



Høgskulen på Vestlandet

BIO160 Bacheloroppgave og Plakat Gruppe A - Bioingeniør

BIO160

Predefinert informasjon

Startdato:	26-05-2021 12:12	Termin:	2021 VÅR
Sluttdato:	28-05-2021 14:00	Vurderingsform:	Bestått/ikke bestått
Eksamensform:	Bacheloroppgave (skriftlig i gruppe)		
Flowkode:	203 BIO160 1 O 2021 VÅR		
Intern sensor:	Line Wergeland		

Deltaker

Naun:	Malene Elisabet Hatlevoll
Kandidatnr.:	217
HVL-id:	580688@hul.no

Informasjon fra deltaker

Antall ord *:	14715
----------------------	-------

Egenerklæring *: Ja

Inneholder besvarelsen Nei
konfidensielt
materiale?:

Jeg bekrefter at jeg har Ja
registrert
oppgavetittelen på
norsk og engelsk i
StudentWeb og vet at
denne vil stå på
vitnemålet mitt *:

Gruppe

Gruppenavn: Gruppe A3
Gruppenummer: 4
Andre medlemmer i gruppen: Ragnhild Ravik Jonsdatter-Sanduær, Magnus Sanden Vasegaard

Jeg godkjenner avtalen om publisering av bacheloroppgaven min *

Ja

Er bacheloroppgaven skrevet som del av et større forskningsprosjekt ved HVL? *

Nei

Er bacheloroppgaven skrevet ved bedrift/virksomhet i næringsliv eller offentlig sektor? *

Ja, Sars International Centre for Marine Molecular Biology (Universitetet i Bergen)

BACHELOROPPGAVE

Studere neuropeptiders rolle i bevegelsesmønsteret til *Ciona intestinalis*

Studying the Role of Neuropeptides on the
Behavioral Pattern of *Ciona intestinalis*

**Magnus Sanden Vasegaard,
Ragnhild Ravik Jonsdatter-Sandvær og
Malene Elisabet Hatlevoll**

Bioingeniørutdanningen
Fakultet for ingeniør og naturvitenskap (FIN), Institutt for
sikkerhet, kjemi- og bioingeniørfag
Veiledere: Marios Chatzigeorgiou og Line Wergeland
28.05.2021

Innholdsfortegnelse

Forord	4
Sammendrag	5
Abstract	6
1. Introduksjon	7
1.1 <i>Ciona intestinalis</i>	7
1.2 <i>Nevropeptider</i>	11
1.2.1 Ci-GnRH.....	13
1.2.2 Ci-CT.....	14
1.2.3 Ci-TK.....	15
1.2.4 Ci-VP.....	15
1.2.5 Ci-GALP	16
1.2.6 Ci-LF og Ci-YFV/L.....	16
1.2.7 Ci-NTLP.....	17
1.2.8 Head Activator	17
1.3 <i>Visualisering av nerveaktivitet i C. intestinalis</i>	17
1.3.1 CaMPARI	18
1.3.2 Elektroporering.....	19
1.3.3 Konfokal mikroskopi	19
2. Metode	22
2.1 <i>Etiske betraktninger</i>	22
2.2 <i>Innsamling og oppbevaring av dyrene</i>	22
2.3 <i>Tillaging av løsninger med neuropeptider</i>	22
2.4 <i>Settlement</i>	23
2.5 <i>Tillaging av arenaer</i>	24
2.6 <i>Horisontal tracking</i>	25
2.7 <i>Ekstrahering av eggceller og sædceller</i>	26
2.8 <i>Fertilisering og elektroporering</i>	26
2.9 <i>Konfokal mikroskopi</i>	28
2.10 <i>Vertikalt trackingoppsett</i>	29
2.11 <i>Ekstrahering av CaMPARI-DNA</i>	30
2.12 <i>Statistiske metoder</i>	30
3. Resultat	31
3.1 <i>Settlement</i>	31
3.2 <i>Horisontal tracking</i>	32
3.3 <i>CaMPARI</i>	35
4. Diskusjon	39
4.1 <i>Settlement</i>	40
4.2 <i>Horisontal tracking</i>	42

4.3 CaMPARI.....	43
4.4 Feilkilder	45
4.5 Fremtidsperspektiver.....	46
5. Konklusjon.....	46
Ordliste	48
Referanser.....	50
Vedlegg	54

Forord

Dette bachelorprosjektet ble utført ved Sars International Centre for Marine Molecular Biology (Universitetet i Bergen) våren 2021. Praktisk laboratoriearbeid ble utført i tidsperioden 18. mars til 5. mai, etterfulgt av en periode med analysering av innsamlede data. Prosjektet har flere bestanddeler som omhandler tracking av bevegelsesmønsteret til *Ciona intestinalis* larver etter tilsetning av neuropeptider, larvers metamorfose etter tilsetning av neuropeptider, og visualisering av larvers nerveaktivitet etter tilsetning av neuropeptider ved hjelp av kalsium integratoren CaMPARI og konfokal mikroskopi. Store mengder data ble innsamlet, men grunnet tidsbegrensninger ble det dessverre ikke mulig å få trackingvideoer ferdig analysert til å bli presentert i denne oppgaven.

Prosjektet har gitt oss et bredt læringsutbytte, og vi har hatt noen hyggelige og lærerike dager på lab. Vi har blant annet blitt godt kjent med det underlige, lille dyret *Ciona intesitnalis*, som vi på forhånd ikke var klar over eksisterte.

Vi ønsker med dette å takke alle som har hjulpet oss på veien. En stor takk til vår eksterne veileder Marios Chatzigeorgiou for god veiledning og engasjement, samt alle andre ansatte ved Sars-senteret for opplæring i metoder. Hjertelig takk til intern veileder Line Wergeland for all hjelp og støtte du har gitt oss under denne prosjektperioden. Spesielt mot slutten gav du oss ny giv og motivasjon da vi trengte det som mest. Vi vil gjerne takke biologistudentene Håvard Vrålstad og Amalie Johannessen for hjelp med tracking. I tillegg vil vi takke elektronikingeniørstudentene Simen Fuglestad, Endre Røberg Løseth og Hector Fabian Moya fra HVL for konstruering av det vertikale trackingsoppsettet. Vi håper dere fikk utbytte av våre tilbakemeldinger. Sist vil vi takke hverandre for et godt samarbeid.

Bergen, 28.05.2021

Malene Elisabeth Hattevoll

Egehaug R. L. Sandvold

Magnus S. Vasegaard

Sammendrag

Den marine arten *Ciona intestinalis* er et ryggstrengdyr (Chordata) klassifisert som menneskets nærmeste virvelløse slektning. Dyret er en utmerket modellorganisme. Helgenomet til *C. intestinalis* er lite, og har rundt 90 % av antallet proteinkodende gen som i det menneskelige genomet. Artens larvestadie med rumpetrollmorfologi er karakterisert av deres notokord (ryggstreng) og dorsale, hule nervesystem. Kort tid etter klekking leter larven etter et egnet sted den kan feste seg og initiere sin radikale metamorfose til voksen form.

Nevropeptider som er identifisert i *C. intestinalis* kan deles inn i to grupper: nevropeptider som er homologe med virveldyr, og artsspesifikke nevropeptider, altså peptider unike for *C. intestinalis*. Utredning av funksjonene og mekanismene til nevropeptider i en modellorganisme som *C. intestinalis* kan gi oss informasjon om homologe nevropeptiders tilsvarende biologiske funksjoner og mekanismer hos virveldyr.

I dette prosjektet ble det undersøkt 31 ulike nevropeptiders virkning på bevegelsesmønsteret til larver ved eksogen tilsetning. I tillegg ble det sett på om peptidene påvirket larvers metamorfose, altså om de hadde en inhiberende eller fremmende effekt. Sist men ikke minst ville tilsvarende nevropeptiders effekt på larvers nerveaktivitet undersøkes ved kalsium integratoren CaMPARI og konfokal mikroskopering.

De ulike metodene gav en bred diversitet av resultater for de ulike nevropeptidene. Noen ga tydelig endring, mens andre gav mindre eller ingen endring etter tilsetning. Dette indikerer at hvert peptid har sin egen funksjon og mekanisme hos dyret.

Nøkkelord: *Ciona intestinalis*, nevropeptider, nevromodulatorer, metamorfose, CaMPARI

Abstract

The marine species *Ciona intestinalis* is a chordate classified the closest invertebrate relative of humans. The animal is an excellent model organism for research. The whole genome of *C. intestinalis* is small, and it has around 90 % of the number of protein-coding genes as found in the human genome. The animal's larval stage with tadpole morphology is characterized by its notochord and dorsal, hollow nervous system. Briefly after hatching the tadpole will search for a fitting place to attach itself and initiate its radical metamorphosis into adult form.

Neuropeptides identified in *C. intestinalis* can be divided into two groups: neuropeptides which are homologs of vertebrates', and novel neuropeptides which are only found in *C. intestinalis*. Investigating the biological functions and mechanisms of neuropeptides in a model organism such as *C. intestinalis* can give us information about equivalent functions of homolog neuropeptides in vertebrates.

In this thesis the effect of 31 different neuropeptides on the behavioral pattern of tadpoles was surveyed by exogenous application. In addition the inhibitory or promoting influence on the metamorphosis of tadpoles from the different neuropeptides were investigated. Lastly the neuropeptides effect on the neural activity of tadpoles was examined by CaMPARI and confocal microscopy.

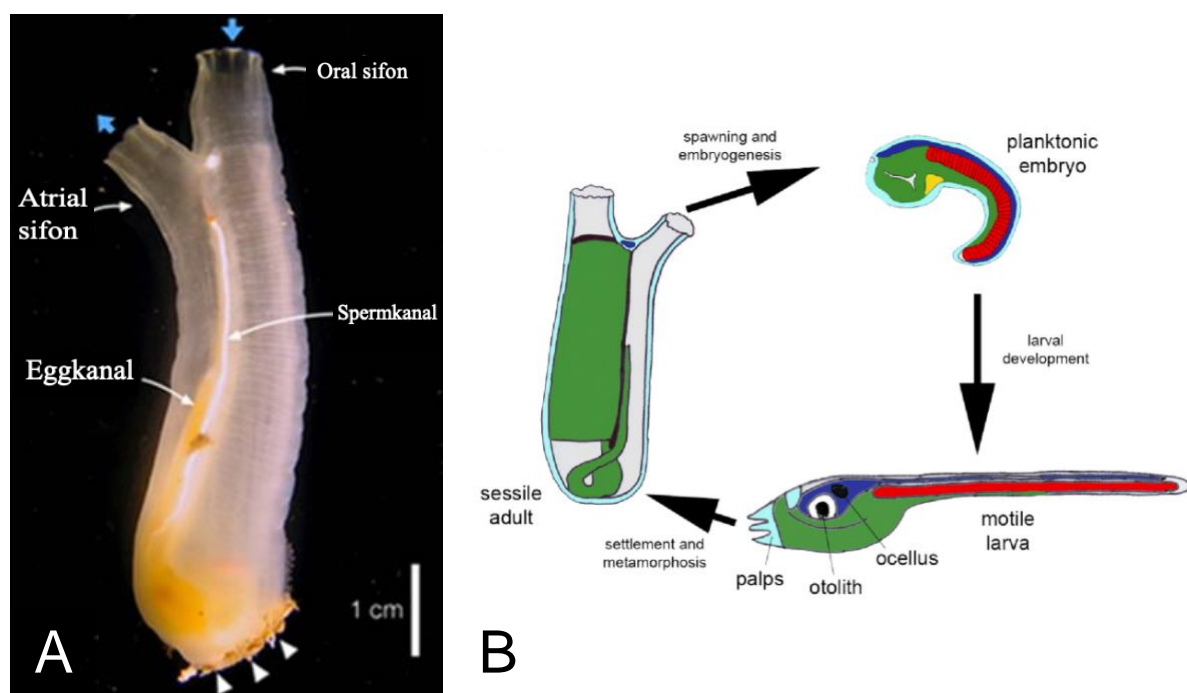
The various methods used gave a wide range of diversity in results among the many neuropeptides. Some gave clear change, while others gave less or no change at all after addition. This indicated that each peptide has its own function and mechanism in the animal.

Keywords: *Ciona intestinalis*, neuropeptides, neuromodulators, metamorphosis, CaMPARI

1. Introduksjon

1.1 *Ciona intestinalis*

Ciona intestinalis er menneskets nærmeste virvelløse slektning, til tross for at artens oppbygning og genomiske arkitektur i stor grad er ulik fra vår egen (1,2). *C. intestinalis* er på norsk kjent som tarmsekkdyr, og er en art i klassen sekkdyr (Ascidiacea) i underrekken kappedyr (Tunicata). Dyret finnes i mange deler av verden på grunn av dens invasive spredning og biobegroing, og er vanlig å finne i norske farvann. *C. intestinalis* trives best i store grupper festet til harde overflater, som for eksempel undersiden av båter, bøyer eller brygger. Voksne dyr er derfor stillesittende ("sessile"), og kan bli opptil 15 cm lange. Artens livssyklus og oppbygningen til et voksent tarmsekkdyr blir presentert i **Figur 1**. De får i seg næring ved å filtrere vann gjennom sine to sifoner. Sifoner er rør lignende organer som man kan finne på toppen av dyret. Dyret har en oral innstrømmingssifon og en atrial utstrømmingssifon der sjøvannet filtreres for å få tak i plankton.

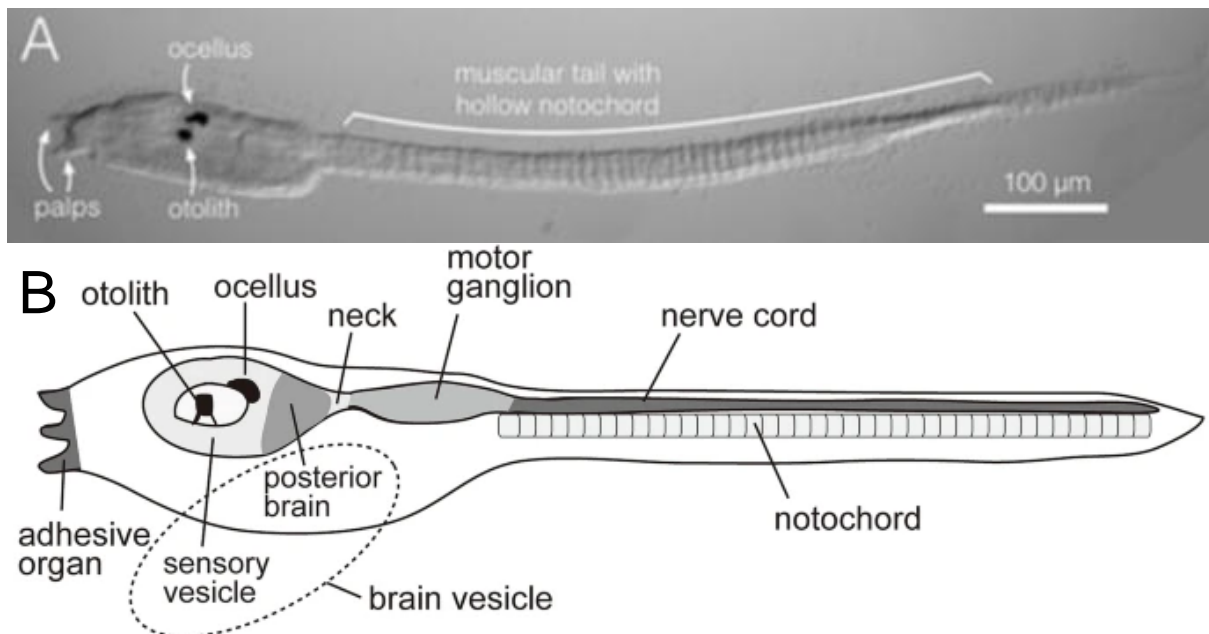


Figur 1. Den stillesittende og filter-spisende arten *Ciona intestinalis*. **A.** Oppbygningen til et voksent individ av *C. intestinalis* (3). Blå piler ovenfor atrial og oral sifon viser retningen sjøvann strømmes gjennom det filter-spisende dyret. Arten er en hermafrodit med både egg- og spermkanal i ett og samme individ. Kanalene er anatomisk plassert tett ved siden av hverandre som markert på figuren. Hvite piler indikerer punktene nederst på dyret der de er festet til overflater. **B.** Skjematisk illustrasjon av livssyklusen til *C. intestinalis* (4). En svømmende larve klekkes ut rundt 18 timer etter at et egg er blitt fertilisert. Larven vil etter kort tid feste seg til en egnet overflate for å gjennomgå metamorfose til sin endelige voksne form.

C. intestinalis er hermafroditter som reproducerer seg via gyting ("broadcast spawning"). Det vil si at samme individ inneholder både egg- og spermceller, og har evne til å utføre selvbefruktning ved å slippe ut gametene sine i det omkringliggende sjøvannet. Opptil flere hundre individer kan slippe ut gametene sine samtidig, slik at sjansene for vellykket fertilisering blir større.

Artens utvikling fra zygote til svømmende larve er veldokumentert, og skjer i et fast mønster (3,5). En rekke celledelinger starter rundt 40 minutter etter at et egg er fertilisert. Embryoet vil så gjennomgå gastrulering når 112 celler er dannet, noe som skjer omtrent 4,5 timer etter fertilisering. Gastrulering er prosessen som omfatter formering av ektoderm, mesoderm og endoderm. Denne morfologiske hendelsen danner forstadiene for dyrets voksne vev.

Prosessten følges av en annen prosess kalt nevrulering, der vev uthules for å danne det dorsale, hule nervesystemet som er spesifikk for alle ryggstrengdyr (Chordata). Nervesnoren går langs anterior-posterior akse av det utviklende embryoet. Alle disse endringene til embryoet foregår inni en fosterhinne. Larven klekkes ut fra fosterhinnen rundt 18 timer etter fertilisering. Larvefasen blir etterfulgt av en radikal metamorfose der de utvikles til sin endelige voksne form (3).

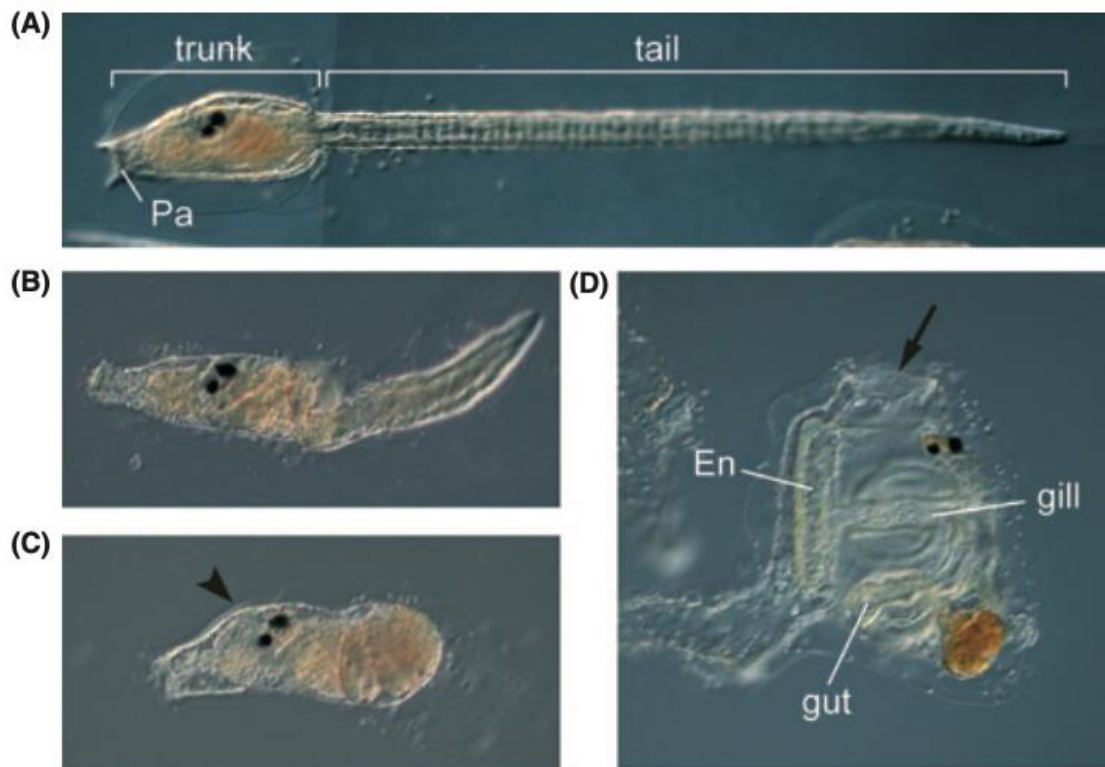


Figur 2. Larvestadiet av *Ciona intestinalis*. *A.* Svømmende larve fotografert i mikroskop (3). *B.* Skjematisk fremstilling av artens oppbygning (6). Fremst på dyret kan man se de tre adhesive palpene som den benytter for å feste seg til harde overflater og starte metamorfose. De pigmenterte sensoriske organene ocellus og otolith viser larvens venstre-høyre asymmetri. Den muskulære halen med larvens karakteristiske notokord (ryggstreng) og hule nervesystem er markert.

C. intestinalis er kjent for deres korte larvefase med rumpetrollmorfologi, som vist i **Figur 2**. Larven har en ryggstrengdyr-spesifikk notokord plassert under nevrallrøret (7). Notokorden, eller ryggstrengen, har flere funksjoner, og er formet som et rør som er lukket i begge ender. Først og fremst gir den larven støtte. Uten notokorden ville larven hverken kunne utvikle seg på korrekt vis, eller ha evne til å svømme. En av grunnene til at notokorden er viktig under embryogenesen er at den sekreterer et fibrinogen-lik protein under sentralnervesystemet. Dette proteinet er essensielt for riktig posisjonering av nevrone celler og for rettleiding av dyrets aksoner ved interaksjoner med Notch signalisering (8,9).

Den nyklekte larven har to pigmenterte sensoriske organer i hjernen kalt otolitt og ocellus. Otolitt sørger for at larven kan oppfatte tyngdekraft, og ocellus sørger for at larven kan oppfatte lys. Under normale omstendigheter vil en larve vanligvis svømme oppover kort tid etter klekking, før de svømmer nedover og vekk fra lys. De svømmer ved å svinge på halen. Årsaken til at de svømmer mot tyngdekraften før de leter etter et egnet sted å slå seg ned, er trolig for at de skal kunne spre seg utover før de initierer metamorfosen (9). Larven har en venstre-høyre asymmetri som lett kan observeres i de sensoriske vesiklene. Ocellus sine pigmentceller blir formert først ved midtlinjen, og beveger seg deretter mot høyre side. Etter denne migreringen vil fotoreseptorceller bli formert på høyre side. (9)

Etter klekking svømmer larven rundt og leter etter et egnet sted den kan feste seg og starte sin metamorfose. Tre adhesive palper er anteriorplassert på dyret, og blir benyttet for dette formålet. Ulike stadier av metamorfosen blir presentert i **Figur 3**. Larven vil gjerne gjennomføre metamorfose raskt etter klekking, da den ikke evner å innta mat før etter transformasjonen. Derfor er den avhengig av en begrenset mengde energi som den har fått maternalt. Det første som skjer når metamorfose blir initiert er at halen blir fullstendig reabsorbent. I løpet av noen timer etter festing utvikles en stolon (utløper) ved festningsstedet, og innvollene til dyret blir reorientert i kroppen. Et slående hjerte kan observeres etter noen få dager. Den endelige topologien til dyret nås når høyre og venstre sifoner fusjonerer ved den dorsale midtlinje etter noen uker. (3)



Figur 3. Ulike stadier av den radikale metamorfose til *Ciona intestinalis*. **A.** Larve av *C. intestinalis*. Hode ("trunk"), hale og adhesive palper (Pa) er markert på figuren. **B.** Larve med påbegynt reabsorpsjon av dens hale. **C.** Larve like etter at halen er blitt fullstendig reabsorbtert. Svart pil indikerer dyrets orale sifon. **D.** Ungdyr etter gjennomgått metamorfose. Posisjonen til den orale sifonen (svart pil) endres under metamorfose pga. kroppens akserotasjon. Organene endostyl (En), gjelle (gill) og tarm (gut) er utviklet. (9)

C. intestinalis er av stor interesse innen forskning på grunn av dens enkle embryologiske utvikling. Artens larve har som nevnt en karakteristisk notokord. I tillegg har de et hult, dorsalt sentralnervesystem (SNS) som er homologt til virveldyrs SNS (9). Artens lille, kompakte genom på 160 mega basepar (Mbp) gjør den til en utmerket modellorganisme. Helgenomet til *C. intestinalis* har rundt 90 % av antallet proteinkodende genene som antallet funnet i det menneskelige genomet (17 000 i *C. intestinalis* vs. 19 000 i *Homo sapiens*) (10–13,3). Sekkdyr (Ascidiacea) og mennesket har med andre ord en felles stamfar langt tilbake i tid. Siden *C. intestinalis* er betydelig enklere oppbygd enn mennesket vil det være hensiktsmessig å benytte den som modellorganisme i forskning knyttet til nervesystemet, og mekanismene som driver morfogenese og embryogenese.

1.2 Nevropeptider

Burbach definerer nevropeptider som små proteinholdige substanser produsert og frigitt av nevroner gjennom den regulerte sekretoriske ruten og som fungerer på nevronele substrater (14). Nevropeptider er korte aminosyresekvenser som har funksjoner både i og utenfor det sentrale nervesystemet. Nevropeptider er til stede i alle deler av nervesystemet, men hvert enkelt peptid er distribuert i ulike deler av gitt system. Egenskapene deres kan bli gruppert inn i tre kategorier (15):

1. post-translational prosessering fra forløperprotein og utskillelse fra kjernevesikler
2. aktivering av celleoverflatereseptorer over relativt lange distanser
3. modulering av målceller i perifert område og i hjernen, som angivelig kan endre sensorisk oppfatning

Peptider er enten komplementære til klassiske transmittere og modulerer handlingene deres, eller de kan spille en annen rolle i nervesystemets funksjon, som f.eks. å utøve trofiske handlinger (16). Det vil si at de kan påvirke vekst, funksjon eller ernæring av endokrine celler. Forskning viser i økende grad en indikasjon om at peptider kan ha trofisk effekt og spille en rolle under den embryonale perioden. Det vil si at visse peptider er viktig utviklingsmessig for foster (17).

Mennesket har over 1 000 totale peptider basert på genome homologier av nevropeptider, peptidhormoner, cytokiner, vekstfaktorer, antimikrobielle peptider, toksiner, giftpeptider og "antifreeze" protein (15). Funksjonen til mange av disse peptidene hos mennesket er enda ikke avdekket. Hos *Ciona intestinalis* har til sammen 40 nevropeptider og peptidhormon blitt karakterisert det siste tiåret. Artens nevropeptider, peptidhormon og deres korresponderende reseptorer har blitt identifisert ved rensning, søk i genomdatabaser, cDNA kloning og peptidomisk deteksjon (18–23). 31 av *C. intestinalis* 40 nevropeptider ble benyttet i denne studien, og presenteres i **Tabell 1**.

Tabell 1. Oversikt over neuropeptider identifisert hos *C. intestinalis* og deres peptidsekvenser. Peptidene er delt inn i peptider som er homologe med peptider som kan finnes hos virveldyr, og artsspesifikke peptider som er unike for *C. intestinalis*. Forstavingen "t-" står for kappedyr (tunicate) og "Ci-" for *Ciona*.

Peptid	Peptidsekvens
Peptider homologe eller relaterte til peptider i virveldyr	
t-GnRH3	pQHWSYEFMPGa
t-GnRH4	pQHWSNQLTPGa
t-GnRH5	pQHWSYEYMPGa
t-GnRH6	pQHWSKGYSPGa
t-GnRH7	pQHWSYALSPGa
t-GnRH8	pQHWSLALSPGa
Ci-GnRH-X	pQHWSNWWIPGAPGYNGa
Ci-TK-I	HVRHFYFLMa
Ci-TK-II	SIGDQPSIFNERASFTGLMa
Ci-VP	CFFRDSCSNMDWYR
Ci-CT	CDGVSTCWLHEKGNVHATAGGKQNVGFGPa
Ci-CK	NYYGWMDFa
Ci-NTLP1	pQLHVPSIL
Ci-NTLP2	GMMGPSII
Ci-NTLP3	MMLGPGIL
Ci-NTLP4	FGMIPSII
Ci-NTLP5	NKLLYPSVI
Ci-NTLP6	SRHPKLYFPGIV
Ci-GALP	PFRGQGGWTLNSVGYNAGLGALRKLF
Artsspesifikke peptider for <i>C. intestinalis</i>	
Ci-LF1	FQSLF
Ci-LF2	YPGFQGLF
Ci-LF3	HNPPLPDLF
Ci-LF4	YNSMGLF
Ci-LF5	SPGMLGLF
Ci-LF6	SDARLQGLF
Ci-LF7	YPNFQGLF
Ci-LF8	GNLHSLF
Ci-YFV1	ELVVRDPYVF
Ci-YFV2	NNQESYFV
Ci-YFV3	DDEPRSYFV
Ci-YFL1	DAARPNYYFL

Peptider blir uttrykt i nevroner på minst tre ulike måter. Noen peptider vil alltid finnes i høye nivå under normale omstendigheter, og det indikerer at de er funksjonelt tilgjengelige hele tiden. En annen type er peptider som vanligvis uttrykkes ved lave eller uoppdagelige nivå. Uttrykk av disse blir oppregulert ved visse omstendigheter, som f.eks. etter en nerveskade. Det vil si at en spesifikk stimulering er nødvendig for at et slikt peptid skal bli funksjonelt relevant. Den tredje typen peptid blir uttrykt tidlig under utviklingen, ofte bare prenatalt, og de blir deretter nedregulert postnatalt. Det er trolig en sammenheng mellom den andre og tredje typen, da mange av peptidene uttrykt forbigående under ontogenesen kan bli "reaktivert" i voksenlivet. Et og samme peptid kan tilhøre alle tre av disse gruppene avhengig av type nevron de blir uttrykt av og hvordan et nevron benytter det gitte peptidet. (16)

Nevropeptider som er kjent og identifisert i *Ciona intestinalis* kan deles inn i 2 grupper. Den første gruppen inneholder peptider som klassifiseres som homologe eller som prototyper av tilsvarende nevropeptider i virveldyr. Den andre gruppen kan klassifiseres som artsspesifikke nevropeptider, det vil si peptider unike for *C. intestinalis*. Videre blir de ulike nevropeptidene som ble benyttet i dette prosjektet introdusert. Utredning av funksjonene og mekanismene til nevropeptider i en modellorganisme som *C. intestinalis* kan gi oss informasjon om homologe nevropeptiders tilsvarende funksjoner og mekanismer hos virveldyr.

1.2.1 Ci-GnRH

Gonadotropinfrigjørende hormoner (GnRH) er hormonpeptider som stimulerer sekresjon av gonadotropiner fra hypofysen. Gonadotropiner fører til syntese av steroidhormoner og stimulerer gonadal modning i virveldyr, og spiller dermed en viktig rolle i reguleringen av reproduktive systemer på diverse måter (24–26). GnRH deltar i nevroendokrine, parakrine, autokrine, nevrotransmitterende og nevromodulerende funksjoner i det sentrale og det perifere nervesystemet (24,25).

C. intestinalis har to GnRH gen, *Ci-gnrh-1* og *-2*. Disse to genene koder tre ulike GnRH peptidsekvenser hver. t-GnRH-3, -5 og -6 blir uttrykt fra *Ci-gnrh-1*, mens t-GnRH-4, -7 og -8 blir uttrykt fra *Ci-gnrh-2* (27). I tillegg er et annet artsspesifikt GnRH peptid kalt Ci-GnRH-X blitt identifisert i det nevralt komplekset hos *C. intestinalis* (28,29). Ci-GnRH-X blir uttrykt i genet kalt *t-gnrh-X* som en enkelt kopi i det sentrale nervesystemet (28,29).

C. intestinalis har fire reseptorer for GnRH, Ci-GnRHR-1, -2, -3 og -4 (23,30,31). Disse reseptorene har ca. 30 % identitet til menneskelig Type I GnRHR, og Ci-GnRHR-1 er 70 %, 38 % og 36 % like til respektivt Ci-GnRHR-2, -3 og -4 (31).

GnRH-reseptorer (GnRHR) induserer økning av intracellulært kalsium i virveldyr (24–26,28,29). Intracellulær kalsium blir bare observert ved binding av nevromodulatoren t-GnRH-6 til reseptoren Ci-GnRHR-1 hos *C. intestinalis* (30). Ci-GnRH-X har en moderat (10–50 %) inhibering på økning av intracellulær kalsium og cAMP produksjon ved t-GnRH-6 binding til Ci-GnRHR-1 og cAMP generering ved t-GnRH-3 og -5 binding til Ci-GnRHR-3, mens Ci-GnRHR-2 ikke ble påvirket (28). Et slik inhiberende peptid av typen GnRH har ikke blitt oppdaget hos noen andre arter (28). Disse funnene indikerer at både GnRH-peptidene og GnRH-reseptorene har utviklet seg sammen gjennom komplekse og evolusjonære signalveier (23).

Ci-GnRH spiller en rolle i andre funksjoner hos *C. intestinalis* enn hos virveldyr, da *C. intestinalis* verken har hypofyse eller gonadotropiner. Det er kjent at t-GnRH-3 og -5 øker aktivitet relatert til gyting i voksne individer (27). I larver er det kjent at GnRH-3 og -5 inhiberer modning av organer ved å nedregulere cellesyklus og haleabsorpsjon, noe som videre utsetter metamorfose i larven (32).

1.2.2 Ci-CT

Kalsitonin (CT) er et hormon som blir frigjort fra skjoldbruskkjertelen i virveldyr, og spiller en viktig rolle i metabolismen av kalsium ved å inhibere aktiviteten til osteoklaster i bein (19). CT i virveldyr består av 32 aminosyrer og er kjennetegnet ved å ha et amidert prolin i C-terminal ende og en sirkulær struktur dannet av en disulfid bro i N-terminal enden. *C. intestinalis* CT (Ci-CT) har tilsvarende egenskaper i N-terminal- og C-terminalendene som CT funnet hos virveldyr.

CT-relaterte peptider blitt funnet i virvelløse dyr slik som *C. intestinalis*, til tross for at de ikke har beinvev. Ci-CT har blitt klonet fra nervekomplekset til voksne *C. intestinalis* (33). Ci-CT genet genererer ingen splicing variant og koder bare for en Ci-CT sekvens (33). Genet blir uttrykt i endostyl (del av gjellene) og nevronal kjertel, noe som indikerer at Ci-CT fungerer som en hormonell faktor hos arten (33). Nervekjertelen er ikke et nerveorgan, men

et svampaktig legeme funnet ventralt for cerebrale ganglion. Interaksjon mellom Ci-CT og deres korresponderende endogene reseptor Ci-CTR har enda ikke blitt observert, og ingen av Ci-CTs fysiologiske funksjoner har blitt belyst enda (20).

1.2.3 Ci-TK

Tachykininer (TK) er hjerne- og tarmpeptider som er involvert i en rekke biologiske funksjoner hos virveldyr, som f.eks. glatt muskelkontraksjon, vasodilatasjon, inflammasjonsprosesser og nevrodegenerasjon (26,34). I virveldyr binder tachykininer seg til G-protein koblete reseptorer (GPCR), som induserer økning i intracellulært kalsium og cAMP produksjon (32).

To tachykininer har blitt isolert fra det nevralt komplekset til *C. intestinalis* (21,35). Disse artsspesifikke tachykininene blir kalt Ci-TK-I og Ci-TK-II, og uttrykkes fra samme ekson i samme forløpergen. Ci-TK peptidene kan indusere sammentrekning av glatt muskulatur i pattedyr, slik som virveldyrs tachykininer. I tillegg har et studie vist at Ci-TK-I induserer økt intracellulær kalsium ved binding til Ci-TKR (35). Ci-TKR er den eneste reseptoren for Ci-TK i *C. intestinalis*, og viser 30-43 % likhet i sekvens til TK-reseptorer funnet i virveldyr (19,23,34,35). Ci-TKR genet er funksjonelt i hjernen, tarmen og i eggstokken til *C. intestinalis* (35). Det er vist at Ci-TK-I fremmer vekst av follikler i eggceller som er relatert til dannelse av eggeplommen (22,36). Det er ukjent om gitt funksjon er bevart i virveldyr. (19,23)

1.2.4 Ci-VP

Vasopressin (VP) er et oligopeptid som tradisjonelt er bygd opp av 9 aminosyrer. Peptidet har blitt identifisert i et bredt spekter av dyrearter, fra pattedyr til protostomier (37–42,29,43,23). VP spiller en sentral rolle i osmoregulering, kontroll av blodtrykk og anti-diuretisk effekt (35–40,28,41,22). VP er også involvert i mekanismer i samband med læring, sosial adferd, angst og autisme (44).

Vasopressinet Ci-VP er blitt identifisert hos *C. intestinalis*. Fordelingen av Ci-VP indikerer at neuropeptidet har en rekke funksjoner og blir overført fra cerebral ganglion til perifere målvev, hvor de utøver fysiologiske funksjoner (20). *C. intestinalis* har én reseptor for Ci-VP, Ci-VPR, og aminosyresekvensen til reseptoren har mellom 35-56 % likhet med

vasopressinreseptorene som finnes hos virveldyr og proteostomier. Reseptoren uttrykkes i fordøyelsessystemet, det nevralt kompleks, endostyl og i gonadene, noe som antyder at peptidets biologiske roller er svært mangfoldig. Ci-VP induserer mobilisering av intracellulært kalsium ved binding til Ci-VPR. (23,39)

1.2.5 Ci-GALP

Galanin og galanin-lignende peptid (GALP) er to nevropeptid som har en rekke biologiske funksjoner hos virveldyr (45). Kawada et al. har detektert et artsspesifikt peptid hos *C. intestinalis* ved peptidomisk analyse (21). Peptidet har blitt kalt Ci-GALP, og omtales som et hybrid mellom galanin og GALP funnet i virveldyr (se **Tabell 2**).

Tabell 2. Sammenligning av aminosyresekvensen til galanin, GALP og Ci-GALP. Konsensus sekvens mellom galanin og GALP hos mennesker er understreket. Stjerner indikerer konsensus aminosyrer mellom GALP og Ci-GALP. C-terminal amidering hos galanin er markert med bokstaven a. (21)

Peptid	Sekvens
Galanin (<i>Homo sapiens</i>)	<u>GWTLNSAGYLLGP</u> HAVGNHRFSFDKNGLTsa
GALP (<i>Homo sapiens</i>)	PAHRGRG <u>GWTLNSAGYLLGP</u> VLHLPQMGDQDGKRETALEILDWLKAIKIDGLPYSHPPQPS
Ci-GALP	PFRGQG GWTLNSVGYNAGL LGALRKLFE
	** * * ***** **

Ci-GALP er det første GALP-peptidet som er karakterisert hos et virvelløst dyr. Hos *C. intestinalis* uttrykkes peptidet i det nevralt kompleks, men det blir i tillegg også funnet i fordøyelseskanaalen.

1.2.6 Ci-LF og Ci-YFV/L

C. intestinalis har to artsspesifikke peptidfamilier kalt Ci-LF og Ci-YFV/L. Ortologer av disse peptidene har ikke blitt funnet i noen andre arter, og har konservert en konsensus sekvens fra et felles Ci-LF forløpergen. Tilsvarende blir Ci-YFV-1 til -3 og Ci-YFL-1 uttrykt fra et annet felles forløpergen. Ci-LF og Ci-YFV/L blir uttrykt fra respektive gener i nevroner i *C. intestinalis* nevralt kompleks (21). For tiden utføres det forskning for å kartlegge deres biologiske funksjoner og tilhørende reseptorer. (23)

1.2.7 Ci-NTLP

Neurotensin (NT) er et peptid som er involvert i fysiologiske funksjoner i SNS, PNS og i det gastrointestinale systemet i pattedyr. Vasodilatasjon er en kjent effekt av peptidet, samt at det viser smertelindrende effekter i PNS. NT stimulerer også hormonfrigjøring fra adenohipofysen. (46,47)

Neurotensin-lignende peptid (Ci-NTLP) er en familie peptider som har blitt detektert hos arten *C. intestinalis* i en studie utført av Kawada et al. (21). Til sammen har 6 peptider som tilhører denne familien blitt identifisert, og de har blitt navngitt Ci-NTLP-1 til Ci-NTLP-6. Studien viste også at Ci-NTLP-1 til -4 blir uttrykt fra forløpergenet *Ci-nt-A*, mens Ci-NTLP-5 og -6 uttrykkes fra *Ci-nt-B*. Ci-NTLP sine sekvenser minner om C-terminal konsensus sekvensen til NT og deres relaterte peptider funnet hos virveldyr. Gitt C-terminal konsensus sekvens er avgjørende for binding av NT peptidfamilien til deres korresponderende reseptorer (47,48). (21)

1.2.8 Head Activator

Head Activator (HA) er et neuropeptid som spiller en viktig rolle i proliferering og bestemmelse av differensiering av stamceller i nesledyrene *Chlorohydra viridissima* og *Nematostella Vectensis*. Stamceller kan enten fortsette med normale cellykluser, eller differensiere seg til nye typer celler. Lave konsentrasjoner av HA promoterer fortsettelse av normal cellyklus, mens høye konsentrasjoner promoterer differensiering. Neuropeptid induserer intracellulære responser via aktivering av cAMP gjennom en GPCR. Reseptoren for genet til HA har en menneskelig homolog kallet SORL1, og det er interessant å merke at mutasjoner i dette genet har blitt knyttet til Alzheimers sykdom. (49,50)

1.3 Visualisering av nerveaktivitet i *C. intestinalis*

Mange av neuropeptidene og nevromodulatorene som ble introdusert tidligere vil antagelig kunne påvirke nerveaktiviteten til *C. intestinalis*. Ved å avbilde nerveceller i *C. intestinalis* etter eksogen applikasjon av neuropeptider kan man direkte undersøke om disse har en merkbar effekt på aktiviteten i nervecellene. Larver som uttrykker CaMPARI i nerveceller kan avbildes ved hjelp av et konfokalt mikroskop, for å undersøke om det skjer en fargekonvertering fra grønn til rød før og etter stråling med 405 nm lys.

1.3.1 CaMPARI

Kalsium-modulert fotoaktiverbar radiometrisk integrator (CaMPARI) er et konstruert fluorescensprotein som kan skifte farge fra grønn til rød. Fargeendringen er avhengig av at proteinet er utsatt for forhøyede kalsiumverdier samtidig som det eksponeres for lys, og endringen er irreversibel. En skjematisk illustrasjon av CaMPARI kan ses i **Figur 4**.



Figur 4. Skjematisk tegning av CaMPARI. CaMPARI, en kalsium-modulert fotoaktiverbart ratiometrisk integrator, er et sirkulær permuert fluoreserende protein med kalsium sensordomener som gjennomgår grønn-til-rød fotokonvertering dersom det blir eksponert for ~400 nm lys ved tilstedeværelse av høy Ca²⁺ (51).

Fargeendringen fra grønn til rød gjør det mulig å visualisere aktive nevrane populasjoner på enkeltcelle- og subsekundsoppløsning (52). CaMPARIs rød/grønn ratio kan indikere aktivitetsnivået til nevronene som følge av at den er en ratiometrisk integrator, og kan dermed korrigere for forskjeller i uttrykkningsnivå. Med andre ord indikerer integratoren om det skjer en økning i influx av kalsium. Økning av intracellulært kalsium skjer ved økning i nevronal aktivitet. Hjernefunksjoner er avhengige av mønstre av synaptiske input og avfyringer av aksjonspotensialer, som kommer i følge med flyktige endringer i konsentrasjonen av fritt intracellulær kalsium ([Ca²⁺]) (53,54).

CaMPARI fungerer også som en negativ fluorescensindikator, da den kan rapportere øyeblikkelig kalsiuminflux om det skjer en reduksjon i fluorescensintensiteten i både det ukonverterte grønne stadiet og det konverterte røde stadiet. (51)

Det finnes per dags dato (2021) to versjoner av CaMPARI, CaMPARI1 og CaMPARI2. Førstegenerasjonen CaMPARI1 har flere feilkilder knyttet til fargeendringer i bakgrunnen ved lav kalsiumkonsentrasjon, treg kinetikk og lavere fluorescens i etterkant av kjemisk

fiksering. CaMPARI2 er andregenerasjon og har sterkere grønn og rød fluorescens, raskere kalsiumkinetikk, samt en minskning av de fargeendringer i bakgrunnen en kan se ved lave kalsiumnivåer. CaMPARI2 har økt fargekontrast mellom grønn og rød slik at det blir lettere å skille mellom kalsiumbundne og kalsiumfrie tilstander. Frekvensen av kalsiumavbindinger er også høyere for CaMPARI2 kontra 1. Siden det eksisterer flere typer celler med ulike kalsiumkonsentrasjoner har det blitt laget en rekke affinitetsvarianter for å kunne imøtekomme hver celletypes krav. (52)

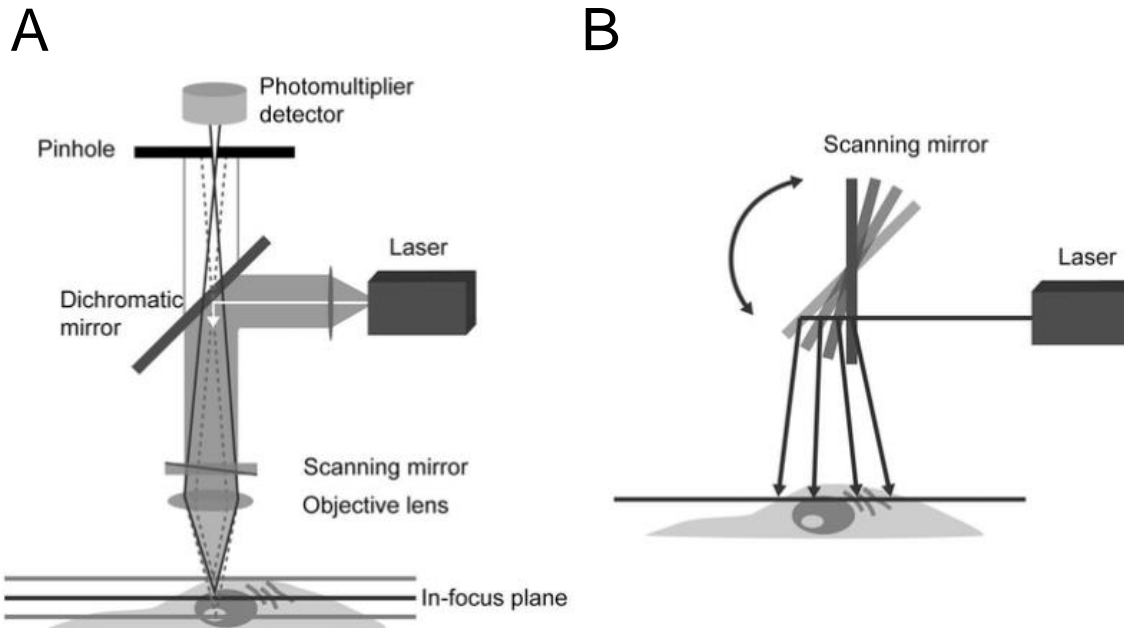
1.3.2 Elektroporering

Elektroporering er en form for transfeksjon som ble anvendt i dette prosjektet for å introdusere DNA som uttrykker CaMPARI2 inn i genomet til manuelt befruktete embryoer av arten *C. intestinalis*. Metoden er et mektig verktøy som kan brukes på hundrevis av artens embryoer samtidig (9,55).

Ved elektroporering blir en løsning som inneholder plasmid DNA blandet sammen med embryoer i en-celle stadiet. Blandingen blir deretter pipettert opp i en elektroporeringskvyvette som utsettes for elektrisk strøm. Elektriske impulser benyttes for å midlertidig gjøre cellemembranen til den eukaryote cellen permeabel for DNA. Metoden revolusjonerte studiene på embryogenesen til *C. intestinalis* siden tusenvis av synkroniserte, transgene embryoer kunne bli genererte ved å klikke på en knapp. I dag brukes metoden i laboratorium over hele verden (56). (57)

1.3.3 Konfokal mikroskopi

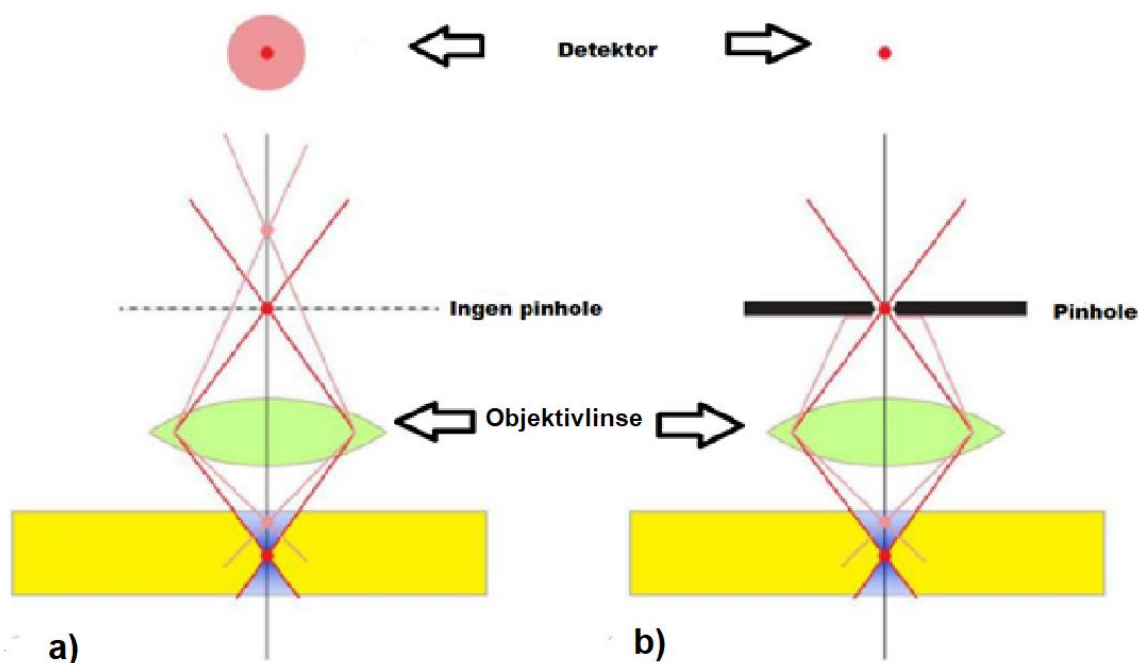
Konfokal mikroskopi gjør det mulig å visualisere nerveaktivitet hos klekte *C. intestinalis* larver fra elektroporete embryo, som har fått CaMPARI introdusert inn i sitt genom. En skisse av oppbyggingen til et konfokalt mikroskop blir vist i **Figur 5**.



Figur 5. Komponenter i et konfokalt mikroskop. **A.** Lys fra laser passerer gjennom linseoptikk som gjør at alle lysstråler som passerer igjennom blir parallelle. Videre treffer laserlyset et dikromatisk speil som reflekterer det mot objektivlinsen. Objektivlinsen vil fokusere lyset på ett punkt i prøven. "Scanning mirror" beveger laserstrålen før den treffer objektivlinsen, slik at lyset vil treffe alt innenfor et synsfelt, punkt for punkt. Emittert fluoreserende lys fra prøven passerer gjennom objektivlinsen, det dikromatiske speilet og treffer detektoren. **B.** Illustrasjonen viser hvordan "scanning mirror" beveger seg for at lyset skal treffe alle punkt i et synsfelt. (58)

Bruk av konfokal mikroskopi er fordelaktig over bruk av fluorescensmikroskopi. I fluorescensmikroskopi vil alle fargemolekyl innenfor et synsfelt som blir stimulert til å sende ut lys bli plukket opp av detektoren, inkludert de som er utenfor fokus. Dette vil skape uskarpe bilder. Konfokale mikroskops oppbygning gjør at den kan avvise lys som er ute av fokus, og dermed oppnå skarpe bilder. Konfokale mikroskoper kan utføre optisk seksjonering, det vil si ta bilder av høy oppløsning gjennom tykke snitt. Sammensetting av snitt med høy oppløsning tillater for danning av tredimensjonale rekonstruksjoner av snitt og vev. (58)

Prinsippet for oppbyggingen til et konfokalt mikroskop er bruk av belysning og deteksjon som er fokusert på et enkelt plan. Dette planet kan beveges gjennom snittets vertikale akse for å bygge et komplett bilde på detektoren. Hele området innenfor et synsfelt i mikroskopet vil bli belyst, men alt lys utenfor det enkelte fokusplanet vil bli avvist. Dette blir oppnådd ved hjelp av at lyset passerer gjennom et lite nålehull, kalt et 'pinhole', før det treffer detektoren. Prinsippet for 'pinhole' er illustrert i **Figur 6.** (58)



Figur 6. Illustrasjon som viser hvordan et pinhull avviser lys som er ute av fokus. Lysstrålene er illustrert som røde linjer. Lysstråler som er ute av fokus er illustrert som rosa. Eksempel a) viser en detektor uten pinhull. Detektoren vil plukke opp lysstråler som er både i og ute av fokus. I eksempel b) er det introdusert et pinhull. Nålehullet blokkerer nesten alt av lys som er ute av fokus. (59)

Den kritiske fylogenetiske posisjonen til sekkdyret (Ascidiacea) *Ciona intestinalis*, som virveldyrs nærmeste slektning, gjør den til en god kandidat som modellorganisme for en rekke biologiske begivenheter (23). Blant disse biologiske begivenhetene kan nerveregulering, neuroendokrin og endokrin regulering inkluderes. Det nevrone nettvirket til *C. intestinalis* har blitt verifisert i deres utviklende og voksne stadie, men artens nevrovitenskap har enda ikke blitt særlig utforsket (60,61,23). Dette prosjektet ønsker å undersøke om 31 av *C. intestinalis* sine 40 identifiserte neuropeptider medfører endringer i artens bevegelsesmønster. Brown og Bivort sier at bevegelse er det ultimate utløpet for nervesystemet til dyr (62). Ved å spore og analysere om det skjer endringer i bevegelsesmønsteret kan man dermed studere det underliggende nervesystemet, som er av interesse. Det er i tillegg ønskelig å undersøke om eksogen tilsetning av neuropeptider vil inducere økning eller minking i fraksjonen larver som svømmer og som har startet sin metamorfose i petriskåler.

2. Metode

2.1 Ethiske betraktninger

De biologiske materialene som ble anvendt i dette bachelorprosjektet er larver og voksne individ av arten *Ciona intestinalis*. Arten er som kjent et virvelløst dyr under rekken kappedyr. Det medfører at de er unntatt fra de strenge etiske betraktningene som finnes i henhold til forskning utført på virveldyr.

Alle dyr benyttet i eksperimentell del av dette prosjektet ble behandlet med varsomhet og respekt. For å unngå at dyrene skulle føle noen form for stress ble hvert individ bare brukt en gang for gyting eller disseksjon. I tillegg bør det nevnes at *C. intestinalis* ikke evner å kjenne smerte. Alle metoder ble utført i samsvar med bioingeniørers yrkesetiske retningslinjer.

2.2 Innsamling og oppbevaring av dyrene

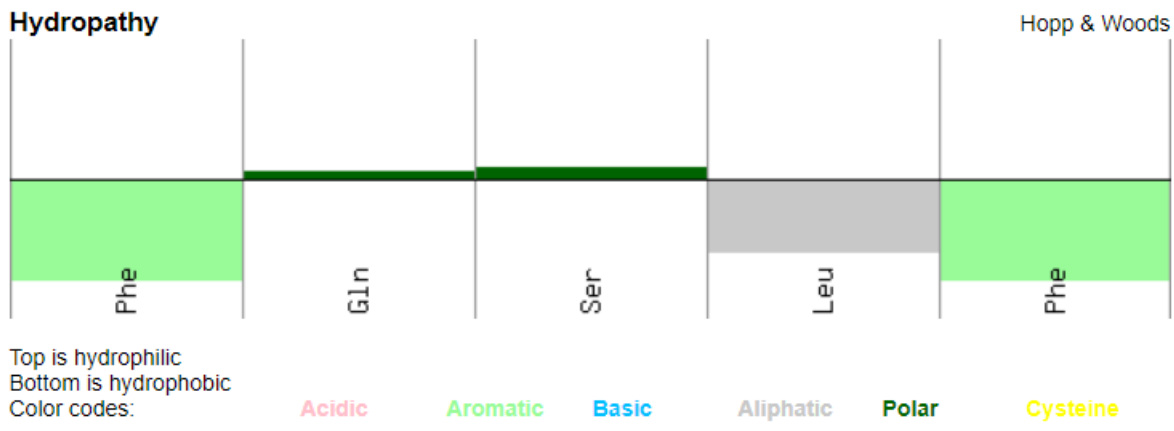
Voksne tarmsekkdyr ble lokalt samlet inn ved Bildøy Marina i Døsjevika, omtrent 15 minutter fra Bergen sentrum. Forskningsinstitusjonens laboratorium hadde egnede oppbevaringstanker med filtrerende sjøvann. Dyrene ble oppbevart ved 14 °C og matet med plankton. Kunstig tillaget sjøvann (ASW) er benyttet i alle metoder for dette prosjektet. Det kunstige sjøvannet hadde en salinitet på ca. 35 ‰ og pH mellom 8,0 - 8,8.

2.3 Tillaging av løsninger med neuropeptider

Neuropeptidene kom enten i pulver- eller væskeform i beholdere med volum på 2 mL. Oversikt over alle neuropeptider som ble benyttet i dette prosjektet er presentert i **Tabell 1**. Peptidenes molekylærvækt (Da) og vekt (mg) var oppgitt på beholderen. Produsenten av peptidene var det nederlandske firmaet *GenScript*.

Det var ønskelig å lage en 10 mL løsning som inneholdt en type neuropeptid med en konsentrasjon på 50 µM. Det ble først tillaget stamløsninger med en konsentrasjon på 50 mM. For å lage disse ble mengden diluent som skulle tilsettes pulveret beregnet og tilsatt. Stamløsningene ble videre fortynnet med kunstig sjøvann for å danne ønsket konsentrasjon på 50 µM. Peptidene hadde varierende løselighet, avhengig av forholdet mellom hydrofile og hydrofobe aminosyrer. Peptider med dårlig vannløselighet ble løst ved hjelp av det organiske

løsningsmiddelet dimetylsulfoksid. LF-1s hydropati, som gir et mål på en aminosyres hydrofobe egenskap, blir vist som eksempel i **Figur 7**.



Figur 7. Vannløselighet for neuropeptidet Ci-LF1. (63)

Alle isoformer av neuropeptidet Ci-LF har et terminalt fenylalanin (Phe), noe som gjør at alle peptider i denne gruppen er hydrofobe og uløselige i vann. Dimetylsulfoksid ble derfor benyttet som diluent for alle isoformer av Ci-LF.

"Scrambled peptide" levert av produsenten *GenScript* ble brukt som negativ kontroll i dette prosjektet. Peptider består som kjent av en serie av aminosyrer i en bestemt sekvens. Et "scrambled peptide" er et peptid som er blitt dannet med randomisert rekkefølge på sine aminosyrer. Siden aminosyrerekkefølgen er blandet, medfører det at tilsetning av løsning som inneholder slike peptider i eksperimentelle forsøk ikke vil føre til noen endringer eller modulering hos *C. intestinalis*. De aktiverer altså ikke noen av artens reseptorer. Negativ kontroll ble tillaget med en konsentrasjon på 50 mM, altså samme konsentrasjon som de andre peptidløsningene.

2.4 Settlement

Undersøkelse av settlement ble utført for å finne ut om tilsetning av 31 ulike neuropeptider til petriskåler ville påvirke larvers metamorfose. Hensikten med metoden var med andre ord å observere om addering av neuropeptid til vannet ville føre til at flere eller færre larver festet seg til bunnen av skålen for å starte sin radikale transformasjon. 30-100 larver ble plassert i små petriskåler med en diameter på 35 mm og høyde på 10 mm (*Sarstedt*). For hvert peptid ble minst 20 skåler talt. Skålene ble fylt opp til de var $\frac{3}{4}$ fulle med ASW etter at larvene var tilsatt. 50 μ L neuropeptidløsning ble så addert i sjøvannet for å undersøke om de ville ha en

eksogen virkning på larvene. Det ble også tillaget kontrollskåler hvor "scrambled peptide" ble benyttet som negativ kontroll. Skålene ble inkubert ved 14 °C over natt.

Neste dag ble antall svømmende larver og antall larver som hadde påbegynt metamorfose talt med en manuell håndteller. For å illustrere forholdet mellom svømmende og metamorfiske larver ble data ført inn i Excel, og overført til programmet GraphPad for å danne fiolinplott. Det ble utført Kruskal-Wallis test for å bestemme om det var statistisk signifikante forskjeller mellom medianverdi for negativ kontroll og medianverdi for de ulike neuropeptidene.

2.5 Tillaging av arenaer

Arenaer ble benyttet til forsøk der bevegelsesmønsteret til larver ble tracket i det horisontale trackingoppsettet. For å unngå krysskontaminering ble det støpt nye arenaer for hvert neuropeptid. Arenaene ble støpt med en agaroseløsning som hadde en konsentrasjon på 0,7 %. Agaroseløsningen ble laget ved å blande 150 mL kunstig sjøvann (ASW) med 1,05 g agarosepulver i en 250 mL reagensflaske av glass med skrukork. Blandingen ble oppvarmet i mikrobølgeovn i ca. 5 minutter til pulveret var fullstendig oppløst. Ti 3D-printede støpeformer til arenaer var til rådighet (se **Figur 8**).

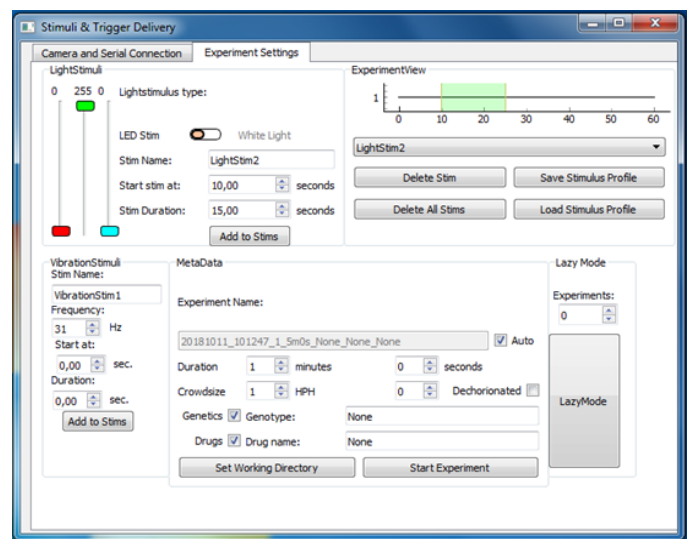


Figur 8. Støpeform og arena som ble benyttet til horisontal tracking av larvers bevegelsesmønster. Arenaene ble støpt i en agaroseløsning med konsentrasjon på 0,7 % i petriskåler.

Støpeformene ble skylt og rensert i dH₂O før bruk. Tillaget agaroseløsning ble overført til petriskåler med diameter på 35 mm. Petriskålene ble plassert på en plate avkjølt med kaldt rennende vann, før agaroseløsningen ble tilsatt. Støpeformene ble festet til petriskålens kant innen løsningen stivnet, og ble fjernet etter omtrent 30 minutter. De ferdig støpte arenaene ble deretter hydrert med ASW i 30 min før bruk. Hydrerte arenaer ble oppbevart i inkubatorskap med en gjennomsnittstemperatur på 14 °C.

2.6 Horizontal tracking

Ansatte ved Sars senteret har de seneste årene utviklet en modulær maskinvare for å kunne tracke det horisontale bevegelsesmønsteret hos larver. Oppsettet består av modulære trackere med en dedikert programvare som håndterer filming av video, metadata annotering og en robust datastruktur som gjør det overkommelig å håndtere store prosjekter. Systemet benyttet til å filme larvenes bevegelsesmønster ble startet opp ved å åpne Spyder (IDE for Python 3.6) på en stasjonær PC som var koblet til oppsettet. Tre konsoller (en for hvert kamera) ble opprettet i programmet, se **Figur 9**.



Figur 9. Konsoll som ble benyttet for å velge riktig innstilling for videoopptak av larvene.

I konsollen ble hvert kamera koblet til, samt en seriekobling til oppsettet. For optimal videokvalitet ble eksponering på 0,00390625, "brightness" på 0, gamma på 1 og IR på 40 valgt i konsollens innstillinger. 2 videoer med "framerate" på 30 fps ble filmet av hver larve i hver runde ved å sette i gang LazyMode, der hver video hadde en varighet på 15 minutter. Det vil si at en runde bestod av 2x15 minutters videoer. Nyklekte og aktive larver i petriskåler fylt med ASW ble pipettert opp i glasspipette med ballong i lysmikroskop (*Nikon SMZ645*), og plassert i hver sin arena. Hver arena ble følgelig tilsatt neuropeptidløsning i forholdet 1 del ASW til 1 del neuropeptidløsning for å undersøke deres eksogene virkning på larvene. Oppsettet er bestående av 3 kamera, og det var derfor mulig å filme 3 larver i 2x15 min i hver runde.

Alle innsamlede videoer ble analysert ved å bruke programmet ToxTrac (versjon 2.91). Dette er en gratis programvare for Windows som kan benyttes for å tracke (spore) organismer. Analyse gav blant annet resultater i form av en Excel-fil som ble brukt for å vurdere bevegelsesmønsteret til organismen. Etter analyse i ToxTrac, trengte videoene videre analyse i en egen programvare utviklet av Sars senterets ansatte for analyse av bevegelse.

2.7 Ekstrahering av eggceller og sædceller

For å utføre manuell befruktning ble egg- og spermceller fra voksne individer av *C. intestinalis* ekstrahert. Zygoter ble tillaget ved fertilisering in vitro og elektroporert for å skape larver med ønsket DNA introdusert i genomet. En liten saks, to typer pinsetter (for å perforere egg- og sædkanal), samt lang og kort glasspipette med ballong ble benyttet i denne sammenhengen. Den atriale sifonen til dyret ble først lokalisert, siden dette er et egnet startsted for dissekering. Det ytterste laget fra sifonens åpning til den andre enden av dyret ble klippet opp. Flere lag ble gjerne klippet gjennom for å lettere komme til gametenes kanaler. Dyrets egg- og sædkanal ble slik synlig og eksponert, som vist i **Figur 10**.



Figur 10. Tarmsekkdyr har et tykt ytre lag som klippes opp for å få eksponert egg- og sædkanal ved disseksjon i forkant av kunstig befruktning.

Større pinsett ble anvendt for å danne et lite hull i eggkanalen. Deretter ble eggene varsomt sugd opp ved hjelp av en glasspipette med lang spiss. Etter å ha ekstrahert eggene, ble de pipettert ned i et Falcon-rør (VWR®) fylt med ASW. Rør med eggceller ble avkjølt stående i kaldt rennende vann. Mindre pinsett ble så brukt til å perforere et hull i sædkanalen litt lenger opp på dyret. Glasspipette med kort spiss ble brukt til å samle opp sperm, som deretter ble plassert i et eppendorfrør (*Sarstedt*) og merket med dato. Sædceller ble oppbevart i kjøleskap etter bruk.

2.8 Fertilisering og elektroporering

Elektroporering ble utført for å sette inn ønsket plasmid-DNA i zygoter av arten *Ciona intestinalis*. Ekstraherte egg- og sædceller ble manuelt befruktet for å lage zygoter som skulle elektroporerer. I dette prosjektet ble DNA av typen PC2>CaMPARI introdusert inn i embryone ved hjelp av denne metoden.

En natriummiks ble tillaget ved å måle opp 10 mL NaTio (*Merck*) i et Falcon-rør og tilsette 10 dråper 1 M NaOH. Natriummiksen ble holdt avkjølt i rennende kaldt vann. Natrium Tioglykolat (NaTio) ble laget ved å tilsette 50 mL ASW til et rør som inneholdt 0,4 g av stoffet i pulverform, før en adderte omtrent 100 μ L 2,5 % pronase (*Merck*) til løsningen. Etter bruk ble NaTio oppbevart lysbeskyttet i kjøleskap.

DNA for PC2>CaMPARI ble preparert i et eppendorfrør ved å tilsette DNA-løsning og destillert vann til et totalvolum på 100 μL . Mengde DNA løsning som skulle adderes ble bestemt utfra konsentrasjon målt ved spektrofotometrisk måling. Deretter ble 400 μL mannitol pipettert i samme rør, slik at det til sammen ble et totalvolum på 500 μL . Løsningen ble så plassert i 14 °C inkubator sammen med en elektroporeringskyvette med 4 mm avstand mellom elektrodene (*Molecular BioProducts*) og en 2 mL mikrotube (*VWR*[®]), begge hydrert med ASW. Et eppendorfrør med 50 μL Tris, pH 9.5 ble også avkjølt i inkubatoren før bruk.

De ekstraherte eggcellene ble pipettert opp fra Falcon-rør tilsatt ASW over til røret som inneholdt natriummiksen. Røret med egg og natriummiksen lagt på en rister i ca. 10 min for å dechorionisere eggene. NaTio ble fjernet fra røret, eggene ble så vasket tre ganger med ASW. Deretter ble eggene overført til en mindre petriskål. Urenheter og membranrester ble vasket vekk tre ganger med ASW i lysmikroskop.

Før fertilisering ble sædceller aktivert. Aktiveringen ble utført ved at avkjølt 50 μL Tris ble hentet fra inkubatorskap, og tilsatt 950 μL ASW og 15 μL sperm. 50 μL av blandingen med aktivert sperm ble tilsatt eggenes petriskål. Eggene ble observert i mikroskopet frem til alle eggene begynte å spinne i sirkel etter ca. 8 minutter, da dette var ensbetydende med at fertiliseringen var vellykket. Dersom spinning ikke kunne observeres ble mer aktivert sperm tilsatt. Overflødig sperm ble deretter vasket vekk i mikroskopet med ASW. Befruktede egg ble varsomt overført til hydrert 2mL mikrotube og tilsatt DNA. Løsningen ble deretter overført fra mikrotuben til hydrert elektroporeringskyvette.

Elektroporeringen utføres ved hjelp av instrumentet *GenePulser Xcell*[™] med *CE Module* og *ShockPod*[™] kyvettekammer (*Bio-Rad*). Instrumentet ble innstilt på 50 V, 1000 i kapasitet (C), uendelig motstand (R) og 4 mm avstand mellom elektrodene. Elektroporeringskyvetten ble plassert i instrumentets kyvettekammer og gitt elektrisk puls. Den elektropørerte løsningen ble overført til en petriskål. Eksploberte egg og urenheter ble vasket vekk i mikroskopet med ASW. 50 μL av antibiotikumet streptomycin ble pipettert i petriskålen. Zygote ble plassert i inkubatorskap (14 °C). Etter 36 timer ble larvene klekt og kunne mikroskoperes i et laserskannende konfokalt mikroskop.

2.9 Konfokal mikroskopi

Det konfokale mikroskopet Olympus FV3000 ble brukt til å visualisere nervesystemet til *C. intestinalis* ved hjelp av CaMPARI2. 35 mm petriskåler med dekkglass og glassoptikk i bunnen (*MatTek*[®]) ble benyttet.

Petriskålenes område for glassoptikk ble tilsatt 5-10 elektroporererte larver som uttrykker CaMPARI-transgenet. Dette området ble så fylt opp med 1 del ASW og 1 del agarosegel som hadde lavt smeltepunkt. Petriskålen ble satt på kuldeplate i omtrent 3 minutter til løsningen stivnet, slik at dyret lå i ro under mikroskopering. Da agarosen hadde stivnet ble skålen plassert på mikroskopet og resterende del av bunn fylt med 1 del ASW og 1 del ønsket peptidløsning eller kontroll. Minst 10 larver ble avbildet for negativ kontroll og hvert peptid.

Konfokalt mikroskop og lasere med bølgelengde 405 nm, 488 nm og 561 nm ble slått på, samt sammenkoblet PC med programvare. Ved mikroskopering ble individene først lokalisert i petriskålen ved 10x forstørrelse, og hvert individs posisjon ble lagret. Mikroskopets programvare ble satt til forhåndslagrede innstillinger som gjaldt for CaMPARI. Innstillingen for CaMPARI besto av fire såkalte laserkanaler, hvorav kanal 1 var UV-kanal, kanal 2 grønt lys (EGFP), kanal 3 rødt lys (Kaede-red) og kanal 4 hvitt lys. Kanalene var delt inn i to grupper, gruppe 1 besto av kanal 2 (grønt lys) og 4 (hvitt lys), gruppe 2 besto derfor av kanal 1 (UV-lys) og kanal 3 (rødt lys). For å kunne avbilde hvert individ, ble okularene først satt til posisjon for individ og fokus funnet ved 20x forstørrelse. Resten av analysen ble gjort på datamaskin ved hjelp av mikroskopets programvare.

Da individet var i fokus ble vinkelen rotert slik at larvens hode lå vannrett. Bildet ble loddrett beskåret slik at det ikke ble unødvendig tomrom med i LSM avbildningen (Laser scanning microscopy). Videre ble startposisjon øverst på dyrets hode og stopposisjon nederst på dyrets hode ble valgt for å angi antall stacks eller skiver mikroskopet skal avbilde. Disse skivene kan etter gjennomført avbildning settes oppå hverandre for å danne en 3D-modell av dyret.

Den første avbildningen, pre stråling, ble foretatt i gruppe 1 (kanal 2 og 4). Da pre var foretatt, byttet en til gruppe 2 og bestrålte larven i 20 sekunder med UV-laseren (405 nm) på 30 %. Videre ble dyret igjen avbildet, post stråling. Ved avbildning for post var det derfor

kun kanal for rødt lys (3) som bestrålte dyret. Slik ble det dannet en tredimensjonal rekonstruksjon av hver larve og deres nevronale aktivitet før og etter UV-bestråling.

Forholdet mellom grønt og rødt signal ble undersøkt ved hjelp av programvaren Fiji (*ImageJ*) for bildeanalyse. Alle lag fra nederst til øverst i dyret ble her satt sammen til ett bilde kalt en stack med maksimal intensitet i programmet. Områder med signal i prøven, ROI, ble manuelt markert. Lysintensitet for rødt og grønt lys ble slik funnet for avbildningene for både pre og post UV-bestråling. Lysintensitetene kom ut i en tabell som tall som ble satt inn i Excel, hvor formler for ratio og delta ble benyttet til å beregne forholdet mellom lysintensitet pre og post UV-bestråling.

2.10 Vertikalt trackingoppsett

Det var opprinnelig planlagt å tracke larvene til *C. intestinalis* i et vertikalt trackingoppsett, som skulle kunne dokumentere larvenes bevegelsesmønster etter lysstimuli og tilsetning av neuropeptidløsninger på video. Oppsettet og programvaren ble konstruert av elektronikkstudenter fra Høgskulen på Vestlandet under prosjektperioden.

Et større antall larver i ASW og neuropeptidløsning skulle bli tilsatt en kyvette og satt inn i det lystette instrumentets kammer. Lysstimuli var en sentral del av dette forsøket og formålet med metoden var å se om tilsetning av neuropeptid ville endre larvenes svømmemønster etter lysstimuli.

Ingen presenterbare resultater ble samlet inn fra dette oppsettet, som følge av at oppsettet ikke ble operativt i tide. Gravitasjonsoppsettet ble testet ut for å finne optimale innstillinger. Tilbakemeldinger på brukervennligheten til programvaren og instrumentet under testing ble gitt til utviklerne, og vil kunne komme til nytte videre i utviklingen mot et operativt oppsett.

2.11 Ekstrahering av CaMPARI-DNA

cDNA fra *E. coli* ble ekstrahert ved hjelp av NucleoBond® Midi kit (MACHEREY-NAGEL). Henviser til protokoll fra produsenten av kitet for full prosedyre (64).

For å kunne ekstrahere ønsket cDNA fra bakteriecellene ble de først høstet ved sentrifugering, slik at de ble samlet i en pellet. Pelleten ble resuspendert og tilsatt lysesbuffer for å lysere bakteriecellene. Lysatet sto så i 5 minutter før det ble tilsatt nøytraliseringsbuffer. Den nøytraliserte lysatet ble så filtrert i kolonne.

Da lysatet var ferdig filtrert og lå nederst i kolonnen, ble et Falcon-rør plassert under kolonnen. Kolonnen ble deretter tilsatt elueringsbuffer for å eluere DNA ut av kolonnen og ned i Falcon-røret. Isopropanol ble tilsatt Falcon-røret for utfelling, slik at DNAet igjen ble konsentrert i en ny pellet. For å vaske pelleten ble den tilsatt etanol (70 %). Etter vask ble etanolen pipettert ut. Pelleten ble så tørket i romtemperatur.

Ekstrahert cDNA ble klargjort til bruk ved å fortynne den tørkede pelleten. For å bestemme om forsøket var vellykket, ble det ferdige produktet testet ved hjelp av spektrofotometrisk måling (UV).

2.12 Statistiske metoder

For variansanalyse i evaluering av hvordan neuropeptider påvirker larvers metamorfose ble innsamlede data analysert ved Kruskal-Wallis test. Kruskal-Wallis test er en ikke-parametrisk rangsumtest som sammenligner varians i tilfeller med mer enn to datasett. I dette tilfellet ble medianverdier for neuropeptider sammenlignet opp mot medianverdi for negativ kontroll. Kruskal-Wallis test ble utført ved hjelp av Excel. Alfaverdien i hypotesetesten ble satt til 0.05. Nullhypotesen ble forkastet når $p < 0.05$, og forskjellen mellom et peptid og negativ kontroll ble dermed regnet som statistisk signifikant. (65)

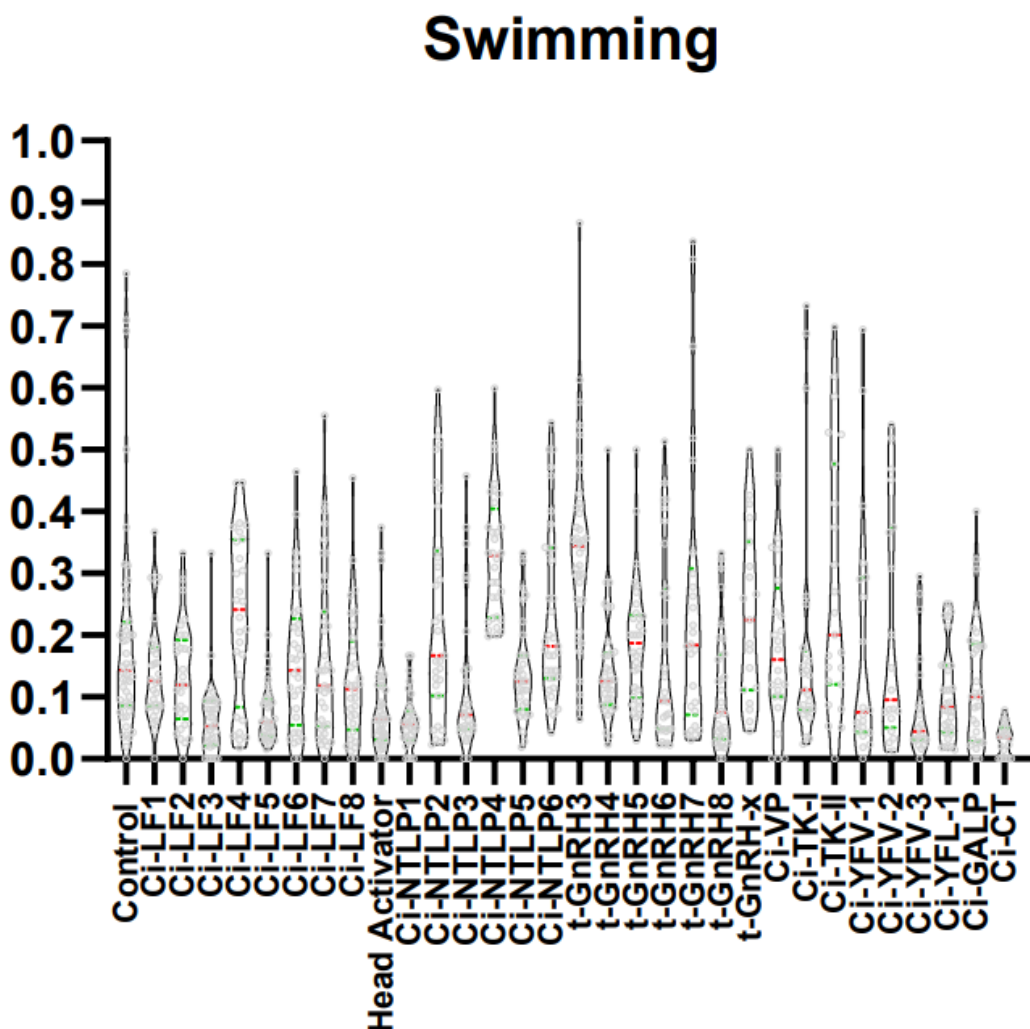
Det ble dannet fiolinplott for datasettene ved hjelp av programvaren GraphPad. Fiolinplott er lik boksploTT, på den måten at den presenterer i hvilke kvartiler data ligger fordelt. Fiolinplott viser også sannsynlighetstettheten for data.

3. Resultat

3.1 Settlement

Det ble undersøkt hvordan ulike neuropeptider påvirket larver av *C. intestinalis* evne til metamorfose. Resultater fra settlement viser om addering av 31 forskjellige neuropeptider til petriskåler med larver fører til at flere eller færre larver fester seg til bunnen av skålen for å starte sin radikale transformasjon.

Fordelingen mellom svømmende og metamorfiske larver for negativ kontroll (“scrambled peptide”) og neuropeptider er visualisert i fiolinplottet i **Figur 11**.



Figur 11. Andel svømmende larver etter eksogen tilsetning av neuropeptider. Røde linjer viser medianverdier, og grønne verdier viser øvre og nedre kvartiler. Grå sirkler viser individuelle datapunkter og representerer en petriskål. Y-aksen viser ratio mellom svømmende larver og larver som har påbegynt metamorfose, uttrykt som $\frac{\text{svømmende larver}}{\text{svømmende larver} + \text{larver med påbegynt metamorfose}}$.

Fiolinplott for ratio av svømmende larver viser at Ci-LF-3, Ci-LF-5, Head Activator (HA), Ci-NTLP-1, Ci-YFV-3 og Ci-CT har en medianverdi som er mindre sammenlignet med negativ kontroll medianverdi, som ligger på rundt 0,15. Fiolinplottet viser også at spesielt neuropeptidene Ci-NTLP-4 og t-GnRH-3 sine medianverdier er høyere, sammenlignet med negativ kontroll medianverdi.

Videre ble en Kruskal-Wallis test utført for å bestemme om det var statistisk signifikante forskjeller mellom medianverdi for negativ kontroll og medianverdi for de ulike neuropeptidene. Varianser ble akseptert som signifikante for $p < 0.05$. De neuropeptidene som hadde en større varians enn satt grense blir presentert i **Tabell 3**.

Tabell 3. Oversikt som viser effekten neuropeptider hadde på ratio av svømmende larver etter tilsetning..

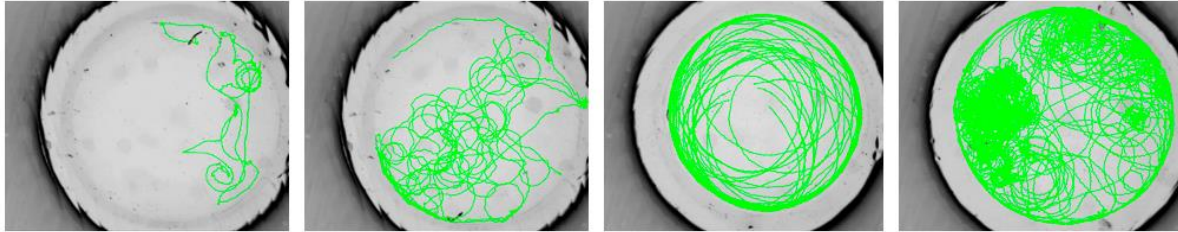
Nevropeptid	Svømmende larver
Ci-LF3	Færre ↓
Ci-LF5	Færre ↓
HA	Færre ↓
Ci-NTLP1	Færre ↓
Ci-NTLP4	Flere ↑
t-GnRH3	Flere ↑
Ci-CT	Færre ↓
Ci-YFV3	Færre ↓

Kruskal-Wallis test viste at peptidene Ci-LF-3, Ci-LF-5, HA, Ci-NTLP-1, Ci-NTLP-4, t-GnRH-3, Ci-CT og Ci-YFV-3 var signifikant forskjellig fra kontrollverdi. Av disse hadde Ci-NTLP-4 og t-GnRH-3 flere svømmende larver enn negativ kontroll, mens Ci-LF-3, Ci-LF-5, HA, Ci-NTLP-1, Ci-CT og Ci-YFV-3 hadde færre svømmende larver enn negativ kontroll.

3.2 Horisontal tracking

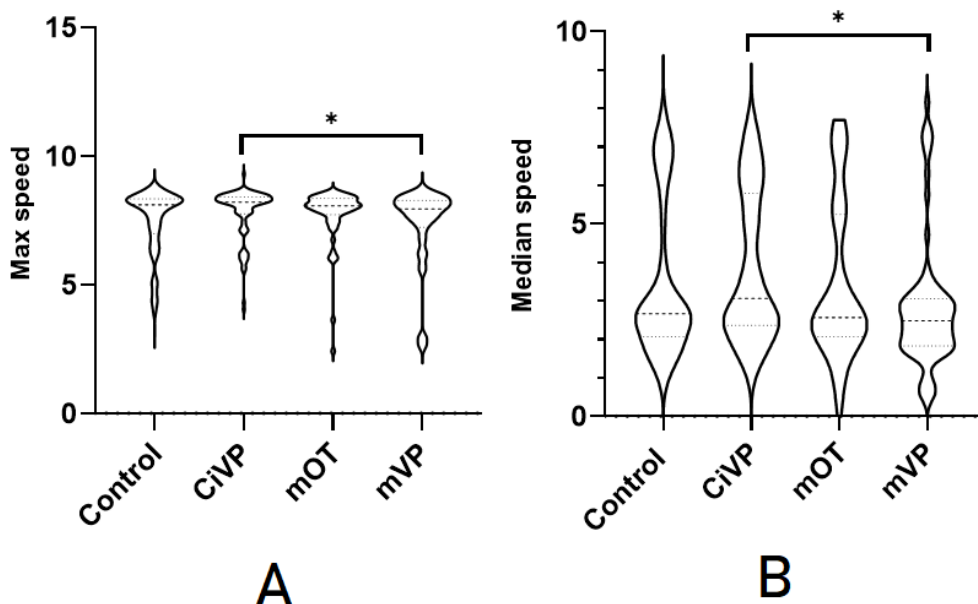
For å videre undersøke hvordan neuropeptidene påvirker larvers atferd, ble det utført tracking av larvers bevegelse i nærvær av neuropeptider. Det ble foretatt tracking av *C. intestinalis* larver tilsatt neuropeptider og negativ kontroll, for å finne eventuelle ulikheter knyttet til svømmehastighet, svømmedistanse og forflytning i arenaer. I løpet av prosjektperioden ble 1260 videoer filmet i det horisontale trackingoppsettet, men det var ikke mulig å fullføre

analysering i tide til å legge fram resultater fra denne delen av prosjektet. **Figur 12** viser noen eksempler på hvordan bevegelsesmønsteret til larver så ut etter utført trackinganalyse i programmet ToxTrac.



Figur 12. Eksempel på ulike bevegelsesmønstre (grønne baner) funnet etter analyse av 15 minutters videoer med 30 fps i programmet ToxTrac.

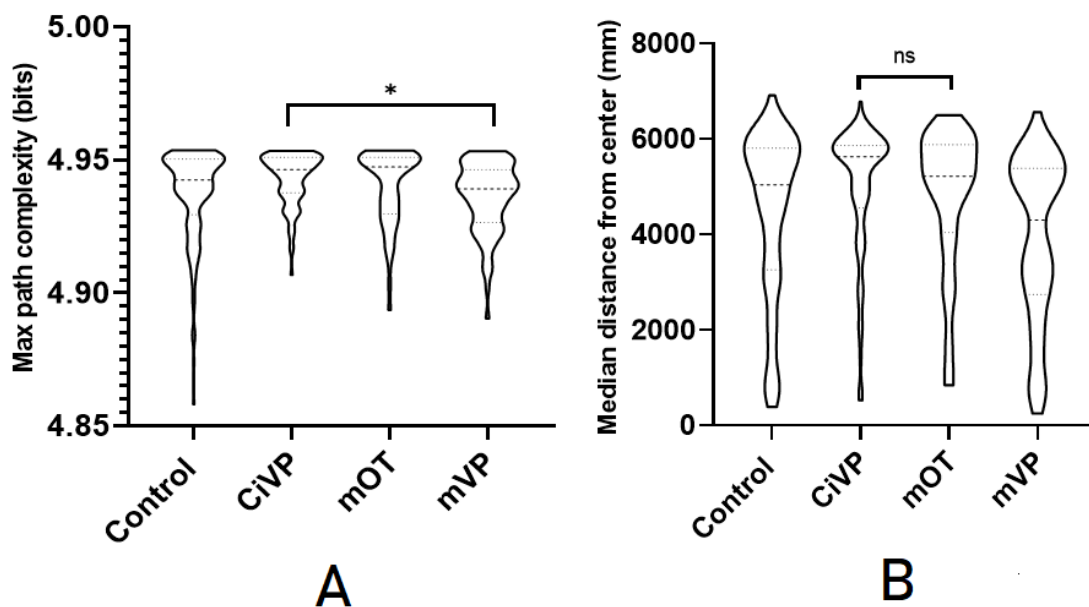
Upubliserte data fra tidligere forsøk utført ved samme forskningsinstitusjon presenteres for å vise hvordan neuropeptider påvirker bevegelsesmønsteret til *C. intestinalis*. Forsøket ble utført av Ruya Houssein (2020), og undersøkte oksytocin- og vasopressinlignende neuropeptiders påvirkning på bevegelsesaktiviteten til *C. intestinalis* (66). **Figur 13** og **Figur 14** viser resultater for larver tilsatt negativ kontroll, Ci-VP, mammalsk oksytocin (m-OT) og mammalsk vasopressin (m-VP).



Figur 13. Farten til larver i nærvær av peptider. Tykk stiplet linje representerer medianverdi. Tynn stiplet linje viser øvre og nedre kvartiler. **A.** Maksimal fart oppnådd av larver etter eksogen tilsetning av negativ kontroll, Ci-VP, mammalsk oksytocin (m-OT) og mammalsk vasopressin (m-VP). **B.** Median av farten til larver etter tilsetning av kontroll, Ci-VP, m-OT og m-VP.

Fiolinplott A i **Figur 13** viser maksimal hastighet etter tilsetning av de ulike peptidene. Det viser seg at larvene tilsatt Ci-VP har en medianverdi som er en høyere enn m-VPs. Nedre kvartil er i tillegg lavere for m-VP enn for Ci-VP. Øvre kvartil er omtrent ved lik linje. For fiolinplott B i samme figur, er medianfarten for larver tilsatt Ci-VP signifikant høyere enn for de øvrige. Både øvre og nedre kvartil hos Ci-VP er ved en høyere median hastighet. Plottet viser også at Ci-VP har flere dyr i det høyere hastighetssjiktet enn m-VP.

Kruskal-Wallis test ble utført for å avgjøre om det var statistisk signifikante forskjeller mellom Ci-VP og m-VP. Varianser ble som kjent akseptert som signifikante ved $p < 0,05$. Maks hastighet for Ci-VP var $239,7 \mu\text{m/s}$, mens m-VP hadde en toppfart på $190 \mu\text{m/s}$. Kruskal-Wallis test gav her $p=0,0446$, altså signifikant forskjell. For medianfarten var hastigheten til Ci-VP på $239,5 \mu\text{m/s}$ og m-VP på $190 \mu\text{m/s}$. Den statistiske testen gav $p=0,0446$ for medianfarten. Både medianfart og maksimal fart er med andre ord signifikant ulik m-VP. Larvene som ble tilsatt Ci-VP hadde altså en signifikant høyere hastighet enn m-VP. Fiolinplott for resultater knyttet til larvers bevegelsesmønster kan ses i **Figur 14**.



Figur 14. Bevegelsesmønsteret til larver i nærvær av peptider. Tykk stiplet linje representerer medianverdi. Tynn stiplet linje viser øvre og nedre kvartiler. A. Maksimal løypekompleksitet oppnådd av larver etter eksogen tilsetning av negativ kontroll, Ci-VP, mammalsk oksytocin (m-OT) og mammalsk vasopressin (m-VP). Y-aksen er gitt i bits. B. Median avstand larver har hatt fra sentrum (mm) etter tilsetning av negativ kontroll, Ci-VP, m-OT og m-VP.

Fiolinplott A i **Figur 14** viser resultat knyttet til kompleksiteten i svømmeløypen hos larvene angitt i bits. Desto mer sikksakk og/eller i sirkler de svømmer, desto større kompleksitet. Ci-VP har en median, samt øvre og nedre kvartil, som er tydelig høyere enn hos m-VP.

Fiolinplott B viser resultater knyttet til forskjeller i tigmotaksisk adferd. Tigmotaktisk atferd er et resultat av en organismes svar på stimuli knyttet til berøring eller kontakt. Organismer med positiv tigmotaktisk atferd vil søke kontakt med andre objekter, mens de ved negativ tigmotaktisk atferd vil unngå kontakt. Arenaens brønn har en diameter på 10 mm. Brønnen der larven svømmer har en indre sirkel i sentrum med en radius på 3,55 mm, som defineres som non-tigmotaktisk område. Arealet på utsiden av sirkelen er tigmotaktisk område. (67)

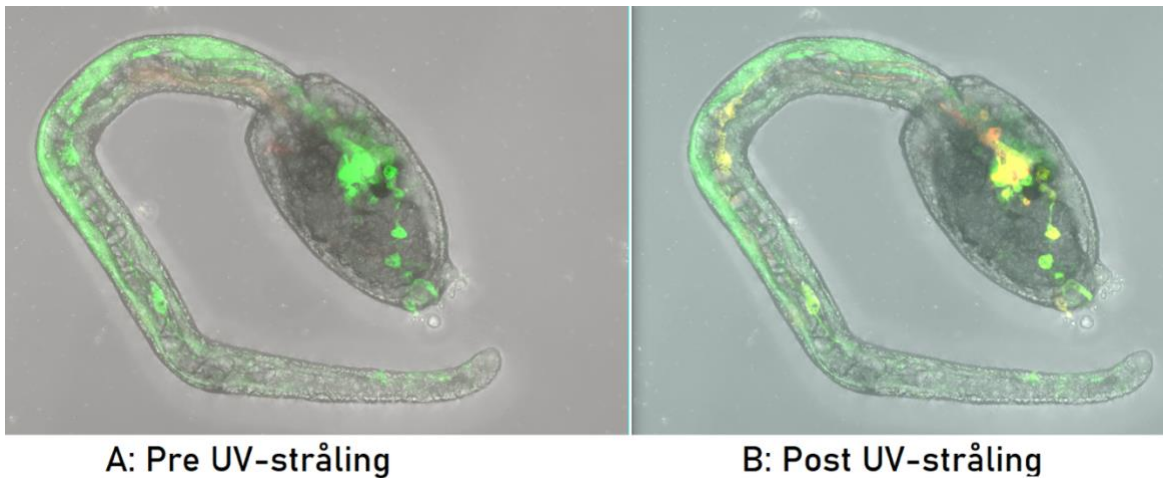
Fiolinplott B i **Figur 14** presenterer median avstand larver har oppholdt seg fra sentrum i mm. Dette estimeres ved å fastslå tiden dyret oppholder seg langs veggene (tigmotaktisk område) kontra i sentrum av arenaen (non-tigmotaktisk område). Medianavstanden fra sentrum for Ci-VP viser at larver har oppholdt seg nær 6000 mm fra sentrum, mens det for m-VP nesten er nede på 4000 mm. Øvre og nedre kvartil viser også til at m-VP har flere dyr nærme sentrum (non-tigmotaktisk område) enn Ci-VP. Dyrene tilsatt m-VP har også vært mer "tilfeldig" spredt mellom 0 og 7000 mm. Dyrene tilsatt Ci-VP har holdt seg på avstand fra sentrum og ute langs arenaen vegger i tigmotaktisk område.

Ved Kruskal-Wallis test med verdiene Ci-VP = 241,1 og mVP = 175,5, fikk resultater $p=0,0024$, altså $p < 0,05$. Det er dermed statistisk signifikant forskjell mellom larver tilsatt m-VP og dyrene tilsatt Ci-VP. Dyrene tilsatt Ci-VP har altså hatt en økt tigmotaktisk atferd, sammenlignet med m-VP.

3.3 CaMPARI

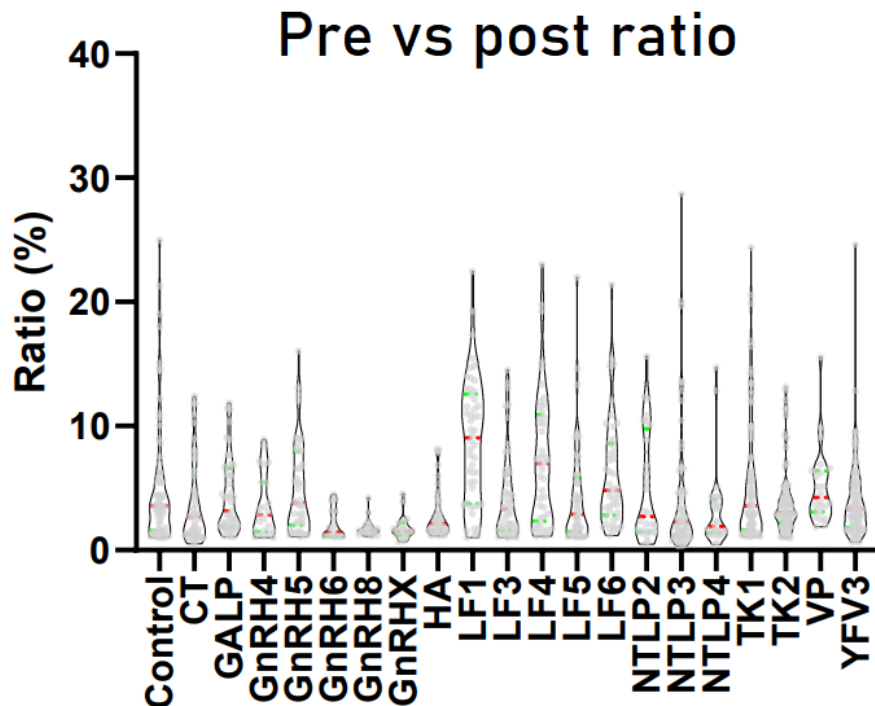
Larver av *C. intestinalis* som hadde blitt elektroporert med PC2>CaMPARI-DNA ble tilsatt neuropeptider for å finne ut om tilsetning av neuropeptider ville gi en endring i kalsiumaktivitet, og dermed visualisere nerveaktivitet hos dyret. Konfokal mikroskopering ble utført for å danne avbildninger som ble analysert. Resultatene viser om tilsetning av neuropeptid gir en statistisk signifikant endring i signal (grønn-til-rød) etter UV-stråling. En økning i signal tilsvarer økt konsentrasjon av intracellulært kalsium, og dermed økt nerveaktivitet. Motsatt vil en nedgang i signal tilsvare lavere konsentrasjon av intracellulært

kalsium og nedsatt nerveaktivitet. Endring i farge pre og post UV-bestråling er illustrert i **Figur 15**.



*Figur 15. Sammenligning av larve som uttrykker PC2>CaMPARI før og etter UV-stråling. Larven i bildene som blir vist som eksempel har blitt tilsatt neuropeptidet Ci-LF-6. Bilder viser alle stacks overlappet til ett bilde med maksimal intensitet. **A:** Nerveceller i larver gir grønt fargesignal. **B:** Nerveceller med høy konsentrasjon av intracellulært kalsium har endret farge og gir rødt fargesignal. Nerveceller med lav konsentrasjon av kalsium forblir grønne eller viser liten grad av fargeendring.*

Figur 15 viser en larve av *C. intestinalis* tilsatt neuropeptidet Ci-LF-6 pre og post UV-bestråling ($\lambda = 405$ nm). En fargekonvertering fra grønn til rød kan observeres ved at fargen blir gul/oransje når grønt og rødt signal overlappes. Fiolinplott fra analyse av de mikroskoperte bildene for 20 av de 31 neuropeptidene blir presentert i **Figur 16**. Plottet viser grønn-til-rød ratioen før og etter bestråling med UV-lys i larver som uttrykker CaMPARI2.



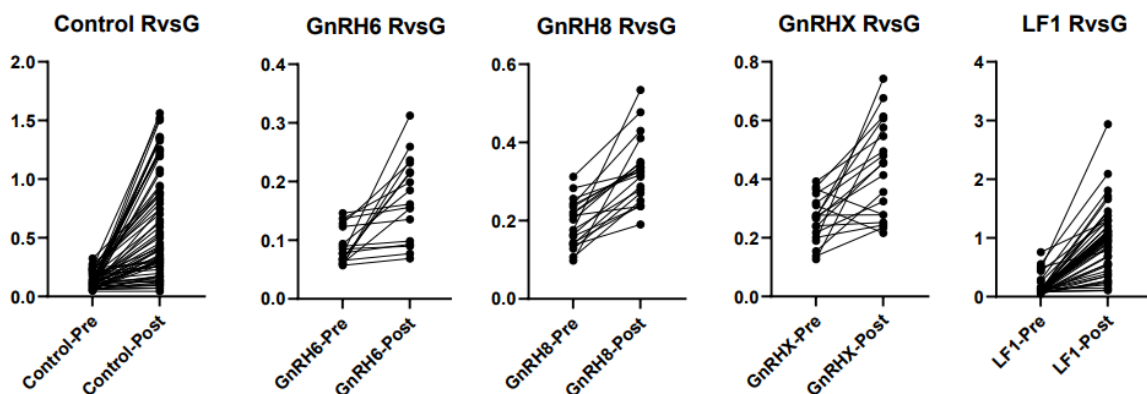
Figur 16. Fiolinplott for ratio (%) av fargeendring mellom pre og post. Plottet illustrerer endringer i kalsiumnivå for hvert neuropeptid. Rød strek viser medianverdi for fargeendring mellom pre og post. Grønne streker viser øvre og nedre kvartiler. Grå sirkler viser individuelle datapunkt. Y-aksen viser ratio av fargeendring fra pre til post i prosent.

Fiolinplottet med CaMPARI-resultater presentert i **Figur 16** gir umiddelbart en oppfatning av endring i kalsiumsignal hos larver tilsatt Ci-LF-1, t-GnRH-6, t-GnRH-8 og Ci-GnRH-X. For å finne ut om noen av peptidene har signifikant forskjell i signal i forhold til den negative kontrollen, ble Kruskal-Wallis test utført. Testen ble gjennomført med gjennomsnittlige individuelle tall samlet fra samtlige peptider opp mot gjennomsnittstall fra kontroll. **Tabell 4** viser de neuropeptidene som hadde statistisk signifikant forskjell i kalsiumaktivitet i forhold til negativ kontroll etter tilsetning.

Tabell 4. Oversikt over neuropeptider som gir økt eller senket kalsiumaktivitet etter tilsetning.

Neuropeptid	Kalsiumaktivitet
Ci-LF-1	Økt ↑
t-GnRH-6	Senket ↓
t-GnRH-8	Senket ↓
Ci-GnRH-X	Senket ↓

Etter å ha foretatt Kruskal-Wallis test, var det fire peptider som hadde statistisk signifikant forskjell i signal i forhold til negativ kontroll. Ci-LF-1 gav en økning i konsentrasjon intracellulært kalsium, mens t-GnRH-6, t-GnRH-8 og Ci-GnRH-X medførte senket konsentrasjon av intracellulært kalsium etter tilsetning. Siden disse peptidene gav et signifikant forskjellig signal fra negativ kontroll, blir to-punktsplott for gitte peptiders signal pre og post UV-bestråling presentert i **Figur 17**.



Figur 17. CaMPARI-resultater for negativ kontroll og neuropeptidene t-GnRH-6, t-GnRH-8, Ci-GnRH-X og Ci-LF-1. Første punkt representerer kalsiumaktivitet pre UV-stråling og andre punkt post UV-bestråling. RvsG referer til forholdet mellom rødt og grønt fargesignal.

To-punktsplottet i **Figur 17** viser verdiene de individuelle larvene tilsatt peptidene hadde pre og post bestråling. I to-punktsplottet kan de individuelle larvenes verdier pre og post UV-bestråling ses, som blir representert med første og andre punkt respektivt. Sammenlignes RvsG ratio for kontrollen post stråling (ca. 0,00-1,60) med peptidene t-GnRH-6 (ca. 0,05-0,32), t-GnRH-8 (ca. 0,20-0,55), og Ci-GnRH-X (ca. 0,20-0,75), kan det observeres at post-verdiene til kontrollen ligger betydelig høyere enn hos peptidene. Ratioverdiene til Ci-LF-1 ligger mer spredt (mellom 0 og 3), men flere av larvene har her oppnådd en signalendring > 1,5, altså høyere enn kontrollens.

4. Diskusjon

Det siste tiåret har flere neuropeptider, peptidhormoner og deres korresponderende reseptorer hos *Ciona intestinalis* blitt identifisert (18–23). Disse funnene gjør videre utforskning av både neuropeptidens system i arten og de molekylære mekanismene som ligger bak diversifiseringen og evolusjonen av neuropeptider mulig (23).

C. intestinalis har et kort larvestadie før de gjennomgår metamorfose og utvikler seg til voksne individer. Under larvestadiet har *C. intestinalis* ryggstrengmorfologi. Ryggstrengdyr som *C. intestinalis* er av interesse for forskning, ettersom de er virveldyrers nærmeste slektning. De kan dermed gi et unikt, evolusjonært perspektiv på hvordan mer komplekse organismer oppstår og utvikler seg. *C. intestinalis* sitt nervesystem, endokrine system og hjerne kan beskrives som simpelt sammenlignet med virveldyrer. Til tross for dette har dyret ~90 % av det samme antallet proteinkodende genene som i det menneskelige helgenomet (3,10–13). Undersøkelser av gener i *C. intestinalis* som er homologe med gener hos virveldyrer kan gi innsikt i hvilken grad dens biologiske funksjoner er bevart i livsformer utviklet senere i evolusjonen.

Forskere som benytter denne modellorganismen er avhengige av tilgang til vilt-fangede individer. Arten er av kosmopolitisk utbredelse, og kan derfor finnes over store deler av verden. Ingen har enda klart å vedlikeholde en avlet populasjon over flere generasjoner i et laboratorium med marine fasiliteter (3). Heldigvis er dyrene enkle å samle inn til forskningsformål, siden de liker seg tett ved vannoverflaten og gjerne sitter samlet i større klaser.

Kunstig fremstilt sjøvann, et medium benyttet innenfor forskning, er egnet for vekst og typisk atferd for *C. intestinalis*. Bruk av kunstig sjøvann fremfor naturlig sjøvann er fordelaktig med hensyn på reproduserbarhet, ettersom tillaging av det kunstige sjøvannet følger en standardisert oppskrift og dermed vil ha mer konsekvente egenskaper enn naturlig sjøvann.

I dette prosjektet ble det undersøkt hvordan en rekke homologe og artsspesifikke neuropeptider i *C. intestinalis* påvirket dens atferd relatert til bevegelsesmønster, metamorfose og nerveaktivitet. Settlement-delen av prosjektet ble gjort ved hjelp av sammenligning av svømmende larver og larver som gjennomgår metamorfose i nærvær av

neuropeptid. I tillegg ble det utført tracking av larvers bevegelsesmønster i et spesiallaget trackingoppsett, og visualisering av neuropeptiders effekt på nerveaktivitet ved hjelp av CaMPARI og konfokal mikroskopi.

4.1 Settlement

Settlement gir et direkte innblikk på hvordan neuropeptider påvirker *C. intestinalis* larvers evne til å gjennomgå metamorfose. Som det ble skrevet innledningsvis er larvene avhengige av å kunne feste seg til en overflate for å kunne starte metamorfose. De vil naturlig søke etter steder hvor det vil være gunstig for den å starte metamorfose, for eksempel under overflater der sollys ikke treffer larvene. På laboratoriet kan man observere at flere hundre larver relativt raskt vil feste seg til en petriskåls bunn (3).

Kruskal-Wallis test ble foretatt på samtlige peptider, testen viste at peptidene Ci-LF-3, Ci-LF-5, Ci-HA, Ci-NTLP-1, Ci-NTLP-4, t-GnRH-3, Ci-CT og Ci-YFV-3 var signifikant forskjellig fra kontrollverdiene. Av disse hadde Ci-NTLP-4 og t-GnRH-3 flere svømmende larver enn negativ kontroll, mens Ci-LF-3, Ci-LF-5, Ci-HA, Ci-NTLP-1, Ci-CT og Ci-YFV-3 hadde færre svømmende larver enn den negative kontrollen. Det kan dermed se ut til at neuropeptidene Ci-NTLP-4 og t-GnRH-3 hadde en hemmende effekt på larvers evne til å gå inn i metamorfose, mens Ci-LF-3, Ci-LF-5, Ci-HA, Ci-NTLP-1, Ci-CT og Ci-YFV-3 hadde en promoterende effekt på larvers evne til metamorfose.

Peptidfamilien GnRH er hormonpeptid som spiller en viktig rolle i virveldyrers kjønnsfunksjoner. GnRH i pattedyr syntetiseres og frigjøres fra hypothalamus, noe som ikke er til stede i sekkdyr som *C. intestinalis*. t-GnRH spiller nødvendigvis dermed en annen rolle i sekkdyrs biologiske funksjoner. I tidligere forsøk utført av Kamiya et al. ble det vist at t-GnRH-3 og t-GnRH-5 hadde en hemmende effekt på larvers evne til metamorfose (32). Funnet gjort her for t-GnRH-3 er konsekvent med dette funnet, men det ble derimot ikke vist at t-GnRH-5 hadde en hemmende effekt på larvers metamorfose i denne undersøkelsen.

CT i virveldyr spiller en viktig rolle i metabolisme av kalsium i virveldyrers skjeletter. Sekkdyr som *C. intestinalis* har ikke beinvev, og Ci-CT spiller dermed nødvendigvis en ulik rolle i sekkdyrs biologiske funksjoner. Interaksjon mellom Ci-CT og deres korresponderende endogene reseptor Ci-CTR har enda ikke blitt observert, og ingen av Ci-CTs fysiologiske

funksjoner har blitt belyst enda (20). Basert på funn i denne undersøkelsen ser det ut til at Ci-CT har en promoterende effekt på larvers evne til metamorfose.

Neurotensin er en familie peptid i pattedyr som deltar i en rekke fysiologiske funksjoner som vasokonstriksjon og inhibering av smertereseptorer. Ci-NTLP er en familie peptid i *C. intestinalis*. Lite er kjent om dens funksjon, men i denne undersøkelsen ble det vist at Ci-NTLP at spiller en rolle i larvers metamorfose og modning. Her er det også interessant å merke at Ci-NTLP-1 og Ci-NTLP-4 viste seg å ha motsatte effekter på larvers evne til metamorfose og modning.

HA er et peptid funnet i nesledyr og sekkdyr og har tidligere vært knyttet til utvikling av stamceller. På grunn av dette er det tenkelig at HA hovedsakelig spiller en rolle i utvikling under den embryoniske fasen. Denne undersøkelsen viset at HA også har fysiologiske funksjoner under larvefasen til *C. intestinalis* og at disse funksjonene er knyttet til promotering av metamorfose og utvikling til voksent stadium. Tidligere upubliserte undersøkelser fra samme forskningsinstitutt har koblet HA til β -tubulin-positive celler. β -tubulin er en nevronmarkør. Kolokalisasjon av HA og β -tubulin bekrefter dermed at HA blir uttrykt i nervesystemet til *C. intestinalis*. En mulig reseptor for HA er kjent, Head Activator Binding protein, fra genet KH.C8.594. Videre undersøkelser trengs for å bekrefte dens tilknytning til HA.

Peptidomikk av det nevralt komplekset har ikke bare identifisert homologer av virveldyrs neuropeptider og peptidhormoner, men også de unike artsspesifikke peptidene Ci-LF og Ci-YFV/L hos *C. intestinalis* (21,23). Lite er kjent om funksjonene familiene av peptidene Ci-LF og Ci-YFV/L. Ut ifra denne undersøkelsen kan det se ut til at Ci-LF-3 og Ci-LF-5 spiller en rolle i larvers modning til voksent stadium. En interessant observasjon er at Ci-LF-3 og Ci-LF-5 hadde motsatte effekter på larvers evne til metamorfose.

Noen peptider (for eksempel Ci-LF-4) hadde ujevn populasjonsfordeling, som illustrert i **Figur 11**. Det er flere feilkilder som kan ha bidratt til ujevne populasjonsfordelinger og generell mangel på presisjon i datasettene. Undersøkelsen ble utført over en 6 ukers lang periode, og det ble hentet inn nye voksne individer av *C. intestinalis* som ble brukt underveis i denne perioden. Noen av disse voksne individene viste seg å være mindre fertile enn forventet. Det bør nevnes at dyrenes gytingsevne vil varere ut ifra sesong. Dette prosjektet ble

utført tidlig i sesongen, noe som medførte at kvaliteten på dyrene var varierende. Denne variasjonen førte til at det ikke alltid var mulig at alle petriskåler inneholdt 30-100 larver, noe som videre fører at visse tellinger vil være mindre representative. Telling av larver ble utført ulike personer og ble ikke alltid utført til samme tidspunkt, noe som også kan ha bidratt til større feilmarginer.

4.2 Horizontal tracking

Det var ønskelig å finne ut om eksogen tilsetning av neuropeptider ved tracking av artens larver ville føre til endringer i deres bevegelsesmønster. Det ble samlet inn videoer for 21 av 31 planlagte neuropeptider i løpet av prosjektperioden. **Tabell 5** viser neuropeptider, samt antall larver og videoer filmet.

Tabell 5. Oversikt over totalt antall dyr tracket fordelt på hvert peptid/peptidfamilie, og totalsum tid filmet presentert i minutter, timer og døgn. Hvert dyr ble filmet i 2x15 minutter, og hver video har derfor en lengde på 15 minutter.

Peptider	Antall larver	Antall kontrollarver	Antall larver, totalt
Ci-LF-1 til -8	160	80	240
t-GnRH-3 til -6	80	40	120
Ci-NTLP-1 til -6	120	60	180
Ci-VP	20	10	30
Ci-GALP	20	10	30
HA	20	10	30
TOTALT	630 larver 1260 filmer		
Filmtid	18 900 minutter 315 timer 13 døgn		

Grunnet tidsbegrensninger og et høyt antall trackingvideoer, kunne dessverre ikke resultater fra denne delen av prosjektet presenteres. Dette kunne nok vært unngått hadde analyseringen av resultatene blitt startet tidligere. Tiden det tok å analysere hver video var ukjent ved prosjektets start, og prosjektet var svært tidsbegrenset. Det er derfor blitt presentert resultater fra et tidligere forsøk fra 2020 utført av Ruya Houssein, der et av peptidene vi også tracket, Ci-VP, ble benyttet. Forsøket utforsket påvirkningen oksytocin- og vasopressinlignende neuropeptider har på bevegelsesaktiviteten til *C. intestinalis*.

Resultatene fra Housseins studie viser en signifikant endring i adferdsmønsteret hos larver tilsatt Ci-VP sammenlignet med m-VP. Tidligere studier har vist at Ci-VP har en korresponderende reseptor navngitt Ci-VP-R, som blir uttrykt i fra gener i larvens nevralkompleks, fordøyelseskanal, gonader og hjerte (23,39). Reseptoren er høyt spesifikk for Ci-VP, og det er derfor forventet at tilsetning av Ci-VP vil føre til en økning i larvenes bevegelseshastighet og aktivitet. Ut fra fiolinplottene presentert i **Figur 13** og **Figur 14** har larver tilsatt Ci-VP høyere hastighet og oppholder seg lengre fra sentrum (tigmotaksisk område) enn øvrige larver tilsatt peptider og negativ kontroll. Hvis median avstand i tigmotaksisk område er signifikant forhøyet, påstås det at dyret har en økt opplevelse av frykt eller angst. Dette kan for eksempel komme av at larvene befinner seg i et nytt og ukjent miljø når de blir tilsatt arenaens brønn under tracking.

Det at larver tilsatt Ci-VP har en signifikant økt avstand fra sentrum (tigmotaksisk område) enn m-VP (**Figur 14**) er evolusjonsmessig interessant, da det i tidligere forsøk er bevisst at organismer utviklet senere i evolusjonen, som mus, viser tilsvarende type adferd. Mus vil etter å ha blitt satt i en arena begynne å kartlegge sine omgivelser, da fortrinnsvis langs arenaens vegger (68).

4.3 CaMPARI

CaMPARI er en kalsiumintegrator som kan gi et innblikk i hvordan neuropeptider påvirker nerveaktivitet i larver av *C. intestinalis*. Nerveceller i *C. intestinalis* ble avbildet etter eksogen applikasjon av neuropeptider for å undersøke om disse hadde en merkbar effekt på aktiviteten i nervecellene.

Ut ifra fiolinplott for pre og post signalratio i **Figur 16**, så har larver tilsatt Ci-LF-1 en tydelig høyere medianverdi enn samtlige andre peptider og negativ kontroll. Øvre kvartil er også ved omtrent 13 % ratio, og er dermed vesentlig høyere enn de andre. Det kan altså tyde på at Ci-LF-1 har en aktiverende effekt på nevronal aktivitet. For larver tilsatt peptidene t-GnRH-6, t-GnRH-8 og Ci-GnRH-X ser det derimot ut til at den nevronele aktiviteten har blitt inhibert.

Kruskal-Wallis test viste at peptidene Ci-LF-1, t-GnRH-6, t-GnRH-8 og Ci-GnRH-X var signifikant forskjellig fra negativ kontroll. Av disse viste Ci-LF-1 økt kalsiumaktivitet i forhold til negativ kontroll, mens t-GnRH-6, t-GnRH-8 og Ci-GnRH-X hadde lavere kalsiumaktivitet enn negativ kontroll.

Ci-LF-1 viste ikke å ha en signifikant effekt på larvers evne til metamorfose etter settlementeksperimentet. Økt kalsiumaktivitet kan dermed ikke knyttes opp mot metamorfose eller modning, og må altså kunne knyttes til andre fysiologiske funksjoner. Peptidene som ga signifikant lavere kalsiumkonsentrasjon, t-GnRH-6, t-GnRH-8 og Ci-GnRH-X, viste heller ingen effekt på larvers evne til metamorfose og må derfor ha en annen fysiologisk funksjon. Det hadde vært interessant å sett resultatene på tracking for disse peptidene, og om tilsetning av peptidene har gitt noen effekter på larvens atferd i arenaer i forhold til svømmemønster, svømmehastighet og tigmotaktisk atferd.

Flere peptider i fiolinplottet (**Figur 15**) viser ujevne populasjonsfordelinger. Data for alle peptid er heller ikke tilgjengelig. Målet for undersøkelsen var å samle inn data fra minst 10 larver per peptid, men av ulike grunner, blant annet varierende grad av kvalitet på dyr brukt til fertilisering, var det ikke tilstrekkelig med tid til å samle inn mengden data ønskelig for alle peptid under prosjektperioden. Manglende data har bidratt til ujevne populasjonsfordelinger og datasett. Dette fører til at resultater fra noen peptider ikke er representative.

Kombinasjonen av feilkilder som følger med metoden, som blant annet varierende kvalitet på elektroporering og signal i larver, gjør at det vil være vanskelig å trekke fullstendige konklusjoner omkring resultatene til peptidene som ikke hadde signifikant endring i signal. I **Figur 16** har for eksempel Ci-LF-4, sett bort fra Ci-LF-1, høyest medianverdi og skiller seg tydelig fra de andre peptidene, men ifølge Kruskal-Wallis test ikke signifikant endring. Det er uvisst om det hadde blitt et annet resultat om flere larver hadde blitt avbildet etter tilsetning av peptidet.

Det var også varierende antall celler med signal i hodet til de mikroskoperte larvene, som igjen gjenspeiler at kvaliteten på f.eks. elektroporering har vært varierende. Kunnskapsnivå er en stor feilkilde ved dette forsøket som kan ha hatt en innvirkning. Dette var metoder som samtlige forfattere av denne oppgaven aldri hadde utført tidligere. Kunnskap vedrørende blant annet konfokal mikroskopi og elektroporering var begrenset ved prosjektstart. Det var kvalitetsforskjeller mellom de første dyrene som ble elektroporert og mikroskopert versus de siste dyrene. Det kan ha gitt utslag på resultatene.

4.4 Feilkilder

Det er en rekke feilkilder som kunne ha oppstått under laboratoriearbeidet. Ved *in vitro* fertilisering etterfulgt av elektroporering, var utfallet noen ganger at de nyklekte larvene ikke hadde noe signal og ikke var brukelige i forsøket. Dette kan skyldes flere ting, for eksempel dårlig kvalitet på voksne individers evne til fertilisering, feil saltkonsentrasjon i ASW, at eggene ikke ble fullstendig dechorioniserte i natriummiksen eller at kvalitet på tilberedt DNA (PC2>CaMPARI) var avvikende.

Under tracking var det ofte mye rusk til stede i arenaene. Dette er en av hovedgrunnene til at analyseringen av trackingresultater ikke ble ferdig i tide, siden trackingprogrammet ToxTrac oppfattet rusk i tillegg til larvene ved videoanalyseringen. Eliminering av alle urenheter som også ble plukket opp ved trackinganalyse var som regel et tidkrevende arbeid. Trackingen foregikk som regel fra 08:00 på morgenen til 16:00 på ettermiddagen. Det medfører at larver tracket på starten av dagen var nyligere klekket enn larver sent på dagen. Dette er heller ikke optimalt, da dyrene helst skulle være relativt nyklekt ved tilsetning av neuropeptidene.

Prosjektperioden foregikk i tillegg i forkant av *C. intestinalis* optimale sesong, det var derfor varierende kvalitet på dyrene og varierende tilgang på voksne individ. Dette kan være noe av forklaringen til at for eksempel elektroporeringen ikke alltid var vellykket.

4.5 Fremtidsperspektiver

Det ble utviklet et oppsett for vertikal tracking av larver i et gravitasjonsoppsett, samt med mulighet for tracking i nærvær av lysstimuli. Metoden og oppsettet ble ikke ferdigstilt innenfor tidsrammene av dette prosjektet og det ble dermed ikke samlet inn data for denne metoden. Data fra denne metoden vil kunne være komplementær til horisontal tracking og vil i tillegg bidra til å kunne undersøke neuropeptiders effekt på larvers atferd relatert til lysstimuli.

Videre kan det også være aktuelt å gjenta undersøkelser fra dette prosjektet med CRISPR-mutanter med fjernet reseptorer for ulike peptider. Denne type studie vil bekrefte neuropeptiders funksjoner og tydeliggjøre deres biologiske roller.

5. Konklusjon

Formålet med prosjektet var å finne ut om tilsetning av 31 ulike neuropeptider til larver av *C. intestinalis* hadde en stimulerende effekt på metamorfose, svømmemønster, svømmehastighet og nevronal aktivitet. Flere av neuropeptidene gav atferdsendring knyttet til metamorfose, svømmemønster og svømmehastighet. I tillegg gav noen av neuropeptidene endring i nevronal aktivitet.

Settlement metoden gav interessante funn knyttet til metamorfose, hvor to av neuropeptidenes resultater tyder på hemming av larvens initiering til metamorfose; Ci-NTLP-4 og t-GnRH-3. Seks av neuropeptidenes resultater indikerer å ha en promoterende effekt på larvers metamorfose; Ci-LF-1, Ci-LF-5, HA, Ci-NTLP-1, Ci-CT og Ci-YFV-3. Det kan altså se ut til at eksogen tilsetning av disse neuropeptidene vil promotere eller hemme metamorfose hos larvene.

Upubliserte resultater utført av Houssein ble presentert i resultatdelen angående tracking av larver etter tilsetning av Ci-VP, m-OT og m-VP. De viste at larver tilsatt neuropeptidet Ci-VP hadde betydelige endringer i atferdsmønster sammenlignet med larver tilsatt m-VP. Larver tilsatt Ci-VP hadde bl.a. høyere svømmehastighet og viste større tigmotaksisk atferd.

Ved CaMPARI var det fire neuropeptider som gav signifikant endring i intracellulær kalsiumkonsentrasjon. Økt intracellulær kalsiumkonsentrasjon betyr at det er økt aktivitet i larvens nerveceller. Neuropeptidet Ci-LF-1 gav økt nerveaktivitet, mens t-GnRH-6, t-GnRH-8 og Ci-GnRH-X gav nedsatt nerveaktivitet. Resultater tilsier dermed at tilsetning av nevnte neuropeptider har hatt en virkning på nervesignaleren til *C. intestinalis*.

I videre studier kan det undersøkes hvorvidt CRISPR-mutanter med fjernede reseptorer påvirkes under samme betingelser som brukt i denne undersøkelsen. Det bør også forskes videre på hvordan larvers adferd påvirkes av neuropeptider i nærvær av lysstimuli i et vertikalt trackingoppsett. Kartlegging av homologe og artsspesifikke neuropeptiders funksjoner i *C. intestinalis* vil være til nytte i å kunne kartlegge nervesystemets og generelle biologiske funksjoners opprinnelse.

Ordliste

ASW: (engelsk "artificial seawater"), kunstig fremstilt sjøvann.

CaMPARI: (engelsk "Calcium-Modulated photoactivatable radiometric integrator"), kalsium-modulert fotoaktiverbar radiometrisk integrator.

CT: (engelsk "calcitonin"), kalsitonin.

Dechorionering: (engelsk "dechorionated"), fjerne membranen som omgir eggene

Dorsal: (av latin *dorsum*, "rygg"), anatomisk begrep som beskriver noe som angår ryggen.

Elektroporering: Teknikk hvor man blander plasmid-DNA med embryo ved en-celle-stadiet, før man plasserer blandingen i en elektroporeringskvyette som utsettes for elektrisk strøm. Denne pulseringen gjør cellemembranene permeable for nytt DNA. (57)

GALP: (engelsk "galanin-like peptide"), galaninlignende peptid.

GnRH: (engelsk "gonadotropin-releasing hormone"), gonadotropinfrigjørende hormon.

Konsensussekvens: (av latin *consensus*, "enighet"), korte strekninger med DNA som viser tilsynelatende liten variasjon i mange forskjellige gener (69).

Maternalt: (av latin *mater*, "mor", engelsk *maternally*), begrep som omtaler noe som kommer morskapelig, her beskriver det energi som blir videreført fra moren til avkommet.

Metamorfose: transformasjon, gjennomgripende forvandling, her fra larvestadie til voksent individ.

Notch signalisering: celsignaliseringssystem som kan finnes i de fleste dyr, og er blant annet viktig under nevrogenesen.

NTLP: (engelsk "neurotensin-like peptide"), neurotensin-lignende peptid.

Ocellus: pigmentert sensorisk organ hos *C. intestinalis* som oppfatter tilstedeværelse av lys.

Ortologer: (av gresk *orthos*, "rett"), homologe gener som eksisterer i ulike arter som følge av at deres felles stamfar dannet nye arter. (70)

OT: (engelsk "oxytocin"), oksytocin.

Otolitt: pigmentert sensorisk organ hos *C. intestinalis* som oppfatter tyngdekraft.

Peptidomikk: systematisk analyse av peptidinnholdet i en celle, vev eller organisme, gjelder vanligvis studier av naturlig forekommende peptider (71).

ROI: (engelsk "regions of interest"), områder som er av interesse.

Ryggstrengdyr: chordata, dyrerekke av dyr som har ryggstreng på minst et stadium av sin eksistens.

Sifon: organer hos virvelløse dyr som ligner rør. Hos den filter-spisende arten *C. intestinalis* benyttes det som inn- og utstrømmingsåpninger for sjøvann.

TK: tachykinin.

Topologi: måten noe er organisert eller henger sammen.

Trofisk: (av gresk *trofe*, "ernæring"), omtaler noe som angår cellers ernæring, vekst og funksjon. (72)

VP: vasopressin.

Referanser

1. Delsuc F, Brinkmann H, Chourrout D, Philippe H. Tunicates and not cephalochordates are the closest living relative of vertebrates. *Nature*. 2006;439:965–8.
2. Putnam NH, Butts T, Ferrier DEK, Furlong RF, Hellsten U. The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. *Nature*. 2008;453:1064–71.
3. Kourakis MJ, Smith WC. An organismal perspective on *C. intestinalis* development, origins and diversification. *eLife*. 2015;4:1–9.
4. Shimeld SM, Purkiss AG, Dirks RPH, Bateman OA, Slingsby C, Lubsen NH. Urochordate $\beta\gamma$ -Crystallin and the Evolutionary Origin of the Vertebrate Eye Lens. *Current Biology*. 2005;15(18):1684–9.
5. Hotta K, Mitsuhashi K, Takahashi H, Inaba K, Oka K, Gojobori T, mfl. A web-based interactive developmental table for the ascidian *Ciona intestinalis*, including 3D real-image embryo reconstructions: I. From fertilized egg to hatching larva. *Developmental Dynamics*. 2007;236:1790–805.
6. Okawa N, Shimai K, Ohnishi K, Ohkura M, Nakai J, Horie T, mfl. Cellular identity and Ca²⁺ signaling activity of the non-reproductive GnRH system in the *Ciona intestinalis* type A (*Ciona robusta*) larva. *Sci Rep [Internet]*. 2020;10(18590). Tilgjengelig på: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75344-7>
7. Satoh N. The ascidian tadpole larva: comparative molecular development and genomics. *Nat Rev Genet*. 2003;4:285–95.
8. Yamada S, Hotta K, Yamamoto T, Ueno N, Satoh N, Takahashi H. Interaction of notokord-derived fibrinogen-like protein with Notch regulates the patterning of the central nervous system of *Ciona intestinalis* embryos. *Dev Biol*. 2009;328:1–12.
9. Sasakura Y, Mita K, Ogura Y, Horie T. Ascidiaceans as excellent chordate models for studying the development of the nervous system during embryogenesis and metamorphosis. *Development, Growth & Differentiation*. 2012;420–37.
10. Satoh N, Kawashima T, Shoguchi E, Nakayama A, Satoh N. An integrated database of the ascidian, *Ciona intestinalis*: towards functional genomics. *Zoological Science*. 2005;22:837–43.
11. Tassy O, Dauga D, Daian F, Sobral D, Robin F, Khoeiry P, mfl. The ANISEED database: digital representation, formalization, and elucidation of a chordate developmental program. *Genome Research*. 2010;20.
12. Ezkurdia I, Juan D, Rodriguez JM, Frankish A, Diekhans M, Harrow J, mfl. Multiple evidence strands suggest that there may be as few as 19 000 human protein-coding genes. *Human Molecular Genetics*. 2014;23:5866–78.
13. Cunningham F, Amode MR, Barrell D, Beal K, Billis K, Brent S, mfl. Ensembl 2015. *Nucleic Acids Research*. 2015;43:D662–9.
14. Burbach JP. What are neuropeptides? *Methods Mol Biol*. 2011;789:1–36.
15. Russo AF. Overview of neuropeptides: Awakening the Senses? *Headache*. 2017;57(Suppl 2):37–46.
16. Hökfelt T, Broberger C, Xu Z-QD, Sergeev V, Ubink R, Diez M. Neuropeptides - an overview. *Neuropharmacology*. 2000;39:1337–56.
17. Tohyama M. An overview of the ontogeny of neurotransmitters and neuromodulators in the central nervous system. I: Handbook of Chemical Neuroanatomy Ontogeny of Transmitters and Peptides in the CNS. Amsterdam: Elsevier; s. 647–50.
18. Sherwood NM, Tello JA, Roch GJ. Neuroendocrinology of protochordates: insights from *Ciona* genomics. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2006;144:254–71.
19. Satake H, Kawada T. Neuropeptides, hormones, and their receptors in ascidians: emerging model animals. I: Invertebrate neuropeptides and hormones: basic knowledge and recent advances. Trivandrum: Transworld Research Network; 2006. s. 253–76.

20. Kawada T, Sekiguchi T, Sakai T, Aoyama M, Satake H. Neuropeptides, Hormone Peptides, and Their Receptors in *Ciona intestinalis*: An Update. *Zoological Science*. 2010;134–53.
21. Kawada T, Ogasawara M, Sekiguchi T, Aoyama M, Hotta K, Oka K, mfl. Peptidomic analysis of the central nervous system of the protochordate, *Ciona intestinalis*: homologs and prototypes of vertebrate peptides and novel peptides. *Endocrinology*. 2011;152:2416–27.
22. Matsubara S, Kawada T, Sakai T, Aoyama M, Osugi T, Shiraishi A, mfl. The significance of *Ciona intestinalis* as a stem organism in integrative studies of functional evolution of the chordate endocrine, neuroendocrine, and nervous systems. *Gen Comp Endocrinol*. 2016;277:101–8.
23. Satake H, Matsubara S, Shiraishi A, Yamamoto T, Osugi T, Sakai T, mfl. Neuropeptides, Peptide Hormones, and Their Receptors of a Tunicate, *Ciona intestinalis*. I: *Evo-Devo: Non-model Species in Cell and Developmental Biology*. Springer, Cham; 2019. s. 102–25.
24. Millar RP, Lu ZL, Pawson AJ, Flanagan CA, Morgan K, Maudsley SR. Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocr Rev*. 2004;25:235–75.
25. Millar RP. GnRHs and GnRH receptors. *Anim Reprod Sci*. 2005;88:5–28.
26. Millar RP, Newton CL. Current and future applications of GnRH, kisspeptin and neurokinin B analogues. *Nat Rev Endocrinol*. 2013;9:451–66.
27. Adams BA, Tello JA, Erchegyi J, Warby C, Hong DJ, Akinsanya KO, mfl. Six novel gonadotropin-releasing hormones are encoded as triplets on each of two genes in the protochordate, *Ciona intestinalis*. *Endocrinology*. 2003;144:1907–19.
28. Kawada T, Aoyama M, Okada I, Sakai T, Sekiguchi T, Ogasawara M, mfl. A novel inhibitory gonadotropin-releasing hormone-related neuropeptide in the ascidian, *Ciona intestinalis*. *Peptides*. 2009;30:2200–5.
29. Kawada T, Sekiguchi T, Sugase K, Satake H. Evolutionary aspects of molecular forms and biological functions of oxytocin family peptides. I: *Handbook of oxytocin research: synthesis, storage and release, actions and drug forms*. Hauppauge, NY: Nova Science; 2009. s. 59–85.
30. Tello JA, Rivier JE, Sherwood NM. Tunicate gonadotropin-releasing hormone (GnRH) peptides selectively activate *Ciona intestinalis* GnRH receptors and the green monkey type II GnRH receptor lineage. *Endocrinology*. 2005;146:4061–73.
31. Kusakabe T, Mishima S, Shimada I, Kitajima Y, Tsuda M. Structure, expression, and cluster organization of genes encoding gonadotropin-releasing hormone receptors found in the neural complex of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Gene*. 2003;322:77–84.
32. Kamiya C, Ohta N, Ogura Y, Yoshida K, Horie T, G. Kusakabe T, mfl. Nonreproductive role of gonadotropin-releasing hormone in the control of ascidian metamorphosis. 2019;
33. Sekiguchi T, Suzuki N, Fujiwara N, Aoyama M, Kawada T, Sugase K, mfl. Calcitonin in a protochordate, *Ciona intestinalis* - the prototype of the vertebrate calcitonin/calcitonin gene-related peptide superfamily. *FEBS J*. 2009;276:4437–47.
34. Steinhoff MS, von Mentzer B, Geppetti P, Pothoulakis C, Bunnett NW. Tachykinins and their receptors: contributions to physiological control and the mechanisms of disease. *Physiol Rev*. 2014;94:265–301.
35. Satake H, Ogasawara M, Kawada T, Masuda K, Aoyama M, Minakata H, mfl. Tachykinins and tachykinin receptor of an ascidian, *Ciona intestinalis*: evolutionary origin of the vertebrate tachykinin family. *J Biol Chem*. 2004;279:53798–805.
36. Aoyama M, Kawada T, Fujie M, Sakai T, Sekiguchi T, Oka K, mfl. A novel biological role of tachykinins as an up-regulator of oocyte growth: identification of an evolutionary origin of tachykininergic functions in the ovary of the ascidian, *Ciona*

- intestinalis. *Endocrinology*. 2008;149:4346–56.
37. Hoyle CHV. Neuropeptide families: evolutionary perspectives. *Regul Pept*. 1998;73:1–33.
 38. Satake H, Takuwa K, Minakata H, Matsushima O. Evidence for conservation of the vasopressin/oxytocin superfamily in Annelida. *J Biol Chem*. 1999;274:5605–11.
 39. Kawada T, Sekiguchi T, Itoh Y, Ogasawara M, Satake H. Characterization of a novel vasopressin/oxytocin superfamily peptide and its receptor from an ascidian, *Ciona intestinalis*. *Peptides*. 2008;29(1672–1678).
 40. Stafflinger E, Hansen KK, Hauser F, Schneider M, Cazzamali G, Williamson M, mfl. Cloning and identification of an oxytocin/vasopressin-like receptor and its ligand from insects. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:3262–7.
 41. Aikins MJ, Schooley DA, Begum K, Detheux M, Beeman RW, Park Y. Vasopressin-like peptide and its receptor function in an indirect diuretic signaling pathway in the red flour beetle. *Insect Biochem Mol Biol*. 2008;38:740–8.
 42. Elphick MR, Rowe ML. NGFFFamide and echinotocin: structurally unrelated myoactive neuropeptides derived from neurophysin-containing precursors in sea urchins. *J Exp Biol*. 2009;212:1067–77.
 43. Beets I, Janssen T, Meelkop E, Temmerman L, Suetens N, Rademakers S, mfl. Vasopressin/oxytocin-related signaling regulates gustatory associative learning in *C. elegans*. *Science*. 2012;338:543–5.
 44. Frank E, Landgraf R. The vasopressin system - from antidiuresis to psychopathology. *Eur J Pharmacol*. 2008;583:226–42.
 45. Lang R, Gundlach AL, Kofler B. The galanin peptide family: receptor pharmacology, pleiotropic biological actions, and implications in health and disease. *Pharmacol Ther*. 2007;115:177–207.
 46. Kieczkowska P, Lipkowski AW. Neurotensin and neurotensin receptors: Characteristic, structure–activity relationship and pain modulation—A review. *European Journal of Pharmacology*. 2013;713(1–3):54–60.
 47. Tyler-McMahon BM, Boules M, Richelson E. Neurotensin: peptide for the next millennium. *Regulatory peptides*. 2000;93(1–3):125–36.
 48. Kitabgi P. Functional domains of the subtype 1 neurotensin receptor (NTS1). *Peptides*. 2006;27:2461–8.
 49. Yin RH, Yu JT, Tan L. The Role of SORL1 in Alzheimer’s Disease. *Mol Neurobiol*. 2015;51(3):909–18.
 50. Hampe W, Urny J, Franke I, Hoffmeister-Ullerich SA, Herrmann D, Petersen CM, mfl. A head-activator binding protein is present in hydra in a soluble and a membrane-anchored form. *Development*. 1999;126(18):4077–86.
 51. Ebner C, Ledderose J, Zolnik TA, Dominiak SE, Turko P, Papoutzi A, mfl. Optically Induced Calcium-Dependent Gene Activation and Labelling of Active Neurons Using CaMPARI and Cal-Light. *Front Synaptic Neurosci*. 2019;11(16).
 52. Moeyaert B, Holt G, Madangopal R, Perez-Alvarez A, Fearey BC, Trojanowski NF, mfl. Improved methods for marking active neuron populations. *Nature Communications*. 2018;
 53. Baker PF, Hodgkin AL, Ridgway EB. Depolarization and calcium entry in squid giant axons. *The Journal of physiology*. 1971;218(3):709–55.
 54. Tank DW, Sugimori M, Connor JA, Llinás RR. Spatially resolved calcium dynamics of mammalian Purkinje cells in cerebellar slice. *Science*. 1988;242(4879):773–7.
 55. Corbo JC, Erives A, Di Gregorio A, Chang A, Levine M. Dorsoventral patterning of the vertebrate neural tube is conserved in a protochordate. *Development*. 1997;124:2335–44.
 56. Zeller RW. Generation and use of transgenic ascidian embryos. *Methods Cell Biol*.

2004;74:713–30.

57. Stolfi A, Christiaen L. Genetic and Genomic Toolbox of the Chordate *Ciona intestinalis*. Genetics Society of America. 2012;55–66.
58. Elliott AD. Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. Current protocols in cytometry. 2020;92(1).
59. Borlinghaus RT. Pinhole Effekt in Confocal Microscopy [Internett]. 2017 [sitert 28. april 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/pinhole-effect-in-confocal-microscopes/>
60. Osugi T, Sasakura Y, Satake H. The nervous system of the adult ascidian *Ciona intestinalis* Type A (*Ciona robusta*): insights from transgenic animal models. PLoS One. 2017;12.
61. Horie T, Horie R, Chen K, Cao C, Nakagawa M, Kusakabe TG, mfl. Regulatory cocktail for dopaminergic neurons in a protovertebrate identified by whole-embryo single-cell transcriptomics. Genes Dev. 2018;32:1297–302.
62. Brown A, Bivort BL. Ethology as a physical science. bioRxiv. 2018;
63. Peptide solubility calculator [Internett]. Innovagen Peptide solubility calculator. 2015 [sitert 19. mars 2021]. Tilgjengelig på: <https://pepcalc.com/peptide-solubility-calculator.php>
64. Macherey-Nagel. Plasmid DNA purification user manual for NucleoBond [Internett]. TaKaRa Bio USA, Inc; 2019. Tilgjengelig på: https://www.takarabio.com/documents/User%20Manual/NucleoBond%20Xtra%20Plasmid%20DNA%20Purification%20User%20Manual_Rev_15.pdf
65. Helbæk M. Statistikk for kjemikere. 2. utg. Vigmostad & Bjørke AS; 2016.
66. Houssein R. Influence of oxytocin/vasopressin-like neuropeptides on behavioral activity in *Ciona Intestinalis*. 2020 jan 20.
67. Rudolf J, Dondorp D, Canon L, Tiew S, Chatzigeorgiou M. Automated behavioural analysis reveals the basic behavioural repertoire of the urochordate *Ciona intestinalis*. Sci Rep. 2019;9(2416).
68. Simon P, Dupuis R, Costentin J. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. 1994;61(1):59–64.
69. Konsensus sekvens [Internett]. Institutt for biovitenskap (UiO). 2011 [sitert 19. mai 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/k/konsensus.html>
70. Ferizi S. homologe gener [Internett]. Store norske leksikon. 2019 [sitert 20. mai 2021]. Tilgjengelig på: https://snl.no/homologe_gener
71. Soloviev M. Peptidomics: divide et impera. Methods Mol Biol. 2010;615:3–9.
72. Fossum S. Trofisk [Internett]. Store medisinske leksikon. 2019 [sitert 18. mai 2021]. Tilgjengelig på: www.sml.snl.no/trofisk

Vedlegg

VEDLEGG 1. Kruskal-Wallis test of Swimming larvae – Settlement

VEDLEGG 2. Kruskal-Wallis test of overview of peptide ratios – CaMPARI

VEDLEGG 3. Oversikt over antall petriskåler og larver talt ved Settlement survey

Peptid	Skåler	Larver
Kontroll	48	2049
Ci-LF-1	32	1874
Ci-LF-2	29	1240
Ci-LF-3	35	1371
Ci-LF-4	33	2010
Ci-LF-5	32	1569
Ci-LF-6	33	1512
Ci-LF-7	39	1109
Ci-LF-8	32	1229
Head Activator	44	2283
Ci-NTLP-1	32	1081
Ci-NTLP-2	31	1828
Ci-NTLP-3	28	956
Ci-NTLP-4	32	1429
Ci-NTLP-5	32	896
Ci-NTLP-6	35	1118
t-GnRH-3	38	1479
t-GnRH-4	33	1127
t-GnRH-5	34	885
t-GnRH-6	32	1362
t-GnRH-7	26	1288
t-GnRH-8	33	1581
Ci-GnRH-X	19	1990
Ci-VP	24	1357
Ci-TK-I	25	2377
Ci-TK-II	23	1611
Ci-YFV-1	20	1598
Ci-YFV-2	20	1743
Ci-YFV-3	20	1470
Ci-YFL-1	32	1082
Ci-GALP	31	1354
Ci-CT	20	2114

VEDLEGG 4. Oversikt over antall larver og antall regioner av interesse – CaMPARI

Peptid	Antall larver avbildet	Regioner av interesse
Kontroll	13	66
Ci-LF-1	10	50
Ci-LF-2	10	50
Ci-LF-4	6	45
Ci-LF-5	10	48
Ci-LF-6	9	44
Ci-VP	6	24
HA	5	40
Ci-CT	11	40
Ci-GALP	11	47
t-GnRH-4	8	21
t-GnRH-5	9	32
t-GnRH-6	5	17
t-GnRH-8	7	20
Ci-GnRH-X	8	18
Ci-NTLP-2	9	29
Ci-NTLP-3	11	52
Ci-NTLP-4	8	24
Ci-TK-I	10	75
Ci-TK-II	10	76
Ci-YFV-3	11	80