Linköpings kommun
Berzeliusskolan

PROJEKTARBETESRAPPORT

Läsåret 2011/2012

Drivers, DJ695 och DJ715, Påverkan av Amyloida Peptider.

Projektgrupp:	Anlind, Nils Nv3E
	Larsson, Linn Nv3E
	Said, Allan Nv3E
Handledare:	Ståhl, Christina
	Brorson, Ann-Christin
Medbedömare:	Sundström, Lena

FÖRORD

I slutet av vårterminen i årskurs två var det dags att välja ämne inför projektarbetet som skulle genomföras under det kommande läsåret. Projektarbetet är en kurs på 100 poäng, varav 20 poäng redan spenderats på miniprojektet. Vår grupp hade flera åsikter när det kom till val av ämne. Vi eftersökte ett ämne som kombinerade praktiskt arbete med teoretiska studier. För oss var det även viktigt att vi, genom detta arbete, fick testa på att arbeta med forskning.

Under valperioden inför projektarbetet kom Ann-Christin Brorson till vår skola för att föreläsa om sin forskning om Alzheimers på Linköpings Universitet. Föreläsning inspirerade oss mycket. Vi valde att ta kontakt med henne i hopp om att hon hade förslag på ett projekt för oss. Hon var positivt inställd till idén och tillsammans utformade vi en studie som lämpade sig för såväl våra som hennes önskemål.

Projektet har, med endast några få undantag, genomförts helt självständigt och vi har funnit det lärorikt och intressant. Samarbete, kommunikation samt planering är några av de egenskaper vi fått visa prov på och utveckla. Det har varit relativt enkelt att finna fakta om Alzheimers Sjukdom (AS) då det finns en stor mängd forskarteam som studerar ämnet. Därav återfinns en uppsjö artiklar att läsa i olika vetenskapliga tidsskrifter. Dessa ger inte bara en god översikt utan också en uppdaterad informationskälla. Dock kan det uppstå vissa svårigheter då det flesta artiklar är skrivna på engelskt fackspråk med många förkortningar utan förklarningar.

För att finansiera studien beslutade vi att skapa en förening inom Unga Forskare. Från förbundet fick vi en uppstartssumma för föreningen, som vi döpte till Bananforskarna, men även bidrag för varje föreningsmedlem som gick med. Totalt fick vi en summa som täckt större delen av projektets kostnad.

Alzheimers Sjukdom är i dagsläget den fjärde största dödsorsaken i Sverige. (23) Det är en demenssjukdom som vanligtvis drabbar äldre personer och påverkar hjärnas normala funktioner. Minne, tolkning av sinnesintryck, omdöme och förståelse är alla viktiga egenskaper som påverkas. Desto längre sjukdomen fortskrider desto allvarligare blir symptomen och desto mer beroende blir personen av sin omgivning. (22) AS slutar i dagsläget oundvikligen i döden. Just nu lever ca 90 000 personer med AS i Sverige (22) och man uppskattar den årliga kostnaden för den svenska demensvården till ca 50 miljarder kronor (23).

SAMMANFATTNING

Den för nuvarande mest betrodda hypotesen kring orsakerna bakom Alzheimers sjukdom (AS) är att en aggregering av beta-amyloida (Aß) peptider hindrar funktionen hos hjärnans celler. Detta leder vidare till celldöd och således minnesförlust, motoriska svårigheter och andra symptom kopplade till AS. För att hitta ett botemedel försöker forskarna nu att stoppa aggregeringen av Aß peptiderna. En av teorierna avser att hindra denna aggregering genom att binda Aβ med två mindre proteiner, kallade affibody. Det har gjorts lyckade försök inom detta område men nu vill forskarna studera ett sjukdomsförlopp som i en högre grad liknar det mänskliga genom att infoga hela den molekyl som Aß klipps ifrån tillsammans med enzymerna som klipper den. Problemet som uppstod i studien var att flugorna hann dö innan de kläcktes. Därför behövs det nu en ny Driver som uttrycker molekylerna i ett senare skede av deras livscykel.

Denna rapport är en sammanställning av ett fem månader långt projekt där effekten av de aggregerade Aß peptiderna i hjärnan av Drosophila Melanogaster, en art i släktet bananflugor, har studerats. Vi har undersökt hur två tidigare obeprövade drivers, genreglerare, uttrycker Aß peptiderna i olika vävnader och stadier av livscykeln. Dessutom har det undersökts huruvida dessa skillnader påverkar flugorna samt den mildrande toxiska effekten av affibody proteinerna.

Våra resultat indikerar att den tidigare obeprövade genregleraren DJ715 fungerar utmärkt som en alternativ driver inom AS forskningen. Anledningen till detta är att den uttrycker i Aß i ett senare livsstadie i Drosophila Melanogaster vilket gör det möjligt att studera ett längre och mer komplett sjukdomsförlopp.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

INNEHÅLLSFÖRTECKNING....4
ORDLISTA....5
INLEDNING....5
SYFTE....5
TEORI....6
Om Alzheimers....6
Övrig Forskning....11
Teori bakom försöken....12
GENOMFÖRANDE....13
FÖRBEREDELSER....13
Projektplan....13
Planering av försök....13
Korsning....15
TESTER....17
Överlevnadstest....17
Aktivitetstest....17
SAMMANFATTNING....3
RESULTAT....18
Överlevnadstest....18
Aktivitetstest....21
Minnestest....22
DISKUSSION....23
Överlevnadstest....23
Aktivitetstest....24
Minnestest....24
BESVARANDE AV FRÅGESTÄLLNINGAR....25
SLUTSATS....26
KÄLLOR....27
Bilder....29
BILAGOR....29
Bilaga 1 Projektplan....29

ORDLISTA

Affibody – proteinmolekyl som har den bindande delen från en antikropp och en utvald bindingsyta som kan binda till ett av Aβs två bindningsställen
ApoE – Är ett ämne som binder till Aβ och sedan bidrar till nedbrytningen av Aβ
ApoE4 – En mutation av ApoE som mångfaldigt ökar risken för AS, hur detta sker är dock inte vetenskapligt bevisat. Det tros ha att göra med nedbrytning eller rensning av Aβ
ApoJ – även känt som Clusterin (eng.), ett protein som hjälper till att forsla bort celldelar och styra apoptos
APP – Amyloidperkursorprotein, ett glykoprotein som finns i alla celler med cellkärnor samt i alla trombocyter
Aβ – Beta-amyloid protein. En del av APP som bildas vid klyvning av β- och γ-sekretas
Driver – Bananfluga med genreglerande gener
GM 1 – ett membranprotein som påverkar nervcellernas förmåga att ändra form beroende på omgivnade miljön. Har även en del i cellens repareringsfunktioner.
NGF receptor – Nerv Growth Faktor receptor. Receptor i membranet som reagerar med nervcellens tillväxt
oligomerer – en mindre mängd sammansatta molekyler ofta 2 till 6
Oxidativ stress – orsakar fria radikaler som reagerar med något av cellens kemiska ämnen och förstör dem
Tau proteiner – proteiner som medverkar i att stabilisera mikrotubili
Transkriptions faktor – ämne som krävs för att DNA ska transkripteras. Kan bland annat starta uppdelningen utav DNA strängarna.
Virgin – Obefruktad hona
αB-crystallin (eng.) -

INLEDNING

SYFTE

Syftet med projektet var att undersöka hur två nya uttryckskontrollerande gener fungerar med uttryckandet utav beta-amyloida formationer samt att få en klarare bild av hur man kan använda bananflugan för att hitta ett botemedel mot Alzheimers sjukdom. Frågeställningen är:

- Vad orsakar Alzheimers sjukdom i människan?
- Hur kan man, med hjälp av bananflugan, hitta botemedel för Alzheimers sjukdom?
- Hur påverkar valet av driver flugan och uttryckandet av Aß?
- Vilka metoder forskas det på idag?

Slutprodukten av projektet är en vetenskaplig rapport som visar vilken påverkan Aβ har på bananflugor beroende på när i livsskedet och var i kroppen proteinet börjar bildas.

TEORI

Om Alzheimers

AS tror man i dagsläget beror på aggregering av felveckade amyloida beta peptider i hjärnan. En Aß peptid är en peptid som har flera olika funktioner i kroppens celler. Dessa inkluderar skydd mot oxidativ stress (1,2), reglering av kolesterol transporten (3,4), aktivering utav kinas (7), funktion som transkriptions faktor (5,6, 7) samt att den har en pro-inflammatorisk verkan (8). Aß peptider skapas genom klyvning av amyloidprekursorprotein (APP). APP är ett glykoprotein som finns i membranet hos alla celler med cellkärna och i alla trombocyter. Längden på APP:t varierar mellan 695, 751 och 770 aminosyror långt. Det är α-, ß - samt γ-sekretas som medverkar vid klyvningen. Först klipper antingen β- eller α-sekretas extracellulärt vid N-terminalen av APP och sedan klipper γ-sekretas intracellulärt vid C-terminalen av APP. Om APP kluvits av ß-sekretas bildas Aß, klipps det av α-sekretas bildas istället en ofarlig molekyl (bild 1) (11). Aß kan beroende på var γ-sekretas klipper (10), bilda olika långa fragment från 39 till 43 aminosyror långa (9). Vanligtvis bildas dock de som är 40 aminosyror långa samt de som är 42 aminosyror långa. Den 42 aminosyror långa varianten har högre tendens att aggregera än de resterande. (11)

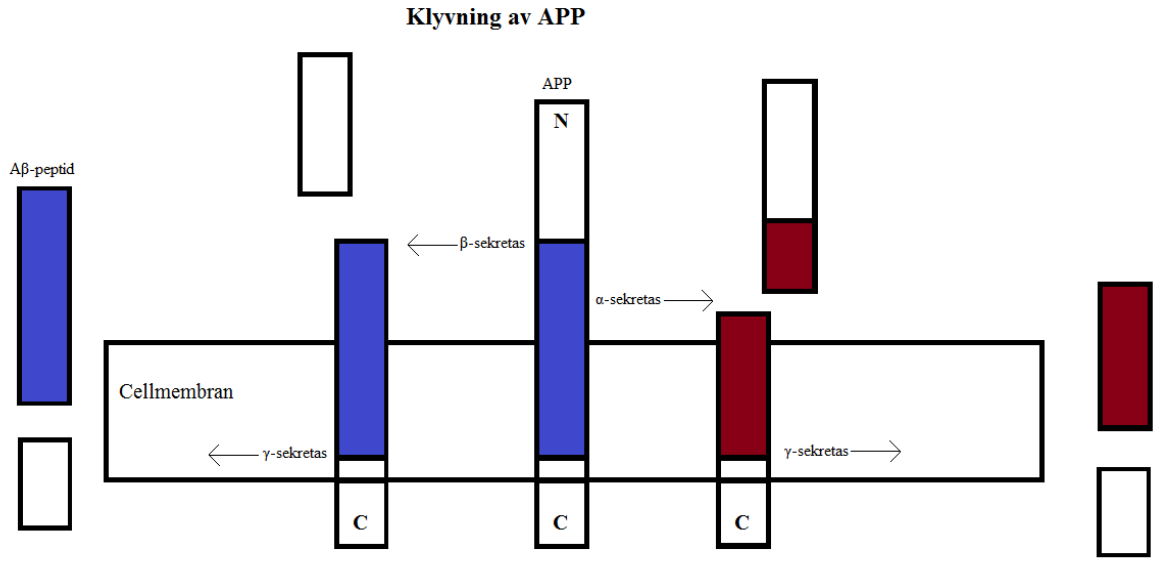

Bild 4. Schematisk bild över klyvningen utav APP i cellmembranet. Till höger: APP klyvs med a-sekretas extracellulärt vid C-terminalen och klyver där Aß sekvensen (rött), γ -sekretas klipper intracellulärt vid N-terminalen och frigör en ofarlig molekyl (Aß är också ofarlig om den ej är felveckad). Till vänster: APP klipps först av ß-sekretas vid N-terminal, γ -sekretas klipper intracellulärt vid C-terminalen och frigör då Aß -peptiden (blå).

Ibland felveckas dock Aß och får en ny tertiärstruktur. Denna nya struktur ändrar viss sekundärstruktur från α-helix till ß-flak. Detta leder i sin tur till att Aß visar upp aktiva ytor som

korresponderar med varandra. Detta gör det möjligt för Aß att aggregera. (25). Aß kan katalyseras till att felveckas med bland annat ApoJ och αB-crystallin eller genom bindning till membranproteinet GM1 (12).

När en kritisk, dock ännu obestämd, mängd Aß har aggregerat kommer dessa ”klumpar” att orsaka problem i flera av cellernas funktioner. Hur den toxiska effekten av detta uttrycks finns det flera teorier om. En av dessa är att Aß-oligomererna ökar den oxidativa stressen då de genererar fria syreradikaler (2). Aß fungerar även som en transkriptionsfaktor för skapandet av mer APP och Aß för att motverka den oxidativa stressen. Detta leder till en cirkel där Aß bildas för att motverka bildningen av Aß.

Aß formationerna katalyserar som en sidoeffekt tauproteiner till att bilda trådar i neurofibrilla knutar i hjärnan. Dessa härvor blockerar nervcellernas synapsblåsor och hindrar kommunikationen mellan nervcellerna (bild 2). Detta leder i sin tur till nervcellernas död.

Tidigare har man trott att Aß blir farligare desto större komplexen blir och att de är som farligast då de bildat plack. På senare år har man dock visat att personer kan inneha stora mängder amyloid plack i centrala nervsystemet och ändå vara helt friska, samt att man kan ha mycket lite plack men ändå lida av mycket allvarlig grad av AS (26).

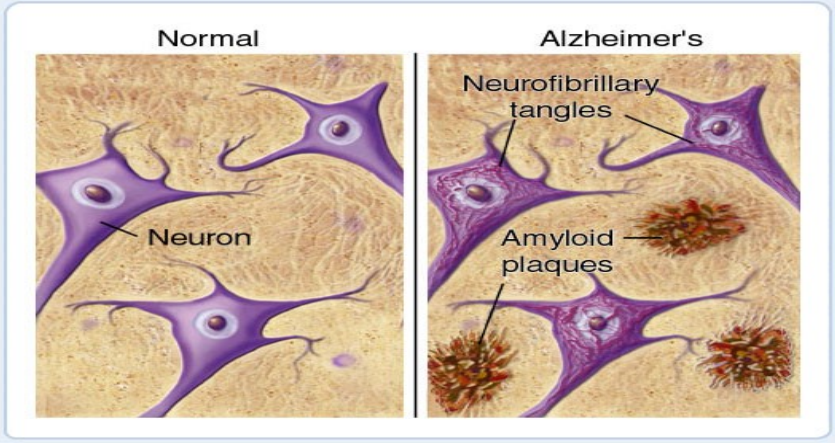

Bild 5. Till vänster: normala nervceller. Till höger: nervceller som drabbats av AS och bildat neurofibrillära trådar (mörkt lila) i nervcellerna. Dessa långa mikrotubulifragment, av proteinet tau, blockerar synapsblåsorna och stör på så viss kommunikationen mellan nervcellerna.

Den toxiska effekten av Aß påverkas av flertalet faktorer, dessa kan delas upp i extracellulära och intracellulära toxiska effekter.

I det första steget av den extracellulära toxiska effekten påverkas aggregeringen och felveckningen av Aß med hjälp av antingen ApoJ och αB-crystallin eller membranproteinet GM1. Dessa Aß monomerer bildar då oligomerer. Dessa oligomerer kan genom bindande till olika receptor skada cellen på ett flertal sätt (12). Det kan orsaka en ökning av Ca^{2+}-jon intaget som i sin tur ökar den oxidativa stressen och slår ut funktionen av synapsblåsans Ca^{2+}-jon kanal som har en avgörande roll i kommunikationen mellan nervceller. De kan även skicka ut en apoptotisk signal till lysosomen, försvaga kinase funktion (och på så sätt blockera insulin receptorer), eller öka GSK-3ß aktiviteten. Den senare leder till att Tau proteinet fosforyliseras och bildar neurofibrillära fibrer. Aß oligomererna kan också bilda porer på membranet (12). Dessa porer kan skapa en jonkanal för Ca^{2+} joner som då kan nå in i cellen och orsakar oxidativ stress (25).

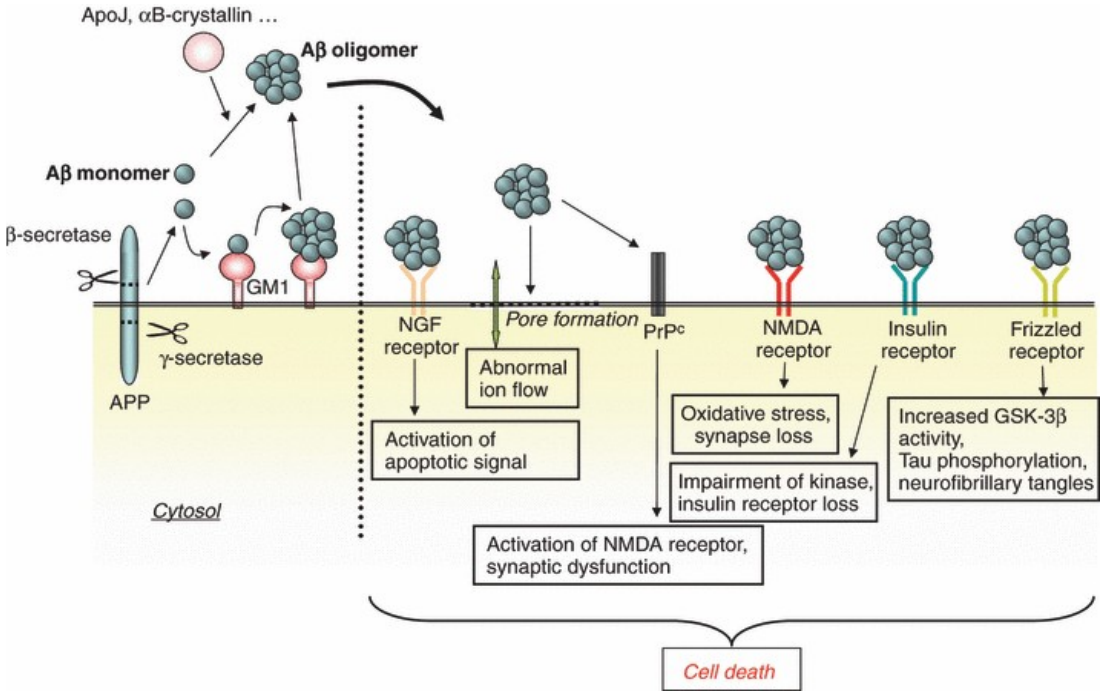

Bild 6. Extracellulära Aß monomererers aggregering antingen med hjälp av membran proteinet GM1 eller genom närvaron av Apo, aB -crystallin. Dessa oligomerer kan sedan binda till olika receptorer som på olika sätt leder till celldöd. (12)

De intracellulära Aß kan nå in i cellen på olika sätt. Det kan tas in via endocytos, protolytisk bildning i golgiaparaten eller i det endoplasmatiska retikulumet. Det kan även tas in genom transport- eller receptorproteiner. Samtliga metoder resulterar i att Aß befinner sig i en vesikel i cytoplasman. Denna vesikel färdas sedan till lysosomen för nedbrytning. I lysosomen är det möjligt att en del av Aß läcker ut eftersom den bryts ner till sina mindre beståndsdelar och då enklare kan ta sig genom lipidskiktet (12). Aß aggregerar igen i cellplastman och kan då förstöra lysosomen, proteasomen (12) och påverka fosforyleringen i mitokondrien(25), PFD och kaperoner

kan katalysera Aß oligomerernas aggregering med varandra och då bilda Aß fibriller. Alla dessa faktorer leder till cellens död (12) (bild 4).

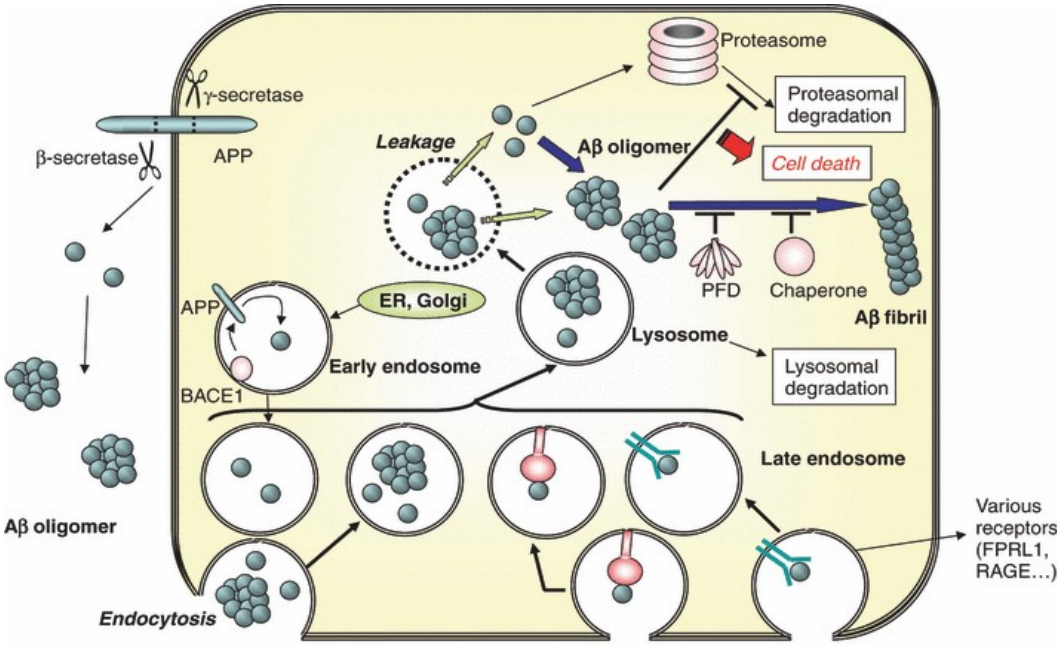

Bild 7. Aß oligomerer kan ta sig in i via protolytisk bildning i golgiaparaten eller endoplasmatiskt retikilum, endocytos, transport- eller receptorproteiner. Aß oligomererna i vesiklar når lysosomen för nedbrytning. När lysosomen försöker bryta ner Aß oligomererna läcker Aß monomerer ut som kan brytas ner av proteasomen. Däremot så kan monomererna dessförinnan bilda nya oligomerer med hjälp av PFD och kaperoner, dessa skadar proteasomen och orsakar celldöd. (12)

Ärftligheten av AS tros bero på mutationer i Psn-1/Psn-2 genen, som kodar för metabolismen av APP. Den kan även bero på mutationer i genen för APP eller i genen för ApoE. Den största genetiska riskfaktorn av dessa är mutationen av den ApoE kodande genen (14). Denna mutation leder till att ApoE4 bildas istället för ApoE. En ApoE4 allel dubblar risken att insjukna i Alzheimers sjukdom och två ApoE4 alleler resulterar i en 12 gånger så hög risk (15). I hjärnan är ApoE:s primära funktion att reglera transporten av kolesterolinnehållande lipidproteinpartiklar. Den sjukdomsframkallande orsaken av ApoE4 är sannolikt relaterad till en ändrad deposition och/eller rensning av Aβ i hjärnan, detaljerna kring hur detta sker har man däremot inte förstått ännu. (15)

Genom Psn-1/Psn-2 mutation så ökar produktionen utav Aß eftersom det är en högre nedbrytning av APP och därav återfinns ett större urval av Aß som sedan kan ingå i felveckning och då aggregeras (26). Därav ökar aggregeringen och därmed sjukdomsrisken.

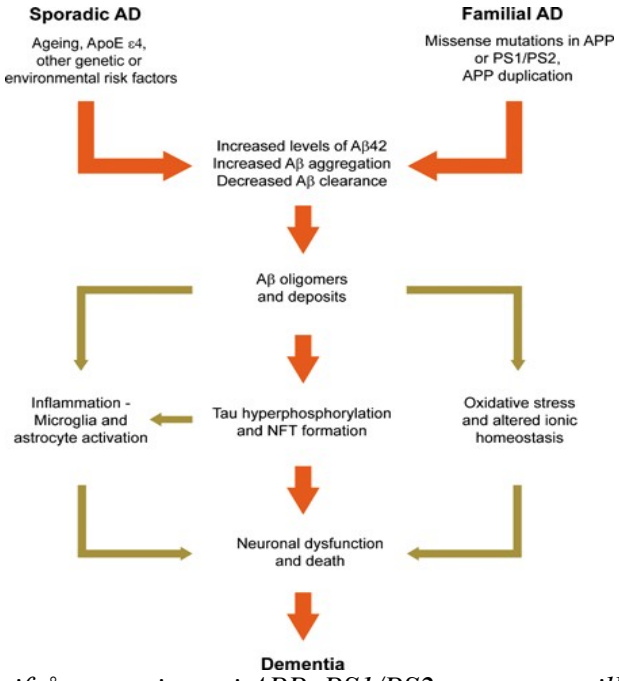

Bild 8. Ärftlig AS kommer ifrån mutationer i APP, PS1/PS2 genen som tillsammans med de sporadiska villkoren så som åldrande ApoE och andra genetiska eller miljöberoende riskfaktorer sätter igång ökade nivåer av Aß som blir själva startskottet för sjukdomsförloppet.(13)

Att Alzheimers sjukdom ofta drabbar äldre personer tros bero på att Aß felveckningen i vanliga fall tas om hand av ett säkerhetssystem som rensar bort de felveckade proteinerna (bryter ner dem till dess grundstenar igen). När man blir äldre försämras detta system och man blir då mer känslig för sjukdomen. För de som har ärvt muterade Psn-1/Psn-2, APP eller ApoE gener blir systemet uttröttat snabbare och på grund utav detta drabbas dessa personer ofta tidigare i livet.

Drivers

Elav är ett pre-mRNA bildande protein. Detta protein uttrycks normalt sätt endast hos melanogastrers nervceller. Genom bindningen till pre-mRNA kan Elav styra transkriptionen. Själva Elav-genens reglering är inte fullt förstått (28).

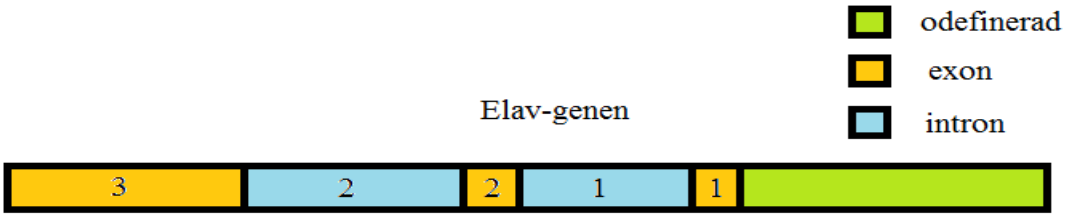

Bild 9. Visar Elav genen med introner i blått och intronen i blått

Dett har bevisats att en 333 baspar (bp) lång sekvens vid exon ett är essentiel för det nervspecifika uttryckandet av Elav. Vid intron ett och två samt exon två har man funnit sekvenser som kan binda till ZESTE, GAGA eller andra DNA bindande preoteiner. Desas är dock inte essentiella. Man har även funnit att ZESTE och GAGA proteiners bindningsplatser är essentiella för det nervspesifika uttryckandet (29).

Den enda forskning som hittils genomförts på DJ715 respektive DJ695 påvissar endast var och när dessa uttrycks. DJ715 uttrycker konstant den modifierade genen i ögon, muskler och hjärn ifrån kläckning. DJ695 uttrycker önskade genen i ökad mängd i nervcellerna (30).

Övrig Forskning

För 20 år sedan hade människan en väldigt begränsad kunskap om AS. Än idag har det inte utvecklats något botemedel för sjukdomen. Forskning rörande demenssjukdomen är väldigt aktuell i hela världen idag.

I dagsläget finns inget botemedel för AS, de mediciner som utvecklats kan enbart lindra symptomen och bromsa sjukdomens förlopp. Man hoppas kunna utveckla mediciner som botar patienter. Det har utförts experiment på möss i hopp om att kunna tillverka ett botemedel (19). Detta har lett till att flera potentiella mediciner som minskar plackbildningen i hjärnan har upptäckts, inga av dessa metoder har dock visat sig effektiva i mänskliga försök. Ett av de nyare försöken har testat cancermedicinen bexaroten som visat sig väldigt effektivt i djurförsök (19). Experimenten har visat att bexarotenet höjer nivån utav AopE (20). Denna metod har visat väldigt tydliga resultat och man hoppas snart kunna påbörja mänskliga försök. Det sägs också att grönt te, ett forntida kinesisk botemedel, har skyddande egenskaper mot AS men också mot vissa cancerceller. (21)

Som tidigare nämnts har man inte funnit ett botemedel mot AS men man har utvecklat ett antal bromsmediciner. Det de har gemensamt är att de alla förstärker funktioner som påverkas av sjukdomen. Donepezil (Aricept), Rivastigmin (Exelon) och Galantamin är alla olika medel som kan förbättra tänkandet och minnet. Medan Acetylkolinesterashämmare kan tas för att förstärka hjärnans signalsystem. Dessutom kan alla de psykiska symtom som medföljer vissa fall av sjukdomen i form av nedstämdhet, vanföreställningar, hallucinationer, oro och ångest även behandlas med mediciner. (27)

Teori bakom försöken

För att försöka efterlikna AS hos människan är det viktigt att så många faktorer som möjligt stämmer överens med det faktiska sjukdomsförloppet. Ett av dessa steg är att se till att Aβ endast uttrycks på de ställen där de är relevanta och uttrycks hos människan. För att lösa detta har varje Aβ fluga förutom genen för uttryckandet av Aβ (och affibody) även ett operon framför det. Denna

sekvens som reglerar uttryckandet av påföljande gen går under namnet Upstream Activation Sequence (UAS). UAS har en aktiv yta som passar in i ämnet GAL4. När GAL4 sätter sig på UAS öppnar GAL4 upp för DNA-polymeras att binda till DNA-strängen. Detta möjliggör för mRNA att starta produktionen utav Aβ (och affibody). Genom att då reglera var och när genen som kodar för GAL4 skall uttryckas kan man alltså styra var och när Aβ (och affibody) skall uttryckas. Systemet kallas GAL4-systemet. Genen GAL4 har isolerats från en jästcell och kodar i vanliga fall för ett transkriptionsaktiverande protein. För att hitta platser där GAL4 uttrycker sig i önskvärda vävnader har genen introducerats slumpmässigt i en flugas genom. Därefter utreds i vilka vävnader flugan producerar GAL4-proteiner (24).

GENOMFÖRANDE

FÖRBEREDELSER

Projektplan

I början av projektet skrevs en projektplan. Den skrevs för att underlätta genomförandet av projektet. I den skrev vi ut datum för när korsningarna skulle ske, när testerna skulle utföras samt när rapporten skulle vara klar. Den innehöll även en viss bakgrund till valet av projekt, inklusive syfte och frågeställningar.

Se bilaga 1

Vi lyckades inte efterfölja datumen på den projektplan vi skapat i början av projektet. Anledningarna till detta var flera.

Den första anledningen var att kontrollflugorna inte förökade sig. Detta ledde till en försening av korsningarna då vi var tvungna att inskaffa nya flugor vilket försenade oss med cirka två veckor. Nästa problem som uppstod var den tid vi uppskattat det att ta för larverna att utvecklas till flugor. Detta ledde till en försening på cirka tre dagar för varje generation och anledningen till den var att temperaturen i vårt förvaringsrum var lägre än den temperatur vi använt för estimera tiden för kläckning. Det nästkommande problemet var att det ursprungliga röret vi använde oss av för aktivitetstestet inte fungerade. Vi var därför tvungna att stoppa försöket och återuppta när nästa generation flugor kläckts och vi hunnit bygga ett rör som var mer optimalt för försöket. Den sista förseningen som uppstod var väntan på kemikalier för genomförandet av minnestestet. På grund av den förseningen har vi ännu inte hunnit genomföra testet men planerar nu att påbörja testet den 1 mars.

Vi valde att bortse från att skriva en uppdaterad projektplan eftersom att vi fann det onödigt då ordningen i vilken vi skulle utföra testerna redan var bestämd.

Planering av försök

När vi förberedde oss inför våra försök var vårt första steg att ta kontakt med Ann-Christin Brorson. Tillsammans med henne beslutade vi oss för hur vi skulle lägga upp studien och syftet bakom projektet. Av henne fick vi sedan 6 vialer innehållande 6 olika fluggenotyper för att påbörja projektet. Nästa steg var att beställa och hämta flugmat från hälsouniversitetet, för att flugorna inte skulle svälta. Dessutom skulle vialerna som maten kom i komma att användas vid korsning, tester och förvaring.

Då födan inköpts var vårt nästa steg i planeringen att tillverka sövningsplattan vi skulle behöva för att söva och sedan sortera flugorna. Den tillverkades av en petriskål, sillikon fog och en kort gummislang. Problemet med att sammankoppla anordningen med koldioxidbehållaren löstes med en lite plastadapter. När sövningsanordningen konstruerats kunde vi påbörja sorteringen.

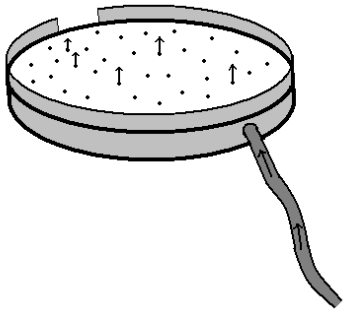

bild X. Schematisk bild av sövningsplattan vi tillverkade. Pilarna indikerar gasflödesriktningen .

Senare under projektet tillverkade vi både en t-labyrint som användes under minnestestet och ett rör till aktivitetstestet. Båda dessa tillverkades utav gamla urtvättade matvialer som fogades samman med tvåkomponentslim och sillikonfog. Provröret som utnyttjades till aktivitetsstudien konstruerades utav tre hoplimmade, tomma vialer, därutav två stycken utan botten. Röret blev 27 centimeter långt med två markeringar, den ena 1 centimeter och den andra 12 centimeter från botten. (Se bild 2) T-labyrinten konstruerades av tre tomma matrör som sammanfogades likt ett T med hål i alla ändar. Senare i projektet gjordes en uppgradering av labyrinten där en tratt i mitten av de två övre vägkorsningarna tillsattes, för att enklare kunna förflytta flugorna till anordningen. (Se bild 1)

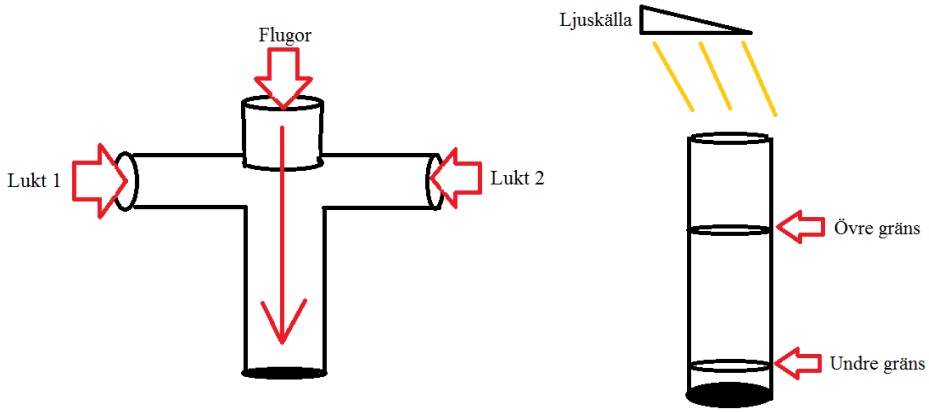

Bild 1. (vänster) visar en schematisk bild av den uppdaterade T-labyrinten som byggdes för minnestestet.
Bild 2. (höger) visar en schematisk bild av aktivitetstestanordningen.

Senare under studiens gång behövde vi beställa hem kemikalier 3-octanol samt 4-metyl-2-pentanol för minnestestet. Dessa beställdes genom skolans kemikalie ansvarig.

Korsning

För att flugorna skulle uttrycka Aß behövde korsas med en driver. Det första steget i korsningen var att sortera ut obefruktade honor och hanar. För att genomföra detta använde vi oss av koldioxid, en steriolupp och en speciell sövningsanordning. Koldioxid leddes in genom ett munstycke som sedan förde gasen vidare till sövningsplattan som var placerad under en steriolupp. I steriolupen kunde flugor sedan studeras för att skilja honor från hanar. Skillnaden mellan könen kan tydligast ses på bakkropp och framben. Honor har en ljusare och spetsigare bakkropp än hanarna. Detta är dock inte lika tydligt när de är nykläckta. Faktumet att hanarna på frambenen har ”sexhakar” som syns som två svarta prickar på vardera framben är däremot något som är enkelt att se ända från kläckning. (se bild 3)

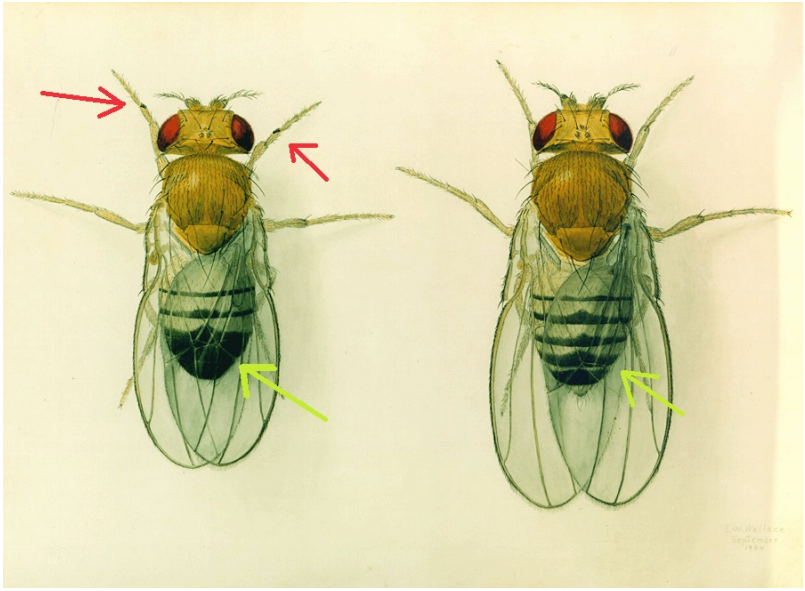

Bild 3. visar på skillnaderna mellan han- och honflugor. De gröna pilarna visar på skillnaden mellan bakkropparna där honan till höger har ett större och ljusare bakparti än hanen till vänster. De röda pilarna pekar på hanens ”sexhakar”.

Sorteringen skedde två gånger om dagen, en gång på morgonen cirka klockan åtta och en gång cirka klockan fyra på eftermiddagen. Anledningen till att de sorterades två gånger om dagen var att vi enbart ville ha garanterat obefruktade honor i den fortsatta korsningen. Detta för att undvika felaktiga korsningar.
När sortering skett utfördes korsningen. Den utfördes genom att överföra hanar med en utvald genotyp med honor utav en driver genotyp i en ny färskt matvial.

HANE		HONA		FRAMKORSAD GENOTYP	
Elav	en driver som uttrycker GAL4 i kroppens samtliga nervceller från embryostadie	**W1118**	beteckningen för ett normalt genom	**W8-Elav**	en kontrollfluga som enbart uttrycker Driver-genen Elav
Elav		**Arc**	en fluga som har kodon för uttryckandet av Aß	**Arc-Elav**	en fluga som uttrycker Aß i samtliga nervceller från embryostadiet
Elav		**AffiArc**	liknar ARC genotypen men kan dessutom uttrycka Affibodyprotein	**AffiElav**	en fluga som uttrycker Aß samt affibody-proteiner i samtliga celler från embryostadiet
DJ695	en Driver som uttrycker GAL4 i samtliga nervceller från kläckning	**W1118**	beteckningen för ett normalt genom	**W8-695**	en kontrollfluga som enbart uttrycker Driver-genen DJ695
DJ695		**Arc**	en fluga som har kodon för uttryckandet av Aß	**Arc-695**	en fluga som uttrycker Aß i samtliga nervceller från kläckning
DJ695		**AffiArc**	liknar ARC genotypen men kan dessutom uttrycka Affibodyprotein	**Affi-695**	en fluga som uttrycker Aß samt affibody-proteiner i samtliga nervceller från kläckning
DJ715	En Driver som uttrycker GAL4 i hjärna, ögon samt muskler från kläckning	**W1118**	beteckningen för ett normalt genom	**W8-715**	en kontrollfluga som enbart uttrycker Driver-genen DJ715
DJ715		**Arc**	en fluga som har kodon för uttryckandet av Aß	**Arc-715**	en fluga som uttrycker Aß i hjärna, ögon samt muskler från kläckning
DJ715		**Affiarc**	liknar ARC genotypen men kan dessutom uttrycka Affibodyprotein	**Affi-715**	en fluga som uttrycker Aß och affibody-proteiner i hjärna, ögon samt muskler från kläckning

Tabell 1. tabell över vilka korsningar som gjordes och vilka egenskaper dessa resulterade i.

I de tester som skulle följa korsningen var det viktigt att vi enbart använde oss av den första generationen. Anledningen kan tydligt ses tabellerna nedan. De visar att 30 % av de flugor som föds i generation två inte uttrycker Aβ peptiden.

Generation 1		
Hona/hane	Ae	Ae
aE	AaEe	AaEe
aE	AaEe	AaEe

Generation 2				
Hona/hane	AE	Ae	aE	ae
AE	AAEE	AAEe	AaEE	AaEe
Ae	AAEe	AAee	AaEe	Aaee
aE	AaEE	AaEe	AaEE	aaEe
ae	AaEe	Aaee	aaEe	aaee

Tabell 2. Visar korsningsscheman över den första och andra generationen. Det syns här tydligt att ca 30 % av den andra generationen inte uttrycker Aβ peptiden (grönmarkerat)

TESTER

Överlevnadstest

Det inledande testet var överlevnadstestet. Tanken bakom detta test var att det skulle påvisa hur länge de olika genotyperna överlevde och på så sätt ge oss en bild av hur de påverkades av Aß. Enbart honor användes i detta test. Anledningen till detta var att förhindra flugorna från att föröka sig i vialerna, eftersom att det då skulle födas nya flugor som inte hörde till testet. När honorna sorterats skrevs antalet flugor in i en tabell, därefter räknades individerna dagligen. Sorteringsdagen var angiven som dag ett. Det maximala antalet individer i varje enskild vial var 20 stycken, anledningen till detta maxantal var dels till för att underlätta räkning men även för att hålla en god levnadsstandard för flugorna. På vialerna skrevs sorteringsdatumet, antalet flugor i vialerna och vilken genotyp vialen innehöll. Tack vare detta kunde alla i gruppen enkelt turas om att räkna antalet flugor trots att alla inte var närvarande varje gång. 100 flugor utav varje framkorsad genotyp sorterades ut och användes till överlevnadstestet. Maten byttes ut varannan dag även detta för att hålla en god levnadsstandard och på så sätt minimera felkällor.

Aktivitetstest

Aktivitetstestets utförande inleddes med en sortering där hanar skildes ifrån mängden honor, eftersom försöket enbart krävde hanar. Totalt sorterades 45 individer utav varje framkorsad genotyp fram. Dessa placerades sedan i botten av provröret som vi byggt. En 60 W stark glödlampa var placerad ovanför provröret för att attrahera flugorna. Sedan fick flugorna under en minuts period klättra mot lampan därefter räknades det totala antalet flugor som hamnat under, över eller mellan markeringarna på röret.

Försöken genomfördes på femton flugor åt gången, detta för att underlättar räkningen utav flugorna. Antalet individer under, emellan respektive över markeringarna skrevs in i en tabell som alla gruppmedlemmar kunde ta del utav, detta medförde att testerna kunde genomföras även om någon i gruppen var frånvarande. Försöken utfördes på måndagar, onsdagar och fredagar under en fem veckors period.

Minnestest

Till minnestestet sorterades åter igen flugor utefter kön. Skillnaden från tidigare experiment var att testerna utfördes på både hanar och honor. Experimentet genomfördes på totalt 24 flugor. Dock testades inte alla genotyper i detta försök, endast genotyperna W1118-ELAV och AFFI-ELAV valdes.

Efter sortering placerades flugorna i tomma rör där de fick svälta i 20 timmar. Efter detta utsattes hanarna av W1118 samt honorna av Affi-Elav genotypen för 3-octanol samt en 1 M suckroslösning. Honorna av W1118 samt hanarna av Affi-Elav genotypen utsattes istället för 4-metyl-2-pentanol. Exponenringen genomfördes genom att droppa kemikalien som flugorna skulle utsättas för på en bit papper. Detta papper placerades sedan i botten på ett tomt provrör som flugorna sedan placerades i, i två minuter. Efter exponeringen fick flugorna vila i en timme, varefter de utsattes de för den andra doften (kemikalien) samt suckroslösningen i två minuter. Efter den sista exponeringen fick de återigen vila i en timme varefter de placerades i T-labyrinten. I labyrinten fick de fritt välja väg och resultaten dokumenterades i en tabell.

RESULTAT

Överlevnadstest

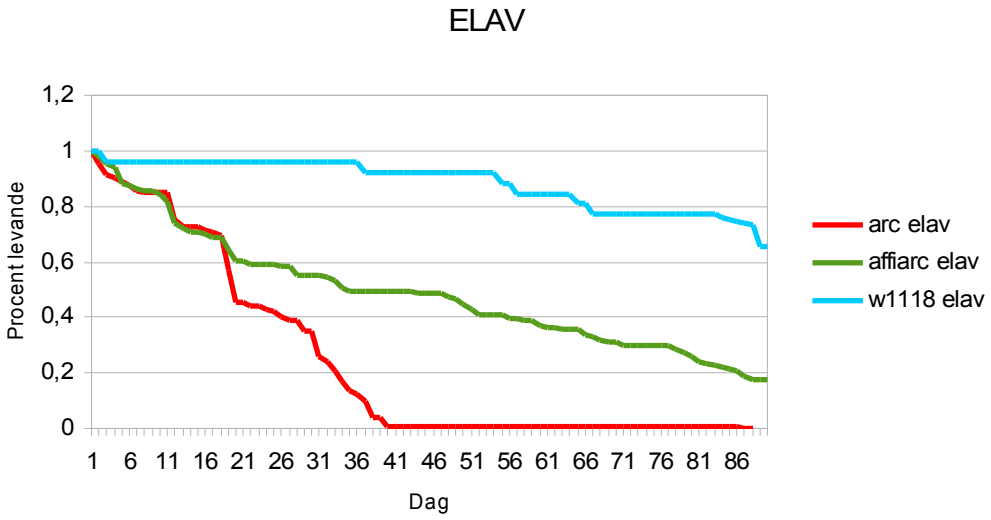

Diagram1. Visar hur drivern ELAV-GAL4 påverkar Alzheimers flugor.

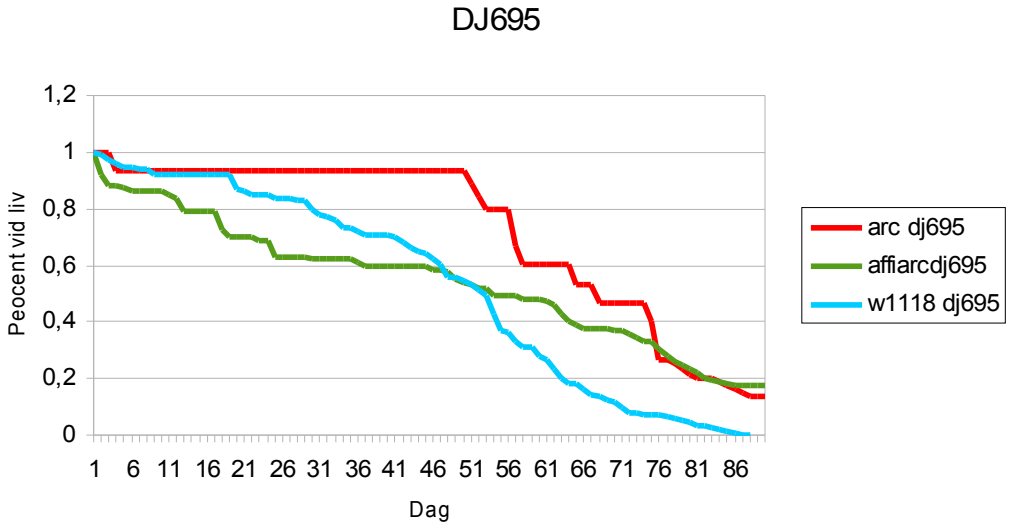

Diagram 2 Visar hur drivern DJ695 får utslag i påverkandet av Alzheimers.

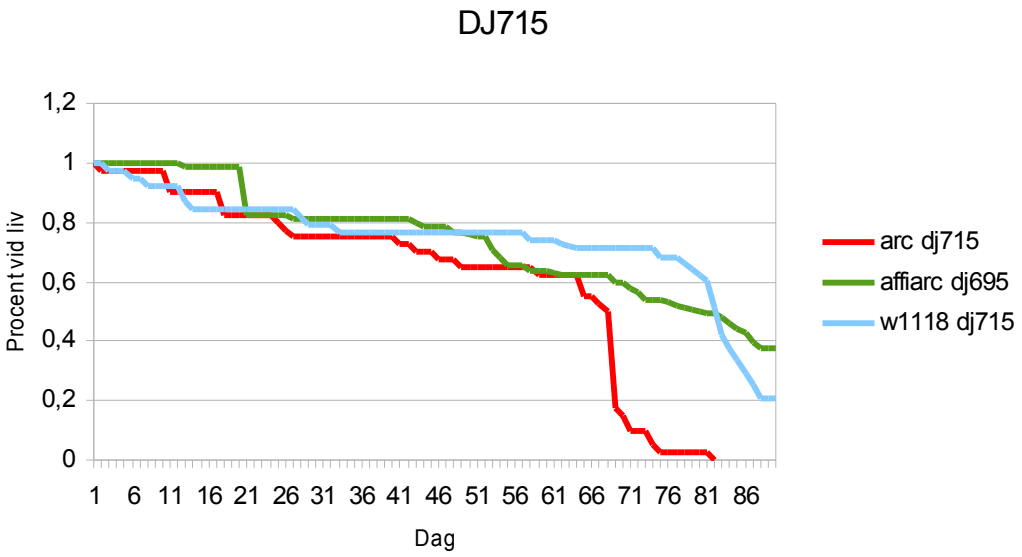

Diagram 3. Visar hur andelen flugor som är levande (y-axel) påverkas per dag (x-axel). Affibody - Arc (grönt) har en högre överlevnadsgrad än Arc (rött). Tydligt fall i andel vid liv efter 70 dagar för Arc.

Resultaten från de olika drivrarna visar olika egenskaper. I diagram 1 som visar ELAV-GAL4 drivern kan vi se att ELAV-ARC flugorna har ett fall efter ca 20 dagar för att sedan dö ut cirka dag 40. Affi-ELAV visar ett konstant fall som däremot har en mycket lägre lutning än hos den för ARC-ELAV. Kontrollflugan har inget märkbart fall utan ligger på en stadig nivå. Dessa resultat återspeglas även i medellivslängden som syns nedan i tabell x. I medellivslängden kan vi observera att AFFI-ELAV har en dubbelt så hög överlevnadsförmåga som ARC-ELAV. Lika så har kontrollflugan dubbelt så hög överlevnadsförmåga som AFFI-ELAV.

Diagram 2 visar hur W1118-DJ695 har ett kontant fall efter cirka 20 dagar, och får således en medellivslängd på cirka 47 dagar enligt tabell x. AFFI-DJ695 har även denna ett konstant fall med något lägre lutning än den hos kontrollflugan därav får den en medellivslängd på cirka 50 dagar. ARC-DJ695 har ett fall vid dag 50 och en medellivslängd på 66 dagar, dock är underlaget endast 15st flugor.

I diagram 3 kan man observera hur ARC-DJ715 har ett märkvärt fall efter 70 dagar vilket ger ett medellivslängd på cirka 54 dagar. AFFI-DJ715 har ett konstant fall och detta ger en medellivslängd på 66 dagar. Hos kontrollflugan kan vi se ett märkbart fall efter cirka 80 dagar vilket ger oss en medellivslängd på 82 dagar.

Medellivslängd

Genotyp	Antal	Medellivslängd (dagar)
W1118 DJ695	100	46,77
AFFIARC DJ695	87	49,6
ARC DJ695	15	66,0
W1118 DJ715	38	81,8
AFFIARC DJ715	69	66,0
ARC DJ715	40	53,7
W1118 ELAV	26	80,0
AFFIARC ELAV	103	46,7
ARC ELAV	105	21,7

Aktivitetstest

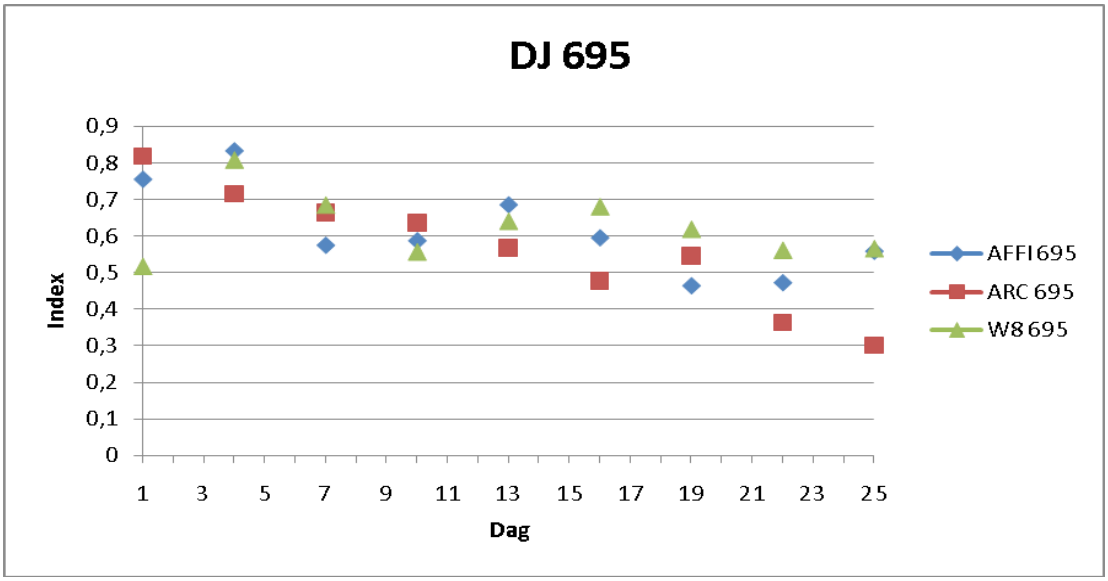

Diagram 4. visar INDEX värdet på de individer som framkorsats med DJ69-Drivern

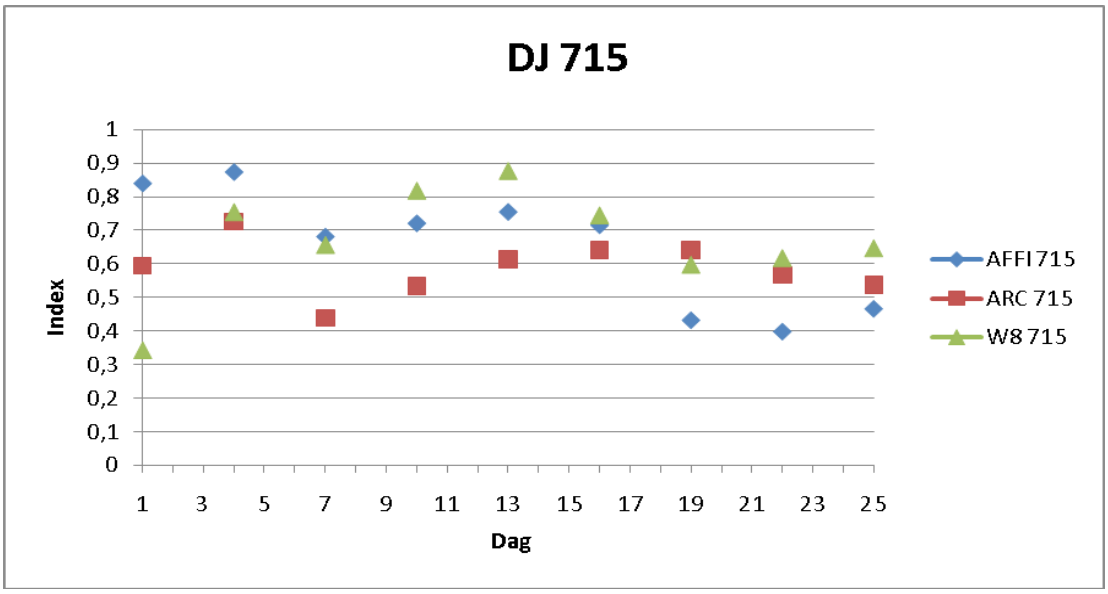

Diagram 5. visar INDEX värdet på de genotyper som framkorsats med DJ715-Drivern

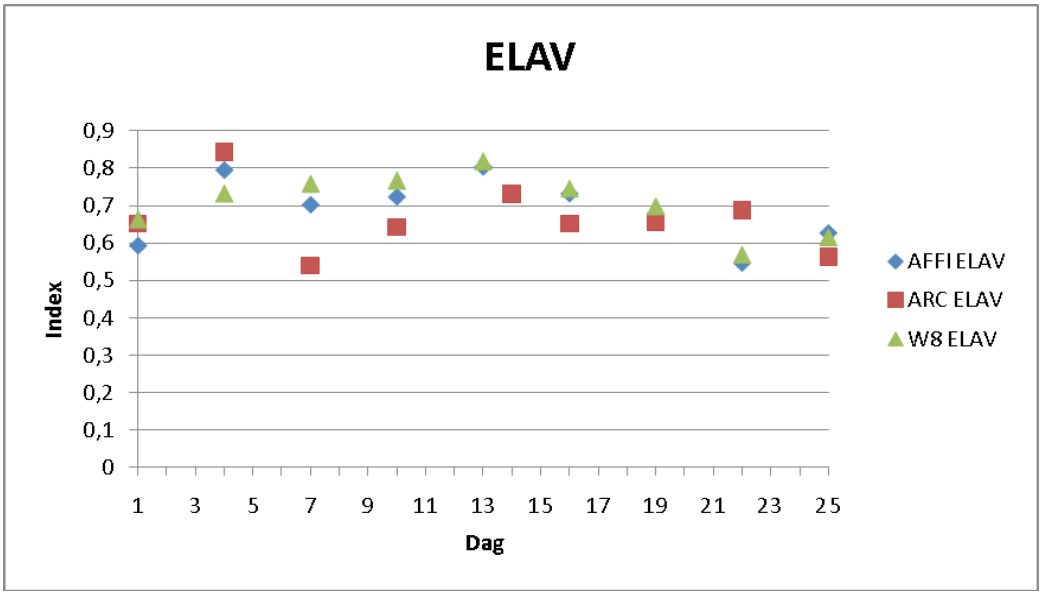

Diagram 6. visar INDEX värdet på på de flugon som framkorsats med Elav-Drivern.

I dessa digram över aktivitetstesten kan det observeras en liknande trend där indexvärdet pendlar runt 0,7 för DJ715 samt Elav. För DJ695 kan man märka en svag minskning för indexvärdet ifrån 0,8 till 0,6. Indexvärdet räknades ut med hjälp av formeln nedan

$$index = \frac{antalflugoröver - (antalflugorunder + antaldödaflugor) + totalaantaletflugor}{totalaantaletflugor * 2}$$

Minnestest

Det som kan ses i tabellen är att hanarna har i en större grad tagit ett aktivt val. Rätt håll visar att flugorna har vandrat till den ende där lukten de har fått tillsammans med sukros lösningen, fel håll visar motsatt lukt. Dessutom har en märkvärt hög andel av dessa valt rätt väg. Underlaget för detta är baserat på totalt 24 individer.

Genotyp	***Kön***	***Rätt håll***	***Fel håll***	***Orörliga***
W1118-Elav	**Honor**	0	0	5
W1118-Elav	**Hanar**	2	1	3
Affi-Elav	**Honor**	0	0	4
Affi-Elav	**Hanar**	5	1	3

DISKUSSION

Överlevnadstest

Överlevnadstestet valdes för att påvisa AS påverkan på Melanogsters livslängd. Denna metod anses vara en av de enklare metoderna för att undersöka hur stor toxisk effekt Aß orsakar. Överlevnadsstudien anses dessutom vara ett försök som har relativt få felkällor. Vi tyckte att testet var lämpligt dels på grund utav dessa anledningar men även för att det krävde en minimal mängd utrustning och därför var lätt att ta med sig hem på helger och lov.

Testet har visat på hur Melanogaster påverkas beroende på var och när Aß peptiderna uttrycks. Det var vad vi ville ha svar på när vi påbörjade testet.

I detta försök använde vi oss i stor utsträckning utav flugor födda i första generationen. Detta betydde att vi kunde rädda större delen av resultaten. Faktumet att vi inte kunnat använda oss utav alla resultat har dock minskat säkerheten av de utslag vi fått och vidare studier bör genomföras. De genotyper som har minst underlag är DJ695-Arc och W1118-Elav

I överlevnadskurvan för drivern ELAV kan vi tydligt se att affibody ger en minskad toxisk effekt hos Melanogaster individerna. Vi kan även se tydliga skillnader mellan kontrollflugorna och de övriga genotyperna. Detta korresponderar väl med tidigare gjorda överlevnadsstudier på dessa genotyper. Däremot dör våra flugor långsamare än de hos de andra studierna, och detta tros bero på att temperaturen i testlokalen var cirka 20 grader medans den hos andra studier innehar en temperatur på cirka 25 grader.

Den nya drivern DJ695 påvisar ett resultat där kontrollflugorna dör i en högre takt än både Affibody och Arc. Detta föreslår att DJ695 skulle uttrycka något som direkt skulle vara farligt för flugorna, men då dessa tester blev förminskad utav misstag i korsningen är urvalet lägre och flera tester måste göras på detta område för att nå en absolut slutsats.

I den andra nya drivern DJ715 kan vi genom att jämföra med ELAV drivern se att den toxiska effekten av Aβ får utslag senare i levnadsskedet som väntat. Det syns även tydligt att affibody ger en klar minskad toxisk effekt då denna genotyp inte genomgår den dramatiska minskningen av andelen levande individer. DJ715s affibody minskar istället i något högre grad än kontroll flugorna.

Resultaten ifrån både DJ695 och DJ715 är helt nya och påvisar att DJ715 är en mycket kompetent driver att använda för att uttrycka AB i ett senare stadie i livscykeln. Förhoppningen är att DJ715 nu skall kunna användas i en ny flugmodell där man uttrycker mänskligt APP, tillskillnad ifrån Melanogsters naturliga dAPP. Tillsammans med APP vill man uttrycka de två enzymerna γ-sekretas och BACE 1 (ß-sekretas) och på så viss få ut Aß. Denna modell närmar sig det mänskliga sjukdomsförloppet. Anledningen till att detta inte fungerar är att mänskliga APP är toxiskt för Melanogaster, och ännu mer toxisk tillsammans med enzymerna. Detta har gjort att man inte kunnat få fram avkommer då de har avlidit innan kläckning. Huruvida man kan använda DJ695 för dessa studier krävs det ytterligare studier för att bevisa.

Aktivitetstest

Detta test hade också till syfte att påvisa Aß toxiska inverkan på Melanogaster individerna. Tanken var dock att det skulle vara avläsligt i ett tidigare skede än vad det var i överlevnadsstudien. Aktivitetsstudien har fler felkällor än överlevnadsstudien då det är fler faktorer som behöver tas med i beräkning. Felkällorna inkluderar avståndet mellan lampan och röret, koldioxid förgiftning på de första värdena på respektive kurva. Att de påverkades av koldioxid förgiftningen kan tydligt ses vid dag 1 i diagram 5 på bland annat W1118 DJ695 där den dippar på 0,5 i indexvärde. Även här var temperaturen där melanogasterna förvarades cirka 20 grader vilket påverkade resultaten till att innefall efter en längre tidsperiod, och således en lägre lutning. Under flertalet tester observerades det dessutom att flugor som klättrat upp i toppen av röret föll ner till botten, vilket skulle indikera att lampan påverkade dem på ett negativt sätt (kanske på grund av att korken var varm). Efter testet dag 10 hos kontrollflugorna för DJ695 kunde man observera hur flugorna blev mer aktiva och klättrade längre och friskare utan lampan, vilket även det indikerar att lampan har

en ohälsosam roll. I diagramet för drivern DJ695 kan man se att Arc genotypen minskar, detta beror dock på att 5 individer rymde under testet den tjugonde dagen.

I korsningsschemana vi infogat tidigare i rapporten finner man att 30 % av avkomman från andra och tredje generationen inte föds med Alzheimers. Detta glömde vi ta hänsyn till då aktivitetstestanordningen inte fungerade och testet försköts. Faktumet att vi bortsåg från detta resulterade i att resultaten från aktivitetstesten vi genomförde blev missvisande.

Som tidigare nämnt så användes endast generation två och tre till aktivitetstestet. I dessa generationer uttryckte endast 60 % av avkomman den modifierade genen. På grund av detta misstag visar samtliga kurvor upp ett beteende som liknar den som kontrollflugans kurva visar.

Minnestest

Syftet var till en början att få en tidig indikation på att flugorna drabbats av AS för att sedan se hur deras minne försämrats. Dessvärre kunde vi inte genomföra experimentet med detta syfte på grund av korsningsfelet som tidigare nämnts. Syftet med experimentet blev istället att se om denna metod är lämplig att använda till liknande experiment.

Testerna utfördes endast på kontrollflugan W1118 Elav samt Affi Elav dels på grund av tidsbrist men även för att testerna skulle utföras på så friska flugor som möjligt. Försöken genomfördes på både honor och hanar för att kunna se om det var någon skillnad på deras förmågor att minnas. Under experimentets gång upplevdes en svårighet vid exponeringen av kemikalierna då flugorna lätt fastnade i pappersbitarna och dog. Detta skulle kunna förebyggas genom att använda ett annat material, så som bomull eller skumplats. Pågrund av vårt material val blev urvalet mycket mindre än beräknat.

I resultaten kan man se att majoriteten av flugorna inte valt någon väg. Detta indikerar att individerna inte har exponerats för kemikalierna under en tillräckligt lång tid eller att de glömt kemikaliernas doft. Ytterligare faktorer som kan räknas in är halten av kemikalier och huruvida den varit för låg eller för hög. Om halten är för låg registreras inte doften av flugorna, om den är för hög finns risken att den skadar flugorna. Det är troligare att halten varit för hög än för låg, eftersom att det tillsattes en relativ hög mängd av kemikalierna. Det är även möjligt att individerna exponerades under en för kort tid. Om detta var fallet skulle flugorna ha svårigheter att koppla en viss doft till belöningen, sukroslösning. Det är mindre troligt att de har glömt kemikaliernas lukter då testerna genomfördes en respektive två timmar efter exponering.

Hos hanarna för respektive genotyperna kan vi se att vissa har valt rätt väg medan ett fåtal har valt fel väg. Då resultatet för honorna visar att de inte valt någon av alternativen i experimentet, påvisar detta att honorna kan ha en sämmre minnesförmåga än hanarna. En annan möjlighet är att deras

exponering har misslyckats. Då vårat urval endast utförts på 24 individer kan man inte garantera att resultatet är korekt.

BESVARANDE AV FRÅGESTÄLLNINGAR

- ***Vad orsakar Alzheimers sjukdom i människan?***

Aß peptiden som finns naturligt i hjärna kan felveckas, misslyckas då nedbrytningen av det felveckade proteinerna kommer dessa peptider att aggregera. Membran proteinet GM1 och ApoJ samt αB-crystallin kan främja denna process. Dessa oligomerer kan sedan öka Ca2+ intaget i cellen som i sin tur orsakar oxidativ stress och då celldöd. De kan också binda till receptorer i membranet och aktivera en apoptos-signal, eller fosforylera Tau proteiner så att dessa bildar giftiga neurofibrillära mikrotubuli trådar. Dessa kan inuti cellen hämma lysosomen och proteasomen eller få dessa att helt sluta fungera. Även detta leder i sin tur till att nervceller dör vilket i sin tur innebär nedsatt hjärnfunktion hos de insjuknade.

- ***Hur kan man med hjälp av bananflugan hitta botemedel för Alzheimers sjukdom?***

Genom att sätta in gener för mänskligt Aß kan man undersöka dess effekt på Melanogaster och därefter undersöka om de ämnen man tror kan hämma effekten, verkligen gör det. Eftersom att Melanogaster bryter ner Aß men hjälp av lysosomen, precis som människan gör, borde samma botemedel som gäller för Melanogaster gälla även för människor.

Om ämnena som lokaliseras som botemedel har en toxisk effekt hos människan kan vi däremot inte se i Melanogaster.

- ***Hur påverkar valet av driver flugan och uttryckandet av Aβ***

Valet av driver för generna påverkar tydligt flugans överlevnad vilket kan ses i diagram 1-3. Även affibody:n tycks uttryckas samtidigt som Aß. Man skulle kunna tänka sig att detta skulle kunna ha setts tidigare i ett aktivitetstestet.

- ***Vilka metoder forskas det på idag?***

I dagsläget forskas det på ett flertal olika metoder. Forskare över hela världen har alla olika utgångspunkter och infallsvinklar. Bland många andra så pågår det en forskningsstudie på möss som genererat över 100 olika potentiella läkemedel. Inget utav dessa har dock visats vara effektiva när de applicerats i mänskliga tester. Ett av de nyare experimenten har sin grund i cancermedicin. De har funnit att den ger upphov till ett protein som bryter ner den ansamlade Aß. Man hoppas i dagsläget på att kunna utföra mänskliga försök snart. En annan studie inriktar sig mot att försöka bilda antikroppar emot Aß och på så sätt förhindra aggregering.

Den metoden som vi inriktat vår forskning på innebär att man använder Melanogaster som modellorganismer. På så viss testar man olika genuppsättningar som tillverkar ämnen som skulle kunna fungera som motmedel för att sedan jämför med de flugor som endast fått de patogena generna. Våra försök använder sig av affibody som binder till Aß och på så vis förhindrar

aggregering. Andra taktiker är att stoppa aggregering är att påverka enzymerna som klipper APP, α-sekretas, β-sekretas och γ-sekretas.

- ***Vilka botemedel har man hittat?***

I dagsläget finns inga botemedel för AS det finns dock ett flertal bromsmediciner som används. Dessa inkluderar acetylkolinesterashämmare som förstärker hjärnans signalsystem, donepezil (Aricept), rivastigmin (Exelon) och galantamin som alla kan förbättra tänkandet och minnet. Dessutom kan alla de psykiska symtom som medföljer vissa fall av sjukdomen i form av nedstämdhet, vanföreställningar, hallucinationer, oro och ångest även behandlas med mediciner.

SLUTSATS

Denna studie har visat att den tidigare oprövade DJ715-drivern ger ett långsammare uttryckande än ELAV-GAL4-drivern och därför är lämplig till vidare studier. Detta kunde vi observera då indivderna som uttryckte Arctik 10.2k genen med hjälp av DJ715 klarade sig längre än de som uttryckte det med hjälp av ELAV-GAL4. En ytterligare indikation till att DJ715 är en lyckad driver är att affibody-genotypen har en klar minskad toxisk effekt precis som den har då man använder ELAV-GAL4-driver. Resultaten från kontrollflugornas grafer, med DJ715-drivern, har indikerat att DJ715 inte är giftig för flugan. Det har även setts indikationer på att DJ695 kan vara giftig och därför inte är lämplig för framtida bruk.

KÄLLOR

1. Abeta40, either soluble or aggregated, is a remarkably potent antioxidant in cell-free oxidative systems. Baruch-Suchodolsky R, Fischer B. Biochemistry. 2009 May 26;48(20):4354-70 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19320465)
2. A novel function of monomeric amyloid beta-protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage. Zou K, Gong JS, Yanagisawa K, Michikawa M. J Neurosci. 2002 Jun 15;22(12):4833-41. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12077180)
3. Function of beta-amyloid in cholesterol transport: a lead to neurotoxicity. Yao ZX, Papadopoulos V. FASEB J. 2002 Oct;16(12):1677-9. Epub 2002 Aug 21. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12206998)
4. Amyloid β-Protein Stimulates Trafficking of Cholesterol and Caveolin-1 from the Plasma Membrane to the Golgi Complex in Mouse Primary Astrocytes. Urule Igbavboa,[*] Grace Y. Sun,[+] Gary A. Weisman,[+] Yan He,[+] and Gibson Wood[*] Neuroscience. 2009 August 18; 162(2): 328–338 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3083247/?tool=pmcentrez)
5. The Alzheimer's amyloid β-peptide (Aβ) binds a specific DNA Aβ-interacting domain (AβID) in the APP, BACE1, and APOE promoters in a sequence-specific manner: characterizing a new regulatory motif. Maloney B, Lahiri DK. Gene. 2011 Nov 15;488(1-2):1-12. Epub 2011 Jun 15. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21699964)
6. Functional activity of the novel Alzheimer's amyloid β-peptide interacting domain (AβID) in the APP and BACE1 promoter sequences and implications in activating apoptotic genes and in amyloidogenesis. Bailey JA, Maloney B, Ge YW, Lahiri DK. Gene. 2011 Nov 15;488(1-2):13-22. Epub 2011 Jun 25. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21708232)
7. Signaling effect of amyloid-beta(42) on the processing of AbetaPP. Tabaton M, Zhu X, Perry G, Smith MA, Giliberto L. Exp Neurol. 2010 Jan;221(1):18-25. Epub 2009 Sep 9. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19747481)
8. The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. Soscia SJ, Kirby JE, Washicosky KJ, Tucker SM, Ingelsson M, Hyman B, Burton MA, Goldstein LE, Duong S, Tanzi RE, Moir RD. PLoS One. 2010 Mar 3;5(3):e9505. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20209079)
9. Regulation of APP cleavage by α-, β- and γ-secretases. Janelle Nunan, David H Small. FEBS Letters Volume 483, Issue 1, 13 October 2000, Pages 6–10. (http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579300020767)
10. Crowther, D. C., Curry, J. R., Duthie, F. A. I., Gubb, D. C., Kinghorn, K. J., Lomas, D. A., Miranda, E och Page, R. 2005 *Intraneuronal Aβ, Non-amyloid Aggregates and Neurodegeneration in a Drosophila Model of Alzheimer's Disease:* Neuroscience 132 (2005) sid. 123-135
11. Marcusson J, Blennow K, Skoog I, Wallin A. Alzheimers sjukdom och andra kognitiva sjukdommar. Andra upplagan. Stockholm; Liber AB; 2003 sid. 55-57

12. Amyloid oligomers: formation and toxicity of Aβ oligomers. Masafumi Sakono, Tamotsu Zako. FEBS Journal Volume 277, Issue 6, pages 1348–1358, March 2010
13. Animal models of amyloid-β-related pathologies in Alzheimer's disease, FEBS Journal, volume 277, Issue 6, sid. 1389-1409, mars 2010 Volume 277, Issue 6,
14. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL & Pericak-Vance MA (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. Science 261, 921–923.
15. Kim J, Basak JM & Holtzman DM (2009) The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. Neuron 63, 287–303.
16. Marianne Grip, Alzheimers sjukdom 2010-06-17,[2012-02-24] http://ki.se/ki/jsp/polopoly.jsp?d=23051&a=47773&l=sv
17. Swedish brain power, 2009-05-19 http://www.youtube.com/watch?v=EwBuRwiys9w
18. Krister Svahn, nya metoder för att behandla Alzheimers, 2011-10-26 [2012-02-24] http://www.sahlgrenska.gu.se/aktuellt/nyheter/Nyheter+Detalj/nya-metoder-for-att-behandla-alzheimers.cid1044793
19. Cancermedicin effektiv mot alzheimer, Kemivärlden Biotech, 2012 http://www.chemicalnet.se/iuware.aspx?pageid=792&ssoid=150766
20. Tom Lundahl, Apolipoprotein E (ApoE) genotypning, Region Halland, 2010 http://www.regionhalland.se/sv/vard-halsa/for-vardgivare/laboratorier/klinisk-kemi-och-transfusionsmedicin/klinisk-kemi/mer-om-analysen1/apolipoprotein-e-apoe-genotypning/
21. Bill hendrik, Green Tea May Help Prevent Alzheimer's Disease, WebMd, 2011 http://www.webmd.com/alzheimers/news/20110106/green-tea-may-help-prevent-alzheimers-disease
22. Författare okänd, Alzheimers Sjukdom, hämtad den 29 februari 2012 http://www.demensforbundet.se/se/om_demens/demenssjukdomar/alzheimers_sjukdom
23. Marianne Grip, Alzheimers Sjukdom, hämtad den 29 februari 2012 http://ki.se/ki/jsp/polopoly.jsp?d=23051&a=47773&l=sv
24. Brand et. al. Targeted Gene expression as a Means of Altering Cell Fates and Generating Dominant Phenotypes1993
25. "Proteiners form och funktion – en balansgång mellan ordning och kaos". Docent föreläsning Ann-Christin Brorsson 14 december
26. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics, John Hardy Et. Al, Science 297, 353,2002
27. Alzheimer Sjukdom av Jan Marcusson senast uppdaterad 2012-01-31 , hämtad den 14-03-2012 http://www.1177.se/Fakta-och-rad/Sjukdomar/Alzheimers-sjukdom/
28. Elav, Quick guide. Matthias Soller och Kalpana White.

29. Neural Specificity of elav Expression: Defining a Drosophila Promotor for Directing Expression to the Nervous System. Kwok-Ming Yao, Kalpana White. Journal og Neurochemistry vol. 63. 1(1994). sid 41-51.
30. Spatio-temporal analysis of gene expression during aging in Drosophila melanogaster. Laurent Seroude, Ted Bummel, Pankaj Kapahi och Seymour Benzer. Aging Cell 1 (2002) sid. 47-56.

Bilder

4. Flugan, Alzhiemers och gymnasiet. Johan Andersson, LiU, 18 Jan 2012
5. http://www.ahaf.org/alzheimers/about/understanding/plaques-and-tangles.html , hämtad den 29/02-*2012*
6. Amyloid oligomers: formation and toxicity of Aβ oligomers Masafumi Sakono, Tamotsu Zako. FEBS Journal Volume 277, Issue 6, pages 1348–1358, March 2010
7. Amyloid oligomers: formation and toxicity of Aβ oligomers Masafumi Sakono, Tamotsu Zako. FEBS Journal Volume 277, Issue 6, pages 1348–1358, March 2010
8. Animal models of amyloid-β-related pathologies in Alzheimer's disease, FEBS Journal, volume 277, Issue 6, sid. 1389-1409, mars 2010

BILAGOR

Bilaga 1 Projektplan

Projektplan, Alzheimers flugor

BAKGRUND

Vi valde att arbeta med detta projekt då vi ville ha ett projekt som innebar en blandning emellan praktisk laboration och teoretiska slutsatser. Vi eftersökte ett projekt där vi skulle få göra en djupdykning och lära oss många nya saker.

Anki Brorssons föreläsning på skolan kombinerat med projektredovisningen ifrån Andreas Bodin, Patrik Tosteberg och Joakim Boda fick upp ögonen för universitetsvärlden. Eftersom Anki hade ett förslag med både Kemi och Biologi som vi alla har ett stort intresse av blev valet solklart.

SYFTE

Syftet med arbetet är:
att *Få en inblick i ett riktigt forskningsarbete samt att få ökad förståelse utav effekterna av Aβ på bananflugor beroende på när i livsskedet som Aβ skapas.*

SLUTPRODUKT

Slutprodukten för vårat projekt är en vetenskaplig rapport som visar vilken påverkan Aβ har för bananflugor beroende på när i livsskedet som proteinet börjar bildas.

GENOMFÖRANDE

Arbetet kommer att genom föras i tre faser. Först en förberedelsefas där vi föder upp flugorna och förbereder oss både teoretiskt och praktiskt för att utföra våra tester på flugorna. Detta följs av en genomförande fas där vi utför aktivitetstest, minnestest samt överlevnadstest på samtliga flugtyper. Sista delen kommer att vara sammanställningsfasen där vi sammanfattar våra resultat och för in våra vetenskapliga slutsatser i vår rapport

.

TIDSPLAN

10 Oktober - Sövnings anordning klar
17 Oktober - korsa flugor (1)
19 Oktober - Aktiveringstest och minnes anordning klar.
25 Oktober - korsa flugor (2)
27 Oktober - Utför Aktivieringstest, minnestest samt överlevnadstest (1)
1 November - Korsa flugor (3)
3 November - Utför Aktiveringstest, minnestest samt överlevnadstest (2)
10 November - Utför Aktiveringstest, minnestest samt överlevnadstest (3)