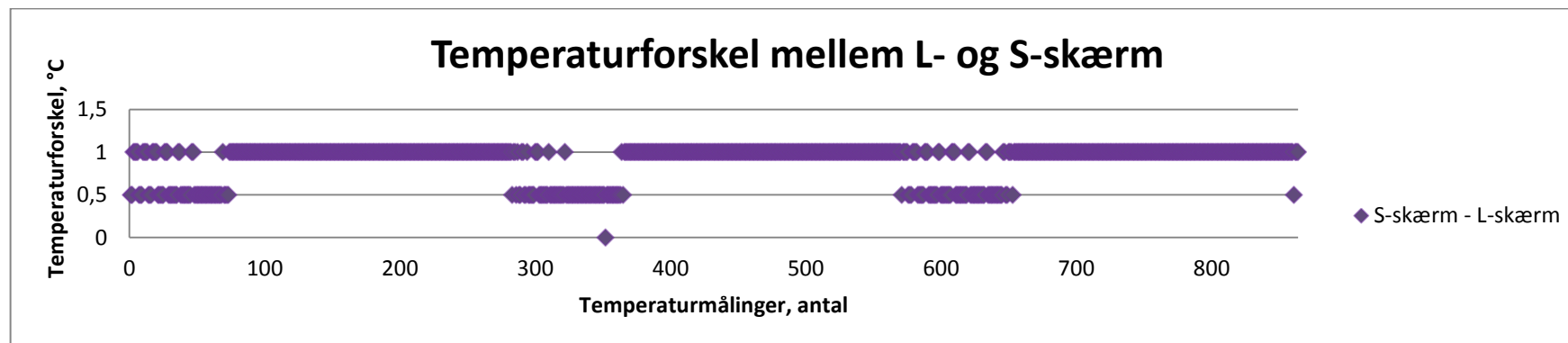
Figur 82 Temperaturvariation målt over og under labyrinten på L-skærmen.

Forsøget med L-skærmen forløb over 260 minutter, hvor temperaturen under labyrinten steg fra 25,6 °C ved forsøgets start til 30,6 °C ved forsøgets afslutning. Temperaturvariationen var 5,5 °C og den maksimale temperatur blev målt til 31,1 °C efter 165 minutter. Temperaturen over labyrinten steg fra 24,1 °C ved forsøgets start til maksimalt 27,6 °C, en temperaturvariation på 3,5 °C. Temperaturen var ikke konstant stigende (Figur 82), som den var ved forsøget med S-skærmen (Figur 81). Labyrinten blev taget ud af klimarummet og rengjort efter hvert replikat, og skærbilledet på L-skærmen blev ændret efter hvert replikat. I forsøget med L-skærmen var temperaturen over labyrinten også langsommere stigende igennem forsøgsperioden end temperaturen under labyrinten.



Figur 83 Gennemsnitlig temperaturvariation baseret på tre dages målinger målt direkte på de to forsøgsskærme.

Tre forsøg med temperaturloggere direkte på L-, og S-skærmen forløb hver over 260 minutter. Den gennemsnitlige temperaturvariation for de tre forsøg er udtrykt i (Figur 83). Temperaturvariationen for L-skærmen blev 12,6 °C, med en starttemperatur på 24,8 °C og en sluttemperatur på 37,4 °C. Temperaturvariationen for S-skærmen blev 12,2 °C, med en starttemperatur på 25,1 °C og en sluttemperatur på 37,3 °C. De to labirinter blev taget ud af klimarummet og rengjort efter hvert replikat, og skærbilledet på begge skærme blev ændret efter hvert replikat. For replikat 1 var S-skærmen gennemsnitligt 0,5 °C varmere end L-skærmen, for replikat 2 var den gennemsnitlige temperaturforskel imellem de to skærme 0,1 °C og for replikat 3 var L-skærmen gennemsnitligt 0,8 °C varmere end S-skærmen.



Figur 84 Temperaturforskel mellem L- og S-skærmen.

I en periode på tre dage, svarende til 864 temperaturmålinger, varierede temperaturen i klimarummet på L-skærmen fra 24,1 °C til 24,6 °C og fra 23,6 °C til 24,1 °C på S-skærmen. I denne periode blev der ikke kørt forsøg og skærmene var slukket i klimarummet. Gennemsnitstemperaturen var 0,9 °C højere på L-skærmen end på S-skærmen (Figur 84).

Appendiks H Diverse datasæt

Diverse datasæt i Excel samt arbejdstegninger kan rekvireres ved henvendelse til forfatterne.

Sandra Marie Neumann Arvidson, sandra@arvidson.dk

Lisbeth Strøm Madsen, lisbethsmadsen@gmail.com