



Høgskulen
på Vestlandet

BACHELOROPPGAVE

Virkning av kalsiumaktivitet på rørdannelse i
Ciona intestinalis embryo

The effect of calcium activity on tube
formation in *Ciona intestinalis* embryo

Mohammed Hadi Hussein

&

Maria Kim Doan Nguyen

Bioingeniør

Fakultet for ingeniør- og naturvitenskap/Institutt for sikkerhet, kjemi- og
bioingeniørfag/Bioingeniør

Veileder: Signe Steinkopf

29.mai 2020

Jeg bekrefter at arbeidet er selvstendig utarbeidet, og at referanser/kildehenvisninger til alle
kilder som er brukt i arbeidet er oppgitt, jf. Forskrift om studium og eksamen ved Høgskulen på Vestlandet, § 12-1.

Innholdsfortegnelse

Forord	2
Etikk	2
Sammendrag	3
Abstract	3
Teori.....	4
<i>Ciona intestinalis</i>	4
<i>Notochord</i>	7
Kalsium signalisering i cellen.....	10
Typer av kalsium signalisering	13
Hvordan følge kalsiumdynamikk.....	15
<i>Ciona intestinalis</i> embryologi	21
CRISPR i <i>Ciona intestinalis</i>	21
PACR	25
Metode	26
1. PCR.....	26
2. Gelelektroforese av PCR-produkt	30
3. DNA-ekstraksjon fra gel	32
4. TOPO TA kloning	33
5. Gateway rekombinasjon kloningsteknologi	34
6. Sekvensering	36
7. Design av sgRNA konstruksjon	38
8. PACR-metode	40
9. Elektroporering.....	40
Resultat	41
Gelelektroforese.....	41
Sekvensering	43
Design av sgRNA	43
Optogenetisk eksperiment med PACR Sensor.....	48
Diskusjon	52
Konklusjon.....	55
Referanser	56
Ordliste	59

Forord

Bachelorprosjektet ble utført på Sars International Centre for Marine Molecular Biology – Universitetet i Bergen i tidsrommet uke 11 til uke 22. Vi ønsker å takke eksterne veiledere Marios Chatzigeorgiou og Jørgen Høyer, samt intern veileder Signe Steinkopf for veiledning av bacheloroppgave. Grunnet koronaviruset ble laboratoriet stengt i uke 11, og det har derfor blitt en mer teoretisk oppgave enn opprinnelig planlagt. Det ble til slutt ikke tid til å utføre prosjektet som beskrevet i teori- og metodedel og har dermed blitt utført en alternativ metode som illustrerer problemstillingen.

Etikk

Som bioingeniørstudenter, er vi pliktet til å følge gjeldende etiske retningslinjer for vårt yrke for å kunne utføre laboratoriearbeidet både i forbindelse med forskning og behandling av pasienter. Dette prosjektet ble utført på biologisk materiale fra lokale sekkedyr som ble samlet fra Døsjevika (Bildøy Marina AS), Døsjevegen, 5353. Ingen deler av eksperimentet ble utført ved bruk av eller på mennesker. Vi vil også erklære at dyrene og alt biologisk materiale ble behandlet med respekt i henhold til yrkets etiske retningslinjer. I henhold til disse retningslinjene, ble prosjektet også utført ved konstruktivt samarbeid og ærlighet mellom alle parter.

Sammendrag

Ciona intestinalis er vår nærmeste virvelløse slektning. Det er derfor mye forskning på dette sekkedyret da det i tillegg har et svært lite genom med kun 40 celledelinger i løpet av embryogenesen. I dette forsøket skal kalsiumaktivitet sin påvirkning på dannelse av notochord, ryggstreng, i sekkedyret studeres. Notochord er avgjørende for bevegelse og stabilitet hos sekkedyret, og er viktig for utvikling av tubulære strukturer som for eksempel blodårer. Kalsium er svært viktig for signaloverføring da det er en essensiell sekundær budbringer som virker både lokalt og over større områder som et helt vev. Forsøket skulle i utgangspunktet utføres ved å benytte CRISPR knockouts som vil si at visse gener ekskluderes i embryoet for å se hvilken virkning dette har på rørdannelsen. Grunnet tidsbegrensning har det istedenfor blitt benyttet PACR sensor for å inhibere kalsiumaktivitet ved utvikling av embryo i mørke. Individuer av *Ciona intestinalis* som fikk utvikle seg i lys inhiberte ikke kalsiumaktivitet. Resultatet viste at det var bedre utvikling hos individer som fikk utvikle seg i lys enn hos individet som ble utviklet i mørket. Konklusjonen var dermed at kalsiumaktivitet er svært viktig for korrekt utvikling av notochord.

Abstract

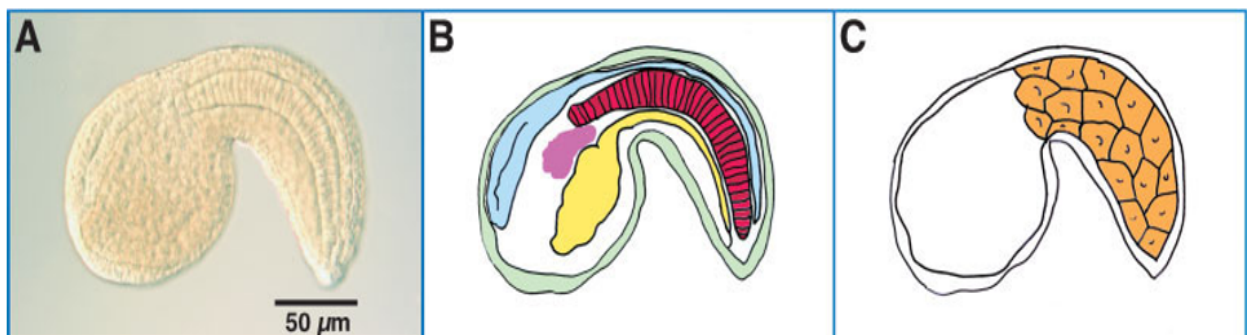
Ciona intestinalis is our closest invertebrate relative. There is therefore a lot of research on this tunicate since it has a small genome with only 40 cell divisions throughout the embryogenesis. In this project the effect of calcium activity on the notochord in the tunicate will be studied. Notochord is a determining factor for motion and stability in *Ciona* and is also important for development of tubular structures such as blood vessels. Calcium is important for signal transduction as it is an essential second messenger that works both locally and over larger areas such as a whole tissue. The project was originally supposed to be performed by using CRISPR knockouts, which means that specific genes would get excluded from the embryo to see how this would affect the notochord development. Due to time limitations a method using PACR sensor has been used instead to inhibit calcium activity in embryos developing in darkness. Individuals of *Ciona intestinalis* that developed with light exposure would therefore not have any calcium inhibition. The result showed that there was a better development of the notochord in individuals that had light exposure than the individual without. The conclusion is therefore that calcium activity is important for correct development of the notochord.

Teori

Ciona intestinalis

Ciona intestinalis er et sekkedyr som benytter sitt voksne liv festet til et hardt underlag, hvor den livnærer seg ved filtrering av vann, og frigjør egg og sperm. *C. intestinalis* er en klasse av kappedyr som er i en underrekke av ryggstrengdyr, som inneholder både virveldyr og virvelløse dyr. For en dag eller to av et sekkedyrers liv er den i en larvefase hvor den har rumpetrollmorfologi. Denne morfologien kan vise til opphavet av ryggstrengdyr. *C. intestinalis* er menneskets nærmeste virvelløse slektning. I 1866 observerte den russiske biologen Alexander Kowalevsky rumpetrollmorfologien og noterte tilstedeværelsen av både dorsalt nervesystem og en prominent notochord (ryggstreng), som er to definerende trekk hos chordate^{1,2}.

Embryoet utvikler seg i et fast mønster i en beskyttende fosterhinne omgitt av fingerliknende, gelatinaktige utstikkere fra folikkelceller. Etter om lag 40 minutter etter fertilisering av egget, starter en konstant serie av celledeling. Ved 4,5 timer etter fertilisering, vil embryo starte å formere ektoderm, mesoderm og endoderm, som er forstadier til alle voksne vev. Denne prosessen kalles gastrula. Deretter starter utforming av dorsal hul nervestreng, en prosess kalt nevrulering^{1,2}.



Figur 1: Organisering av ved i en sekkedylarve. (A) Fotomikrograf av en *C. intestinalis* larve om lag 14 timer etter fertilisering ved 15°C. (B) Skisse av larven hvor det sentrale nervesystemet (blå), notochord (rød), endoderm (gul), mesoderm (lilla) og epidermis (grønn) presenteres. Epidermis er kun avbildet i et begrenset område, men dekker i realiteten hele larven. (C) Avbildet er 18 muskelceller som beskytter notochord farget orange².

Om lag 18 timer etter fertilisering vil en *C. intestinalis* larve klekkes fra fosterhinnen og lete etter et optimalt sted å feste seg for å gjennomgå en radikal metamorfose. Det første trinnet av metamorfosen er en komplett tilbaketrekning av halen som frarøver larven sine mest gjenkjennelige chordate trekk. Deretter utvikles en stilk ved festeområdet, slik at innvollene reorienterer seg inni kroppen. Innen et par dager etter festing til en overflate vil et hjerte bli synlig. Munnen vil starte å filtrere vann for næring^{1,2}.



Figur 2: Et voksent *C. intestinalis* individ har to “siphons”, en oral og en atrial som markert på figuren. Dette er et rørsystem som skyller gjennom vann for at et ascidian skal få i seg næring. De blå pilene viser vannets flyt gjennom individet. *C. intestinalis* er hermafroditter og har derfor både spermdukt og egg, som avbildet og markert¹.

Sekkedyr og virveldyr utviklet seg fra samme opphavslinje fram til et skille for over 500 millioner år siden. Sekkedyr er medlemmer av *urochordata*, som er den underrekken som skilte seg fra den siste felles forløperen til alle ryggstrengdyr. Det er derfor mange likehetstrekk og ulikheter mellom sekkedyr og virveldyr. Dette skillet skaper over en milliard år i uavhengig evolusjon mellom sekkedyr og moderne virveldyr som menneske, mus, kylling, frosk og sebrafisk. Til tross for den evolusjonære distansen er det grunnleggende kroppsplanet til ryggstrengdyr gjenkjennelig hos sekkedyrlarver. *C. intestinalis* er som tidligere nevnt et kappedyr som ligger under divisjonen ryggstrengdyr. Ryggstrengdyr kjennetegnes av notochord, også kalt ryggstreng, som er en *anterior* til *posterior* orientert stav av celler som ligger under ryggraden. I de første ryggstrengdyrene er det trolig at notochord, ryggstrengen, ga en biomekanisk fordel til svømmende larver ved å tilføre stivhet og væskespreng som gir en karakteristisk, elastisk konsistens til vevet. Hos virveldyr har notochord i tillegg en viktig rolle som signal senter for nærliggende vev til et utviklende embryo^{1,2}.

Andre morfologiske trekk som er felles hos *C. intestinalis* og ryggstrengdyr er hult nervesystem og hæl. Etter at det fylogenetiske treet for ryggstrengdyr ble omorganisert, ble kappedyr og virveldyr ansett som søstergrupper innenfor rekken ryggstrengdyr. Dette førte til en bedre forståelse av visse trekk som var tenkt til å være spesifikke for virveldyr. Blant disse trekkene er *neurogenic placode* som gir opphav til sensorisk struktur i hode, og *neural crest cell* som er essensiell i utvikling av hjerne. Disse strukturene er tenkt til å ha forløpere hos kappedyr, noe som indikerer at disse strukturene forekom før kappedyr og virveldyr skilte seg fra samme slekt^{1,2}.

Notochord

Notochord, ryggstreng, er en embryonisk struktur som er konservert hos alle ryggstrengdyr gjennom deres evolusjon. Til tross for at denne strukturen forsvinner i senere trinn av embryoutvikling hos for eksempel mennesker, vedvarer notochord gjennom hele livet hos andre ryggstrengdyr som sebrafisk. Notochord er en essensiell struktur som spiller viktige roller i utviklingen av embryoet. Den frigjør signalmolekyler som hjelper i formering og utvikling av ulike vev og strukturer i kroppen som nervalrør, mesoderm (som gir opphav til de fleste organer og vev i kroppen som bindevev og muskler) og endoderm. Notochord sin rolle i arrangement av nærliggende vev er velkjent, og den mest karakteristiske rollen er å gi mønster til nervalrør. Proteiner som kalles *Hedgehog* proteiner er blant de viktigste signalmolekylene som frigjøres fra notochord, da de induserer ulike steg i utvikling av nervalrøret. Notochord frigjør også viktige signaler som etablerer venstre-høyre asymmetri. Noen signaler som er derivert fra notochord er også viktige i spesifisering og forming av dorsal aorta og hjerte. I tillegg spiller disse signaler viktige roller i utvikling av tidlig endoderm og pankreas^{3,4}.

Andre grunnleggende roller som notochord har, er å gi strukturell støtte som bidrar til bevegelse og svømming hos dyr. Hos ryggstrengdyr er notochord et hovedelement i skjelettet til embryo. Uten ferdig differensiert notochord vil ikke embryoet klare å forlenge seg, noe som fører til manglende evner til å svømme eller få i seg næring^{3,4}.

Hos mennesker er notochord forbigående embryonisk struktur som brytes ned i femte uke av fosterutviklingen, hvor det meste av vevet utvikler seg til mellomvirvelskive mens en mindre mengde blir til *nukleus pulposus*. *Nukleus pulposus* er den bløte kjernen av mellomvirvelskivene. Denne kjernen kan ikke komprimeres da de har væskepreg, men kan forandre form. De representerer derfor de viktigste værende elementene i de bløte delene av ryggstølen. Rester av notochord struktur finnes i svært små mengder i den bløte kjernen av mellomvirvelskive hos barn og voksne. Notochord cellene i mellomvirvelskiven er også antatt å frigjøre faktorer som beskytter *nukleus pulposus* cellene fra den degraderende effekten av cytokiner, i tillegg til å hemme celledød og apoptose^{3,4}.

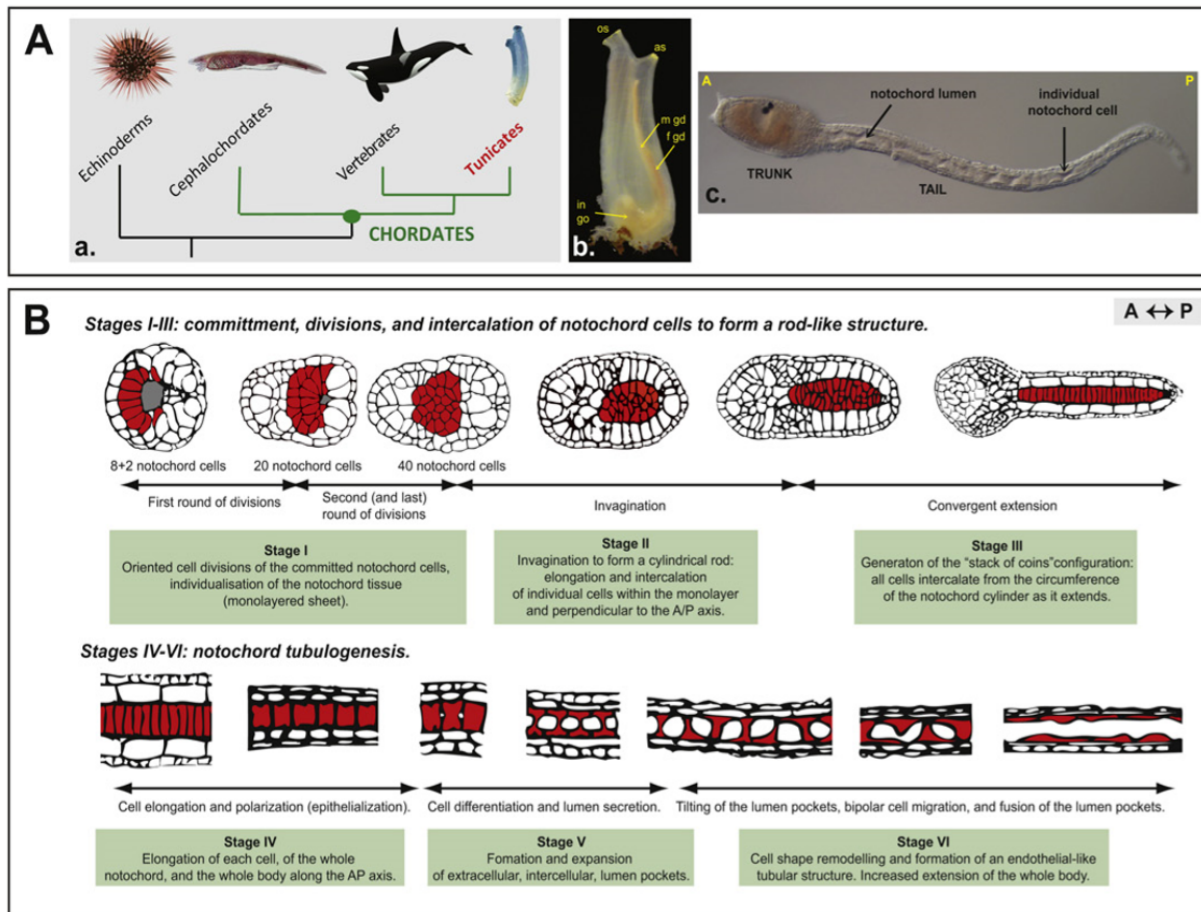
Det har blitt foreslått at skade eller trauma på notochord kan resultere i medfødt misdannelse på ryggraden. Hos mennesker og mus blir store celler med vakuoler tapt, og *nukleus pulposus* blir fylt med små bruskliknende celler. Tap av disse store cellene antas å være assosiert med begynnelsen av skivedegenerasjon⁵.

Den strukturen som får klinisk signifikans når notochord rester gir opphav til neoplasie som vokser sakte kalles *chordoma*. *Chordoma* cellene er morfologisk liknende på notochord. Selv om disse typer neoplasie er sjeldne, er de likevel invasive. Det vil si at de invaderer omkringliggende vev og kan spre seg. *Chordoma* cellene er årsak til 20% av primære spinale svulster. Hos mennesker har det blitt oppdaget funn av rester av notochord i 20% av voksne virvler, uten at disse utvikler seg til svulst. Det er antatt at *chordoma* formes som resultat av aktivering og proliferering av notochord rester⁵.

I virveldyr utvikles notochord fra dorsal organismer, som er en gruppe celle som har ansvar for å initiere nervevev. Disse cellene er en region av et virveldyrs gastrula, som tidligere nevnt er ektoderm, mesoderm og endoderm, som er forstadier til alle voksne vev. Liknende regioner som dorsal organismer eller andre homologe strukturer finnes hos andre organismer som for eksempel *dorsal lip* hos amfibier. Siden *C. intestinalis* er påvist til å være det første av ryggstrengdyr til å utvikle notochord, vil grundig forståelse av notochord utvikling hos disse dyrene gi bedre innblikk i prosessen hos andre dyr og mennesker. Slik forståelse kan oppnås ved å studere likheter og forskjeller mellom notochord hos *C. intestinalis* og andre dyr som sebrafisk, mus og mennesker⁶.

Til tross for at notochord utvikles hos ryggstrengdyr fra dorsal region eller homologe strukturer, vil utvikling innebære noen ulikheter blant ulike arter. Hos *C. intestinalis*, vil notochord ta form som endotel-liknende rør ved at cellene blir presset mot ytre vegg, og lumen fylles med vann som cellene frigjør. Hos sebrafisk derimot, blir det ikke formet lumen, men cellene bli forstørret på grunn av store intracellulære vakuoler som blir fylt med vann⁶.

C. intestinalis sin notochord hos larver er formet som et rett rør lukket ved begge ender. Det består av 40 endotel-liknende celler som omgir en stor lumen. Cellene er bundet med notochord-kappe består av bindevevfibriller. Ved hælen, ligger notochord i sentral posisjon omgitt av muskler. Her fungerer notochord som et hydrostatisk skjelett som er essensielt for bevegelse og svømming⁶. Brachyury genet er et T-box transkripsjonsfaktor-gen som er utelukkende uttrykt i notochord cellene som Brachyury protein. Proteinene er som sagt en transkripsjonsfaktor som regulerer aktiviteten til andre gener ved binding til T-boks og spiller derfor en viktig rolle i notochord dannelse i *Ciona intestinalis*⁷.



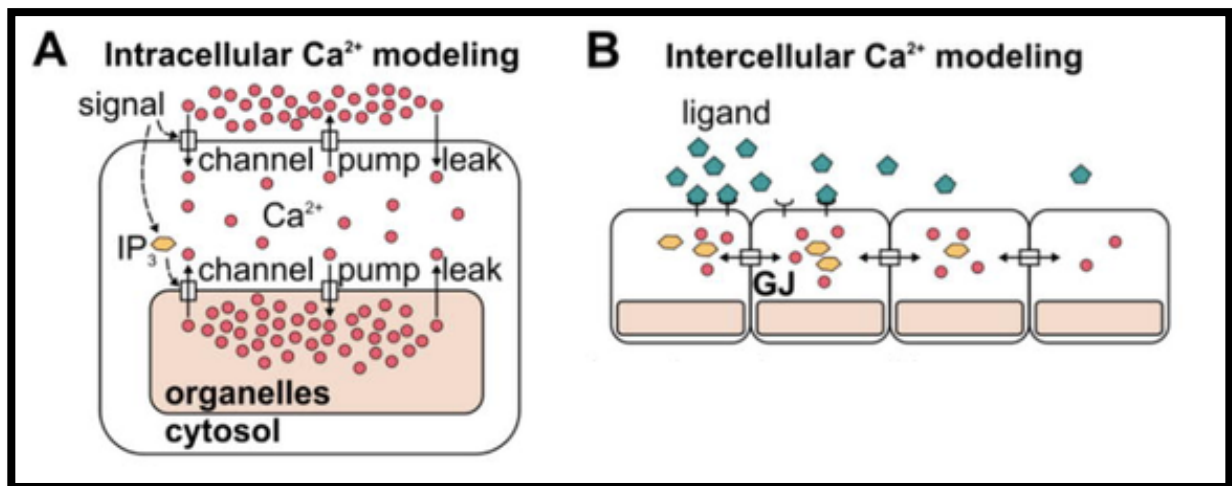
Figur 3: *Ciona intestinalis* notochord tubulogenesis. (A) *Ciona intestinalis*. (a) Det fylogenetiske treet for ryggstrengdyr som viser utvikling fra Urochordata, den siste felles forløperen mellom virveldyr og kappedyr, til Echinoderm som er gruppen kalt pigghuder, Cephalochordates som er en klasse kalt lansettfisker, virveldyr og til slutt kappedyr som er markert i rødt. (b) Et voksent individ. Markert i gult er ulike organer av det voksne individet. Se figur 2 for tydeligere markeringer av karakteristiske organer. (c) Ruget larve på siste stadiet av larveutvikling. Markert på figuren fra venstre til høyre er torso, notochord lumen, hale og en individuell notochord celle. (B) Faser i utvikling av notochord og morfogenese under embryonisk utvikling. Den første raden viser celledeling og forming av notochord-celler til en stavstruktur som er fase 1-3 av larveutviklingen. Den nederste raden viser celleforlengelse og dannelse av lumenlommer som så går sammen for å danne et stort lumen. Dette er fase 4-6 av larveutviklingen⁶.

Det er flere biologiske, geometriske og biofysiske kjennetegn som gjør *C. intestinalis* notochord til en interessant og enkel modell for å undersøke morfogenese og rørdannelse. Blant disse kjennetegnene er fravær av celleprolifisering og celledød, morfogenese som gir et enkelt og rett rør, ingen stor forlengelse av røret, cellepolaritet er oppbevart gjennom hele formingsprosess, notochord vev er geometrisk konstant og cellene er geometrisk like, i tillegg til at notochord befinner seg i et enkelt biologisk og topologisk miljø⁶.

Kalsium signalisering i cellen

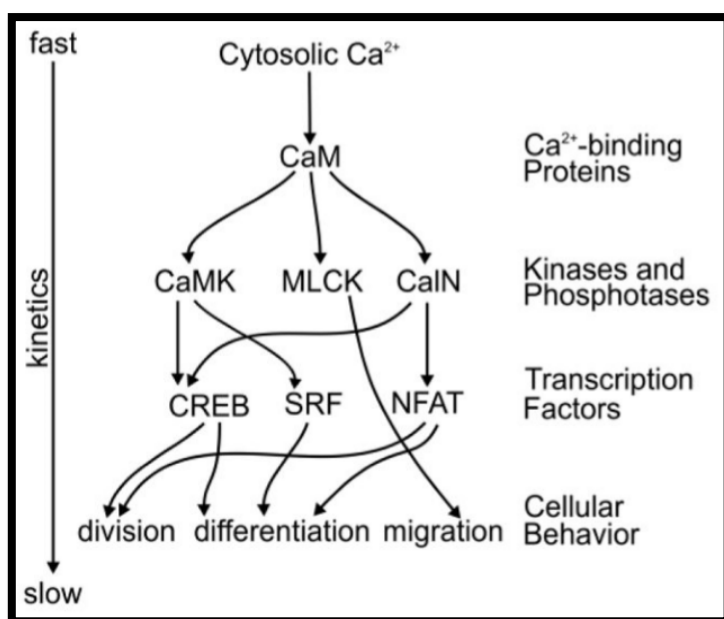
Kalsiumioner (Ca^{2+}) er involvert i nærmest alle cellulære aktiviteter. Sammen med fosfat, endrer kalsium ladning og konformasjon på proteinene i cellene, noe som gjør disse ionene til universale signalføring verktøy i cellene. Cellene bruker mye energi på å holde 20 000-ganger gradient mellom ekstracellulær og intracellulær Ca^{2+} konsentrasjon. Energien fra denne gradienten benyttes i signaloverføring i cellen hvor et stort antall proteiner er tilpasset til å binde kalsium⁸. Kalsiumsignalisering kan foregå intracellulært eller intercellulært^{8,9}.

En modell for cytosolisk Ca^{2+} konsentrasjon hos en enkeltcelle baserer seg på tre måter Ca^{2+} kan transporteres innad i en celle. Transportveiene består av kanaler, pumper og lekkage fra organeller til cytosol. Disse fluksene kan oppstå på cellemembranen eller på membranen til ulike organeller slik som for eksempel endoplasmatisk retikulum. Frigjøring av Ca^{2+} til cytosol via Ca^{2+} kanaler reguleres ofte av signal fra IP_3 , ATP eller Ca^{2+} (figur 4). Større modeller hvor man ser interaksjon mellom flere celler viser at Ca^{2+} kan transporteres mellom naboceller via *gap junction*, som er en gate mellom to naboceller hvor cytoplasma fra de to cellene kobles direkte. Dette fører til enkel transport av Ca^{2+} eller andre molekyler mellom cellene. Det er en delikat balanse av de tre cellulære fluksene og celle-cellekommunikasjon som viderefører korrekte signaler intracellulært og intercellulært¹⁰.



Figur 4: Modell av intracellulær og intercellulær Ca^{2+} transport for å overføre signal. (A) Intracellulær Ca^{2+} modell hvor signal fører til Ca^{2+} transport inn i cellen via kanaler, pumper eller lekkasje. Signal kan reguleres av for eksempel IP_3 hvor Ca^{2+} fra organeller frigjøres til cytosol for å forsterke signalet. (B) Celle-cellekommunikasjon via gap junction hvor Ca^{2+} kan forflytte direkte fra celle til celle¹⁰.

Intracellulær og intercellulær signalisering kontrolleres av Ca^{2+} kanaler i plasmamembranen som omgir cellen eller membraner rundt ulike organeller. Noen organeller benyttes som kalsiumlager som så kan reguleres til å frigi kalsium for å forsterke et signal. Signalets størrelse er proporsjonal med Ca^{2+} konsentrasjonen. For å kunne avlese signalet må Ca^{2+} bindes reversibelt til proteindomenet på mottakerproteiner, i tillegg til andre proteiner som reguleres av Ca^{2+} bindende proteiner. Ved binding av kalsium til protein som er mottakelig for kalsiumet vil proteinet endre strukturen og dermed funksjon. Et eksempel på et slikt protein er *Calmodulin* (CaM) som er et viktig protein for å overføre kalsiumsignalet videre til målproteinene. Ved



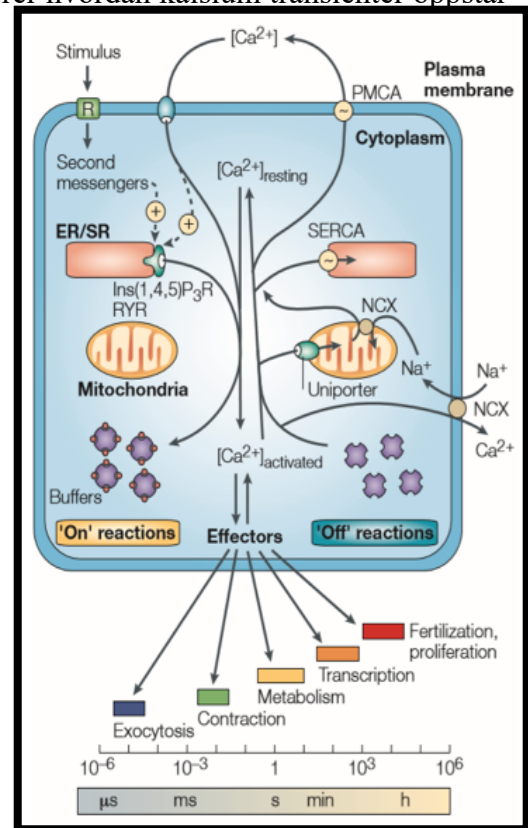
overføring av signal ved binding av proteiner for å endre funksjon, kan kalsiumsignalet resultere i en rask og spesifikk aktivering av ulike kinaser og transkripsjonsfaktorer for å utløse en reaksjon eller prosess som for eksempel celledød. Se figur 4 for illustrasjon av signaloverføring¹⁰.

Figur 5: Eksempel på Ca^{2+} signaloverføring. Ca^{2+} binder til CaM som

overfører signalet videre ved å binde til kinaser eller fosfataser slik at disse aktiveres, noe som kan påvirke en celle betraktelig. Dette vil føre til at kalsiumsignalet overføres videre, i dette tilfellet ved å aktivere transkripsjonsfaktorer som vil påvirke cellens oppførsel fremover¹⁰.

Kalsium fungerer på ulike måter for å regulere cellulære funksjoner som foregår over et bredt dynamisk omfang. På den ene siden kan kalsium ved nervesynapse indusere eksocytose i løpet av millisekunder. På den andre siden kan kalsium ved celledeling eller prolifering virke innen minutter eller timer⁹. Til enhver tid er kalsiumkonsentrasjonen bestemt av en balanse mellom på-reaksjon, som frigjør kalsium til cytoplasma, og av-reaksjon som fjerner kalsium fra cytoplasma ved hjelp av buffere og pumper⁹.

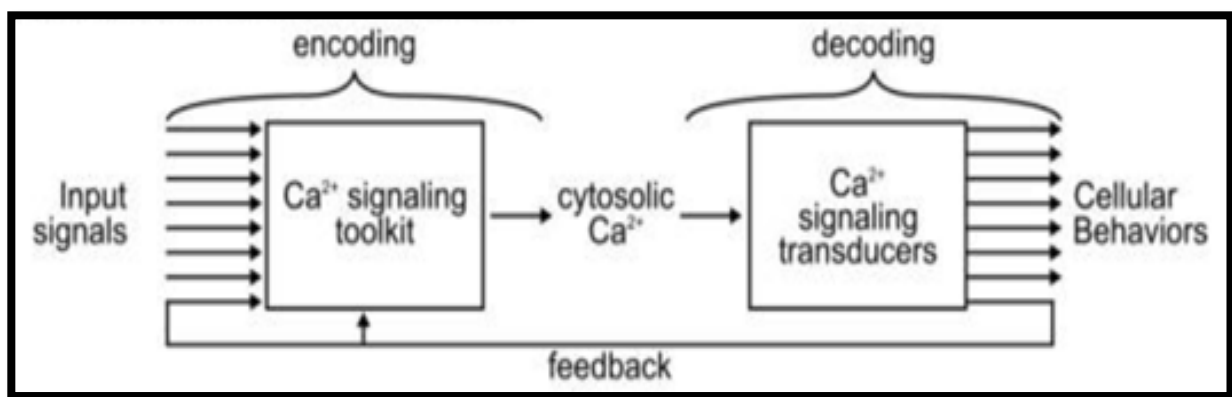
Kalsiumsignalisering har en felles, etablert signalmekanisme til tross for at cellenes respons på signalet er spesifikt for en type celle. Dette kan skyldes at avlesning av kalsiumsignal er avhengig av genene som blir uttrykt i cellen. Likevel vil disse signaliseringssystemene fungere ved å generere pulseringer av kalsium⁸. Figur 2 skisserer hvordan kalsium transienter oppstår ved hjelp av på- og av-reaksjoner⁹. Signal fra kalsium som kommer utenfra cellen vil transporteres via ulike plasmamembrankanaler som responderer til induserende stimuli som inkluderer depolarisasjon, ekstracellulære agonister, intracellulære budbringere og tømning av intracellulær kalsiumlager⁹. Intracellulært derimot, blir frigjøring av kalsium (enten fra endoplasmatisk retikulum eller sarkoplasmatiske retikulum) kontrollert av kalsium selv eller en gruppe budbringere som inositol-1,4,5-tisfosfat ($\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$), syklisk ADP ribose (cADPR), nikotinsyre adenin dinukleotid fosfat (NAADP) og sfingosin-1-fosfat (SIP). Disse budbringerne vil enten stimulere eller modulere frigjøringskanalene av intracellulære lagre⁹.



Figur 6: Dynamisk og homeostase for kalsium signalisering. Under på-reaksjon, føres kalsium inn i cellen og ut av ER og SR ved påvirkning fra stimuli. Kalsium binder til noen effektorer som aktiverer ulike prosesser i cellen over bredtidspektrum. Under av-reaksjon, forlater kalsium buffere og effektorer, og blir fjernet fra cellen gjennom pumper og $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ -vekslere. $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -veksler (NCX) og plasmamembran Ca^{2+} -ATPase (PMCA) driver kalsium ut av cellen mens Ca^{2+} -ATPaser i sarkoplasmatiske retikulum pumper kalsium inn i ER. Mitokondria tar kalsium raskt inn gjennom uniport og frigjør det sakte til cytosol hvor SERCA og PMCA som er Ca^{2+} -ATPaser, håndterer det. Cellen er avhengig av kalsium homeostase for å overleve. $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3\text{R}$ er inositol-1,4,5-trifosfat reseptor og RYR er ryanodin reseptor⁹.

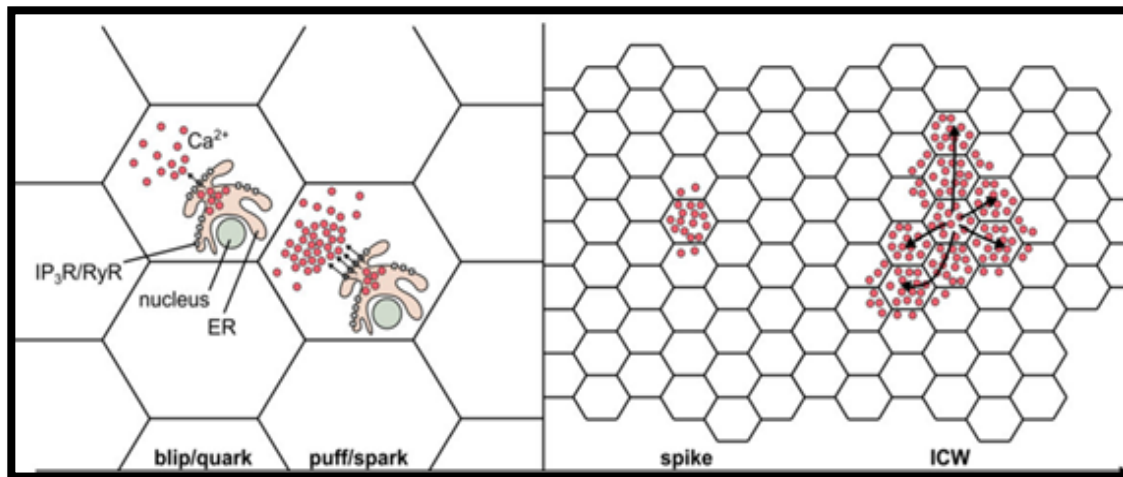
Typer av kalsium signalisering

Hvordan vevsegenskaper oppstår ved integrering av lokale signaler og hvordan epitelcellene oppfører seg kollektivt er kritisk for utviklingen av embryoet. Integrering av flere signaliseringsveier som spesifiserer cellens signaliseringsinformasjon krever en sekundær budbringer som kalsium. Kalsium signalisering, som nevnt tidligere, kontrollerer mange cellulære prosesser som celledeling, celledød og differensiering¹⁰. Gjennom morfogenese, benytter epitelcellene et avansert kommunikasjonsnettverk for å håndtere ulike signaler og implementere det genetiske programmet som driver utviklingen. Som en sekundær budbringer, er kalsium sentralt i integrering av slike signaler i dette nettverket¹⁰.



Figur 7: Generell struktur av signaliseringsnettverk for kalsium. Mange input signaler kan integreres inn i det spesialiserte Ca^{2+} signaliseringsnettverket som kun inneholder få komponenter, men som regulerer mange celleaktiviteter. Dette kalles en sløyfeform av signalisering. Signalene fra input signaler vil føre til økning av Ca^{2+} i cytosol som vil føre til aktivering av målceller. Målcellene vil dekode signalet basert på de spesifikke genene. Dette vil føre til en bestemt celleaktivitet. Ved utført celleaktivitet kan dette føre til feedback hvor nettverket får beskjed om det trengs mer eller mindre signal¹⁰.

De to laveste nivåene av Ca^{2+} signalisering er *blips* som også kalles (*qurrks*) og *puffs* som også kalles (*sparks*) (figur 8). Mens *blips* er forårsaket av åpning av en enkel membranbundet kanal, skjer *puffs* ved åpning av flere nabokanaler samtidig¹⁰.



Figur 8: Romlige og dynamiske egenskaper av Ca^{2+} signalisering. Ved blips er det bare en reseptor aktivert kanal involvert. Puffs involverer mer en reseptor aktivert kanal (IP3R eller RyR). Ved spikes er hele cellen aktiv, og Ca^{2+} kan spre seg til nabocelle. Intracellulær Ca^{2+} wave (ICW) involverer flere full-celle respons som er koblet sammen og resulterer i Ca^{2+} signalisering gjennom hele vevet. Pilene representerer diffusjon av kalsium¹⁰.

Et annet nivå av Ca^{2+} signalisering er *spikes* (figur 8), som er store nok til å aktivere de fleste kanalene i cellen. Ca^{2+} signaler med tilstrekkelig størrelse kan spre seg til nabocellene ved diffusjon gjennom *gap junction* eller parakrin signalisering og føre dermed til intercellulært bølge. Slik bred rekkevidde av Ca^{2+} signaliseringsnivåer, gir Ca^{2+} et økt romligmønster til å påvirke hele systemet¹⁰. Svingning i Ca^{2+} konsentrasjoner inneholder mer informasjon enn statisk konsentrasjon i forhold til form, frekvens, høyde og grunnkonsentrasjon som kan dekodes gjennom uavhengige signalveier. Tiden til Ca^{2+} respons varierer fra nanosekunder som ved membranskade, sekunder som ved respons til mekanisk stimuli eller langtids respons som ved endring i grunnkonsentrasjon av kalsium¹⁰. Bedre forståelse av kalsium rolle som sekundær-budbringer i integrering av signalene involvert i cellulære prosesser, gir bedre innblikk på systemnivå for å forstå kalsium rolle i cellene oppførsel kollektivt under morfogenese, vevsheling og regenerering. For å oppnå dette, kan databasert moduler av kalsiumsignalisering brukes til å kontrollere vevsutvikling enten syntetisk eller ved bruk av sensorer innen utviklede vev¹⁰.

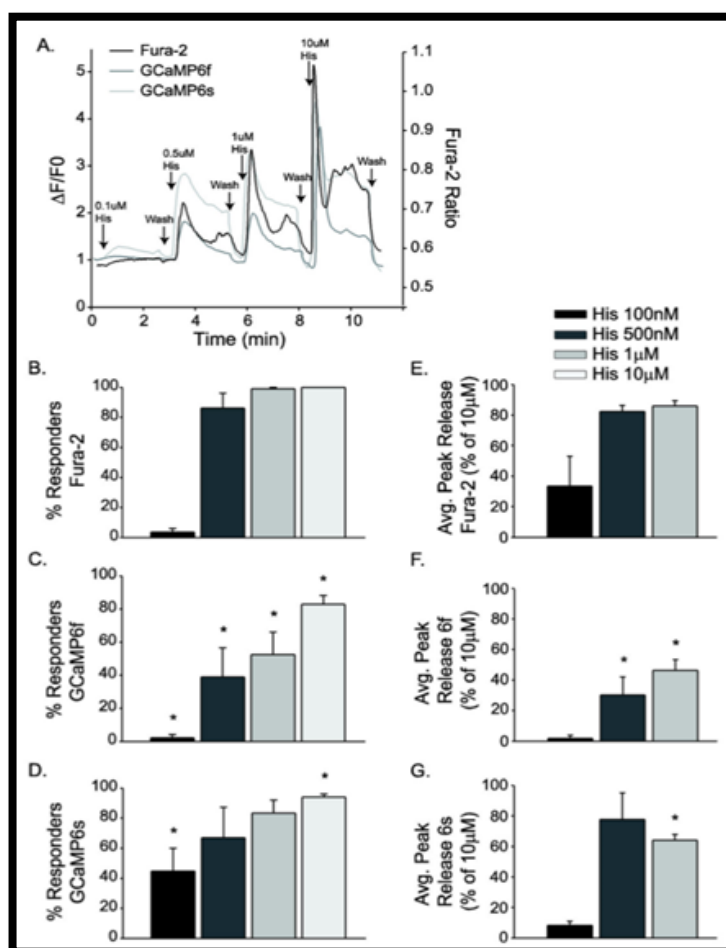
Hvordan følge kalsiumdynamikk

For å studere dynamikken av kalsium frigjøring i cellene, brukes det fluorescens kalsium indikatorer. Når disse indikatorene binder til kalsium, viser de endring i eksiteringsbølgelengde. Slike indikatorer kalles også forholdsmetriske, dvs. at endring i fluorescensintensiteten ved hver eksiteringsbølgelengde er proporsjonal med endringen i mengden av tilsatt fargestoff. Mange slike indikatorer ble utviklet som for eksempel *Fura-2*, *Indo-1* og *Fura Red*, hvor hver av disse har ulik affinitet for kalsium og ulike eksiterings-emisjonsbølgelengder. Noen av disse indikatorene er basert på at de konfererer deres sensitivitet for kalsium til grønne fluorescerende proteiner kalt GFP ved bruk av permuterte GFP proteiner¹¹.

GCaMPs er blant de GFP-basert genetisk kodet kalsiumindikatorer som er brukt og består av sirkulær pre-mutert GFP, *calmodulin* og *calmodulinbindende motif* som er et peptidsekvens-derivat fra myosin i skjelettmuskel (M13 peptid)¹¹. Når GCaMPs binder til kalsium, vil den gjennomgå konformasjonsendring som fører til økt fluorescensintensitet¹¹. GCaMP6s, 6m og 6f er forbedrede varianter av denne indikatoren med bedre lysstyrke og større dynamikkrekkevidde. Det er lite som er kjent om varig kalsiumdynamikk i cytoplasma på grunn av tekniske begrensninger ved bruk av kalsiumsensitive fargestoff. Disse utfordringene er overvunnet ved bruk av genetiske kodede indikatorer. Prestasjonen av genetisk kodede kalsiumindikatorer GCaMP6s og GCaMP6f ble sammenlignet mot det ratiometriske fargestoffet Fura-2 (figur 9). Det ble funnet at GCaMP6s hadde lik eller bedre prestasjon enn Fura-2 ved deteksjon av agonist-indusert kalsium-transienter¹¹.

For å sammenligne, ble Fura-2, GCaMP6s eller GCaMP6f kodende RNA introdusert til HeLa celler ved elektroporering, denne prosessen kalles *transfection*, Cellene ble så inkubert og bestrålt med lys ved to ulike bølgelengder på henholdsvis 340 og 380 nm. Fluorescens ble deretter målt ved 510 nm. Indikatorene absorberer lys ulikt ved disse to bølgelengdene og vil dermed emittere ulike lysmengder. Ved å måle fluorescens etter binding til kalsium ved to bølgelengder, vil forholdet mellom disse målingene, gi andel bundet indikatorer, og dermed kan kalsiumkonsentrasjonen bestemmes.

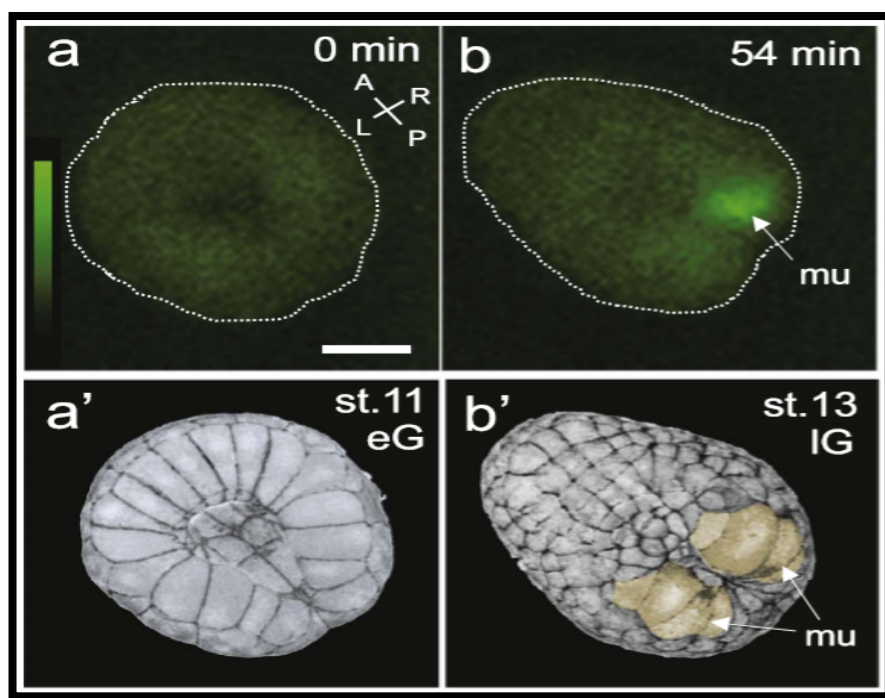
Valg av type indikator vil avhenge av størrelse og lengde på kalsium-transienten. Derfor benyttes indikatorer med rask kinetikk og lav affinitet for kalsium, som GCaMP6f, for å studere raske kalsium signaler som i nerveimpulser. Mens for saktere kalsiumsignaler som oppstår under apoptose eller rørforming hos Ciona embryo, vil indikatorer med høy lysstyrke og affinitet for kalsium (som GCaMP6s) være bedre valg for å detektere små endringer i kalsiumfrigjøring¹¹.



Figur 9: Sammenligning av Fura-2 med GCaMP6s og GCaMP6f ved måling av agonist-indusert kalsium frigjøring. **A.** Representativ enkel celle viser endringer i kalsium hos HeLa celler som er enten inkubert med Fura-2 eller uttrykker GCaMP6f/GCaMP6s som en respons til økt histamin konsentrasjon (0.1 μ M, 0.5 μ M, 1 μ M og 10 μ M). Fluorescens signaler er målt som $\Delta F/F_0$ (GCaMP6 proteins) og Fura-2 fluorescens signal er presentert som 340/380nm ratio. **B–D.** søylegraf viser prosent av celler som har endringer i fluorescens i respons til økt histamin konsentrasjon (% cellerespons). Total kvantifiserte celler er: Fura-2 (n=92), GCaMP6f (n=103) and GCaMP6s (n=179). **E–G.** Viser toppen for kalsium frigjøring som respons til ulike konsentrasjoner av histamin (0.1 μ M, 0.5 μ M and 1 μ M). Disse ble analysert for hver kalsiumindikator. Toppene for frigjøring er presentert som prosent av mettede dose av histamin (10 μ M histamin)¹¹. All data er presentert som gjennomsnitt \pm SEM, *p < 0.05 vs Fura-2 ved hver konsentrasjon.

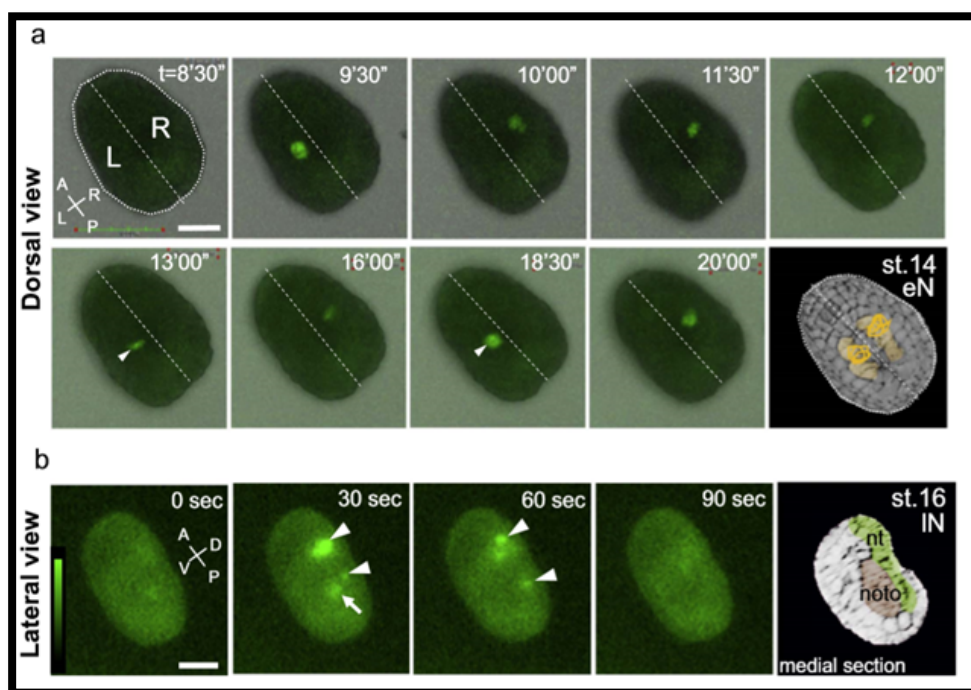
Kalsiumsignalisering i *Ciona notochord*

Som nevnt tidligere, er kalsiumionet en viktig sekundær budbringer. Som en sekundær budbringer, er raske økninger i kalsiumnivå (transient) viktige i ulike stadier av embryogenese¹². Disse Ca^{2+} transientene kan beskrives ved visualisering av Ca^{2+} dynamikk i ryggstrengdyr embryo under utvikling ved bruk av fluorescerende protein-basert Ca^{2+} indikator, som GCaMP6s kombinert med fin mikroskopering¹². Økning i kalsium hos sekkedyr er ikke observert før sent gastrula stadiet hvor den første kalsium transienten er observert i celler som gir opphav til muskel i det sene gastrula stadiet i embryoet. Flere slike kalsium transienter fortsetter også til tidlig nevrulering stadiet, se figur 10. Disse transientene er antatt å ha en rolle i arrangering av muskelceller og forlenging som forekommer mellom gastrulering og hælknupp stadiet. Det er også foreslått at slike spontane transienter av kalsium kan være konserverv gjennom myogenese hos chordate¹².



Figur 10: Representative bilder av Ca^{2+} transienter under gastrula stadiet. (a) Ca^{2+} transienter er ikke detektert på stadiet 11, det tidlige gastrula stadiet (early gastrula (eG) stage). (a') 3D anatomi av eG ved stadiet 11 (se ordliste). (b) Etter 54 minutter inkubasjon, var Ca^{2+} transienter detektert i muskel-linje celler ved stadiet 13 (se ordliste), den sene gastrula (the late gastrula (lG) stage). (b') 3D anatomi av lG på stadiet 13. Muskel-linje celler er farget i brun (hvite piler). Forkortelser: A, anterior; L, left; mu, muscle lineage cells; P, posterior; R, right. Skale: $50 \mu\text{m}$ ¹².

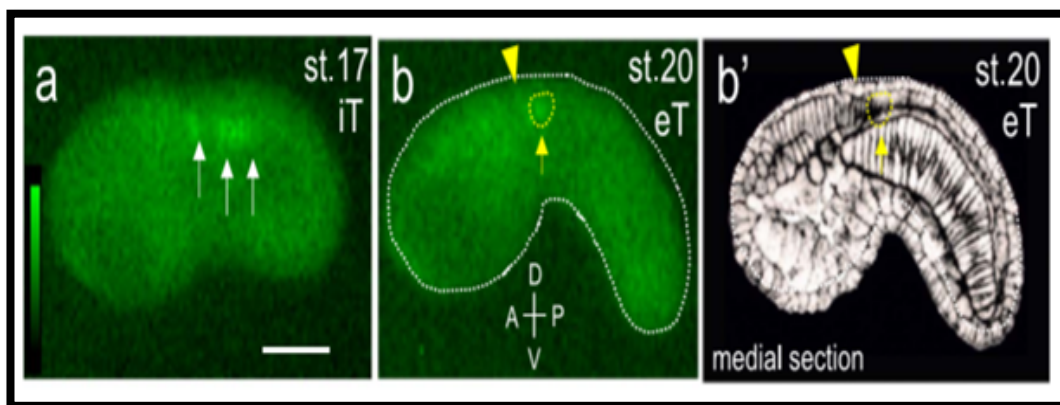
Ved nevruleringsstadiet, er kalsiumtransienter kun observert i dorsal region og ikke i ventral region av embryoet. Stort sett er disse transientene observert i få tall av nevrale plater, som er cellelinjer som gir opphav til kolinergene nerver og anterior inhibitoriske nerver, tidlig i nevruleringsstadiet. I dette stadiet observeres også noen få kalsiumtransienter i muskelcelle linje, noe som stemmer overens med observasjoner under gastrulering stadiet (figur 11). Flere av slike transienter er observert i samme type celler med relativt lange tidsrom, 39 ± 4 (gjennomsnitt \pm SD). I dette stadiet blir det også observert ulike tall av transienter mellom høyre og venstre side av neural platene, og i noen tilfeller blir transientene forstørret og overført til nabocellene¹².



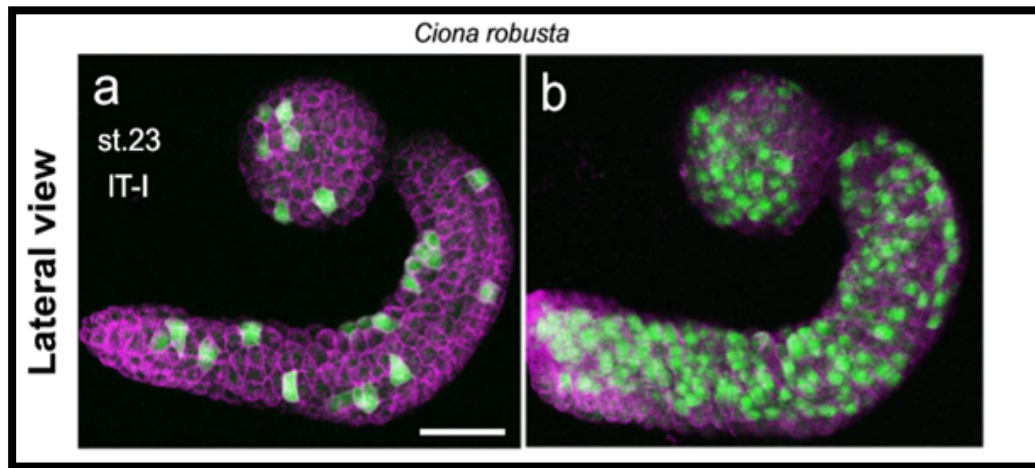
Figur 11: Representativt bilde av Ca^{2+} transienter under neurulering. (a) Typiske sekvens bilder av Ca^{2+} transienter på stadiet 14, tidlig nevrulering stadiet (the early neurula (eN) stage), ved dorsal synsvinkel, er Ca^{2+} transienter observert i neural-linje celler etter sent gastrula stadiet. Ulike størrelser av Ca^{2+} transienter var observert i samme område (hvite piler). Nederst til høyre, er et 3D-anatomi av tidlig nevrulering stadiet som viser cellelinjer som gir opphav til kolinergene og inhibitoriske nerver (farget i brun). (b) Typisk tidsforløp av Ca^{2+} transienter på stadiet 16, den sene nevrulering stadiet (the late neurula (lN) stage), fra lateral synsvinkel. Ca^{2+} transienter var observert i dorsal nevrogene celler (hvite piler) og axial notochord celler (hvit pil). Nederst til høyre, er et bilde som viser medialt snitt av sent nevrulering stadiet. Neural rør (nt) og notochord (noto) er farget i grønt og brunt, i henholdsvis. Forkortelser: A: A, anterior; D, dorsal; L, left; P, posterior; R, right; V, ventral. Skale: $50 \mu\text{m}$ ¹².

I tillegg til nevrogene celler, er kalsiumtransientene også observert ved posterior notochord i dette stadiet og inntil *tailbud* (hæle knopp?) stadiet. Disse transientene i notochord befinner seg på axial midtlinje og kan skilles fra transientene i nevrogene cellene på den dorsale siden av embryoet. Observerte kalsium transienter i aktivt interkalerende notochord cellene hos sekkedyr, angir at kalsiumtransienter av denne interkaleringen er en konservert mekanisme blant ryggstrengdyr. Når kalsiumtransienter i seneste stadiene av neurulering er terminert, avtar kalsiumaktiviteten og blir sjelden synlig under starten av *tailbud* stadiet¹².

Ved tidlig *tailbud* stadiet, er kalsiumtransientene igjen observert under differensieringen av nervene i ryggnervesnor (*nerve cord*) hvor noen *vesceral ganglion* (innvoller ganglier) forløpere viser rytmisk kalsiumtransienter med tidsrom på 22 ± 4 s (figur 12). Slike transienter kan være opphav til det såkalte sentrale mønstergeneratorer (CPG)¹¹, se ordliste. Kalsiumtransientene er også observert på midten av *tailbud* stadiet i et bredt område av epiderme celler og blir kalt CTECs (*calcium transient in epidermal celles*) (figur 13). Tall og frekvens av disse CTECs øker kraftig senere i *tailbud* stadiet, og tidspunktet for denne økningen i CTECs sammenfaller med bøyning i hælen¹².



Figur 12: Typisk Ca^{2+} transienter i starten og under tidlig hæl knopp stadiet. (a) Representativt bilde av Ca^{2+} transienter på stadiet 17, start av hæl knopp (initial tailbud (iT)). Signalet var detektert på nevrerør (hvite piler). (b) Representativt bilde av Ca^{2+} transient på stadiet 20, tidlig hæl knopp (early tailbud (eT)). Ca^{2+} transient var observert i innvoller ganglier (visceral ganglion, VG) område under tidlig hæl knopp stadiet. Posisjonen av Ca^{2+} transient er merket med gul pil. (b') Medialt snitt av den tidlige hæl knopp stadiet i embryoet. Tidlig hæl knopp merket med hvit stiplert linje, område med Ca^{2+} transient er merket med gul stiplert linje. Forkortelser: A, anterior; D, dorsal; P, posterior; V, ventral. skale: $50 \mu\text{m}$ ¹².



Figur 13: Representativt bilde av Ca^{2+} transient fra midten til sent hæl knopp stadiet. (a) 3-D bilde av Ca^{2+} transient under sent hæl knopp stadiet (the late tailbud I (LT-I)) viser Ca^{2+} transienter i epidermis cellene (CTECs). (b) Samlet Ca^{2+} transienter fra 74 integrerte bilder (maksimum intensitet) for 45 min (38 s intervall) under det sene hæl knopp stadiet. Ca^{2+} transienter var observert ved et bredt epidermis område. Ca^{2+} transienter var visualisert med GCaMP6s som lyser grønt¹².

Analysering av kalsiumaktivitet har avdekket ulike kjennetegn for kalsiumtransientene i forhold til tidsrom og frekvens, og slik karakterisering av kalsiumtransientene ved tidlig sekkedyr embryogenese kan hjelpe med å bedre forstå kalsiumsignaliseringsrolle i embryogenese i chordate¹².

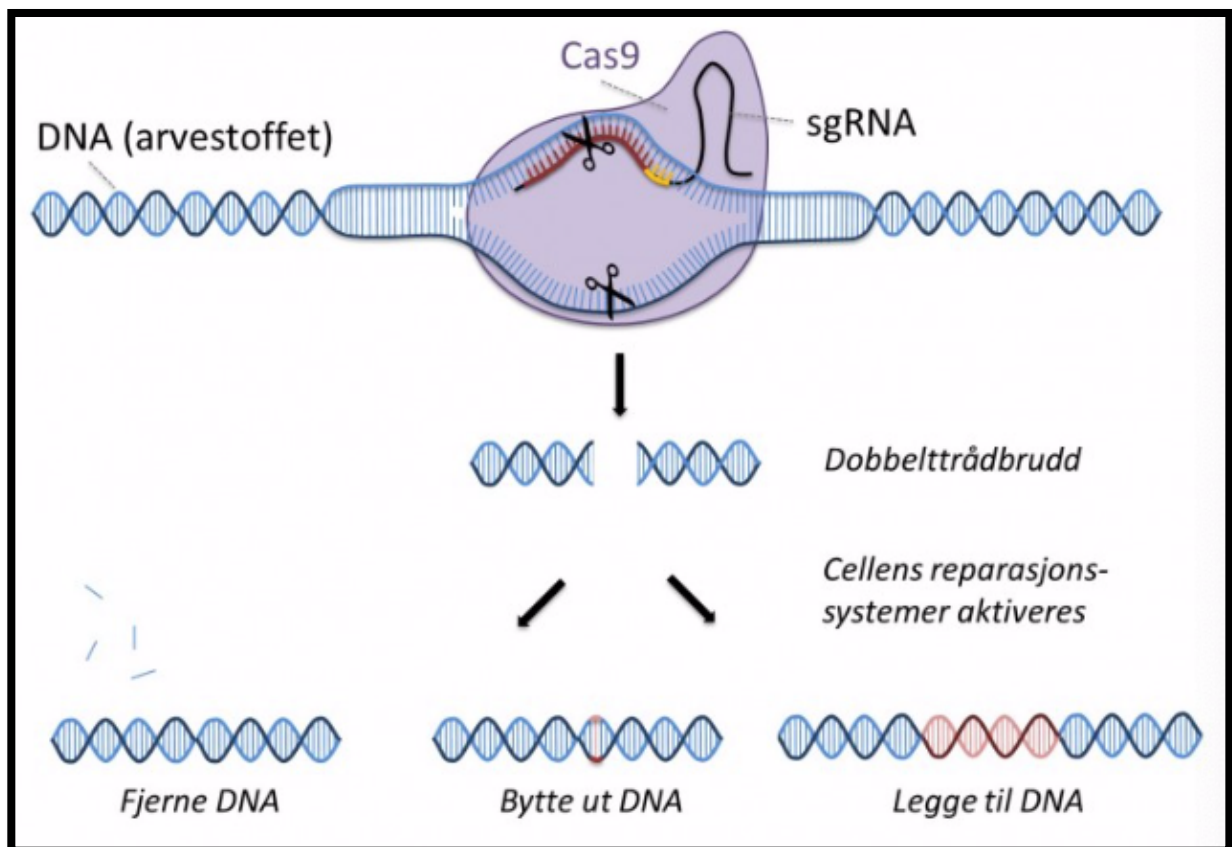
***Ciona intestinalis* embryologi**

Embryologi er læren om organismers tidlige utvikling, fra det encellede stadium til påbegynnelsen av det selvstendige liv. Sekkedyrs tidlige utvikling starter med en organisering av egget som fertiliseres, hvor kjernemembranen forsvinner slik at sædcellene kan spre sin genetiske informasjon i egget. Deretter starter celledeling. Ved stadiet hvor det har blitt dannet 22 celler, vil det dannes 4 mesoderm-, 10 endoderm-, 8 ektoderm-, samt chorda- og nevralt plateceller. Dette legger grunnlaget for gastrulering. Ved 44 celler vil mesodermcellene separeres fra muskelceller. Gastruleringen vil starte ved stadiet av celledeling hvor sekkedyret har nådd 160 celler. Dannelsen av gastrula fortsetter ved kontinuerlig celledeling. Det vil etter hvert dannes en larvemorfologi som danner forutsetning for et selvstendig liv¹³. Det er i dette tidlige stadiet av *Ciona intestinalis* liv det utføres CRISPR for å mutere gener for å se disse genenes påvirkning på Ca^{2+} signalisering.

CRISPR i *Ciona intestinalis*

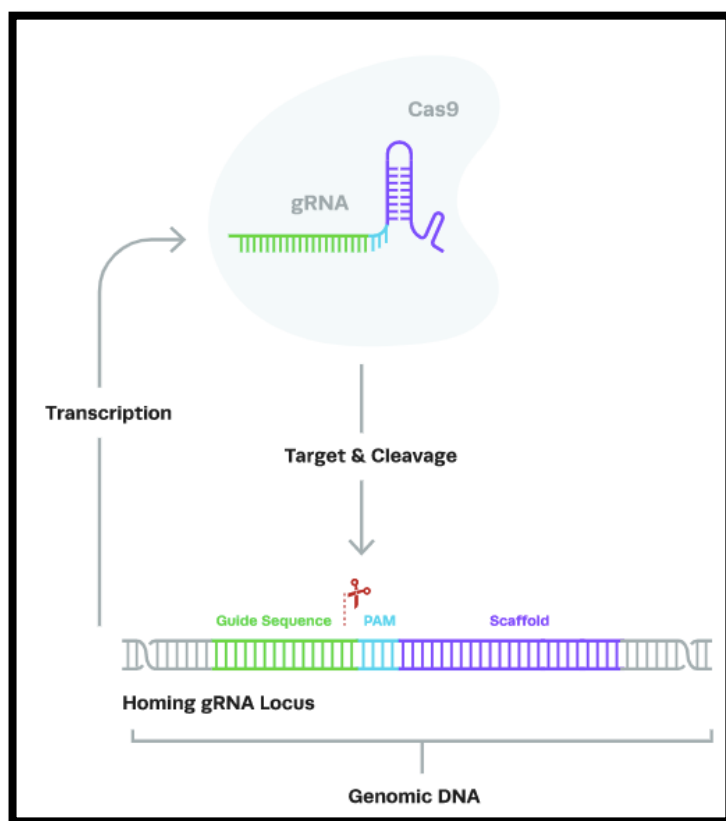
Utviklingsbiologi har alltid vært interessert i å avdekke roller av spesifikke gener i embryogenese ved hjelp av *loss-of-function* mutasjon. Slike mutasjoner var oppnådd ved bruk av design av sekvens spesifikke DNA-bindende domener som befinner seg i naturlige transkripsjonsfaktorer. *Zinc Finger Nucleases* (ZFNs) og *Transcription Activator-Like Effector Nucleases* (TALENs) er blant disse domener som kan indusere *site-specific double-stranded breaks* (DSBs), som igjen fører til feil reparasjon av disse bruddene i DNA ved *non-homologous end joining* (NHEJ), og dermed mutasjon. Likevel har disse teknikkene deres begrensninger i forhold til høy kostnad, tidskrevende og begrenset mål genom-område. Derfor er CRISPR/Cas9, som er raskere og billigere, bedre egnet metode for å oppnå dette målet. Og med noen modifiseringer kan CRISPR/Cas9 også brukes til å sette inn gener og visualisere genom dynamikken¹.

CRISPR står for *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* og beskriver et immunsystem som finnes i en del bakterier for beskyttelse mot virus. CRISPR vil si at det er like fragmenter av DNA som gjentas flere ganger i DNA-tråden¹⁴. Man kan dermed benytte disse fragmentene som et mål for hvor man kan redigere et påfølgende ukjent gen i DNA-tråden som ikke gjentas regelmessig ved å veilede enzymet Cas9, CRISPR-assosierte proteiner, sammen med sgRNA-tråd, enkelttrådet guide RNA, til dette fremmede genet. RNA-tråden vil binde seg til det komplementære fragmentet på DNA-et, og enzymet Cas9 vil dermed kutte DNA der sgRNA har bundet seg. Kuttet ligner på kutt som kan oppstå tilfeldig ved celledeling eller som følger av skader fra for eksempel UV-stråling. For å reparere bruddet vil cellen som oftest lime sammen DNA-tråden igjen. Istedenfor å lime sammen DNA-tråden kan man sette inn en ønsket DNA-bit i bruddsonen, som så vil limes sammen med det andre DNA-et. Slik kan man bytte ut eller endre gener ved hjelp av CRISPR/Cas9-systemet¹⁴.



Figur 14: Enkel skissering av CRISPR/Cas. Enzymet Cas9 benytter sgRNA som veileder for hvor den skal kutte DNA-et. Dette skaper et dobbeltrådbrudd som kan benyttes for å fjerne DNA, bytte ut DNA-et eller legge til DNA¹⁴.

Sekkeddyret *Ciona intestinalis* benyttes som modell-organismer i forskning om ryggstrengdyrs utvikling. Dette har blitt benyttet i stor grad for å undersøke «*gain of function*» eksperimenter, for å se om endring av et visst gen fører til bedre funksjon. Det har derimot ikke blitt brukt like mye i eksperimenter hvor man undersøker vevsspesifikke gener med «*loss of function*», altså om redigering av visse gener fører til tap av en bestemt funksjon. For benyttelse av CRISPR/Cas9 i *Ciona* embryoet må de ulike CRISPR komponentene samt plasmid DNA føres inn i embryoet ved elektroporering (*electroporation*). Genredigering i *Ciona* kan utføres ved CRISPR/Cas9-metoden for å indusere dobbeltråddbrudd på spesifikke steder av DNA-et¹⁵. Cas9 proteinet interagerer med en spesifikk DNA sekvens som den er komplementær med, for eksempel en sekvens bestående av 'NGG' for Cas9 fra bakterien *Streptococcus pyogenes*. Denne sekvensen er kjent som *Protospacer Adjacent Motif* (PAM). Bindingen mellom Cas9 sin sg-RNA og PAM trigger proteinets nuklease aktivitet som resulterer i brudd av dobbeltråden¹⁵. For å teste uttrykk av Cas9 i *Ciona* har det i et forsøk blitt benyttet Cas9 med blant annet to kjernelokaliseringssignal, som viste gode resultater ved at Cas 9 ble uttrykt sterkt og lokalisert til kjernen¹⁵.



Figur 15: Binding mellom Cas 9 sitt sg-RNA og PAM med målsekvens fører til brudd på et bestemt område, altså det området mellom sg-RNA og PAM-sekvensen¹⁷.

Et viktig punkt for en vellykket CRISPR knockout i *Ciona* er å velge en mest mulig effektiv sgRNA da disse kan variere i egenskap til å indusere dobbelttråddbrudd av Cas9. Noen sgRNA er svært aktive, mens andre ikke danner målbare mutasjoner. Det har derfor blitt forsøkt å lage en algoritme for å forutse effektiviteten av et sgRNA. Det foreslås to forskjellige algoritmer som avhenger av metoden av sgRNA transkripsjon, in vivo med RNA polymerase III eller in vitro med viral T7 polymerase, da effektiviteten er avhengig av ekspresjonsnivå og stabilitet som igjen er avhengig av transkripsjonsmetoden. Ved valg av sgRNA er det viktig å ta hensyn til effektiviteten av kuttingen, men også om det kan oppstå dobbelttråddbrudd andre steder enn på målområdet. Ideelt sett skal en sgRNA kun være komplementær med et område av genomet, slik at man ikke potensielt får et kutt på uønskede steder. I tillegg kan enkelnukleotid polymorfisme (*single nucleotide polymorphisms* SNPs), som er naturlige mutasjoner hvor det oppstår endring av en base, forhindre at sgRNA bindes til målområdet som dermed forhindre kutting av Cas9. SNPs oppstår i høy frekvens i ville *Ciona* populasjoner med stor genetisk variasjon¹.

Ved valg av sgRNA må det i tillegg tas hensyn til valg av mål for sgRNA-et på lokuset av interesse. Cellens naturlige repareringsmekanismer av kutt fra Cas9 har en tendens til å favorisere korte *indels* i *Ciona*. *Indels* er i molekylær biologi et begrep for innsettelse eller sletting av baser i genomet. Dette fører til at det genomiske uttrykket kan endres da dette fører til en endring av selve sekvensen, enten ved at cellen legger til en base eller sletter en base. Dette kan føre til et «frameshift» som vil si at en endring forskyver den påfølgende sekvensen som igjen kan føre til endring av proteins funksjon eller at et stoppkodon produseres tidligere i sekvensen enn opprinnelig¹⁶.

Ved dannelse av *indels* i genomet må en ha i tankene at sgRNA kanskje dermed ikke lenger passer den ønskede målsekvensen. Hvor denne mutasjonen oppstår har dermed svært mye å si for om sgRNA vil finne målsekvensen. Det kan ha stor betydning dersom målsekvensen er nært translasjonsstartpunkt, eller liten betydning dersom mutasjonen oppstår nært translasjonsstart da translasjonen ofte vil starte ved et startkodon senere i sekvensen. Det gjelder derfor å velge sgRNA med målsekvens som ikke er for langt unna translasjonsstart slik at man kan ta høyde for mutasjonene som kan oppstå ved Cas9 kutt. En effektiv strategi for å forhindre de mulige feilkildene ved valg av sgRNA er å benytte en kombinasjon av to eller flere sgRNA for å øke sannsynligheten for et godt resultat¹⁶.

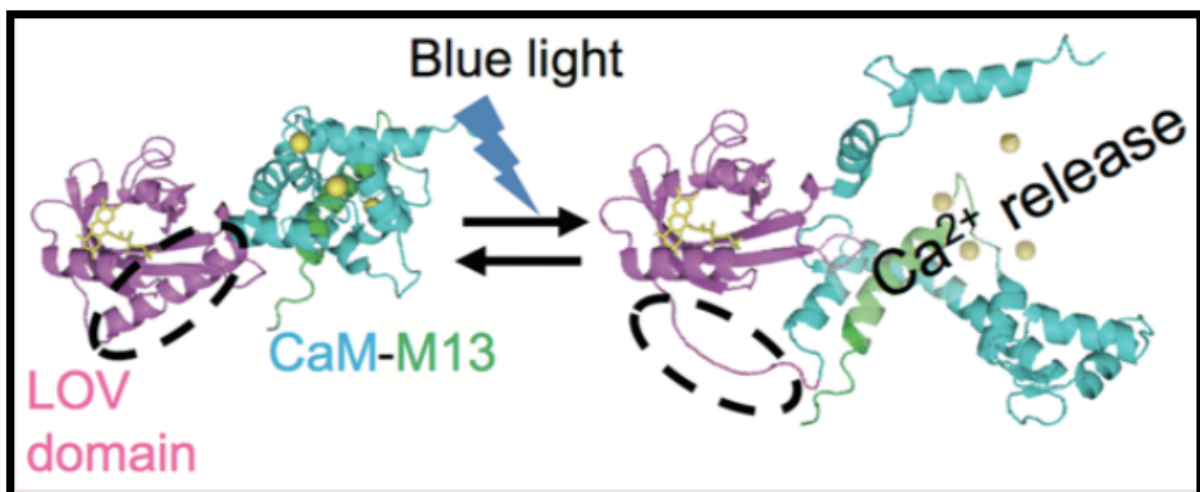
PACR

I tillegg til gene-knockout som en metode til å studere effekten av kalsiumsignalisering på utvikling av notochord-cellene i *Ciona* embryo, kan denne effekten overvåkes ved å manipulere kalsium tilgjengelighet i disse cellenes cytoplasma ved bruk av PACR.

PACR står for *photoactivatable Ca²⁺-releaser* som kan benyttes for å oppnå optisk kontroll av Ca²⁺-konsentrasjon i levende organismer ved å genetisk kode dette verktøyet inn i organismens genom. PACR er et protein som består av tre deler; et lyssensitivt domene derivat fra LOV 2, calmodulin (CaM), et kalsiumbindende domene og M13-peptid som stabiliserer bindingen av Ca²⁺ til calmodulin³³.

LOV2 står for *light oxygen voltage* domene og undergår en stor strukturell endring ved eksponering av blått lys med bølgelengde på omtrent 450nm³³. Calmodulin er som tidligere nevnt et kalsiumbindende protein som modulerer enzymaktiviteten til andre proteiner ved endring av Ca²⁺-konsentrasjon. Ved normal tilstand vil Calmodulin ikke binde til Ca²⁺ ved en intracellulær konsentrasjon av Ca²⁺ på under 100nM. Fusjonsproteinet CaM-M13 har derimot lavere affinitet for kalsium og vil dermed kunne binde til Ca²⁺ i fysiologisk hviletilstand³³.

Ved innsettelse av LOV2 til CaM-M13 vil dermed bindingen av kalsium bli lysavhengig. Det vil si at dersom det er blått lys til stede vil bindingsaffiniteten øke grunnet en strukturell endring av LOV2 som forstyrrer CaM-M13 interaksjon som igjen vil føre til frigjøring av kalsium³³.



Figur: 16: Skjematiske representasjon av PACR. Lilla, turkis, grønt og gult referer henholdsvis til LOV2 domene, CaM, M13 peptid og Ca²⁺. I mørke, til venstre, vil PACR binde Ca²⁺. Ved eksponering av blått lys, til høyre, vil den strukturelle endringen i PACR føre til kalsiumfrigjøring³³.

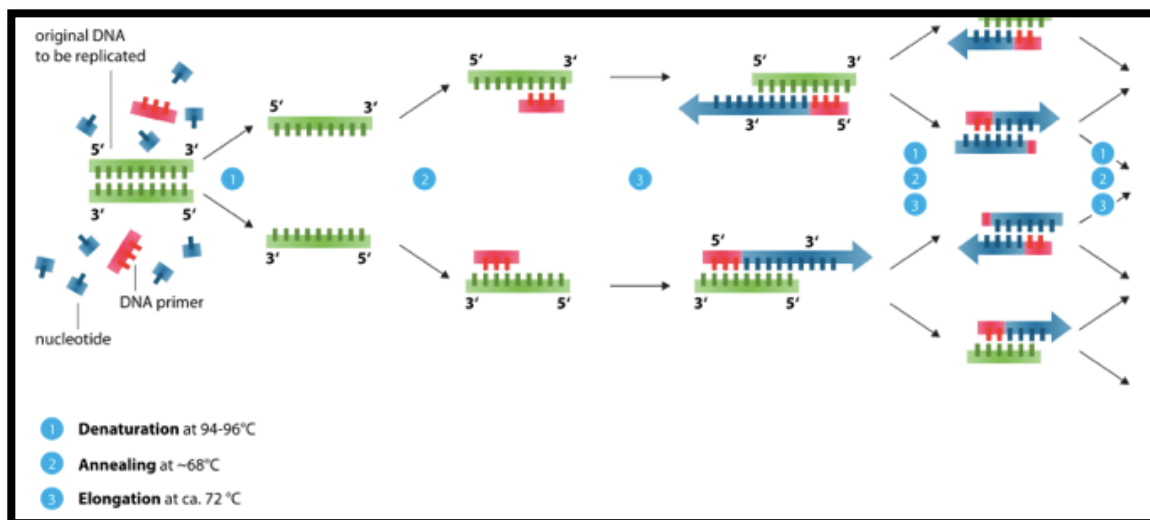
Metode

Grunnet utbruddet av COVID-19 har det blitt en endring av prosjektet som tidligere nevnt. I metoddelen beskrives derfor to ulike metoder for å undersøke effekten av kalsiumsignalisering på rørdannelse i *Ciona* embryoet. Den opprinnelige metoden, altså CRISPR, ble utført frem til design av sgRNA. Den alternative metoden, altså PACR, krever mindre tid og ble derfor brukt for å få mest mulig utbytte av forsøket.

1. PCR

PCR er en forkortelse for Polymerase Chain Reaction. Formålet med PCR er at man kan lage et enormt antall kopier av én bestemt DNA-sekvens, noe som har revolusjonert forskning innenfor fagfeltet siden metoden ble utviklet på 80-tallet. PCR kan benyttes for å påvise om en bestemt sekvens finnes i en prøve. I tillegg er det en fordel å ha mange kopier av en bestemt sekvens da dette kan benyttes til videre analyser av DNA-et. Dette kan blant annet benyttes til å påvise genetiske sykdommer og kreft, samt identifisere planter, dyr, bakterier og virus²⁰.

Til PCR benyttes det en spesifikk reaksjonsblanding. Man trenger blant annet templat DNA er det DNA-et man ønsker å kopiere opp, samt to primere for å finne templatet. Primerne kalles forward primer og revers primer da de festes i hver sin ende av templatet. Primerne er små DNA-fragmenter som er komplementære til DNA-tråden man ønsker å kopiere. Disse må festes til templatet, da DNA polymerasen, et enzym som kopierer DNA, ikke kan starte replikasjon, men kan kun bygge videre fra en primer. For at DNA-polymerasen skal kunne konstruere kopier av DNA- tråden må nukleotidene dNTP (N=A, T, G, C) også være i reaksjonsblandingen, slik at polymerasen kan feste dem til den komplementære basen på templatet²¹.



Figur 17: PCR-prosessen i de tre ulike stegene. 1: Denaturering hvor dsDNA skilles til enkelttråd DNA. 2: Annealing/hybridisering hvor forward og reverse primer festes til DNA-tråden. 3: Polymerisering/elongation hvor enzymet DNA-polymerase bygger DNA-tråden fra primerene ved å feste på komplementære nukleotider. Hele prosessen gjentas til ønskede sykluser har blitt utført²².

En standard PCR-prosess består av 3 hovedtrinn: denaturering, hybridisering og polymerisering. Denaturering vil si at reaksjonsblandingen varmes slik at dobbeltråden i DNA-et skilles fra hverandre. Neste trinn er hybridisering som vil si at blandingen kjøles ned slik at primer-DNA, som er korte, enkelttrådede DNA-biter, kan binde seg til templatet. Primerene er komplementære til sekvensen på templatet som skal amplifiseres. Lengden av primerne gjør dem spesifikke slik at det kun er DNA som inneholder komplementære sekvenser som oppkopieres²¹. Det siste trinnet er polymerisering, som vil si at temperaturen heves, slik at DNA polymerasen fester seg til primerene på templatet og fester på nye nukleotider for å replikere DNA fra 3-OH-enden av primerne. Slik vil man få to nye like DNA tråder fra den ene DNA-tråden man hadde i utgangspunktet. Prosessen gjentas til man har fått oppformert nok DNA til formålet²⁰.

Følgende utstyr ble benyttet:

- PCR-maskin (Bio-Rad T100™ Thermal Cycler)
- PCR-rør
- Boks med is
- Forward primer (se appendix 1)
- Revers primer (se appendix 1)
- Reagenser til PCR som er beskrevet i tabell 1.1.

Primer mix ble tillaget ved å blande 80 µL H₂O, 10 µL forward primer og 10 µL backward primer for et bestemt gen. Se Appendix 1 for primersekvenser.

Mastermix (reagenser til for eksempel 6 prøver) ble blandet først ifølge tabell 1 med alle reagenser utenom primer mix. Samme prosedyre ble fulgt ved tillaging av mastermix til flere prøver ved å multiplisere volum av reagens med antall prøver.

Tabell 1: Tillaging av mastermix til henholdsvis én og 6 prøver

Reagenser	1 prøve (µL)	6 prøver (µL)	Sluttkonsentrasjon per prøve
PCR-vann	35	210	
5 X Green GoTaq Buffer	10	60	1X (1,5 mM MgCl ₂) ²
dNTPs	5	30	2,5 mM per dNTP
Templat	1	6	145 ng/µL
GoTaq Polymerase	0,25	1,5	1,25 u
Primer mix	1,5		10 mM
Totalvolum	52,75	307,5	

Mastermixen ble fordelt på 5 PCR rør à 50 µL, og tilsatt de spesifikke primer-mixene til sine respektive rør og satt i PCR-instrumentet. Se Appendix 1 for spesifikke primere til de ulike genene. PCR-reaksjonen foregikk i en thermosyklus under varmt lokk for å forhindre at prøvene fordamper. Programmet for PCR er gitt i tabell 2.

Tabell 2: PCR-program på instrumentet Bio-Rad T100™ Thermal Cycler

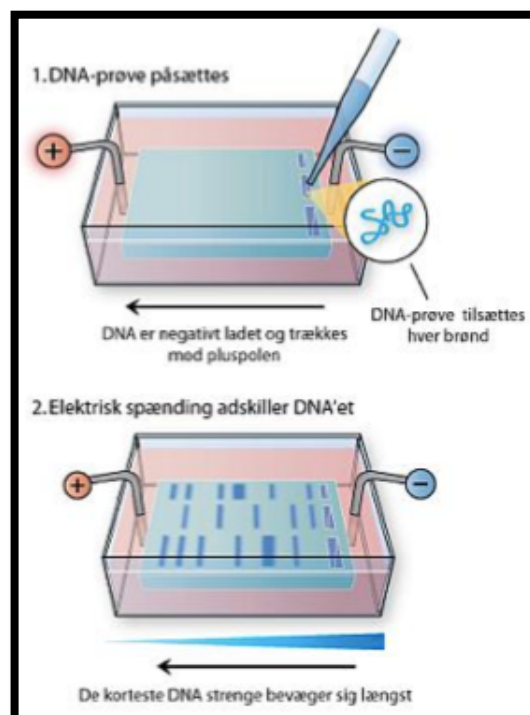
	Innledende denaturering	PCR				Hold
		35 sykluser			Siste syntese	
		Denaturering	Hybridisering	Syntese		
Temp. (°C)	95	95	55	72	72	4
Tid	2 min	30sek	1sek	1,5 min	5min	∞
Volum µL	Ca. 50					

Ved arbeid med DNA, er det viktig å holde ren sone for dette for å unngå kontaminering med fremmed DNA som kan gir feil PCR produkt som inneholder et annet DNA enn det som er ønsket. Det er også hensiktsmessig å jobbe raskt ved håndtering av PCR master mix for å unngå at primerne hybridiserer med seg selv og reaksjonen stopper. Enzymet polymerase skal også holdes på is for å hindre reaksjonen i å starte for tidlig og fører til redusert PCR produkt.

2. Gelelektroforese av PCR-produkt

Gel-elektroforese er en teknikk der man separerer molekyler basert på størrelse og ladning ved hjelp av et elektrisk felt. DNA har ved nøytral pH negativ ladning på sin overflate på grunn av fosfatgruppene i molekylet, som gjør at DNA molekylene vil vandre mot den positive polen i et elektrisk felt. Hensikten er å sammenligne størrelser på DNA-et for å identifisere for eksempel bakterie, eller å undersøke om PCR har blitt utført korrekt slik at man har fått et DNA-produkt.

Elektroforesen foregår i agarosegel. Agarose er et lineært polysakkarid som består av gjentatte enheter av disakkaridet agarobiose²³. Agarose er isolert fra alger. Normalt benyttes agarosegeler som inneholder fra 0,5-2% agarose. Prosenten av agarose tilsvarer tettheten av sukkermolekylene i gelen. Desto mer agarose, desto tettere sitter sukkermolekylene i gelen, desto vanskeligere blir det for DNA å trenge gjennom gelen²⁵. Det vil si at lav konsentrasjon benyttes til å separere store DNA-fragmenter, og stor konsentrasjon av agarose brukes for å separere små biter. DNA-fragmentene vil dermed skilles basert på størrelse da små fragmenter vil ha mindre motstand og dermed bevege seg fortere gjennom gelen²⁵.



Figur 18: Gelelektroforese. 1. DNA-prøve tilsettes ved negativ pol, og vil dermed vandre mot positiv ladning. 2. Elektronisk spenning skiller DNA-et da de korteste DNA-trådene beveger seg lengst da de har mindre motstand i gelen²⁸.

Agarosepulver blandes med en TAE buffer som smeltes til en flytende klar væske som deretter helles i støpeformer. TAE står for Tris base, acetic acid, EDTA. Tris og iseddik sørger for at pH holdes stabilt og hindrer hydrolyse av DNA, mens EDTA binder opp toverdige ioner i løsningen, slik som Mg^{2+} som mange DNaser er avhengige av. Disse vil dermed hindres i å bryte ned DNA^{24,26}. For å kunne observere DNA-båndene i en gel tilsettes etidiumbromid (EtBr). Dette er et fluorescerende stoff som vil binde seg i DNA-molekylet mellom to basepar i en dobbelheliks²⁶.

Følgende utstyr ble benyttet:

- Erlenmeyerkolbe, 200 mL
- Elektroforese-kar med kammer og geltrau
- Spenningskilde
- Mikrobølgeovn
- Geldokumentasjonsutstyr
- Agarose
- 50 x TAE elektroforesebuffer (kommersiell) fortynnes 1:50 med destillert vann til 1 x TAE

Det ble veid opp 2 gram agarosepulver som ble løst i 200 mL elektroforesebuffer 1 x TAE i en Erlenmeyerkolbe for å lage en 1% agarosegel. Dette ble varmet opp i mikrobølgeovn for å tilstrekkelig løse opp pulveret i bufferen. Løsningen fikk tid til å kjøles ned for å unngå ødeleggelse av geltrauet. Støpekam ble plassert i geltrau som så ble plassert i støpekaret før det ble tilsatt ca. 50 μ L EtBr i gelvæsken. Løsningen ble så helt over i trauet, hvor det fikk stå i minst 30 minutter for å stivne før gelelektroforese. Støpekam ble fjernet fra gel. Geltrauet ble rotert til riktig retning slik at brønnene laget av støpekammen sto vendt mot negativ pol slik at DNA-et kan vandre mot positiv pol. Deretter ble PCR-produktene loadet i brønnene sammen med en størrelsesmarkør, 1 Kb Plus DNA Ladder. Gelelektroforesen ble deretter kjørt på 150V i ca. 30 minutter. Etter endt gelelektroforese ble det tatt bilde ved hjelp av geldokumentasjonsutstyr.

Noen feilkilder en må være oppmerksom på under utførelse av gelelektroforese er riktig *loading* (tilsetning) av PCR produkter for å få hele ønsket volumet i brønnene, riktig orientering av gelen i kammeret og strømretning for å unngå at DNA båndene vandrer ut av gelen.

3. DNA-ekstraksjon fra gel

Følgende utstyr ble benyttet:

- UV-instrument, og UV maske for å beskytte ansiktet mot UV bestråling
- Skalpell
- Gelekstraksjonskit (Zymoclean Gel DNA Recovery Kit)
- Sentrifuge

Etter gelelektroforese kuttet gel med DNA-bånd ut fra gelen ved å bestråle gel i UV-lys for å observere DNA-et, og plassert i merkede Eppendorfrør. Deretter ble det tilsatt 3x volum Agarose Dissolving Buffer (ADB) av vekten av gelen som ble overført. Dette er et reagens som løser opp agarosegel. For eksempel ble det målt gelbit på 35 gram som ble ansett som 35 µL, hvor det da ble det tilsatt 105 µL av ADB. Blandingen ble inkubert i 37-55°C i 5-10 minutter inntil agarosen var fullstendig oppløst. Dette ble helt over i en Zymo spinnkolonne i et tilhørende oppsamlingsrør. Oppsamlingsrøret ble så sentrifugert ved 14000 rpm i 30 sekunder. Filtratet ble kastet før 200 µL av vaskebuffer fra kitet ble tilsatt til kolonnen. Dette ble så sentrifugert, og filtratet ble kastet. Vaskesteget ble så repetert en gang. Til slutt ble elueringsbuffer/vann tilsatt direkte i kolonnen. Kolonnen ble plassert i en ny tube og sentrifugert ved tidligere nevnt hastighet i 30 sekunder for å eluere DNA-et, som da vil være filtratet i tuben.

For å unngå feil ved ekstraksjon av DNA fra gelen, må merking av Eppendorfrør tilsvare plassering av DNA i gelen. Samtidig som løsning av gelen i ADB må være fullstendig for å hindre tap av DNA ved ekstraksjon. Og ikke minst bruk av hansker for rent DNA ekstraksjon for å forhindre kontaminasjon.

4. TOPO TA kloning

Ved PCR med bruk av *Taq* DNA polymerase, enzymet som kobler komplementære nukleotider til templat DNA-tråd, vil det amplifiserte DNA-et inneholde en adeninbase på 3'enden av PCR-produktet. Dette forårsaker såkalt «overhang» eller «sticky ends»²². Disse begrepene benyttes dersom det er en rekke av nukleotider på enden av DNA-molekylet uten komplementære baser. Det blir dermed en ekstra DNA-tråd som stikker ut fra selve DNA-molekylet²⁹. Dette kan for eksempel se slik ut hvor den øverste DNA-tråden inneholder en ekstra adeninbase på 3'enden mens den andre tråden mangler den komplementære basen på 5'enden:

5'-ATCTGACTA-3'

3'-TAGACTGA-5'

TOPO TA vektor som benyttes for kloning inneholder derfor et ekstra 3'-tymin overheng som da kan være komplementær med adenin på DNA-tråden som stikker ut av DNA-molekylet. Vektoren i seg selv benyttes for å kunne teste PCR-produktet flere ganger uten å gjøre PCR-prosessen. Årsaken til dette er at vektoren inneholder promoter, samt forward og revers primer for områder for transkripsjon og sekvensering *in vitro*. Vektoren inneholder i tillegg gener for ampicillin- eller kanamycin-resistans. Etter injeksjon av vektor i kompetent *E. coli* kan man da så bakterien ut på en skål hvor bakteriekoloniene vil bli blå eller hvite avhengig av om de ønskede genene er tilstede eller ikke²⁹.

Følgende utstyr ble benyttet:

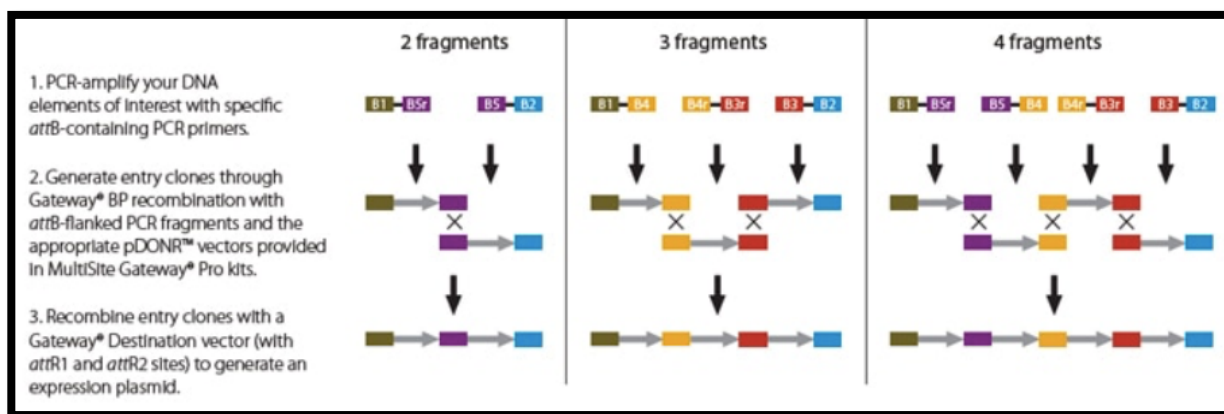
- PCR-produkt
- Mikrorør
- TOPO vektor (ThermoFischer)
- Agarskål

For å danne vektor med PCR-produktet ble det blandet like mengder PCR-produkt med TOPO vektor i et mikrorør. For eksempel 1 µL av hver. Deretter inkuberes blandingen i 5 minutter ved romtemperatur. Deretter kan dette transformeres i bakteriene ved å så det ut på en agarskål som må få tid til å vokse kolonier over natten²⁹. For å sikre best utbytte av plasmid, må bakteriekultur blir håndtert på riktig måte, dvs. riktig tetthet av bakterievekst, konsentrasjon av antibiotika og inkubasjonstid. Høy tetthet av bakterievekst kan inaktivere all ampicillin i skålen og gi lavt utbytte av plasmidet.

5. Gateway rekombinasjon kloningsteknologi

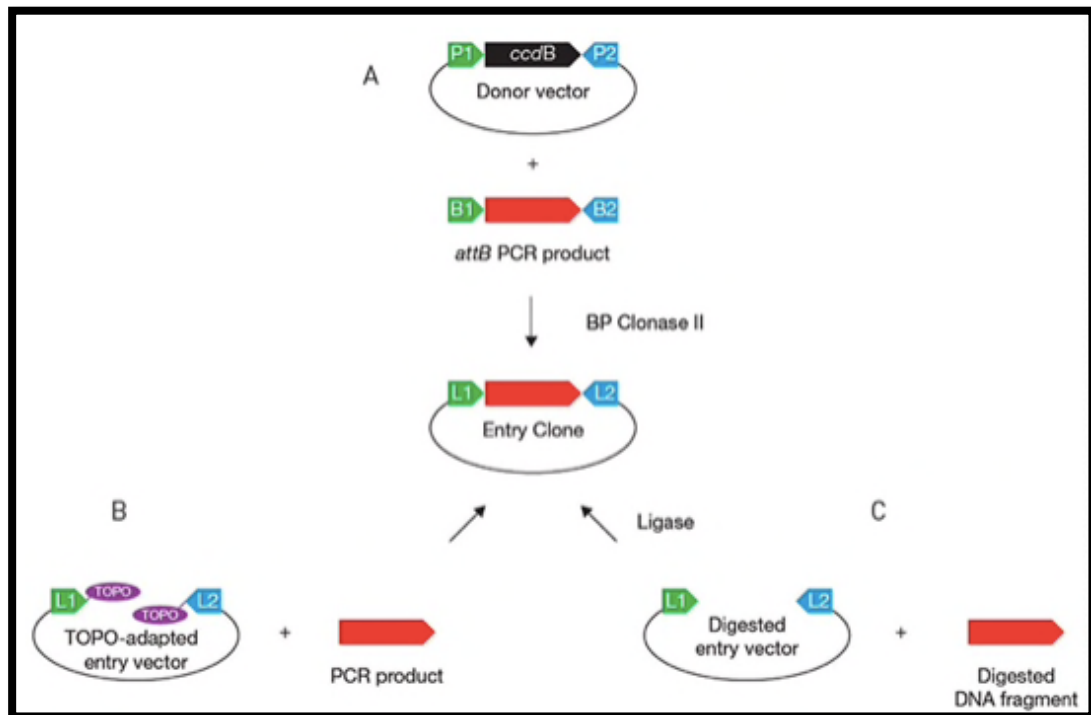
Gateway rekombinasjon kloningsteknologi benyttes for å rekombinere ulike DNA-fragmenter i en enkelt vektor som så kan klones. Dette vil så elektroporerer inn i bakteriens plasmid. Ved vekst av bakterien vil alle de videre generasjonene av bakterien inneholde dette DNA-et. På denne måten kan man kloner den ønskede DNA-sekvensen.

Denne metoden har forenklet kloningsprosessen svært mye da man ikke trenger å benytte restriksjonsenzym for å kloner slik som man gjorde før. I tillegg kan bruk av restriksjonsenzym begrense klonesuksessen. Et eksempel på dette er at restriksjonsenzym kutter bestemte sekvenser. Dette kan føre til at enzymet kutter i målsekvensen da man ikke kan kutte spesifikt basert på målsekvensen. En annen faktor er at bruk av restriksjonsenzym krever flere trinn i etterkant for å få hente ut de ønskede genbitene. Disse faktorene unngår man med den nye teknologien da det benyttes en vektor istedenfor. Ved bruk av *gateway* teknologi beholder man sekvensen i tillegg til at man begrenser antall trinn noe som gir en effektivitet på opp mot 95% mot cirka 50% med restriksjonsenzym. Tiden begrenses også da *gateway* benytter cirka en time sammenlignet med restriksjonsenzym som kan ta opp mot et døgn. *Gateway* rekombinasjon kloningsteknologi benytter tre trinn.



Figur 19: Skisse av hvordan DNA-fragmenter kan rekombineres, med enten 2 fragmenter, 3 fragmenter eller 4 fragmenter. Første trinn er å amplifisere DNA-et man ønsker sammen med attB PCR primere. I trinn to genereres entry klone med attB flankerte PCR fragmenter og vektorer. I trinn tre rekombineres entry kloner med destinasjonsvektor for å generere et plasmid med ferdig uttrykk²⁹.

Først må man bestemme en *entry* klon, en slags start-klone, som inneholder genet av interesse som skal klones eller et DNA fragment. Gensekvensen er flankert av attL sekvenser, som kan rekombineres med attR sekvenser for å lage en ønsket klon, se figur 18. Det finnes tre metoder for å produsere en *entry* klon, kalt BP kloning, restriksjonsenzym og ligase kloning, og til slutt TOPO kloning.



Figur 20: Strategier for bygging av entry klon. Figuren viser de tre ulike metodene; (A) BP kloning. (B) TOPO kloning. (C) Restriksjonsenzym og ligase kloning. De røde pilene representerer genet man ønsker å klon²⁹.

Når *entry* klonen er klar vil genet av interesse bli overført til plasmid nummer to kalt destinasjonsvektor. Denne reaksjonen håndteres av LR Clonase enzymmix som inneholder de nødvendige proteinene som trengs for å overføre genet av interesse fra *entry* klon og integrere det inn i destinasjonsvektoren, som da blir *expression* klon, uttrykksklone.

Det siste trinnet er å velge destinasjonsvektoren. Etter kloning av interessegenet til en *Gateway*-vektor, kan den overføres til så mange destinasjonsvektorer man ønsker. Dette valget må ta hensyn til organisme, protein eller formål man ønsker å benytte klonen til.

6. Sekvensering

For å undersøke effektiviteten av sgRNA benyttes DNA-sekvensering. DNA-sekvensering er en metode som benyttes for å lese rekkefølgen av nukleotider i DNA-et. Målet er å få tilgang til organismens genetiske kode som er avgjørende for hvordan gener bygges opp og uttrykkes³⁰. Det finnes to hovedmetoder for å bestemme sekvensen av nukleotider i DNA. En kjemisk metode og en enzymatisk metode. I denne øvelsen omtales den enzymatiske metoden, også kalt Sangers dideoksy-metode, utviklet av Frederick Sanger på 1970-tallet.

Sangers dideoksy-metode baserer seg på bruk av en DNA polymerase som binder seg til en sekvenseringsprimer på ddNTP-er i tillegg til dNTP-er på komplementære baser på det DNA-et med ukjent sekvens. Dideoksynukleotider mangler en OH-gruppe på karbon 3 slik at fosfat ikke kan bindes slik at DNA-tråden vil avsluttes. Punktmutasjoner i aktive seter gjør at polymerasen diskriminerer mindre mot ddNTP som blir brukt, i tillegg til at de ligner såpass mye på de vanlige nukleotidene at DNA polymerasen ikke klarer å skille dem³¹. Ved sekvensering blir det laget små DNA-biter som må være merket for å kunne detekteres i etterkant. Da kan man ta i bruk primere som har blitt merket på forhånd eller bruke merkede nukleotider ved selve DNA-syntesen. I moderne sekvensering er det dideoksynukleotidet som festes i enden av DNA-biten som er fluorescensmerket, noe som utføres i denne øvelsen, som detekteres ved hjelp av kapillær elektroforese³².

I moderne automatisert sekvensering utføres hele analysen i ett rør slik at man har alle de 4 ddNTP-ene i samme reaksjonsblanding. Disse er merket med 4 ulike fluorescerende forbindelser som kalles for *dye terminator*. Alle like store DNA-biter skal dermed ende med samme ddNTP og derfor ha samme fargekode. Dermed vil alle fragmenter som skyldes ddATP-terminering få én farge mens ddGTP-terminering vil få en annen farge osv³².

Ved kapillær elektroforese separeres fragmentene ved å kjøre DNA-prøven gjennom et tynt kapillærrør som er mindre enn 0,1mm i diameter som er fylt med en polymer. Polymeren fungerer som separasjonsmedium, hvor DNA-fragmentene separeres på størrelse under høy temperatur og spenning. De minste kommer først gjennom kapillæret hvor de passerer en lasertstråle der emisjon detekteres av CCD-kamera og resultatet presenteres som et kromatogram. Hvert fragment vil gi en topp på kromatogrammet, hvor fargen tilsier hvilken base det er. Dermed kan sekvensen leses automatisk ut fra toppene på kromatogrammet³². Sekvenseringen ble utført på 7 av de 11 genene som ble amplifisert på dag 1 og 2. Resultater av sekvenseringen er presentert i appendix 1 som bilde og FASTA format.

Ved sekvensering av CRISPR-produkt vil korte *indels* føre til at det ikke blir en klar topp for hver base i sekvensen. Det vil derimot se ut som om det er to topper i kromatogrammet for samme posisjon i sekvensen som gjør at det ser ut som om det er to forskjellige nukleotidbaser i samme posisjon. Dette kalles et «*peakshift*», og kan beregnes ved hjelp av en algoritme. Tidligere studier visere til en lineær korrelasjon mellom beregnet CRISPR *peakshifts* og frekvens av tap av funksjon av fenotype F0. Dette studiet antyder at desto flere *peakshift* sgRNA generer, desto mer effektivt vil sgRNA produsere tap av funksjon alleler, som ofte er målet i CRISPR *knockout* eksperimenter¹⁵.

7. Design av sgRNA konstruksjon

Ønsket sekvenser fra Ciona genomet kan bli lagt inn i CRISPOR portal som er et nettbasert CRISPR sgRNA designverktøy. Portalen angir alle gyldige sgRNA sekvenser samt deres scorer beregnet ved en algoritme for å vurdere deres effektivitet, spesifisitet og bestemme primer sekvensen for å bygge uttrykksvektoren. CRISPOR tar også hensyn til *off-targets* og SNPs som benyttes for å vurdere om sekvensene er brukbare¹⁵. sgRNA uttrykksvektor kan bygges som plasmid ved å lime oligonukleotidsekvenser inn i en lineær vektor. Denne metoden er egnet for de sgRNA som er testet på forhånd og kjent for å være effektive¹⁵.

Målgenet ble skannet for PAM sekvens (NGG), og målgenet startet 19 nukleotider i 5'-enden fra PAM. Målgenet med mange tyminholdige nukleotider nær 3'-enden eller mange SNPs, blir forkastet. BLAST kan også brukes til å skanne for mulige *off-targets*.

target PAM

TCAACCCAACTGAGGGTTGGACAACAGCTGGAGCAACAGT ...

Guaninnukleotid ble lagt til 5'-enden for å danne *protospacer*:

GCTGAGGGTTGGACAACAGCAGC

For å få et overheng på øvre oligonukleotidtråd for kloning, ble *agat* lagt til 5'-enden:

agatGCTGAGGGTTGGACAACAGCAGC

Den nedre oligonukleotidtråden ble laget ved å kopiere den komplementære tråden til den øvre baklengs, og *aaac* ble lagt til som overheng til den nedre tråden:

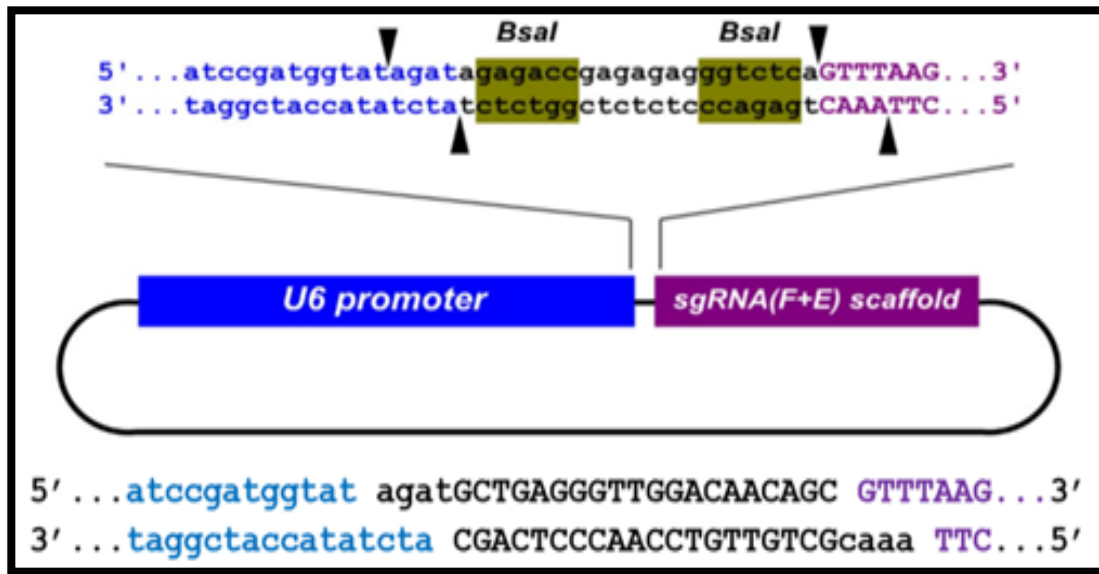
aaacGCTGTTGTCCAACCCTCAGC

Øvre og nedre tråd ble bundet sammen ved 10 µM (kokt for 5 minutter i 10 mM Tris, pH7.5, 50 mM NaCl, og avkjølt ved romtemperatur):

Øvre agatGCTGAGGGTTGGACAACAGC

CGACTCCCAACCTGTTGTGCGcaaa nedre

Bundet oligonukleotid ble fortynnet 1:1000 og det ble limt inn *U6>sgRNA(F+E)* som er linearisert med BsaI (et enzym som kutter fosfodiesterbindinger fra gjenkjenningbase og lager *sticky ends*).



Figur 21: Kutting og liming av oligo-sekvensene inn i U6>sgRNA(F+E) ved hjelp av BsaI enzym. Blått markerer sekvensen som tilsvarer U6 promoter, svart er oligosekvensene som beskrevet ovenfor, mens lilla tilsvarer sgRNA (F+E). Oligosekvensene limes inn i U6>sgRNA(F+E) ved hjelp av BsaI enzym som kutter fosfodiesterbindinger og lager sticky ends¹⁶.

De ferdigbehandlede oligonukleotidene ble overført til kompetent bakterie. Dette gir mulighet for rask screening ved hjelp av koloni PCR hvor tilfeldige bakteriekolonier plukkes for amplifisering hver gang det trengs. Her ble det brukt samme U6 promoter forward primer og bunn oligo som ble brukt i annealing ovenfor. PCR produktet kan så sekvenseres for å sikre at de har ønsket sgRNA før de elektroporerer i embryoene.

8. PACR-metode

cDNA til CaM13 blir amplifisert fra et plasmid mens cDNA til LOV2 blir syntetisert av DNA oligonukleotider. Disse komponentene blir deretter klonet i en uttrykksvektor som igjen blir satt inn i *Ciona* embryoet ved transfeksjon. Før transfeksjonen, blir det rekombinante proteinet transformert i *E. coli* for å kontrollere uttrykket, proteinet blir rensset og aktiviteten av kontrollert kalsium *in vitro* blir målt. Som nevnt tidligere, blir vektoren samt fluorescerende fargestoff elektroporert inn i *Ciona* embryoene. Mens noen av embryoene utvikler seg i mørke, blir resten av de utviklet i lys for å studere virkning av kalsiumsignalisering i utvikling av notochord. Kalsiumaktiviteten og fluorescens intensitet blir undersøkt ved hjelp av mikroskop og blått lys for å samle bilder for de ulike stadiene i notochord dannelse³³.

9. Elektroporering

Før elektroporering, ble befruktet egg satt i en dechorionation løsning bestående av (100 mg natrium tioglykolat (Sigma T0632), 9 mL ASW, 32 µL 10 M NaOH, 1 mL 0.1 % protease E (Sigma P5417)) og rørt forsiktig for å fjerne Folikkelceller og fosterhinnen (*chorion*). Eggene ble vasket tre ganger i SAW200 mL av disse eggene ble overført til en kyvette som inneholder en elektroporering-løsning bestående av (25-50 µg sgRNA plasmid, 25 µg *Eef1a1>nls::Cas9::nls*, 400µL av 0.96 M D-Mannitol og vann til 500 µL). Kyvetten ble tilført elektrisk støt på Bio-Rad Gene Pulser XCell ved 50 mV og 4mm kyvette mellomrom. Tiden for elektroporering var mellom 15 til 30 ms.

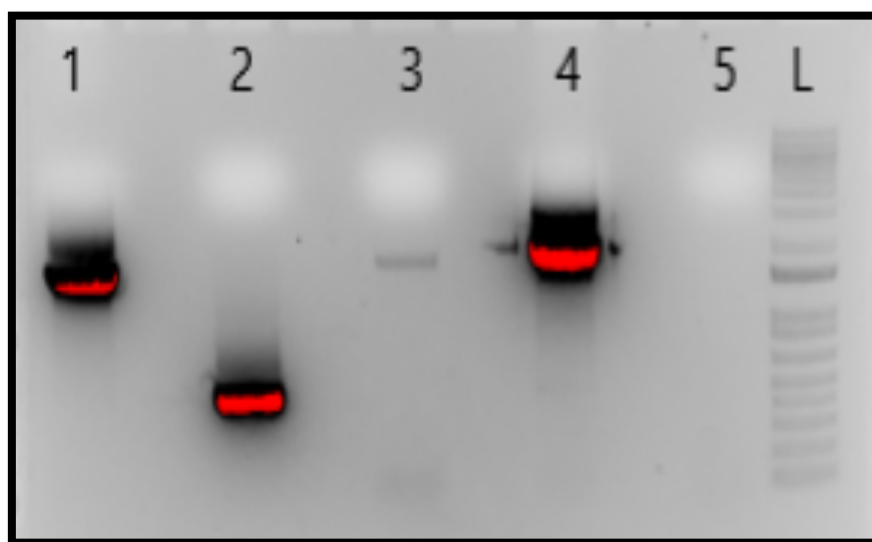
Resultat

Som nevnt tidligere, førte utbruddet av COVID-19 til at det opprinnelige forsøket CRISPR avslutter ved design av sgRNA, og resultatene fra denne metoden er presentert frem til den delen. Resten av resultatene som er presentert her, ble samlet ved å utføre den alternative metoden PACR.

Gelelektroforese

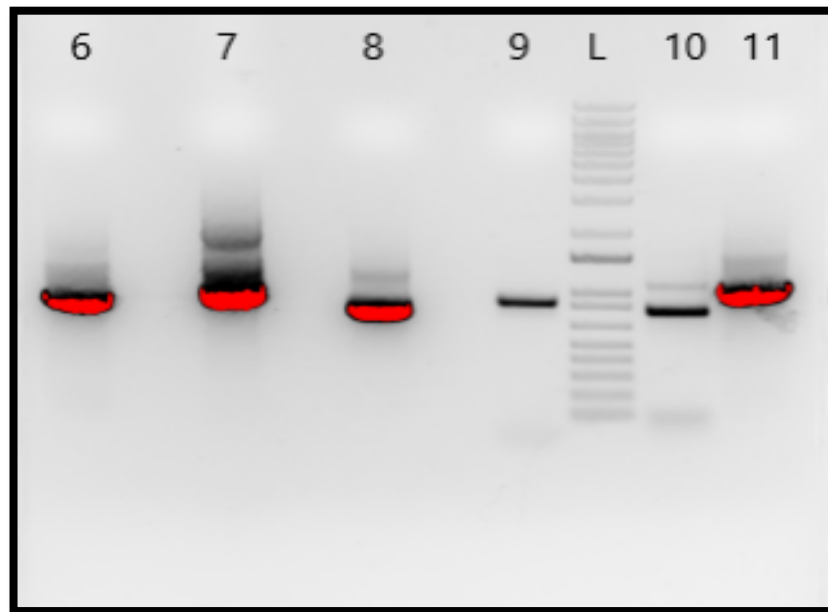
Resultatet av gelelektroforesen viser et bilde av gelen som har blitt tatt via geldokumentasjonsutstyr. Fra venstre til høyre kan det observeres, på figur 8, primer 1, 2, 3, 4 og 5 samt DNA-ladder. DNA-ladder gir et estimat av antall basepar hvert bånd ligger på da dette er kjent fra før av. Nummeret til primerne som er markert i bildet samsvarer med nummeret som er angitt for primermixen i Appendix 1.

Som man kan se på figur 22, er det svært tykke og mørke bånd for primermix 1, 2, 3 og 4. Primermix 3 har et svakt grått bånd, mens primermix 5 ikke har noen synlige bånd.



Figur 22: DNA bånd fra PCR produkt og DNA-ladder, L, separert ved gelelektroforese. Tallene fra venstre tilsvarer henholdsvis nummer på primernummer som beskrevet i appendix 1.

Dokumentasjon av den andre gelelektroforesen, se figur 23, viser et mer ønskelig resultat da alle primermix har fått tydelige bånd i gelen. Primermix 6, 7, 8 og 11 har et tydelig bånd med svakere bånd over. Mix nummer 7 har også antydning til kroneformede bånd da båndene krummer i hver ende. Primermix 9 har kun et tydelig og svart bånd, mens primermix 10 har svakere bånd både over og under det mest markante båndet.

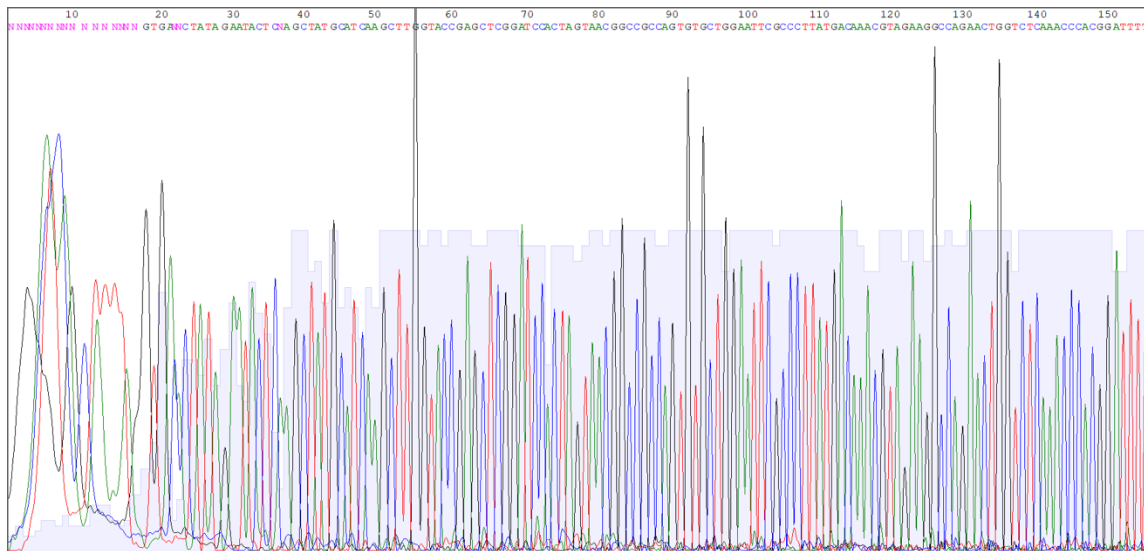


Figur 23: DNA bånd fra PCR produkt og DNA-ladder separert ved gelelektroforese. Tallene fra venstre tilsvarer henholdsvis nummer på primernummer som beskrevet i appendix 1.

DNA fra de genene ble deretter ekstrahert og rensset for amplifikasjon ved hjelp av TOPO TA vector og kompetent *E. coli*, sekvensering og design av sgRNAsom beskrevet i metoden.

Sekvensering

De ulike ddNTPene gir ulike fargesignal som tilsvarer ulike nukleotider og som kan observeres i elektroferrogram. De blå toppene viser cytosin, de grønne toppene er adenin, de røde toppene er tymin, mens de svarte toppene er guanin. På x-aksen til elektroferrogrammet benyttes tid som enhet, mens enheten langs y-aksen er signalstyrke.



Figur 24: Et eksempel på et elektroferrogram fra sekvensering av et av de analyserte cDNA-ene. Elektroferrogrammet er vist i programvare ApE. Farger på toppene tilsvarer de fire nukleotidene adenin (grønn), cytosin (blå), guanin (svart) og tymin (rød).

Design av sgRNA

Etter sekvensering av de ulike PCR produktene for cDNA, ble sekvensene vurdert ved hjelp av programvaren ApE. Figur 24 viser et eksempel på et elektroferrogram fra en av de sekvensene. Deretter ble sekvensene brukt for å designe sgRNA som beskrevet i metoden ved hjelp av CRISPOR. Figurene under viser resultater fra sammenstilling, der FASTA data lagt inn i CRISPOR gir forslag til beste sammentreffet. Figurene 25-27 viser den brukte metoden der CamkII er vist som et eksempel.

Sammenstilling på Ghost database benyttes for å sammenligne sekvenseringsresultatet med tidligere analyserte genom av *Ciona intestinalis*. Forskjeller markert i rødt på figur 25 kan skyldes variasjoner basert på tid mellom analysene eller lokalisasjon av dyret, da mange av analysene i databasene har blitt utført for mange år siden i andre land.

Predicted guide sequences for PAMs

Ranked by default from highest to lowest specificity score (Hsu et al., Nat Biotech 2013). Click on a column title to rank by a score.

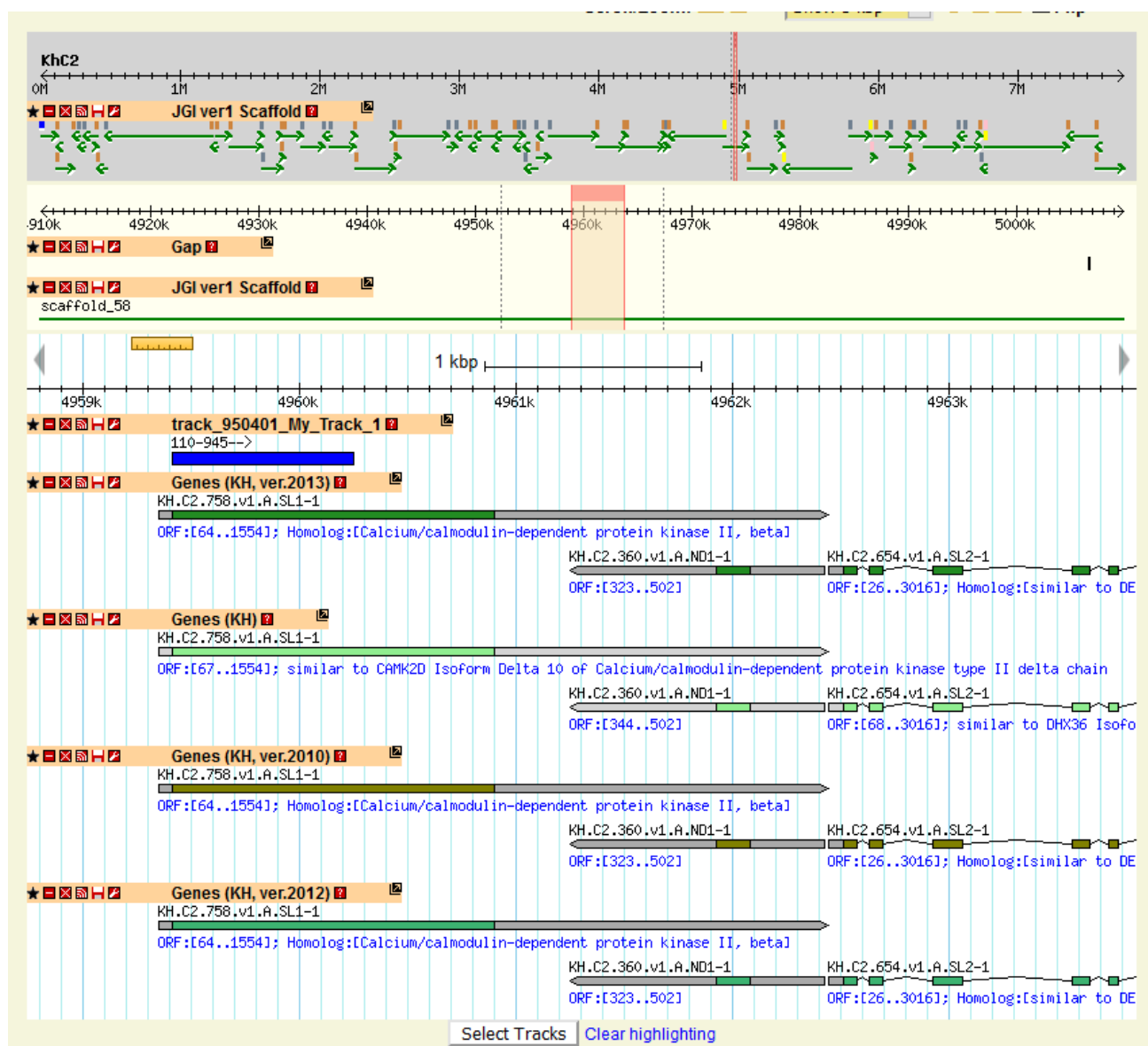
If you use this website, please cite our paper in NAR 2018. Too much information? Look at the CRISPOR manual.

Download as Excel tables: [Guides](#) / [Guides, all scores](#) / [Off-targets](#) / [Saturating mutagenesis assistant](#)

Position/ Strand	Guide Sequence + PAM + Restriction Enzymes <input type="checkbox"/> Only G- <input type="checkbox"/> Only GG- <input type="checkbox"/> Only A-	MIT Specificity Score	CFD Spec. score	Predicted Efficiency Show all scores	Outcome Doench '16 Mor-Mateos Out-of-Frame Lindel	Off-targets for 0-1-2-3-4 mismatches + next to PAM	Genome Browser links to matches sorted by CFD off-target score
35 / rev	ATAGGTATCTGAAATCCGT GGG Enzymes: <i>BstDSI</i> , <i>BseDI</i> Cloning / PCR primers	100	100	--	--	--	0-0-0-0-2 0-0-0-0-0 2 off-targets 4:C312343 6.44 Kbp 4:C307395 5.50 Kbp
80 / fw	TCTTGCAAGGAAATGGCA AGG Cloning / PCR primers	100	100	51	25	58 82	0-0-0-0-0 0-0-0-0-0 0 off-targets
95 / fw	GGCAAGGGAGCAATTAGT TGG Cloning / PCR primers	100	100	67	57	68 82	0-0-0-0-1 0-0-0-0-0 1 off-targets 4:C285657 0.49 Kbp
122 / rev	CTTAGCAGCATATCTGTT TGG Inefficient Enzymes: <i>LpnPI</i> Cloning / PCR primers	100	99	34	40	80 90	0-0-0-1-1 0-0-0-0-0 2 off-targets 4:scaffold13911 0.47 Kbp 3:C262535 2.02 Kbp

Figur 26: Forslag for sgRNA fra CRISPOR for *CamkII*. Sekvensen legges inn i CRISPOR etter å ha fjernet usikre sekvenser som er merket med rødt ved start og slutt. CRISPOR angir prosent spesifisitet og effektivitet for hver match. I dette tilfellet, er beste valget er den tredje sekvens på posisjon 95/fw med spesifisitet på 100% og effektivitet på 67%.

Figur 26 viser spesifisitet, effektivitet og off-target for å kunne forutsi hvor vellykket en CRISPR med det bestemte sgRNA-et kan bli. På figuren ser man at spesifisiteten er svært høy med større variasjon i effektivitet. Det er derfor viktig å se på disse parameterne ved valg av sgRNA.



Figur 27: *CamkII* genet. Figuren viser størrelsen på genet (blå), retning av uttrykk av genet (en pil) og eksoner i genet (grønn).

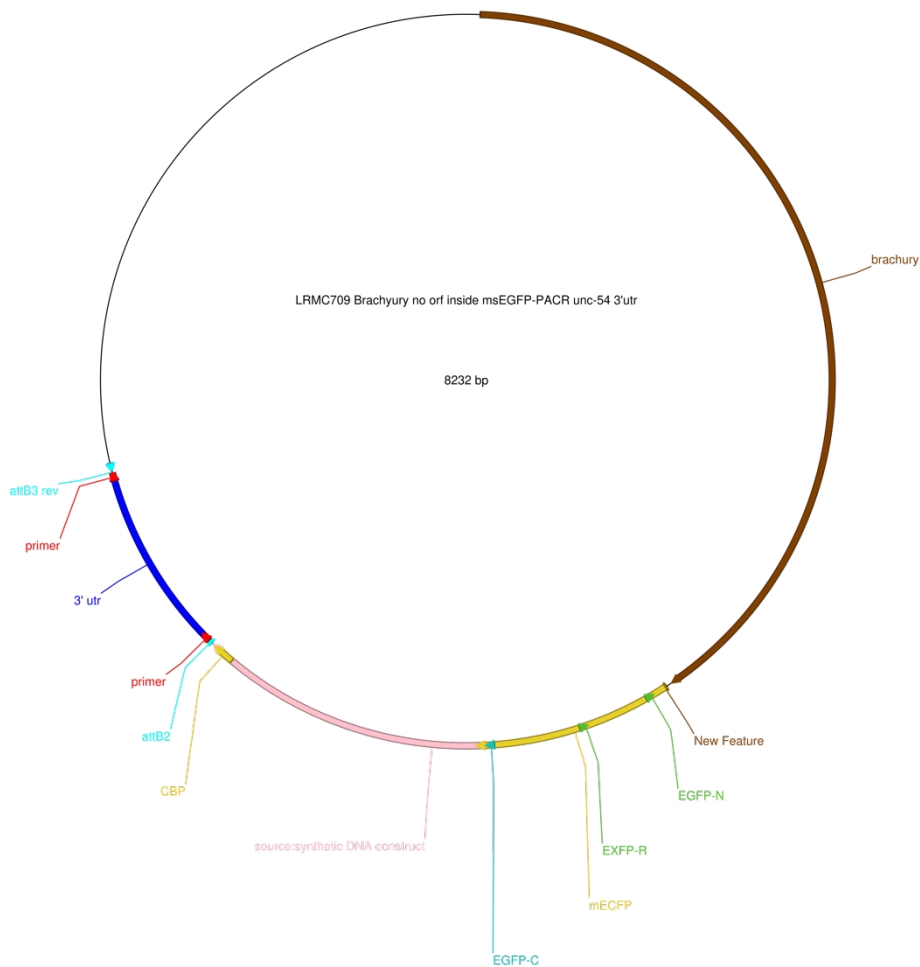
Tabell 3: Resultat for valg av sgRNA med oppgitt spesifisitet, effektivitet, off target og out of frame.

Gen	Posisjon for sgRNA	Spesifisitet%	Effektivitet%	Off target	Out of frame
CamkII	95/fw	100	67	1	68
IP3R	530/fw	93	71	23	63
ORAI1	725/rev	99	45	6	65
RGS	189/rev	99	80	3	77
RYS	505/rev	97	55	22	75
STEM1	188/fw	97	63	24	78
TENSIN	570/rev	97	69	10	67

Tabell 3 viser resultatet for valg av sgRNA for de ulike genene. For CamKII ble det valgt sgRNA 95 forward som har en spesifisitet på 100% og en effektivitet på 67%. I tillegg er det kun 1 off target og høy out of frame. De resterende genene har tilsvarende tall da det har blitt resonnert på samme måte. Ved valg av sgRNA har det vært fokus på høy spesifisitet men også høy effektivitet, samt så lite off target som mulig men høy out of frame. For IP3R ble 530 forward som har 93% spesifisitet, 71% effektivitet, 23 off target og 63 out of frame. For ORAI1 ble det valgt 725 reverse da den hadde høy spesifisitet, beste mulige effektivitet av det som var tilgjengelig, samt lav off target og høy out of frame. For RGS med sgRNA 505 reverse er det ideelle parametere og stor sjanse for en vellykket CRISPR da spesifisitet, effektivitet og out of frame er høy, mens off target er svært lav. For STEM1 ble det valgt 188 forward og for tensin ble det valgt 570 reverse da det var de ulike parameterne svarte til forventningene.

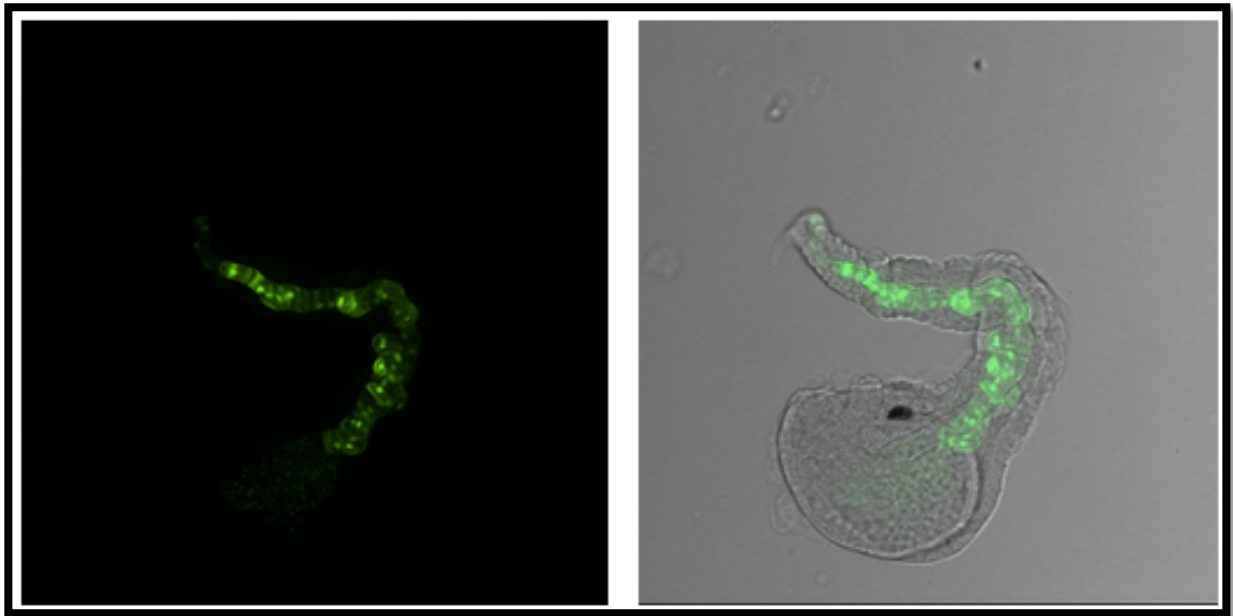
Optogenetisk eksperiment med PACR Sensor

Plasmidet som inneholder de ulike komponentene av PACR (figur28) blir satt sammen og elektroporert i embryoene. Brachyury promoter er en del av plasmidet som konstrueres da dette som tidligere nevnt er et T-box transkripsjonsfaktor-gen som er utelukkende uttrykt i notochord cellene som Brachyury protein. Proteinene er som sagt en transkripsjonsfaktor som regulerer aktiviteten til andre gener ved binding til T-box. Brachyury promoter har en størrelse på 3284bp og er avmerket i brunt. Se figur 28. Den delen av plasmidet som er merket rosa er syntetisk DNA-konstruksjon hvor man kan sette inn de genene man ønsker skal bli uttrykt hos dyret.



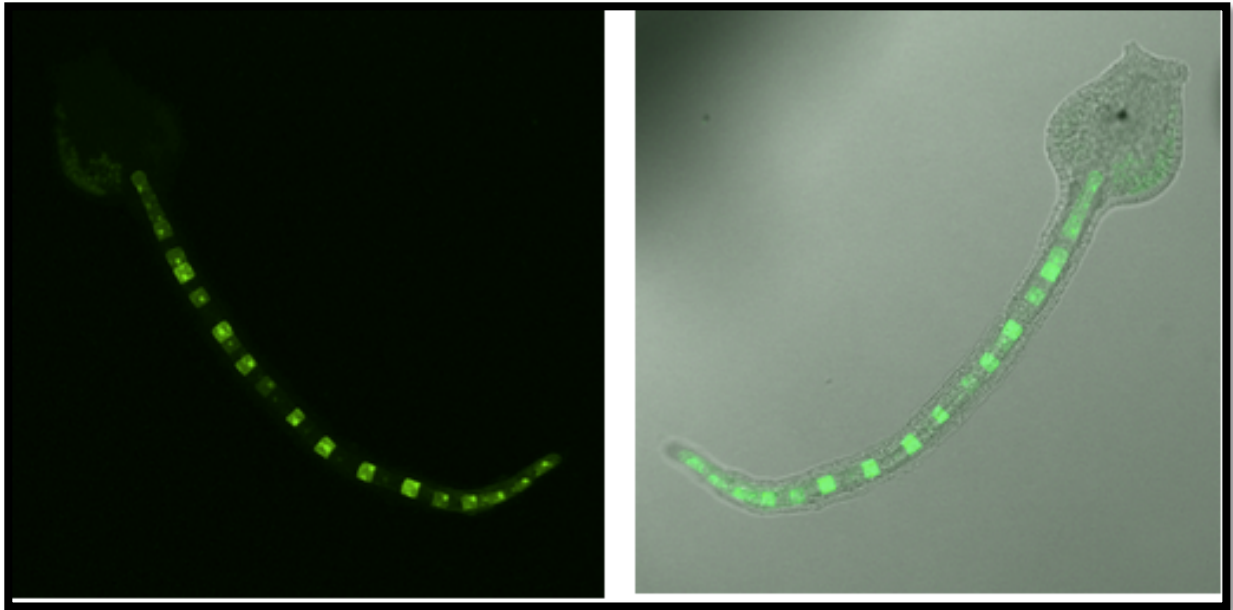
Figur 28: Plasmidkart til pMCH2866 Brachyury no orf inside>msEGFP-PACR >unc-54 3'utr. Kartet viser lengder og posisjoner til Brachyury og de andre komponentene i plasmidet.

Figurene 29-32 viser et optogenetisk eksperiment som har blitt utført med PACR sensor. PACR står for photactivatable Ca^{2+} -releaser. Teori og metode er nærmere beskrevet av Fukada, N., et al. (32). Figur 29 viser et bilde av et *Ciona*-individ som er utviklet uten lys. Notochorden som er den grønne strukturen, er i dette tilfellet krummet og med utydelige grenser mellom cellene.



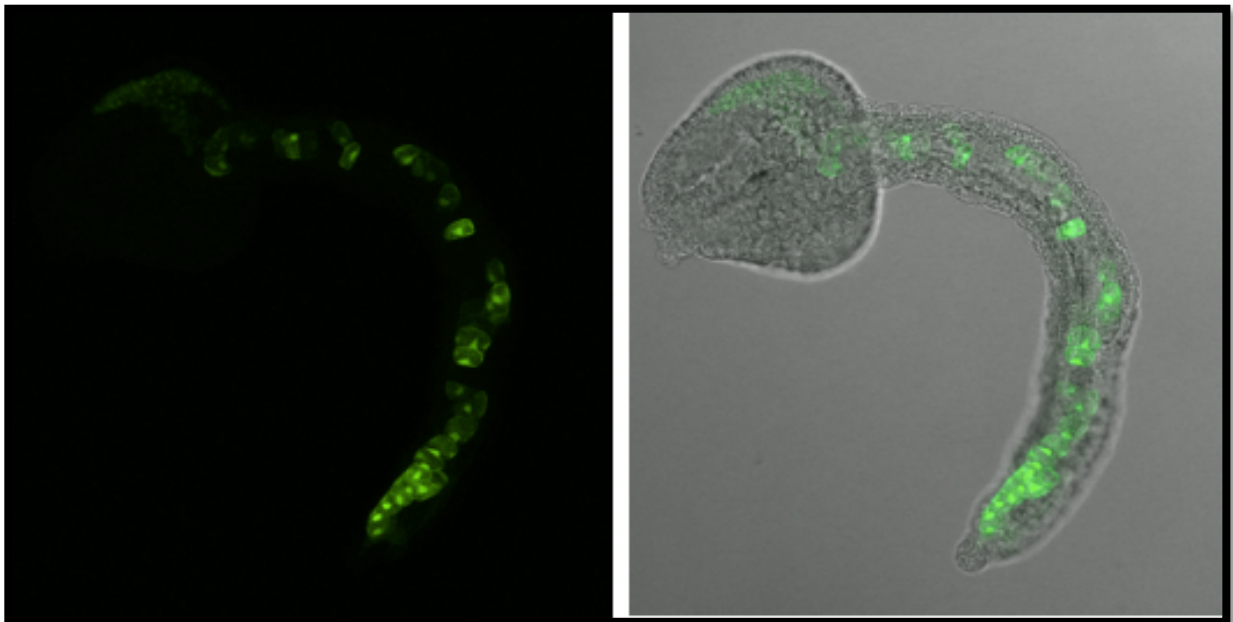
Figur 29: Individ av Ciona intestinalis som er utviklet uten lys hvor kalsiumaktiviteten er hindret ved binding til calmodulin som førte til defekt notochord.

Resultater av individer som er utviklet i lys ser annerledes ut. I figur 30 er det en rettere struktur sammenlignet med figur 29, og hver enkelt celle er også svært synlig.



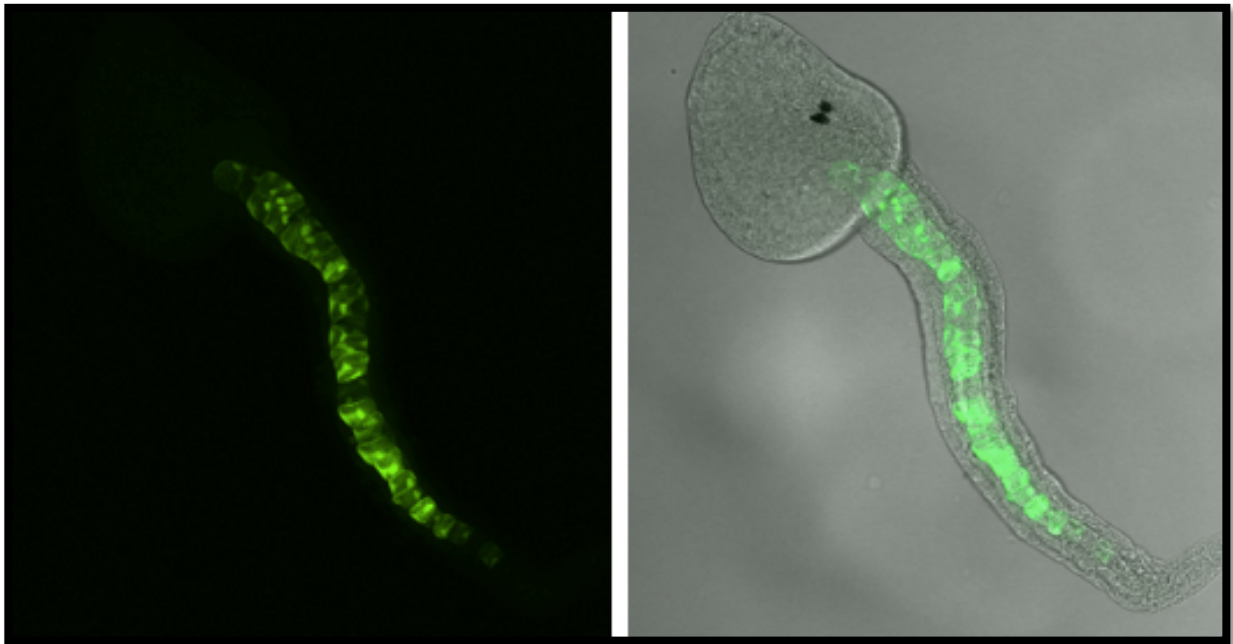
Figur 30: Individ 1 av Ciona intestinalis som har utviklet seg med eksponering av lys hvor kalsium er tilgjengelig for signaloverføring i notochord-cellene for rørdannelse.

Den neste figuren, figur 31, viser også et sekkedyr som har fått utvikle seg i lys, men som har likhetstrekk med individet som ikke har fått lys. Det er en krummet form på notochord i figur 31, men med mer tydelige cellegrenser enn observert i figur 29.



Figur 31: Individ 2 av Ciona intestinalis som har utviklet seg med eksponering av lys. Cellene begynte å binde kalsium etter eksponering til lys, og litt celle-forlengelse kan ses i en defekt notochord.

Notochord i figur 32, har også fått utvikle seg i lys, men har ikke like separerte celler som for eksempel vist i figur 30. Den har derimot en rettere struktur enn vist i figur 29.



Figur 32: Individ 3 av Ciona intestinalis som har utviklet seg med eksponering av lys.

Diskusjon

Denne oppgaven har blitt svært påvirket av utbruddet av COVID-19 som stengte laboratoriet over lengre tid. Det ble derfor kun tid til en uke på laboratoriet i forkant av nedstengningen. Dette har ført til store endringer av den opprinnelige oppgaven. Det ble planlagt å utføre eksperimentet som beskrevet i metodedelen. Dette var dessverre ikke mulig da laboratoriet var stengt over lengre tid, samt at de ulike forsøkene som skulle utføres, for eksempel sekvensering, tok lengre tid enn planlagt. Dette førte til at den eksperimentelle delen ikke kunne fullføres som opprinnelig planlagt. Det har derfor blitt presentert et resultat som ikke beskrives detaljert i teori- eller metodedel, og det henvises derfor til arbeidet til Fukada, N., et al. (33) for en mer detaljert beskrivelse av teori og metode. Resultatet som er benyttet i dette prosjektet er basert på denne metoden og viser noe om virkningen av kalsiumaktivitet på rørdannelse i *Ciona intestinalis*. I diskusjonen vil det derfor diskuteres delresultater fra opprinnelig metode som beskrevet og deretter resultatet fra PACR.

Resultatet fra sekvenseringen, elektroferrogrammene, brukes for å sikre effektiviteten av metoden og at det riktige genet ble klonet. Som nevnt i metoden, var det bare 8 av de 11 genene av interesse som ble sekvensert. Sekvensene er presentert i appendiks. Dette var på grunn av mangel på PCR produkt, mislykket TOPO TA kloning eller dårlig kvalitet på DNA fra de resterende genene, altså CALM, Agrin og Adenyl Cyklase. Høyde og bredde til toppene tyder på kvaliteten til sekvensering. Dersom det er brede, overlappende eller lavintensitetstopper, kan det være vanskelig å tyde hvilken base som er i sekvensen. I elektroferrogrammene er det et område i starten med dårligere kvalitet hvor toppene er brede og har lav signalstyrke, som dermed gir vanskeligheter med å tyde hvilken base som sekvenseres. Deretter kommer et bredt område med tydelige topper med god signalstyrke og dermed stor sannsynlighet for at det er sekvensert riktig base. Signalstyrken vil så minke etter hvert og toppene blir overlappende med svak signalstyrke igjen slik at det blir vanskeligere å tolke hvilken base som er i sekvensen.

Dette bekreftes i sekvensene da det er mange baser som betegnes med N i starten og slutten av sekvensen. N vil si at dataprogrammet ikke klarer å tyde hvilken base som er den korrekte. Utydelige topper kan skyldes at det er flere baser som avgir signal med samme styrke eller posisjon, for eksempel som følge av kontaminasjon hvor annet DNA enn det som skal analyseres blir sekvensert. En annen årsak kan være at det er for mye DNA i prøven, noe som fører til at det blir mye støy ved analyse. I tillegg kan usikkerheten i starten og i slutten av sekvenseringsprosessen skyldes enzymets kvalitet og evne til å sekvensere. Det vil for eksempel ta tid før enzymet starter sekvenseringen da primeren må bindes før sekvenseringen starter, noe som kan gi usikker sekvensering. Effektiviteten til enzymet vil også minke etter hvert noe som kan forårsake nedgang i signalstyrke.

Resultatene fra CRISPOR (se eksempel i figur 26) gir som sagt forslag til noen sgRNA rangert etter spesifisiteten fra høyest til lavest. I figuren vises de tre første forslagene for sgRNA for CamkII som har høy spesifisitet på 100% mens effektiviteten varierer. For å velge sgRNA, er det viktig å velge en med høy spesifisitet og høy effektivitet for å sikre at CRISPR fungerer optimalt. Høy spesifisitet indikerer at man får benyttet CRISPR i det området man ønsker å redigere. Effektivitet beskriver hvor høy sannsynlighet det er for at CRISPR fungerer ved valg av en bestemt sgRNA. Det må også tas hensyn til scorene for *Out-of-Frame* ved valg av sgRNA for de ulike sgRNA siden denne parameteren har betydning for uttrykk av defekte eller ufunksjonelle proteiner. For CamkII vil den beste sgRNA være den sekvensen på posisjon 95/fw med spesifisitet på 100%, effektivitet på 67% og *Out-of-Frame* på 68%. Basert på samme resonnementet, blir sgRNA for de andre genene valgt.

PACR sensor er et optogentisk verktøy som blir uttrykt i notochord med detaljert nomenklatur: pMCH2866 Brachyury no orf inside>msEGFP-PACR >unc-54 3'utr. Plasmidet inhiberer kalsiumaktivitet i notochord dersom sekkedyret ikke får utvikle seg i lys. Figur 24 viser et *Ciona*-individ som ikke har fått tilgang til lys, som vil si at PACR inhiberer kalsiumaktiviteten ved at Calmodulin bindes til kalsium. Dette individet har fått en underutviklet notochord da den mangler den rette strukturen og de klare cellegrensene. Figur 25-27 viser individer som har fått utvikle seg i lys. Notochord skal da utvikles normalt da dette verktøyet er inaktivt. Kalsiumaktivitet vil da ikke inhiberes da Calmodulin ikke vil binde kalsium. Som man kan se av figurene 25-27 er det variasjoner i hvordan notochorden utvikles til tross for at sekkedyrene har blitt utsatt for samme behandling. Figur 25 viser et sekkedyr med en velutviklet notochord med tydelige celler og rørformet struktur. Figur 26 og 27 har mindre tydelige celler og har en mer krummet struktur. Dette kan for eksempel tyde på at det er variasjoner fra individ til individ i hvordan notochord utvikles, eller at de ikke har blitt utsatt for nøyaktig lik behandling.

I et slikt prosjekt er det ulike faktorer som kan påvirke kvaliteten av kalsiumsignaliseringen i sekkedyret. En feilkilde kan være nivået av plasmid som benyttes, som kan variere enten ved mengden som elektroporerer i dyret, eller eventuelt hvor mye av plasmidet som inkorporeres i embryoet. Dette vil påvirke mengden av kalsiumsignal som visualiseres i *Ciona*. En annen feilkilde kan være uttrykksnivået til de ulike cellene, da ulike celler kan uttrykke et sterkere signal og dermed vil uttrykke sterkere effekt. Dette vil føre til at sammenlikningsgrunnlaget ikke er likt da dette vil variere fra celle til celle, som gjør resultatet vanskeligere å diskutere og en konklusjon vil bli vanskeligere å trekke. Den tredje feilkilden som kan oppstå i et optogenetisk forsøk er lys bestrålingen, hvor lysintensiteten som benyttes vil påvirke mengden kalsiumsignal som sekkedyret uttrykker. Dette bør i utgangspunktet ikke være en avgjørende faktor så lenge lysintensiteten holdes konstant gjennom hele eksperimentet.

Da dette eksperimentet ikke har blitt utført i henhold til CRISPR knockout metoden som har blitt beskrevet, er det ønskelig å bruke denne metoden for å undersøke virkningen av kalsiumaktivitet på rørdannelse i sekkedyret i et fremtidig prosjekt. Ekstern veileder Marios Chatzigeorgiou har planer om å utføre prosjektet som opprinnelig planlagt med CRISPR knockouts. I tillegg viser ikke de presenterte resultatene et entydighet da de ulike individene har varierende utviklet notochord til tross for at de har fått samme behandling. Det er derfor ønskelig med flere paralleller for å undersøke om variasjonene skyldes de ovennevnte faktorene som kan påvirke kvaliteten.

Konklusjon

Notochord er en definerende struktur hos ryggstrengdyr og er viktig for rørdannelse og motorikk. I sekkedyret *Ciona intestinalis* har det blitt benyttet et optogenetisk eksperiment for å undersøke virkningen av kalsiumaktivitet på rørdannelse. Dette har blitt utført ved inhibitoren PACR som får Calmodulin til å binde kalsium dersom sekkedyret utvikles i mørke. Resultatene viser at individet med best utviklet notochord er det individet som har blitt utsatt for lys. Det vil si at kalsiumaktivitet ikke har blitt inhibert hos dette individet, som indikerer at kalsiumaktivitet en viktig faktor for en normal utvikling av notochord.

Referanser

Teori

1. Kourakis, M. J. & Smith, W. C. An organismal perspective on *C. intestinalis* development, origins and diversification. *Elife* 4, doi:10.7554/eLife.06024 (2015).
2. Passamaneck, Y. J. & Di Gregorio, A. *Ciona intestinalis*: chordate development made simple. *Dev Dyn* 233, 1-19, doi:10.1002/dvdy.20300 (2005).
3. Stemple, D. L. Structure and function of the notochord: an essential organ for chordate development. *Development* 132, 2503-2512, doi:10.1242/dev.01812 (2005).
4. Annona, G., Holland, N. D. & D'Aniello, S. Evolution of the notochord. *Evodevo* 6, 30, doi:10.1186/s13227-015-0025-3 (2015).
5. Ramesh, T. et al. Update on the Notochord Including its Embryology, Molecular Development, and Pathology: A Primer for the Clinician. *Cureus* 9, e1137, doi:10.7759/cureus.1137 (2017).
6. Denker, E. & Jiang, D. *Ciona intestinalis* notochord as a new model to investigate the cellular and molecular mechanisms of tubulogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 23, 308-319, doi:10.1016/j.semcdb.2012.03.004 (2012).
7. Hotta, K., Yamada, S., Ueno, N., Satoh, N., & Takahashi, H. (2007). Brachyury-downstream notochord genes and convergent extension in *Ciona intestinalis* embryos. *Development, growth & differentiation*, 49(5), 373–382. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2007.00935.x>
8. Clapham, D. E. Calcium signaling. *Cell* 131, 1047-1058, doi:10.1016/j.cell.2007.11.028 (2007).
9. Berridge, M. J., Bootman, M. D. & Roderick, H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 517-529, doi:10.1038/nrm1155 (2003).
10. Brodskiy, P. A. & Zartman, J. J. Calcium as a signal integrator in developing epithelial tissues. *Physical Biology* 15, doi:10.1088/1478-3975/aabb18 (2018).
11. Chen, T.-W. et al. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499, 295, doi:10.1038/nature12354
12. Akahoshi, T., Hotta, K., & Oka, K. (Accepted/In press). Characterization of calcium transients during early embryogenesis in ascidians *Ciona robusta* (*Ciona intestinalis* type A) and *Ciona savignyi*. *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.09.019>
13. Conklin EG. [The Organization and Cell-Lineage of the Ascidian Egg](#) (1905) *J. Acad., Nat. Sci. Phila.* 13, 1.
14. Bioteknologirådet. (2019). Genredigering/CRISPR: Teknologien. Hentet 15.4.20 fra: <http://www.bioteknologiradet.no/temaer/genredigering-crispr/genredigeringcrispr-fagressurser-om-teknologien/genredigeringcrispr-teknologien/>
15. Stolfi, A., Gandhi, S., Salek, F. & Christiaen, L. Tissue-specific genome editing in *Ciona* embryos by CRISPR/Cas9. *Development* 141, 4115-4120, doi:10.1242/dev.114488 (2014).
16. Gandhi, S., Razy-Krajka, F., Christiaen, L. & Stolfi, A. CRISPR Knockouts in *Ciona* Embryos. *Adv Exp Med Biol* 1029, 141-152, doi:10.1007/978-981-10-7545-2_13 (2018).
17. Gandhi, S., Haeussler, M., Razy-Krajka, F., Christiaen, L. & Stolfi, A. Evaluation and rational design of guide RNAs for efficient CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis in *Ciona*. *Dev Biol* 425, 8-20,

18. Kolar, K., Dondorp, D. & Chatzigeorgiou, M. Mesmerize: A highly versatile platform for calcium imaging analysis and creation of self-contained FAIR datasets. bioRxiv, 840488, doi:10.1101/840488 (2019).
19. Synthego. 2020. Importance of the PAM Sequence in CRISPR Experiments. Hentet 16.4.20 fra: <https://www.synthego.com/guide/how-to-use-crispr/pam-sequence>

PCR

20. Sjøberg, N.O. (2013). Molekylær genetikk. Genteknologi - humant DNA. 5. utg. Forlaget Vett og Viten (Høvik).
21. UiO. (2019). PCR. Institutt for biovitenskap. Hentet 30.9.19 fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/p/pcr.html>
22. SuiGenerisBrewing. Using PCR to Identify Contamination in Beer – Part 1. Hentet 7.4.20 fra: <http://sui generisbrewing.com/index.php/2017/11/22/contamination-detection-1/>

Gelelektroforese

23. Vaaje-Kolstad, G. agarose. (2019, 23. september). I Store norske leksikon. Hentet 21.11.2019 fra <https://snl.no/agarose>
24. Sigmon, J. (1996). The effect of ethidium bromide on mobility of DNA fragments in agarose gel electrophoresis. Greenville Hospital System/Clemson University Biomedical Cooperative. Hentet 21.11.19 fra <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8957173>.
25. Sjøberg, N.O. (2013). Molekylær genetikk. Genteknologi - humant DNA. 5. utg. Forlaget Vett og Viten (Høvik).
26. Thermo Fischer Scientific. (2019). Ethidium Bromide (EtBr) Dye for DNA and RNA Detection. Hentet 21.11.19 fra <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/nucleic-acid-gel-electrophoresis/dna-stains/etbr.html>
27. UiO. Agarose gel-elektroforese. Laboratoriekompedium ved Institutt for biovitenskap. Hentet 30.9.19 fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/om/skolelab/kompedium/kompedium-gelelektroforese.pdf>
28. Rugbjerg, P. PCR (Polymerase Chain Reaction): Opkopiering af DNA. Biotech Academy. Hentet 7.4.20 fra: http://talentfuldeunge.dk/sites/default/files/billeder/pcr_og_gelelektroforese_2_0.pdf

TOPO TA kloning

29. invitrogen. (2016). TOPO PCR cloning solutions. Hentet 6.4.20 fra: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/cloning/gateway-cloning/multisite-gateway-technology.html>

Sekvensering

30. Haugen, M.N. (2019). DNA-sekvensering. Store norske leksikon. Hentet 8.10.19 fra <https://snl.no/DNA-sekvensering>
31. UiO. (2011). DNA sekvensering. Institutt for biovitenskap. Hentet 8.10.19 fra <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/d/dnasekv.html>
32. Sjøberg, N.O. (2013). Molekylær genetikk. Genteknologi - humant DNA. 5. utg. Forlaget Vett og Viten (Høvik).

PACR

33. Fukuda, N., et al. (2014). "Optical control of the Ca^{2+} concentration in a live specimen with a genetically encoded Ca^{2+} -releasing molecular tool." *ACS Chem Biol* 9(5): 1197-1203.

Ordliste

Agonist: Et molekyl som starter en fysiologisk prosess når det binder til en reseptor.

Chordate: Ryggstrengdyr. En rekke i dyrerikdom som omfatter virveldyrene og virvelløse dyrene¹.

Chordoma: En type svulst som er antatt til å vokse sakte fra cellulære rester av notochord⁵.

CPG: *Central Pattern Generator, sentral mønstergenerator* er nevrale kretsløp som ved aktivering gir rytmiske motorisk mønstre som å gå, svømme og puste i fravær av rytmiske innspill.

Dorsal: Anatomisk begrep som beskriver noe som vender mot ryggen.

Dorsal lip: En struktur som blir utviklet tidlig hos fosteret og spiller viktig rolle i organisering av kimlag dvs. de tre lag som dannes under utvikling av tidlig foster og kalles ektoderm (ytterhud), mesoderm (gir dyrets øvrige struktur) og endoderm (slimhinne).

Dorsal organizer: Et område av gastrula hos virveldyr som gir opphav til notochord³.

Elektroporering: En fysisk transeksjon metode som bruker elektrisk pulsering til å lage forbigående porer i cellemembran som substanser som DNA kan trenge gjennom og inn i cellen²⁴.

Follikkelcelle: Celler som omgir eggcelle og hjelper med å forlenge epitellaget hos fosteret.

Gastrula: Tidlig morfologisk endring hos fosteret som fører til forming av kimlag, altså ekto-endo- og mesoderm¹.

Grønt fluorescerende protein: Et protein som lyser grønt under blått lys. Disse proteinene brukes til å studere ulike biokjemiske prosesser i cellene.

Hedghog: Et protein som spiller viktig rolle i signalveiene under utvikling hos insekter og dyr. Proteinet blir kodet av SHH genet (Sonic Hedghog gen) hos mennesker.

Kappedyr: Nærmeste dyr til virveldyr. De er en rekke under chordate, lever festet til underlag og spiser ved filtrering¹.

Metamorfose: En biologisk prosess hvor et dyr utvikler seg fra et foster til et voksent individ.

Na⁺/Ca²⁺-veksler: En antiporter. Et membranprotein som fjerner kalsium fra cellen ved å bruke energien fra natrium gradient når natrium strømmer nedover sin gradient inn i cellen.

Nevrulering: Rulling av vev hos chordate til å forme en hul ryggnervesnor som er et unik trekk hos chordate¹.

Neural crest cell: Midlertidig gruppe av celler som er unik hos virveldyr og oppstår fra fosterets ektoderm. Cellene gir opphav til ulike cellelinjer som melanocytter, glattemuskler, perifere og enteriske nerver og gliaceller¹.

Neurogenic placode: Et fortykket område i epitile i fosterets ektoderm som gir opphav til nerver og ulike strukturer i nervesystemet¹.

Nukleus pulposus: Den bløte kjernen i sentrum av mellomvirvelskivene som består av vann og løsaktig nettverk av kollagenfiber.

Sekkedyr: Er en underrekke av ryggstrengdyr som lever festet til underlag og spiser ved filtrering¹.

Stadiet 11, 13 og 14: Stadier i utvikling av *Ciona* embryo. De tilsvarer tidlig gastrulering og tidlig nevrulering til henholdsvis.

Transient: forbigående, kort hendelse i et system som fører til tilstandsendringer, som for eksempel svingning i Ca²⁺ konsentrasjon i en celleaktivitet.

Transfeksjon: Bevisst føring av naken eller renset nukleinsyre i eukaryote celler²⁴.

Urochordate: Tidligere navn på kappedyr.

Vakuoler: Membranavgrensede og væskefylte strukturer som finnes i mange typer celler. Væskeinnhold avhengig av hvilken funksjon vakuolen har.

Venstre-høyre asymmetri: Begrepet beskriver forskjellen i strukturer mellom venstre og høyre side hos dyr.