

Prosjektplan

Dette prosjektet består av to deler.

Del 1: Bygge og teste reagens (sgRNAs) som skal brukes for å dissekere molekylær "pathway" for kalsium signalisering i notochord.

Del 2: Teste genetisk kodede indikatorer for å monitorere kalsium og cAMP dynamikk i notochord under utvikling.

Skriving utføres underveis. Oppstart 10.mars med å skrive introduksjon.

Del 1 utføres over tre uker. Oppstart uke 11 onsdag 11.mars med analyser:

1. Kloner cDNA for relevante gener ved bruk av lokale dyrs cDNA.
2. Sekvenser cDNA kloner for å determinere den presise DNA sekvensen.
3. Designe sgRNA med relevant software.
4. Bygge sgRNA konstruksjoner.
5. Teste sgRNAs ved å bruke smeltekurver og sekvensere det genomisk fragment.

Gener som vi skal genere cDNA og potensielt gRNA.

Gen model	Gen	Hva den gjør.	Relevant kilde
KH.C9.28	Tensin	Kalsium regulert celleadhesjon	Hotta et al 1999
KH.C11.99	SERCA Pump	Kalsium signalisering	
KH.C12.89	ORAI1	Kalsium signalisering	
KH.C11.665	Noto8	Kalsium regulert	Katikala et al., 2013 PMID: 24204212
KH.C11.737	CALM1/3 (også Noto8)	Kalsium signalisering	
KH.C9.162	RGS21,4,8	Kalsium signalisering	
KH.C2.758	CamKII	Kalsium signalisering	
KH.C8.870	IP3R	Kalsium signalisering	
KH.C2.294	STIM1	Kalsium signalisering	
KH.C8.122	Agrin	Kalsium regulert celleadhesjon	
KH.C11.332	RyR	Kalsium signalisering	
KH.C14.320	Adenyl Cyclase	cAMP signalisering	
KH.C12.525	PDE5A	cAMP signalisering	Fra RNasek
KH.C5.128	PDE4D	cAMP signalisering	Fra RNasek
KH.C.5.250	PDE8B	cAMP signalisering	Fra RNasek
KH.C9.7	PDE1C	cAMP signalisering	Fra RNasek

Skriving av metode og resultat utføres underveis.

Kalsium og cAMP signal indikatorer som skal testes:

Del 2 utføres i ca. 2 uker fra uke 14/15:

1. Elektroporere konstruksjoner i Ciona egg.
2. Filme videoer ved bruk av kalsium bildedannende mikroskop.

3. Analysere data ved bruk av programmet Mesmerize

Innsamlingsnummer	LR nummer	Navn til konstruksjon
pMCH2711	LRMC658	brachyury no ORF>Gcamp>unc-54 3'utr (as a control)
pMCH2863	LRMC706.2	Brachyury no orf inside>R-CEPIA1er >unc-54 3'utr
pMCH2864	LRMC707.1	Brachyury no orf inside>CEPIA2mt>unc-54 3'utr
pMCH2865	LRMC708.1	Brachyury no orf inside>G-CEPIA1er>unc-54 3'utr
pMCH2711	LRMC658	brachyury no ORF>Gcamp>unc-54 3'utr
pMCH2867	LRMC710.1	Brachyury no orf inside>cAMP _{Pr} sensor 2nd position>unc-54 3'utr

Diskusjon skrives etter fullførte analyser. Estimat ca. uke 20.