



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:	Laila Tram Vo
Kandidatnr.:	245
HVL-id:	580669@hvl.no

Informasjon fra deltaker

Antall ord *:	13380
----------------------	-------

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: A9
Gruppenummer: 3
Andre medlemmer i gruppen: Tigist Eshetu Jemal, Ermias Fkadu Tesfagiorgis

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? *

Nei

BACHELOROPPGAVE

Rollen til ulike signalveier og
kalsiumkanaler for utviklingen av
nervesystemet i tarmsekkdyr

The role of diverse signaling pathways and
calcium channels on the nervous system
development in *Ciona Intestinalis*

**Ermias Fkadu Tesfagiorgs, Laila Tram Vo og
Tigist Eshetu Jemal**

Bioingeniør

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

Veileder: Line Wergeland og Marios Chatzigeorgiou

28. mai 2021

Sammendrag

Hensikten med dette prosjektet var å undersøke effekten av noen utvalgte signalveier, som GABA, glutamat og kalsiumkanaler i utviklingen av nervesystemet til tarmsekkdyr. Dette for å kunne bekrefte hypotesen om at tarmsekkdyr er en god modell å bruke for å studere utviklingen av nervesystemet til ryggstrengdyr. For å følge utviklingen av nervesystemet ble det utviklet transgene embryoer merket med grønt fluorescerende proteiner (GFP).

Larvestadiene av tarmsekkdyr ble deretter studert gjennom et konfokalt mikroskop, og videre ble ulike analyseringsprogrammer benyttet for å studere organismens ulike fenotyper i tillegg til morfologiske endringer på cellenivå. Det ble samtidig benyttet ulike kjemiske stoffer for å blokkere eller inhibere de utvalgte signalveiene. Videre ble det også benyttet optogenetiske verktøy for å bekrefte resultatene fra to av de kjemiske stoffene. Resultatene viser fenotypiske endringer både på hele organismen, og også på enkeltcelle nivå. Dette betyr at disse utvalgte signalveiene har en betydning for nervesystemet. Signalisering av neurotransmitterne glutamat og GABA, samt signalveier for kalsium er dermed viktig for utviklingen av nervesystemet i tarmsekkdyr. Dette stemmer overens med tidligere studier hvor det har blitt observert lignende resultater i andre organismer, som hos mus, frosk og sporefrosk (*Xenopus*).

Nøkkelord: *Ciona Intestinalis*, nervesystem, signalveier, embryogenese, transgenese

Abstract

The purpose of this study was to investigate the effect of different signaling pathways, such as GABA, glutamate and calcium channels on the development of the nervous system in *Ciona Intestinalis*. This is to confirm whether *C. Intestinalis* is a good model to use for studying the development of the nervous system in Chordate. To monitor the development of the nervous system, a transgenic embryo labelled with green fluorescent proteins (GFP) was developed. The mosaic embryo was then visualized and imaged through a confocal microscope. The data collected was processed and analysed by different analysis softwares. These results were used to study the phenotypes on the organisms developed and the morphological phenotypes at the cellular level. Various drugs were used to block or inhibit the different signaling pathways. Some optogenetic tools were also used to recapitulate two of the results seen by using drugs. The results shows that the animals exhibited both phenotypic changes on the organisms and phenotypic changes on the neurons. The neurotransmitters like glutamate and GABA, as well as signaling pathways for calcium are therefore important for the development of the nervous system in *C. Intestinalis*. This is consistent with what is observed in previous studies done on other organisms, such as mice, frogs, and *Xenopus*.

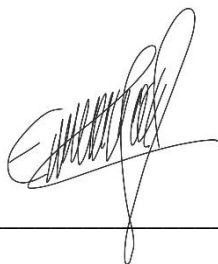
Key words: *Ciona Intestinalis*, nervous system, signaling pathways, embryogenesis, transgenesis

Forord

Denne oppgaven er et bachelorprosjekt ved Bioingeniørutdanningen på Høgskolen på Vestlandet (HVL), som ble utført våren 2021. Prosjektet har vært et samarbeid mellom HVL og Universitetet i Bergen (UiB) ved laboratorium: SARS International Centre for Marine Molecular Biology. Alt laboratoriearbeid ble i hovedsak utført på laboratoriet SARS. Det ble også benyttet analyseinstrumenter og reagenser tilhørende UiB.

I forbindelse med prosjektet ønsker vi å takke alle som har bidratt. Først og fremst vil vi rette en stor takk til vår flinke veileder og forsker, Marios Chatzigeorgiou, ved SARS/UiB. Han har lagt til rette for gode arbeidsforhold og har vært til god hjelp under den eksperimentelle delen av prosjektet. I tillegg har han gitt gode råd og veiledning underveis i skriveprosessen. Vi vil takke SARS for lån av utstyr og laboratorier, samt tilgang til reagenser. Videre vil vi takke Jørgen Høyer og Riccardo Esposito, som er en del av teamet til Marios, for god opplæring og hjelp til analysering på instrumentene. Førsteamanuensis, Line Wergeland, har vært intern veileder, og vi vil rette en stor takk til henne for gode råd i forbindelse med skriving av oppgaven samt motivasjon. Til slutt vil vi takke Turid Aarhus Braseth for konstruktiv prosessveiledning.

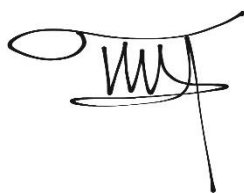
Bergen 27. Mai 2021



Ermias Fkadu Tesfagiorgs



Laila Tram Vo



Tigist Eshetu Jemal

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	2
Abstract.....	3
Forord.....	4
Innholdsfortegnelse.....	5
Ordliste.....	8
1. Innledning	9
2. Teori.....	11
2.1. Tarmsekkdyr (<i>Ciona Intestinalis</i>).....	11
2.2. Fordelene ved å velge tarmsekkdyr som modellorganisme	12
2.3. Livssyklus til Tarmsekkdyr.....	13
2.4. Nervesystemet til Tarmsekkdyr	14
2.4.1. Embryonal utvikling av nervesystemet.....	14
2.4.2. Larvens nervesystem.....	15
2.5. ETR-1	15
2.6. Nevrotransmittere.....	16
2.7. Kalsiumkanaler.....	17
2.8. Neksus (Gap-junction)	17
2.9. Optogenetisk verktøy	17
2.9.1. PACR	18
2.9.2. PA-Rac1	19
3. Material og metode	20
3.1. Tarmsekkdyr.....	20
3.1.1. Innsamling og kultur av tarmsekkdyr	20
3.1.2. Etiske betraktninger	20
3.1.3. Fertilisering og dekorionering.....	20
3.2. Genetiske metoder.....	21
3.2.1. Plasmider.....	21
3.2.2. Transformasjon	21
3.2.3. Mini-prep	21
3.2.4. Gelelektroforese.....	22
3.2.5. Midi-prep: DNA-rensing og bestemmelse av mengde	22
3.2.6. Elektroporering	22
3.2.7. Kjemiske stoffer og optogenetikk.....	22
3.3. Fiksering og tillaging av preparat.....	24

3.4.	Konfokal mikroskopi.....	24
3.5.	Analyseprogram	24
3.5.1.	Analyse av morfologien til nevroner	24
3.5.2.	Fenotypeanalyse på hele organismen.....	27
4.	Resultat	28
4.1.	Nevronenes morfologi.....	28
4.1.1.	Morfologien til nevronene endres ved påvirkning av utvalgte signalveier.....	28
4.1.2.	Optogenetikk: PACR og PA-Rac1.....	34
4.2.	Analyse av fenotypiske endringer på organismen.....	36
4.2.1.	Nevrotransmittere	37
4.2.2.	Kalsiumkanaler	40
4.2.3.	Neksus.....	40
4.2.4.	Mobilitet.....	41
4.2.5.	ATP-tilførsel	41
5.	Diskusjon	42
5.1.	Signalveier og kalsiumkanalers påvirkning på utviklingen av nervesystemet til tarmsekkdyr.....	42
5.1.1.	Nevrotransmittere	42
5.1.2.	Kalsiumkanaler	45
5.1.3.	Neksus.....	46
5.1.4.	Mobilitet.....	46
5.1.5.	ATP-tilførsel	46
5.2.	PACR og PA-Rac1 bekrefter endring i morfologi til nevronene	47
5.3.	Prosjektets begrensninger.....	47
5.4.	Fremtidige tiltak	48
6.	Konklusjon.....	49
7.	Litteraturliste.....	50
8.	Vedlegg.....	55
8.1.	Antall analyser.....	55
8.2.	Gelelektroforese	57
8.2.1.	Kontroll	57
8.2.2.	PACR	58
8.2.4.	PA-Rac1	59
8.3.	Imaris.....	60
8.3.1.	Fiolin plott - Kjemiske stoffer.....	60

8.3.2.	Fiolin plott – Optogenetikk.....	63
8.3.3.	Statistikk – Tabeller	65

Ordliste

AMPA: α -amino-3-hydroksey-5-metyl-4-isoksazolpropionsyre

ASW: Artificial Sea Water, kunstig saltvann

CNS: sentralnervesystemet

HrETR-1: Halocynthia roretzi ETR-1 er en nevralk markør

Kaudal: ved eller nær halen, eller den bakre delen av kroppen

Gastrulering: er prosessen under embryonal utvikling som endrer embryoet fra et enkelt lag av celler (en blastula) til flerlagsstruktur (gastrula)

Genetisk redundans: to eller flere gener har samme funksjon, og inaktivering av den ene eller den andre har lite eller ingen effekt på den biologiske fenotypen

LB-medium: Luria/Bertani buljong

Morfogenese: utviklingen av form i vev og organer

Nevrulering: er prosessen hvor nevrulerøret utvikler seg fra nevralk plate.

NMDA: N-metyl-d-aspartat

Organogenese: utviklingsstadiet fra vev og celler til dannelse av organer

Sekundær budbringer: et molekyl i en celle som videreformidlet signaler cellen mottar fra utsiden

Synaptisk transmisjon: Signaloverføring mellom synapser (kontaktsted mellom nerveceller)

Transgenese: er prosessen med å introdusere et gen (transgen) i genomet til en annen organisme.

1. Innledning

Nervesystemet er kompleks og består av mange signalveier og cellulære prosesser som er viktig for utviklingen av hjernen. Gjennom evolusjon har nervesystemet utviklet seg i flercellede dyr. Nevronene har hatt en viktig oppgave i nervesystemet. Kompleksiteten av nervesystemet til dyr kan variere fra enkle nervenetts hos maneter, til milliarder av sammenkoblede nevroner i menneskehjernen. Selv med store forskjeller kan man også finne likheter og vanlige trekk i nevroner og i nervesystemene i ulike flercellede dyr. Det kan være lignende spenningsregulerte ionekanaler som forårsaker aksjonspotensialet i nevronene hos både tarmsekkdyr og mennesker. Synaptisk transmisjon mellom nevronene i et nervenetts hos maneter fungerer på samme måte som i hjernebarken hos mennesker. Til tross for store forskjeller i nervesystemene mellom organismer, har de underliggende prinsippene for utviklingen blitt opprettholdt gjennom evolusjonen (1).

Forståelsen av slike prosesser og hvordan signalveier utvikles er viktig av flere grunner. Det gir oss informasjon om hvordan mekanismer for cellefunksjon og interaksjoner mellom celler fungerer. Dette er viktig for morfogenese og organogenese. Kunnskapen er også nyttig for å avdekke årsaker til misdannelser, siden feil i hvilket som helst trinn i signalveiene under utviklingen er betraktet som en stor årsak (2). Og ikke minst vil denne forståelsen kunne avdekke mekanismene bak sykdommer relatert til nervesystemet som f.eks. epilepsi, ALS (Amyotrofisk Lateral Sklerose), alzheimer og demens.

Den teknologiske utviklingen og bruken av genetiske metoder som optogenetikk har gitt oss viktige verktøy for å studere og manipulere nevroner på laboratoriene. Optogenetiske metoder er revolusjonerende innen cellebiologi ved å benytte lys for å forstyrre signalveier over tid. På denne måten kan man manipulere utviklingen av en organisme. Dette har gjort det mulig å oppnå en bedre innsikt innen blant annet nevrofysiologi og kognitiv nevrovitenskap (3).

Hensikten med dette prosjektet er å studere utviklingen av et enkelt nervesystem, samt benytte kjemiske stoffer og genetiske metoder som optogenetikk for å finne fenotyper relatert til nervesystemet. Det finnes flere viktige signalveier i en organisme. Hovedfokuset til prosjektet er å se på rollen til kalsium, som er den mest vanligste sekundære budbringeren i den intracellulære prosessen. Et annet fokus som er lagt vekt på er rollen til neurotransmittere. Neurotransmittere er i grunn dårlig studert delvis pga. reguleringen av disse molekylene er komplekse, og at de har egenskapen til genetisk redundans.

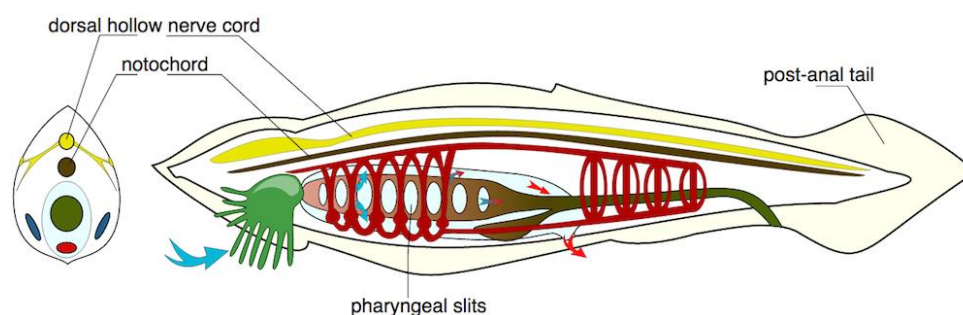
Tarmsekkdyr (*Ciona Intestinalis*), som er organismen i fokus i dette prosjektet, er en god modellorganisme for studier av nervesystemets utvikling. Sentralnervesystemet til larvestadiet av organismen er et av de enkleste nervesystemet med lignende oppbygning som hos ryggstrengdyr. Tarmsekkdyr har et tellbart antall celler i nervesystemet på ca. 330 celler, som gjør det lett å studere. En annen fordel er at nervesystemet til tarmsekkdyr er lett mottakelig for både farmakologisk og genetisk induerte endringer. Organismen viser til lite genetisk redundans, og det viktigste er at utviklingen av nervesystemet hos tarmsekkdyr har lignende trekk som utviklingen av nervesystemet hos ryggstrengdyr som mennesker (4).

Problemstillingen i dette prosjektet er dermed todelt. Den første delen er å undersøke effekten av utvalgte signalveier, som GABA, glutamat og kalsiumkanaler i utviklingen av nervesystemet til tarmsekkdyr. Dette er for å finne eksperimentelle tilnærminger for å forårsake og kvantifisere endringer i nervesystemet til tarmsekkdyr. Dette går ut på å bestemme hvilke plasmider og kjemiske stoffer som skal benyttes, i hvilket stadium organismene bør fikseres og optimalisering av utførelsen av avbildningen av organismene. Den andre delen er å bruke disse resultatene for å bestemme om dette er en effektiv tilnæringsmåte for å finne ut om tarmsekkdyr er en god modell for studier av nervesystemets utvikling. Dette kan man finne ut av ved å stille spørsmål om det har blitt forårsaket fenotyper av både organismen og morfologien til nevronene, og om disse fenotypene har en betydning for nervesystemet?

2. Teori

2.1. Tarmsekkdyr (*Ciona Intestinalis*)

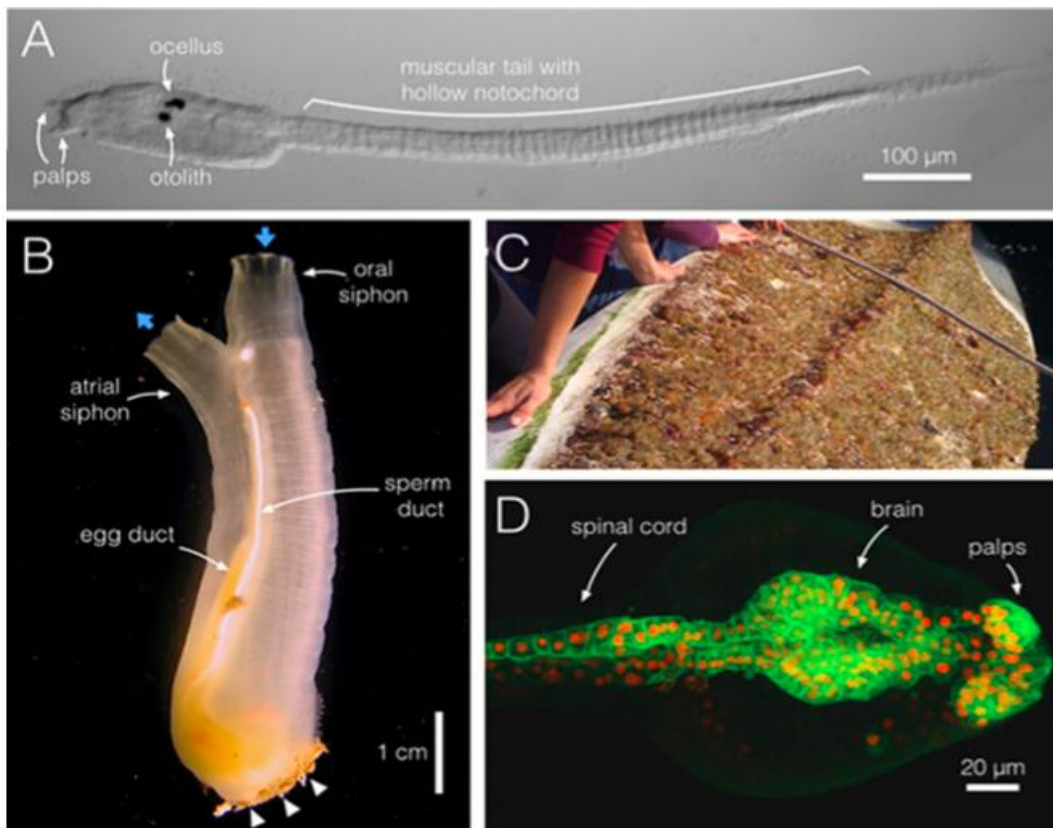
Rekken for ryggstrengdyr (Chordata) har tre undergrupper bestående av virveldyr (Vertebrate), tunikater/kappedyrene (Tunicata) og lansettfisker (Cephalochordata). Organismen (Figur 2-B) som skal studeres i dette prosjektet er som nevnt tarmsekkdyr, og er klassifisert under gruppen tunikater (5). Ryggstrengdyr har karakteristiske trekk som gjør dem spesielle, sammenlignet med andre rekker i dyreriket (Figur 1). Dette er fire karakteristiske trekk som dukker opp på et tidspunkt under utviklingen av organismen, og er ryggstrengen (notochord), et hult nevrالرør (nervestreng) på ryggsiden, postnatal hale og gjelletarm (5).



Figur 1. Karakteristiske trekk hos ryggstrengdyr: ryggstrengen (notochord), nevrالرør (dorsal hollow nerve cord), postanal hale (post-anal tail) og gjelletarm (pharyngeal slits) (6)

De tre nevnte undergruppene av ryggstrengdyr har blitt utviklet fra det samme stamtreet gjennom evolusjon over millioner av år. Mellom disse tre gruppene var det tidligere først trodd at lansettfisker og virveldyr var nærmest i slekt med hverandre, men nyere studier viser at det er tunikater som er den nærmeste slektningen til virveldyr (5).

Tarmsekkdyr har en enkel kroppsplan, som er myk og retraktil (sammentrekkbar) med en gjennomsiktig grønnulaktig farge. Dette gjør organene til organismen synlige. Tarmsekkdyr er poselignende, og har en sylindrisk kroppsform som kan bli opptil 15 cm. Det er vanlig å finne organismene på berggrunn og steinblokker, men også på overflater som metall, betong og tre. Tarmsekkdyr er filterspisere ved at de tar til seg næring i vannet vha. filtrering. Organismen er hermafroditter, men de kan ikke fertilisere seg selv. Fertiliseringen skjer ved at hundrevis av individuelle tarmsekkdyr frigjør egg og sæd-celler samtidig i det omkringliggende sjøvannet, og fertiliseringsprosessen starter når sædcellene møter eggcellene (5).



Figur 2: Tarmsekkdyr (*C. intestinalis*). Utviklingen fra en larve til en filterspisende voksen organisme.

(A) I løpet av sin korte larvefase finner tarmsekkdyr et sted å feste seg til vha. sine fremre klebende palper (vist i både A og D), hvor den initierer metamorfose. Larven svømmer med en muskuløs hale, som stivheten til ryggstrengen (notochord) hjelper til med. Organismen føler lys og tyngdekraften med de pigmenterte hjerneorganene (ocellus og otolith), som er til hjelp for orientering i miljøet. (B.) Et voksent tarmsekkdyr har to sifoner, en oral og en atriell, som er plassert motsatt fra hverandre. De blå pilene indikerer strømmen av vann gjennom organismen. (C.) Tarmsekkdyr festet til undersiden av en kajakk. (D.) En konfokal projeksjon av hjernen og ryggmargen til larvestadiet av en tarmsekkdyr. Cellemembraner er vist med en grønnfarge, og cellekjerner er vist med en rødfarge (5).

2.2. Fordelene ved å velge tarmsekkdyr som modellorganisme

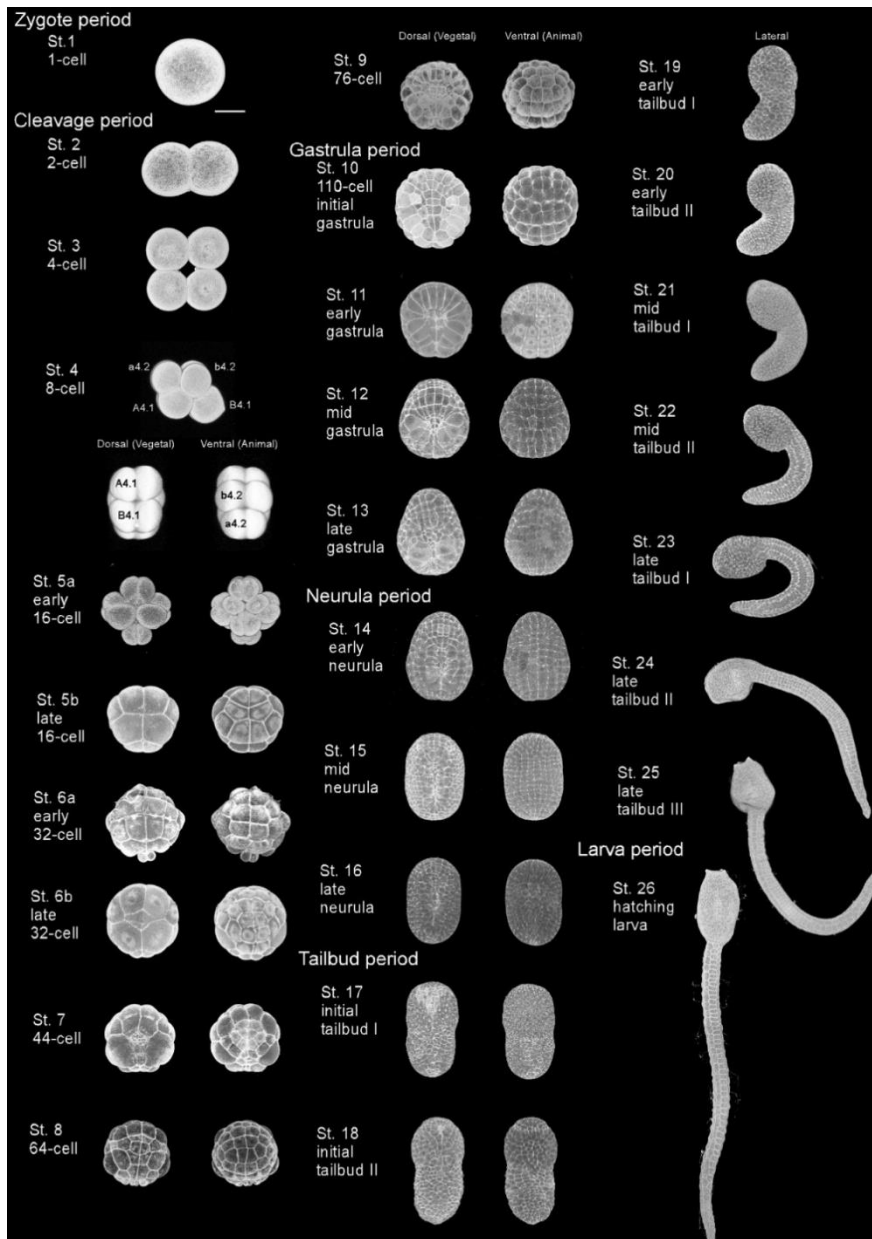
Å velge tarmsekkdyr som en modellorganisme kan ha flere fordeler. Først og fremst er den fylogenetiske posisjonen til tarmsekkdyr en fordel ettersom at organismen regnes som en nær slektning til virveldyr, som mennesket. Det betyr at det finnes betydningsfulle likheter mellom tarmsekkdyr og mennesket, som f.eks. utviklingen av nervesystemet. Andre fordeler er at nervesystemet til tarmsekkdyr er enkelt, sammenlignet med det mer kompliserte nervesystemet hos mennesket. Dette gjør det mulig å forstå utviklingen og prosessene som skjer på cellenivå (9). Tarmsekkdyr har en liten hjerne og nervesystemet består bare av ca. 330 nevroner. I tillegg har nevronene hos tarmsekkdyr en enkel morfologi.

Tarmsekkdyr er gjennomsiktige, dette muliggjør direkte observasjon av vev og organer uten behov for snitting. Denne egenskapen er en fordel siden man da kan lett mikroskopere organismen i sin helhet og likevel observere innsiden. Størrelsen av larvestadiet til organismen gjør at hele organismen kan observeres i ett synsfelt gjennom mikroskopering, dette fører til at man sparer tid til avbildning. En annen tidssparende fordel er at organismen kan utvikles raskt, nesten over natten, til ønsket larvestadiet for prosjektet. I dette prosjektet er det nødvendig med mange forsøksdyr. Dette er ikke et problem ettersom at man kan samle en stor mengde med sædceller og eggceller fra en og samme organisme til *in vitro* fertilisering, noe som igjen gjør at man kan produsere hundrevis av embryoer på kort tid (8). Embryoene har en chorion (forsterhinne) rundt seg, som gjør at de ikke er lett gjennomtrengelig. Ved å fjerne denne ved dekorionering kan embryoene fertiliseres samt være lett gjennomtrengelig for stoffer og kjemikalier. Alle disse nevnte fordelene er grunner til at tarmsekkdyr har blitt valgt som forsøksdyr i prosjektet.

2.3. Livssyklus til Tarmsekkdyr.

Larvene til tarmsekkdyr ser ut som typiske rumpetroll, og de benytter halen til å svømme med (9). I den tidlige utviklingsfasen fra en zygote til en svømmelarve, gjennomgår embryoet et typisk utviklingsmønster (Figur 3). Et embryo utvikles i en beskyttende korion omgitt av fingerlignende projeksjoner av follikkelceller. Omtrent 40 minutter etter befruktning vil en serie med celledeling begynne. Omtrent 4,5 timer etter befruktning har embryoet rundt 112 celler og gjennomgår gastrulasjon. Nevrulering skjer raskt etterpå med dannelsen av et hult nevrallrør (nervestreng) på ryggsiden av organismen. Tarmsekkdyrlarven vil deretter klekke ut fra korionen og begynne å lete etter et passende sted å feste seg til. Denne prosessen skjer ca. 18 timer etter befruktning. Tarmsekkdyret har dermed gjennomgått en metamorfose ved at det har oppstått en utviklingsendring i form og struktur av organismen, som oppstår etter befruktning. Larven klarer å orientere seg i miljøet ved hjelp av to pigmenterte sanseorganer funnet i hjernen (otolitt og ocellus), som registrerer henholdsvis tyngdekraft og lys. I prinsippet vil larven svømme vekk fra lys. Som et resultat av dette vil tarmsekkdyr befinne seg i mørke miljø, som på undersiden av båter, sjømerker og kaier (5).

En fullt utviklet larve består kun av seks vevstyper, som er nervesystemet, ryggstrengen, muskel, ektoderm, endoderm og mesenkym. Ryggstrengen består av bare 40 celler, muskelen av 36 celler og sentralnervesystemet av ca. 330 celler, hvorav 100 er nevroner (8). Etter metamorfose vil ikke tarmsekkdyr ha noen tydelige likheter til virveldyr (9). Den endelige morfologien til et voksent tarmsekkdyr kan oppnås etter noen uker.



Figur 3. Utviklingsfaser til tarmsekkembryoet etter befruktning til en larve. I dette prosjektet ble embryoene fiksert i løpet av trinn 24 (10).

2.4. Nervesystemet til Tarmsekkdyr

2.4.1. Embryonal utvikling av nervesystemet

Utviklingen av sentralnervesystemet til embryoene til tarmsekkdyr er enkel, og har likhetstrekk med utviklingen av sentralnervesystemet til embryoer til virveldyr. Disse likhetene ligger både i de morfologiske og de molekylære egenskapene (8).

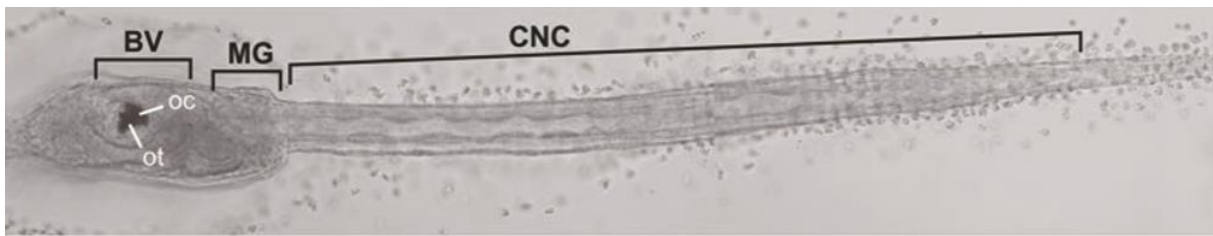
Starten av celleutviklingen av nervesystemet ligger i den grunnleggende cellulære enheten som kalles for nevralkanen. Denne flate nevralkanen ligger på ryggsiden av embryoet, og er den som danner nevralkanen ved at den foldes på en måte som resulterer i et rør. Dette er en

prosess som kalles for nevrulering. Nevralrøret vil deretter utvikle seg til de forskjellige delene av hjernen (11).

Hvordan nevrulering dannes er et sentralt tema i utviklingsbiologien. En svikt i nevruleringen kan føre til nevrulrørsdefekter, som igjen vil påvirke riktig utvikling av nervesystemet. Denne defekten kan f.eks. føre til fødselsskader hos ryggvirveldyr som tarmsekkdyr og mennesker. Ryggmargsbrokk er et vanlig eksempel på en fødselsdefekt forårsaket av nevrulrørsdefekter hos mennesker (12).

2.4.2. Larvens nervesystem

Nervesystemet til larvestadiet til tarmsekkdyr består av noen hundre nevroner. Det består også av et mindre antall ikke-nevronale celler. Nervesystemet til larven er sammensatt av et perifert nervesystem og sentralnervesystemet. Sentralnervesystemet består av hjernevesikler, motor ganglion og en kaudal (bakre del av kroppen) nervestreg (Figur 4) (9).



Figur 4. Sentralnervesystemet til larven til tarmsekkdyr er vist på ryggsiden og halen til organismen. Denne figuren viser sentralnervesystemet med hjernevesikler (BV) som inneholder otolith og ocellus pigmentceller (henholdsvis ot og oc), motor ganglion (MG) og kaudal nervestreg(CNC) som strekker seg langs ryggstrengen (9).

2.5. ETR-1

Studiet går ut på å se utviklingen av nervesystemet. For å se nervesystemet må man skille nevroner fra andre typer celler i tarmsekkdyr. Det ble benyttet grønt fluorescerende protein (GFP) for å markere nevronene i organismen, og på denne måten kan man observere nervesystemet gjennom et konfokalt mikroskop. For å produsere GFP, trenger man et DNA som kan fremme denne produksjonen i cellene. I dette prosjektet ble det brukt ETR-1 som en promotor. En promotor er en region av DNA der transkripsjon av et gen er initiert. Det er GFP som blir produsert i den endelige prosessen ved translasjon.

HrETR-1 (Halocynthia roretzi ETR-1) er et gen som uttrykkes i en stor andel av utviklende nevrone celler i sekkedyr. HrETR-1 er derfor en tidlig nevrone markør som kan brukes til å analysere nevrone differensiering. Genuttrykket av HrETR-1 kommer frem så tidlig som ved

110-celletrinnet i zygotisk utvikling (13). Ved å bruke ETR-1 genen kan man produsere GFP. GFP gir det ønskede signalet som utnyttes i dette prosjektet for å karakterisere nevronene i nervesystemet.

2.6. Nevrotransmittere

Nevroner er de grunnleggende enhetene i nervesystemet. Utveksling av informasjon mellom nevroner er viktig. De ulike molekylene som bærer på signalinformasjonen mellom nevroner kalles nevrotransmittere. Nevrotransmittere kan være eksiterende eller hemmende.

Eksiterende nevrotransmitteres oppgave er å aktivere aksjonspotensialet, mens oppgaven til hemmende nevrotransmittere er det motsatte, å hindre aksjonspotensial. I dette prosjektet er det valgt å se nærmere på nevrotransmitterene er glutamin, glysin, adrenalin og gammaaminobutansyre (GABA) (14).

Glutamin og adrenalin er viktige eksiterende nevrotransmittere, både hos virveldyr og virvelløse dyr. GABA og glysin er viktige inhiberende nevrotransmittere i sentralnervesystemet hos både virveldyr og virvelløse dyr (15).

Nevrotransmittere og deres reseptorer er viktige og spiller en stor rolle for utviklingsprosessen til nervesystemet (16). Ved å hemme eller aktivere nevrotransmittere og deres tilknyttede molekyler, kan man måle effekten av nevrotransmitterne under utviklingen av nervesystemet (f.eks. under utvikling av nevrallrøret).

I dette prosjektet ble det brukt forskjellige kjemiske stoffer som retter seg mot de viktigste nevrotransmitterne som virker på nervesystemet (Tabell 2). Det ble benyttet 5 kjemiske stoffer mot GABA, 9 kjemiske stoffer mot glutamat, 1 kjemisk stoff mot glysin og 2 kjemiske stoffer mot adrenalin. Disse stoffene har ulike signalmål, men det endelige resultatet vil påvirke tilgjengeligheten av den samme nevrotransmitteren. Tilførselen av GABA er for eksempel hemmet ved å blokkere GABA direkte, hemme GABA-transaminase, blokkere GABA-reseptorer, utnytte GABA-reseptorantagonister og ved å hemme GABA-transportere (Tabell 2). Et annet eksempel er tilførselen av glutamat, som kan bli blokkert ved å blokkere glutamatsignaliseringen, hemme glutaminsyntetase, blokkere AMPA-reseptorer, blokkere NMDA-reseptorer og ved å hemme glutamtransportere (Tabell 2).

2.7. Kalsiumkanaler

Kalsium (Ca^{2+}) er et ion som spiller en viktig rolle i funksjonen til eukaryote celler og spesielt i nervesystemet. Kalsium har sin funksjon både ekstracellulært og intracellulært. Ekstracellulært kalsium påvirker nevronenes evne til å eksiteres, og er nødvendig for frigjøring av neurotransmittere. Intracellulært kalsium er bundet til molekyler i cytoplasma, eller i membranbundne organeller som mitokondrier og endoplasmatisk retikulum. Intracellulært kalsium styrer membranpermeabiliteten for kaliumioner, og dermed den totale elektriske aktiviteten til de fleste nevroner. Det er også viktig for frigjøring av neurotransmittere og mange andre celledfunksjoner. Det er kjent at kalsium har en viktig rolle som intracellulært signalmolekyl (17). Kalsiumkanaler spiller en veldig viktig rolle i frigjøringen av neurotransmittere fra det presynaptiske nevronet til synaptisk spalte. Det finnes fire typer kalsiumkanaler (L, N, P og T), og disse identifiseres etter både biofysiske og farmakologiske kriterier (40).

Prosjektet legger vekt på to spenningsregulerte kalsiumkanaler, N-type kalsiumkanaler og T-type kalsiumkanaler. N-type kalsiumkanaler blokkeres av kadmium, og T-type kalsiumkanaler blokkeres av nikkell (Tabell 2). Prosjektet har også lagt vekt på påvirkningen av intracellulære kalsiumkanaler (SOCs) og inositol trifosfat (IP3) reseptorer. SOCs blokkeres av GdCl₃, og 2-APB blokkerer IP3 reseptorer (Tabell 2).

2.8. Neksus (Gap-junction)

En annen signalvei som er viktig for utviklingen av nervesystemet er neksus. Neksus er en av de viktigste kommunikasjonskanalene mellom nevroner. Ved å blokkere neksus i et embryo under utvikling, kan man se dets betydning i utviklingen av nervesystemet. I dette prosjektet ble det kjemiske stoffet carbenoxolone (CBX) (Tabell 2) benyttet for inhibering av neksus.

Neksus er membranstrukturer som danner et nettverk av kanaler slik at kommunikasjon mellom celler som ligger tett inntil hverandre kan oppnås. På denne måten kan utveksling av ioner, sekundære budbringere og små metabolitter mellom cellene foregå. Disse forbindelsene består hovedsakelig av proteinfamilien connexiner. Neksus er viktig for elektriske synapser slik at aksjonspotensialet kan passeres mellom nevroner (10).

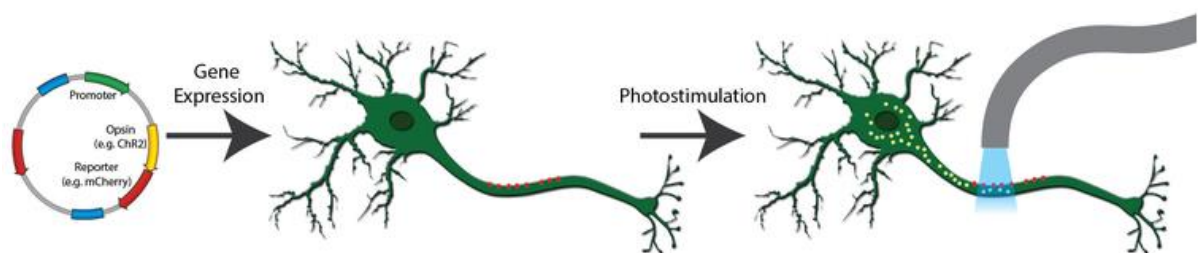
2.9. Optogenetisk verktøy

Optogenetikk er en metode som brukes ved å kombinere lys og genteknikk for å kontrollere nevronaktiviteten (Figur 5). Genteknikk er prosessen der man endrer informasjonen i organismenes genetiske kode. I optogenetiske studier benytter man den spesifikke genetiske

koden til nevronene de ønsker å studere og legger på en ny kode til den. Denne nye koden fører til at disse nevronene klarer å produsere spesielle proteiner som opsiner. Disse proteinene reagerer på spesifikke typer lys. I nevrovitenskap er den mest brukte opsinen kalt channelrhodopsin-2 (ChR2), og kan brukes til å kontrollere nevronaktiviteten.

Nevronaktiviteten til nevroner med ChR2 slås bare på når blått lys lyser dem opp. Dette gir muligheten til kontroll over tidspunktet for nevronaktivitet i nevronene. Normale nevroner påvirkes ikke av blått lys (19). Ved bruk av lys eller begrense lystilgangen, kan man dermed manipulere signalveier ved å aktivere eller deaktivere disse. Når disse opsinene blir benyttet som verktøy for å kontrollere nevronaktiviteten, festes vanligvis fluorescerende proteiner til opsinene for å spore deres uttrykk og plassering i nevronene. Det finnes mange andre typer proteiner som kan kontrolleres av lys, blant annet kryptokromer, fytokromer eller lys-oksxygen-spenningssensing (LOV) -proteiner. Disse fusjonene kan deretter brukes som optiske brytere for å kontrollere proteininteraksjoner, lokalisering eller aktivitet av mange forskjellige typer proteiner (20). Ved hjelp av optogenetikk kan man derfor kontrollere den intracellulære lokaliseringen av proteiner, protein-protein interaksjoner, molekylære signaler osv (21).

I dette prosjektet brukes det to ulike optogenetiske verktøy, PACR og PA-Rac1. PACR er et optogenetisk verktøy som brukes til å kontrollere kalsiumkanaler, og PA-Rac1 er et optogenetisk verktøy som brukes til å kontrollere cellemotilitet.



Figur 5: Skjematisk diagram over et eksempel på et optogenetisk program. Kanalrhodopsin(ChR2) sammen med mCherry uttrykkes i nevroner (røde prikker). Når disse utsettes for lys ved riktig bølgelengde, åpnes kanalene slik at kationer strømmer inn i cellen (gule prikker), og nevronet aktiveres (22).

2.9.1. PACR

Ca^{2+} er viktige sekundære budbringere for signalveier i en eukaryot celle, og er en del av mange forskjellige cellulære prosesser. Ved bruk av kjemiske eller genetisk-kodede indikatorer som optogenetikk, kan betydningen av Ca^{2+} studeres ved å direkte visualisere mulige endringer som har oppstått. Ett av disse optogenetiske verktøyene er PACR (Photoactivatable Ca^{2+} releaser; fotoaktiverbart Ca^{2+} -frigivende protein). PACR blir dannet

ved å sette inn et lyssensitivt proteindomene (LOV2) i et Ca^{2+} -bindende protein, som kalles calmodulin-M13 peptid. PACR brukes til å generere intracellulære Ca^{2+} signaler, ved at celler frigjør Ca^{2+} som svar ved påvirkning av lys med en bestemt bølgelengde (23). Det er blått lys som benyttes i dette studiet.

2.9.2. PA-Rac1

Den andre optogenetisk verktøyet er PA-Rac1. PA-Rac1 er genetisk kodet fotoaktiverbart protein, og er viktig for GTPase som regulerer aktin i cytoskjelettet til cellene. Lokalisert Rac-aktivering eller inaktivering kan påvirke cellebevegelse. PA-Rac1 kan derfor brukes for å kontrollere mobiliteten til cellene, og brukes her på nevronene (24). Det er blått lys som brukes til å inaktivere PA-Rac1 i dette studiet. Dette betyr at aktiveringen av cellebevegelse skjer uten eksponering av blått lys.

3. Material og metode

3.1. Tarmsekkdyr

3.1.1. Innsamling og kultur av tarmsekkdyr

Voksne tarmsekkdyr ble hentet fra båthavnen Bildøy Marina AS, som ligger ved Sotra (20 minutters kjøretur fra SARS laboratoriet). Dyrene ble så tatt med tilbake til fasiliteten, hvor de blir oppbevart. Et eget datastyrt kultursystem for organismene sørget for en kontinuerlig strøm av filtrert vann. Både temperaturen på vannet og strømningshastigheten av vannet blir dataregulert. Voksne tarmsekkdyr klarer å leve i vann med temperatur mellom $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, men de foretrekker en temperatur på $10\text{-}20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.1.2. Etske betraktninger

I dette prosjektet har det blitt forsket på tarmsekkdyr. Organismene er virvelløse organismer, som er i nær slekt med ryggvirveldyr. Alle forsøk på ryggvirveldyr skal følge strenge etiske regler, men pga. at tarmsekkdyr er virvelløse dyr så gjelder ikke denne regelen for denne organismen. Noen unntak finnes for de virvelløse dyrene blekksprut og akkar. Det er vist at tarmsekkdyr ikke viser noen form for smerte ettersom at de mangler gener som er ansvarlig for smertefølelse (25). Dette gjør at forsøkene ikke er etisk problematiske.

Siden prøvemateriale av dyr er direkte involvert i dette prosjektet, følger Universitetet i Bergen retningslinjene for 3R (Replacement, Reduction and Refinement). 3R-ene går ut på erstatning av dyreforsøk med andre alternativer (Replacement), redusere antall dyr som brukes i dyreforsøk (Reduction), og forbedre dyreforsøk for å redusere lidelse og øke dyrevelferd og praktiske eksperimenter (Refinement) (26).

3.1.3. Fertilisering og dekorionering

Det ble utført disseksjon av tarmsekkdyr for å samle både sperm og egg fra organismene. Først ble eggene samlet fra kanalen uten at sperm-kanalen ble brutt. Eggene er ubrukelig videre dersom de kommer i kontakt med spermen ved oppsamling, med tanke på at man har startet fertiliseringsprosessen. Før fertilisering, ble eggene dekorionert i en løsning (10 mL ferdiglaget natrium tioglykolat (NaTio) og 10 dråper 1M NaOH) i 8 minutter. Dekorionering er en metode som muliggjør visualisering av stadier i embryo og larve, ved å fjerne folikkelceller og forsterhinnen (chorion) rundt eggene. Etter ferdig dekorionering av eggene ble løsningen synlig gul. Eggene ble vasket to ganger med ASW (Artificial Sea Water). De dekorionerte eggene ble deretter overført til en petriskål med ASW for å bli vasket nøyaktig med en vakuumslange et par ganger, før $50\text{ }\mu\text{L}$ spermblending ($15\text{ }\mu\text{L}$ sperm, $50\text{ }\mu\text{L}$ TRIS

(pH 9,5) og 950 μL ASW) ble tilsatt for fertilisering. Fertiliseringsprosessen varte i 6-8 min, før overflødig sperm ble vasket vekk med vakuumslange og bytting av ASW.

3.2. Genetiske metoder

3.2.1. Plasmider

I dette prosjektet ble det benyttet tre ulike plasmider. Plasmidet ETR1 ble benyttet i kontrollorganismene og i organismene tilsatt de ulike kjemiske stoffene for påvirkning av nervesystemet. Plasmidene PACR og PA Rac1 ble benyttet i tilsvarende kontrollorganismer og organismene hvor signalveiene ble manipulert ved å kontrollere lysmengden.

Tabell 1. Oversikt over plasmider benyttet til elektroporering.

Plasmider	Målsignal	Konsentrasjon ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
ETR1>UNC76GFP	Kontroll	3,4
ETR-1>msEGFP- PACR>unc-54 3'utr	Kalsiumkanaler	2,0 9,0
ETR-1>mCherry-PA- Rac1>unc-54 3'utr	Cytoskjelett	2,1

3.2.2. Transformasjon

Alle plasmidene brukt i dette prosjektet ble dyrket opp i *E. coli* ved hjelp av transformasjon. Varmesjokk kompetente *E. coli* ble tilført det ønskede plasmidet og satt på is i 30 minutter. Deretter ble røret inkubert ved 42 °C i 45 sekunder før det ble satt tilbake på is i 2 min. Denne forskjellen i temperatur fører til dannelsen av porer i membranen til bakteriene, slik at plasmidet trenger inn. Metoden er kalt for transformasjon. Bakterieløsningen ble tilsatt 300 mL LB-medium (Luria/Bertani buljong) uten antibiotika, et næringsrikt medium for vekst av bakterier, og deretter satt til inkubering ved 37 °C i 1 time. Til slutt ble bakterieløsningen spredt på en agarskål, som ble inkubert over natten ved 37 °C.

Dagen derpå ble en koloni valgt fra agarskålen for videre dyrkning i LB-medium med antibiotika (streptomycin), og satt til inkubering over natten ved 37 °C. Alle plasmidene brukt i dette prosjektet inneholder et gen for streptomycin-resistens som seleksjonsmarkør.

3.2.3. Mini-prep

For å sjekke om det riktige plasmidet ble dyrket, ble det først utført mini-prep, hvor en liten mengde av plasmidet ble brukt. GeneJet Plasmid Miniprep Kit (#K0502) ble benyttet for å ekstrahere plasmid fra bakteriekolonien som ble dyrket. Protokoll A for GeneJET Plasmid Miniprep Kit fra ThermoFisher Scientific ble fulgt for å rense plasmidet (27).

Sentrifugehastigheten som ble benyttet var 1700 G. Det ferdig rensede plasmidet ble satt til side for verifisering ved hjelp av gelelektroforese.

3.2.4. Gelelektroforese

Plasmidet som ble rensert med mini-prep ble kuttet med restriksjonsenzymet PvuI, og kjørt på en 1% agarosegel. Markøren som ble benyttet var 1 KB Plus DNA Ladder (28). Ved avsluttet gelelektroforese, ble gelen analysert på instrumentet ChemiDoc™ CRS+ med Image Lab™. Resultatet fra gelen ble sammenlignet med forventet resultat av restriksjonskuttet plasmid. Programvaren ApE ble benyttet for bearbeidelsen av de forventede resultatene.

3.2.5. Midi-prep: DNA-rensing og bestemmelse av mengde

Etter å ha bekreftet plasmid DNAet ekstrahert fra bakteriene, ble all mengde av produsert plasmid fra den ene kolonien rensert ved hjelp av Nucleobond Xtra Midi. Protokoll (Rev. 15) fra produsenten TaKaRa (29). For å regne ut konsentrasjonen av ferdig rensert plasmid, ble det målt på et spektrofotometer før det ble beregnet.

3.2.6. Elektroporering

Metoden elektroporering benytter seg av et høyspennet elektrisk sjokk på celler, som gjør det mulig å introdusere fremmed DNA. Prosedyren er en standard genoverføring. I dette prosjektet blir metoden brukt for å introdusere plasmidene gitt i Tabell 1 til embryoene.

Før elektroporering, ble de ferdig fertiliserte eggene blandet med 100 µg ønsket plasmid-løsning og 400 µL 96 % mannitol. Oversikt over de ulike plasmidene som ble brukt er gitt i Tabell 1. Denne blandingen ble overført til en kyvette og deretter tilført en elektrisk puls på instrumentet Bio-Rad Gene Pulser XCell™ (50 V og 4 mm kyvette mellomrom). Denne elektriske pulsen skaper porer i membranen til embryoene, slik at plasmid kan trenge inn. Innholdet i kyvetten ble deretter overført til en større petriskål. Ødelagte egg ble vasket bort før antibiotika (50 µL streptomycin) ble tilsatt og embryoene ble satt til inkubering i omtrent 24 timer ved 12-14 °C.

3.2.7. Kjemiske stoffer og optogenetikk

Ved larvestadiet 13 (Figur 3) ble organismene tilsatt ulike kjemiske stoffer (Tabell 2) for inhibering og blokkering av viktige funksjoner for utvikling av nervesystemet. Dette stadiet var omtrent etter 10 timers inkubering. Organismene ble deretter satt tilbake til videre inkubering. Plasmidet for kontroll ble benyttet for denne metoden (Tabell 1).

Tabell 2. Kjemiske stoffer gruppert med dets målsignal som blir brukt i prosjektet.

Kjemisk stoffer	Forkortelse	Effekt
GABA		
2-Aminoethyl hydrogen sulfat/Ethanolamine-O-sulfate		Hemmer GABA (30)
Vigabatrin		Hemmer GABA-transaminase (31)
Bicuculine		Blokkerer GABA-reseptorer (32)
Picrotoxin		GABA-reseptorantagonist (33)
(S)-1-[2-[Tris(4-methoxyphenyl)methoxy]ethyl]-3-piperidinecarboxylic acid	SNAP-5114	Hemmer GABA-transportere (34)
Glycine		
ALX-5407		Hemmer glysin-transportere (35)
Glutamat		
L-Methionine sulfoximine		Hemmer glutamin (36)
L-theanine		Hemmer glutamat-transportere (37)
Dihydrokainic acid		glutamat (GTL) transporthemmere (38)
Valproic Acid	VPA	Blokkerer signalisering av glutamat
Ro25-6981 maleate		Blokkerer NMDA-reseptorer (39)
1-(4-aminophenyl)-4-methyl-7,8-methylenedioxy-5H-2,3-benzodiazepine	GYK-152466	Blokkerer AMPA (α -amino-3-hydroksey-5-metyl-4-isoksazolpropionsyre)-reseptorer (40)
Kynurenic acid	KYNA	antagonist av NMDA, AMPA og kainatreseptorer (41)
N-(Carbobenzyloxy)-L-glutamic acid, Z-L-Glutamic acid	Z-Glu-OH	
2,3-dioxo-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxaline	NBQX	Blokkerer AMPA-reseptorer (42)
Adrenalin		
Metoprolol		Blokkering av β 1-reseptorer (43)
Propranolol		Er ikke-selektiv β - reseptorblokker (44)
Calcium voltage-gated		
Cadmium		Blokkerer N-type spenningsregulerte kalsiumkanaler (45)
Nickel		Blokkerer T-type spenningsregulerte kalsiumkanaler (45)
Calcium store-operated channels		
GdCl ₃		Blokkerer intracellulære kalsiumkanaler/Store-operated Calcium channels (SOCs)
2-APB (2-Aminoethoxydiphenyl borat)		Blokkerer IP3 reseptorer (46)
Gap junction		
CBX		Blokkerer neksus (47)
ATP		
β -guanidinopropionic acid		Inhiberer kreatin transportere (48)
Motility		
CK-666		Arp2 / 3-komplekset hemmer viktig forgrenet aktin-nukleering (49)
Fingolimod	FTY720	Sfingosin 1-fosfatreseptoragonist (50)

For den optogenetiske metoden ble plasmidene (PACR og PA-Rac1, Tabell 1) fordelt i to skåler etter elektroporering, dette for å inkubere de i blått lys med gjenbrukbare isblokker ved 12-14 °C. Den ene skålen ble pakket inn i aluminiumsfolie, slik at embryoene ble utviklet i mørke forhold. For PACR er kontrollen den som ble inkubert med blått lys, mens for PA-Rac1 er kontrollen den som ble inkubert uten lys.

3.3. Fiksering og tillaging av preparat

Organismene ble fiksert etter at de hadde utviklet seg til ønsket stadium av embryogenesen, som er larvestadiet 24 (Figur 3). De ble samlet i et eppendorfrør, og tilsatt 200 µL fikseringsløsning (6,3 mL MEM-FA (0,1 M MOPS (pH 7,4) 0,5 M NaCl, 1 mM EGTA), og 3,7 mL 10 % formalaldehyd), hvor de lå i 15 min. MEM-FA blir preparert uten formalaldehyd, dette blir tilsatt rett før bruk. Løsningen ble fjernet og det ble tilsatt 100 µL PBT løsning (1x PBS, 0,01 % Triton-x100) for vasking av organismene i 20 minutter. Dette ble gjentatt totalt tre ganger. Organismene ble deretter inkubert over natten på kjøll (4 °C) i en phalloidinløsning (Alexa Fluor™ 647 phalloidin), som ble løst i PBT. Dette for å visualiseres F-aktin under mikroskopet. Dagen derpå ble organismene vasket to ganger med PBT, og tilsatt 200 µL løsning med 2 % DABCO og 50 % glycerol/PBS for tillaging av preparat til mikroskopering.

3.4. Konfokal mikroskopi

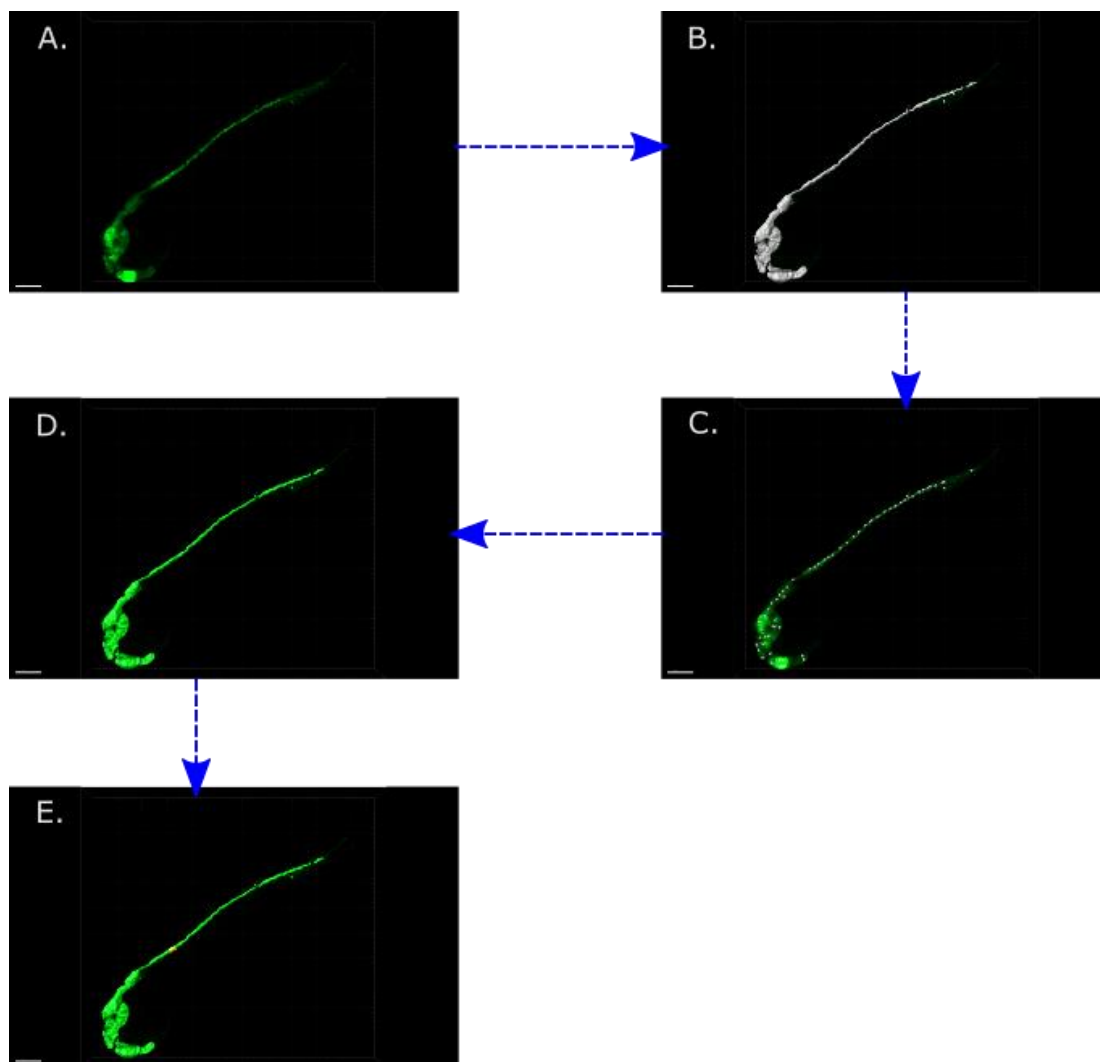
Det ble benyttet et Olympus konfokal laser scanning mikroskop, FV3000, for visualisering av organismer med fluorescerende signal under et 20X objektiv. Larver som hadde sterkest signal ble valgt til avbildning for videre analysering. Bølgelengdene brukt for avbildning var 488 λ og 640 λ.

3.5. Analyseprogram

3.5.1. Analyse av morfologien til nevroner

3.5.1.1. *Imaris*

Imaris er et visualiserings- og analyseringsverktøy for bilder i 3D og 4D laget av Oxford Instruments. Programvaren ble brukt for å finne nevroner som gir fluorescens signal i organismene, og kartlegge cellenes størrelse, form og volum av cellene. Figur 6 A-E. viser prosessgangen ved benyttelse av programvaren, for deteksjon av nevronene.

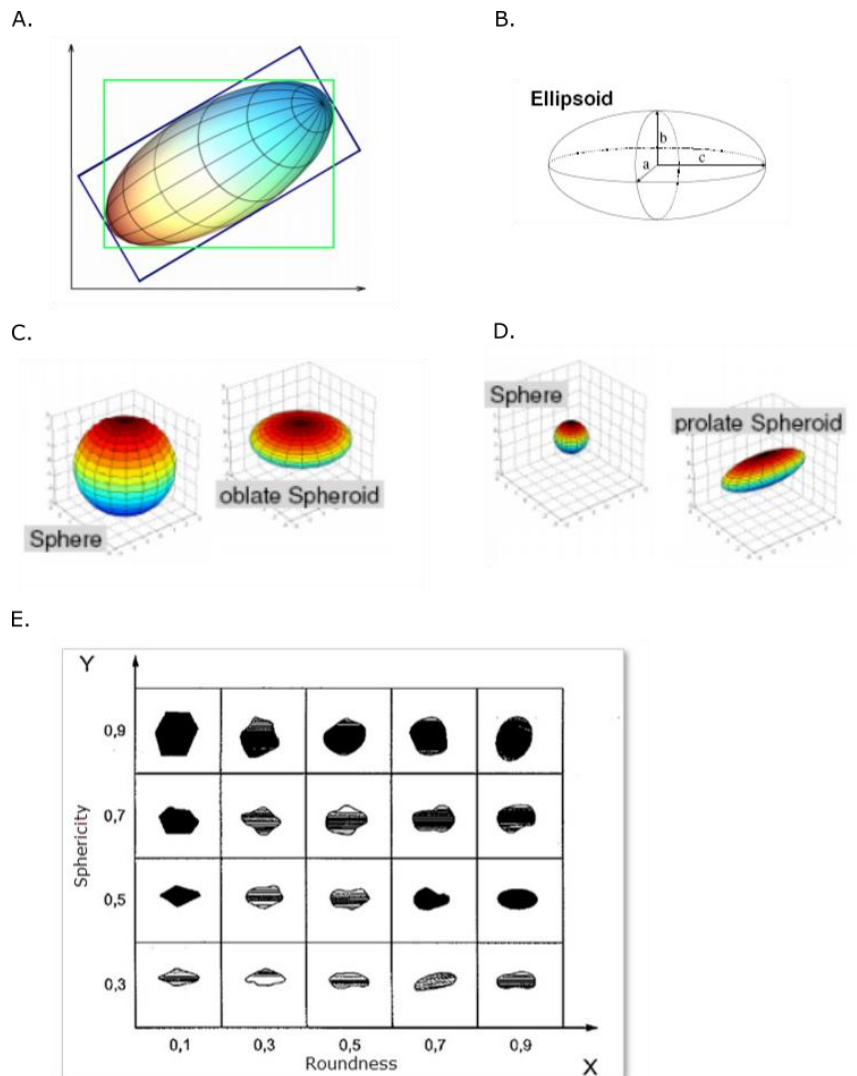


Figur 6. Prosessgangen ved bruk av programvaren Imaris. (A.) GFP som viser signal i nervesystemet (B.) En grå «overflate» markerer området med fluorescens (C.) Overflaten av nervecellene blir vist som sirkler (D.) De endelige områdene av nervecellene vises (E.) Verdier av nervecellens morfologi har blitt kalkulert. Det gule område midt på bildet indikerer én nervecelle.

Overflatestatistikken (Surface) ble automatisk beregnet for hver overflate på Imaris.

Parameterne som ble målt var nevronenes område, avgrensingsboksen (lengde A-C), ellipsoiden (lengde A-C), oblat ellipsoide, prolate ellipsoide, sfærisitet og volum.

Området er størrelsen på en overflate. Avgrensingsboksen (lengde A, B og C) er en rektangulær boks i 3D, eller et rektangel i 2D, som inneholder et objekt (Figur 7 A). Objektet her er nevronene. Ellipsoide er en type andregradsflate, hvor A, B og C (lengdene på de tre halvaksene) er faste positive reelle tall som bestemmer formen av ellipsoiden (Figur 7 B). En oblat ellipsoide er en disk-lignende sfæroide (Figur 7 C), mens en prolate ellipsoide er en sigar-lignende sfæroide (Figur 7 D). Sfærisitet er et mål på hvor sfærisk et objekt er. Volum er en kvantifisering av hvor mye plass et objekt opptar (51).



Figur 7. Noen parametere fra Imaris. (A.) Avgrensingsboksen for et objekt. Aksejusterte avgrensingsboksen (AA) er vist i grønt. Objektorienterte avgrensingsboksen (OO) er vist i blått, og er parameteren som har blitt beregnet i dette prosjektet. (B.) Ellipsoiden til objektet, hvor halvaksene er a, b og c. (C.) En vanlig sfære sammenlignet med en oblat sfæroide, hvor en oblat sfæroide er mer flat. (D.) En vanlig sfære sammenlignet med en prolate sfæroide, hvor en prolate sfæroide er mer forlengt. (E.) Krumbeins digram for en objektets rundhet og sfærisitet. Modifisert bilde (51,52).

3.5.1.2. Graphpad

Verdiene for nevronene fra Imaris ble lagt inn i Graphpad. En ferdig mal for Kruska-Wallis test, Mann-Whitney test og for fiolin plott ble benyttet. En fiolin plott viser distribueringen av numerisk data for en eller flere grupper ved bruk av tetthetskurver, som viser medianen (rød stiplet linje) og interkvartilbredden (grønn stiplet linje). Kruska-Wallis test ble benyttet for å sammenligne flere enn to verdier. Det er en rangsumtest for tilfeller med mer enn to datasett, og kan benyttes til å sammenligne middelveier når dataene ikke er normalfordelt. Mann-Whitney test ble benyttet for å sammenligne to verdier. Det er en ikke-parametrisk test som kan benyttes for å sammenligne to uavhengige datasett. Testen går ut på at alle verdiene fra

de to datasettene rangeres i en stigende rekkefølge, og at numrene for begge settene summeres. Deretter vurderes størrelsene på disse rangsummene for å avgjøre om det er en signifikant forskjell mellom de to datasettene (53).

3.5.2. Fenotypeanalyse på hele organismen

Det ble benyttet to programvarer for å vurdere en fenotype likheter og forskjeller mellom organismene avbildet med konfokal mikroskopi.

3.5.2.1. *Fiji*

Fiji er en programvare for bildebehandling, som gjør det lett å analysere bilder fra mikroskopi. Mikroskopet tar tredimensjonale bilder av 80 ulike snitt på z-prosjeksjon. Programvaren ble brukt for å komprimere alle snittene til ett bilde, slik at man kan se den helhetlige organismen.

Prosjeksjonen er todimensjonal, og det viser hele organismen. Bildet ble skalert til 1024 pixler bredde og 1024 pixler høyde. Det ble brukt to av tre fluorescensens bilder (kanal 1 og 2), rosa (phalloidin) og grønt (GFP), for videre analysering på programvaren PhenoRipper. Den grønne kanalen representerer signaler i nervesystemet.

3.5.2.2. *PhenoRipper*

PhenoRipper er designet for analysering av bilder fra mikroskopering. Programvaren analyserer hele organismene, og brukes for å studere morfologisk karakteristikk (fenotype) av organismene. Programvaren sammenligner og sorterer organismene etter hva som er likt og hva som er forskjellig mellom larvene hvor det har blitt tilsatt kjemiske stoffer. Resultatene presenteres basert på deres fenotypiske likheter og fenotypiske forskjeller. De som har lignende fenotyper, vil gruppere seg nær hverandre på plottet som dannes.

4. Resultat

4.1. Nevronenes morfologi

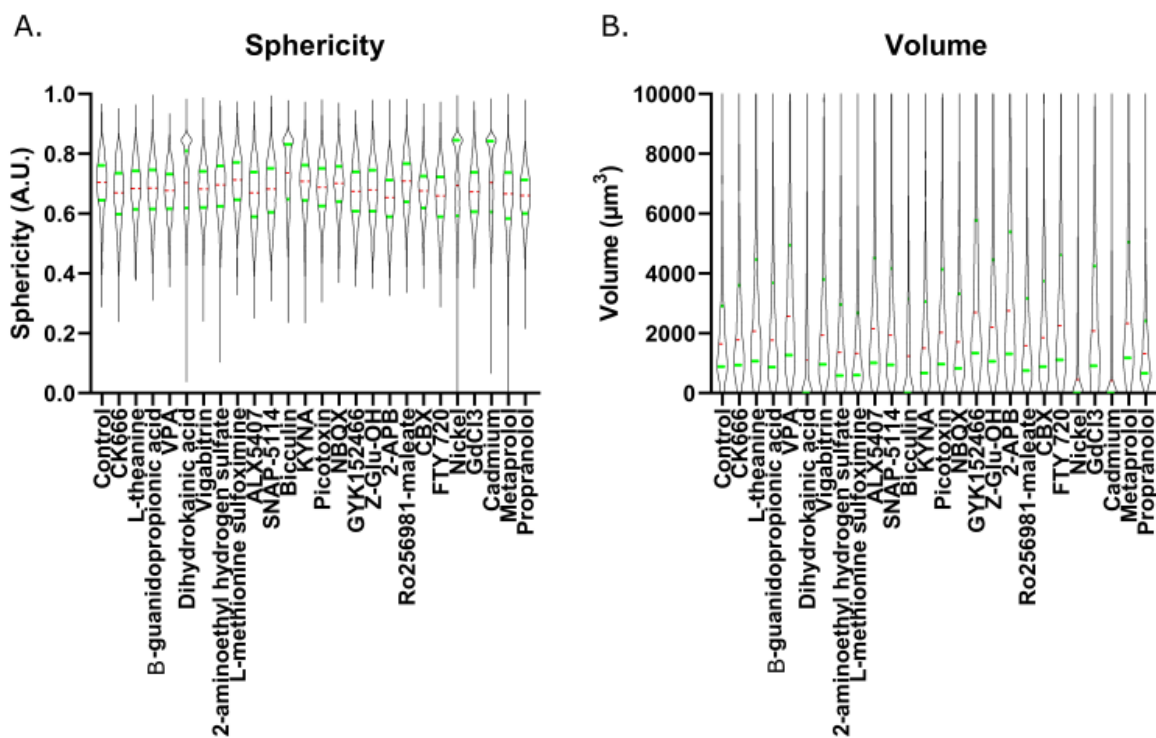
Ved tilsetning av de utvalgte kjemiske stoffene med kjent effekt, kan man se om disse gir en endring i morfologien til nevronene til tarmsekkdyr. Hensikten er å finne ut om de utvalgte signalveiene hos tarmsekkdyr har en betydning for utviklingen av nevronene. Det ble analysert totalt 411 tarmsekkdyr med programvaren Imaris. Analysen ble utført for å kvantifisere effektene på nivået til de enkelte celleegenskapene. Disse verdiene ble plottet inn i fiolin plott, og resulterte i 11 forskjellige plott for både de kjemiske stoffene tilsatt og plasmidene tilsatt for optogenetikk. Figur 8 og Figur 9 viser to av disse plottene, sfærisiteten og volumet til nevronene.

Statistikken er gitt i vedlegget, og er oppsummert fra Tabell 2-Tabell 11. Det ble utført en Kruska-Wallis test ved sammenligning av kontroll med kjemiske stoffer tilsatt (Tabell 2-Tabell 10). For optogenetikk ble det utført en Mann-Whitney test (Tabell 11).

Verdiene som er oppsummert i tabellene bekrefter observasjoner fra fiolin-plottene, og er gjeldene for diskusjonen videre. Sammenlignet med kontrollen forteller de røde områdene i tabellen at nevronene har økning av parameteren, mens de grønne områdene tilsvarer en minking av parameteren. De hvite områdene tilsvarer ingen signifikant endring sammenlignet med kontrollen. Det er noen parametere som ikke er relevant å se på, og det er parameterne for oblat og prolate ellipsoidene. Dette er pga. de fleste kjemiske stoffene tilsatt resulterte i ingen signifikant forskjell for disse parameterne.

4.1.1. Morfologien til nevronene endres ved påvirkning av utvalgte signalveier

Sfærisiteten av nevronene for kontrollen ligger på gjennomsnitt omtrent 0,7 på fiolin plottet (Figur 8 A), og medianen til volumet for kontrollen ligger på under $2000 \mu\text{m}^3$ (Figur 8 B). De fleste kjemiske stoffene tilsatt har ført til en endring av både sfærisitet og volum, hvor det ble både observeres en økning og en minking.



Figur 8. Sfærisitet og volum av nevronene for kontrollorganismen og organismer tilsatt utvalgte kjemiske stoffer. De røde strekene indikerer medianen til nervecellene, mens de grønne strekene indikerer første og andre kvartil av verdiene. (A.) Fiolin plott av nevronenes sfærisitet ved tilsetning av tilsvarende kjemiske stoffer (B.) Fiolin plott av nevronenes volum ved tilsetning av tilsvarende kjemiske stoffer.

4.1.1.1. Neurotransmittere

Neurotransmittere er molekyler som hjelper til med utveksling av informasjon ved å bære på signalinformasjon mellom nevroner. Hensikten er å se om morfologien til nevronene endres ved å hemme eller blokkere utvalgte neurotransmittere.

4.1.1.1.1. GABA

De utvalgte kjemiske stoffene som ble tilsatt til larvene var Vigabatrin, 2-aminoethyl hydrogen sulfat, SNAP5114, Bicculine og Picotoxin. Disse stoffene påvirker tilførselen av GABA til nervesystemet.

Resultatene viser at Bicculine har resultert i en betydelig økning av sfærisiteten, og en betydelig minking av volumet til nevronene. Resterende stoffer har resultert i en både en signifikant økning og minking av sfærisiteten og volumet av nevronene. Tabell 2 viser en oversikt for de ulike kjemiske stoffene som virker på GABA. Her er det en tydelig todeling av de kjemiske stoffene der Vigabatrin, SNAP-5114 og Picotoxin har samme mønster. De øker for de fleste parameterne utenom sfærisiteten som minker. 2-Aminoethyl hydrogen

sulfate og Bicculine har det motsatte mønsteret. Bicculine minker for de fleste parameterne utenom sfærisiteten som øker, mens 2-Aminoethyl hydrogen sulfate har noen få parameter som minker, og er dermed satt i samme gruppe som Bicculine.

Tabell 3. Oppsummerte resultater for GABA: Rød: signifikant lavere verdi (økning), grønn: signifikant høyere verdi (minking), hvit: ingen signifikant endring.

	Area	Bounding Box Length A	Bounding Box Length B	Bounding Box Length C	Ellipsoid Axis Length A	Ellipsoid Axis Length B	Ellipsoid Axis Length C	Ellipticity oblate	Ellipticity prolate	Sphericity	Volume
Control vs. Vigabitrin								X	X		
Control vs. Picrotoxin								X	X		
Control vs. SNAP-5114								X	X		
Control vs. 2-aminoethyl hydrogen sulfate	X		X	X		X	X	X	X	X	
Control vs. Bicculine											

4.1.1.1.2. Glutamat

De utvalgte kjemiske stoffene som ble tilsatt til larvene var L-theanine, VPA, Dihydrokainic acid, L-methionine sulfoximine, KYNA, NBQX, GYK-152466, Z-Glu-OH og Ro25-6981.

Disse stoffene påvirker tilførselen av glutamat til nervesystemet.

De fleste kjemiske stoffene som påvirker glutamat resulterte i lavere sfærisitet av nevronene, mens de gav både en minking og en økning av volumet til nevronene. Tilsetning av GYK-152466 og Z-Glu-OH resulterte i en mye lavere sfærisitet, mens tilsetning av VPA resulterte i at nevronene fikk et mye større volum.

Dersom man ser på Tabell 4 deler stoffene for glutamat seg i tre grupper etter ulike fargemønstre. L-theanine, VPA, GYK-152466 og Z-Glu-OH er en gruppe hvor de fleste parameterne øker. Dihydrokainic acid og L-methionine sulfoximine er den andre gruppen hvor alle parametere som slår ut øker. KYNA, NBQX og Ro25-6981 maleate er den siste gruppen hvor de fleste eller ingen av parameterne har endret seg.

Tabell 4. Oppsummerte resultater for glutamat: Rød: signifikant lavere verdi (økning), grønn: signifikant høyere verdi (minking), hvit: ingen signifikant endring.

	Area	Bounding Box Length A	Bounding Box Length B	Bounding Box Length C	Ellipsoid Axis Length A	Ellipsoid Axis Length B	Ellipsoid Axis Length C	Ellipticity oblate	Ellipticity prolate	Sphericity	Volume
Control vs. Ro256981-maleate	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Control vs. NBQX	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Control vs. KYNA	x		x	x		x	x	x	x	x	x
Control vs. L-theanine		x			x			x	x		
Control vs. VPA		x						x	x		
Control vs. GYK152466								x	x		
Control vs. Z-Glu-OH								x	x		
Control vs. Dihydrokainic acid										x	
Control vs. L-methionine sulfoximine				x				x	x	x	

4.1.1.1.3. Glysin

ALX5407 er et kjemisk stoff som har en påvirkning på neurotransmittoren glysin.

Sfærisheten til nevronene ved tilsetning av ALX5407 minker, mens volum og de andre parameterne øker.

Tabell 5. Oppsummerte resultater for glysin: Rød: signifikant lavere verdi (økning), grønn: signifikant høyere verdi (minking), hvit: ingen signifikant endring.

	Area	Bounding Box Length A	Bounding Box Length B	Bounding Box Length C	Ellipsoid Axis Length A	Ellipsoid Axis Length B	Ellipsoid Axis Length C	Ellipticity oblate	Ellipticity prolate	Sphericity	Volume
Control vs. ALX5407								x	x		

4.1.1.1.4. Adrenalin

For å påvirke neurotransmitteren adrenalin i nervesystemet, ble de kjemiske stoffene Metoprolol og Propranolol benyttet. Sfærisheten til nevronene ble mindre etter tilsetning av Metoprolol og Propranolol. Volumet av nevronene økte for Metoprolol og minket for Propranolol. Det eneste som er likt mellom disse to stoffene er sfærisheten til nevronene, ellers er alle parameterne forskjellige fra hverandre.

Tabell 6. Oppsummerte resultater for adrenalin: Rød: signifikant lavere verdi (økning), grønn: signifikant høyere verdi (minking), hvit: ingen signifikant endring.

	Area	Bounding Box Length 00 A	Bounding Box Length 00 B	Bounding Box Length 00 C	Ellipsoid Axis Length A	Ellipsoid Axis Length B	Ellipsoid Axis Length C	Ellipticity oblate	Ellipticity prolate	Sphericity	Volume
Control vs. Metoprolol								X	X		
Control vs. Propranolol	X		X			X	X				

4.1.1.2. Kalsiumkanaler

Kalsiumkanaler er viktig for frigjøring av neurotransmittere og mange andre celledfunksjoner. Nickel, Cadmium, GdCl₃ og 2-APB er kjemiske stoffer som ble benyttet for å påvirke kalsiumkanalene. Nickel og Cadmium gir et lignende mønster, mens GdCl₃ og 2-APB forårsaker andre endringer i nevronenes morfologi.

Resultatene viser en betydelig minking i sfærishet ved tilsetning av 2-APB. Volumet til nevronene ble betydelig redusert av både Nickel og Cadmium, mens tilsetning av 2-APB gav betydelig økning av volumet.

Dersom man ser på fargemønstrene i Tabell 7, deler stoffene seg i to ulike grupper. Nickel og Cadmium gav lavere verdier for nesten alle parameterne, mens det motsatte er resultatet for GdCl₃ og 2-APB.

Tabell 7. Oppsummerte resultater for kalsiumkanaler: Rød: signifikant lavere verdi (økning), grønn: signifikant høyere verdi (minking), hvit: ingen signifikant endring.

	Area	Bounding Box Length A	Bounding Box Length B	Bounding Box Length C	Ellipsoid Axis Length A	Ellipsoid Axis Length B	Ellipsoid Axis Length C	Ellipticity oblate	Ellipticity prolate	Sphericity	Volume
Control vs. 2-APB								X	X		
Control vs. GdCl3								X	X		
Control vs. Nickel										X	
Control vs. Cadmium										X	

4.1.1.3. Neksus

Neksus er en av de viktigste kommunikasjonskanalene mellom nevroner. CBX er et kjemisk stoff som ble benyttet for å påvirke neksus i nervesystemet. Tilsetning av CBX gav en reduksjon i sfærisitet og ingen endring for volumet til nevronene.

Tabell 8. Oppsummerte resultater for neksus: Rød: signifikant lavere verdi (økning), grønn: signifikant høyere verdi (minking), hvit: ingen signifikant endring.

	Area	Bounding Box Length A	Bounding Box Length B	Bounding Box Length C	Ellipsoid Axis Length A	Ellipsoid Axis Length B	Ellipsoid Axis Length C	Ellipticity oblate	Ellipticity prolate	Sphericity	Volume
Control vs. CBX		X			X			X	X		X

4.1.1.4. Mobilitet

De utvalgte kjemiske stoffene med påvirkning på cellens mobilitet, er CK666 og FTY720. Det observeres en reduksjon i sfærisitet ved tilsetning av begge stoffene, og en betydelig økning av volum ved tilsetning av FTY720. I Tabell 9 er fargemønstrene til disse to stoffene nesten identiske.

Tabell 9. Oppsummerte resultater for mobilitet: Rød: signifikant lavere verdi (økning), grønn: signifikant høyere verdi (minking), hvit: ingen signifikant endring.

	Area	Bounding Box Length A	Bounding Box Length B	Bounding Box Length C	Ellipsoid Axis Length A	Ellipsoid Axis Length B	Ellipsoid Axis Length C	Ellipticity oblate	Ellipticity prolate	Sphericity	Volume
Control vs. CK666					X			X	X		X
Control vs. FTY 720								X	X		

4.1.1.5. ATP-tilførsel

ATP-tilførselen er viktig for alle celler for å få nok energi til å utføre forskjellige cellefunksjoner. β -guanidopropionic acid er et kjemisk stoff som ble benyttet for å påvirke ATP-tilførselen til nevronene. Tilsetning av β -guanidopropionic acid gav en reduksjon i sfærisiteten til nevronene, mens det var ingen signifikant endring i volumet.

Tabell 10. Oppsummerte resultater for ATP: Rød: signifikant lavere verdi (økning), grønn: signifikant høyere verdi (minking), hvit: ingen signifikant endring.

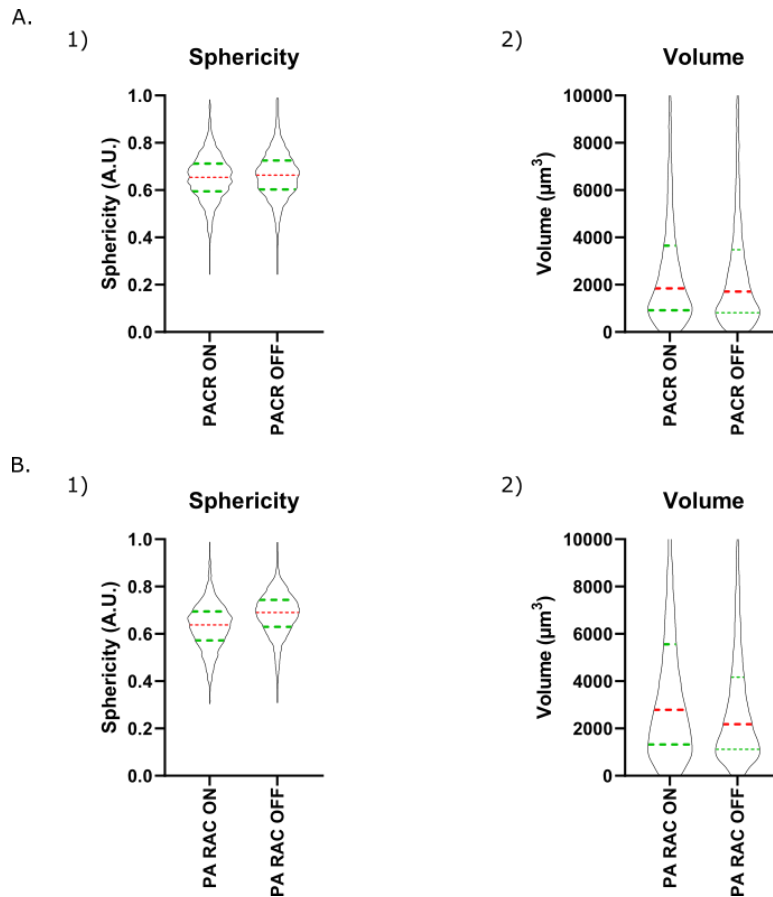
	Area	Bounding Box Length A	Bounding Box Length B	Bounding Box Length C	Ellipsoid Axis Length A	Ellipsoid Axis Length B	Ellipsoid Axis Length C	Ellipticity oblate	Ellipticity prolate	Sphericity	Volume
Control vs. β -guanidopropionic acid		x			x			x	x		x

4.1.2. Optogenetikk: PACR og PA-Rac1

Optogenetikk er en metode som benyttes for å kontrollere celleaktiviteter. Hensikten ved bruk av optogenetikk er å bekrefte endringer i nevronenes morfologi. De kjemiske stoffene benyttet kan ha resultert til påvirkninger på andre typer celler, og ikke bare på nevronene. For å utelukke dette ble plasmider som koder for nevrone-spesifikke funksjoner benyttet. Plasmidet for PACR ble benyttet for å manipulere aktiviteten av kalsiumkanaler, mens plasmidet for PA-Rac1 ble benyttet for å manipulere motiliteten til nevronene.

Figur 9. viser tarmsekkdyr som ble tilsatt plasmidet PACR og PA-Rac1, hvor de ble inkubert både med og uten blått lys. For PACR er organismene som ble inkubert med blått lys kontrollen, mens organismene som ble inkubert uten lys er kontrollen for PA-Rac1. For PACR er medianen til kontrollen på litt over 0,6, mens volumets median er litt under 2000 μm^3 . For PA-Rac1 er medianen for sfærisiteten på omtrent 0,7, mens volumets median er litt over 2000 μm^3 . Det ble utført Mann-Whitney test for å sammenligne parameterne gitt for nevronene (Tabell 11).

Resultatene viser en minking av sfærisitet og volum til nevronene til larvene som ble inkubert i et mørkt miljø. De fleste parameterne slo derimot ut som ingen signifikant endring. For PA-Rac1 ble det en endring for både sfærisitet og volumet på nevronene. I et miljø med blått lys ble nevronene mindre i sfærisitet, mens de derimot ble større i volum. Sfærisiteten kom på litt over 0,6, mens volumet kom på omtrent 3000 μm^3 . De fleste av parameterne for PA-Rac1 økte i verdi.



Figur 9. Endring i sfærisitet og volum av nevronene ved bruk av optogenetiske verktøy. ON tilsvarer med lys, OFF tilsvarer uten lys. Organismene som ble utviklet med blått lys er kontrollen. De røde strekene indikerer medianen til nervecellene, mens de grønne strekene indikerer første og andre kvartil av verdiene (A.) Fiolin plott for PACR, av følgende 1) Sfærisitet og 2) Volum til nevronene. Kontrollen er PACR ON. (B.) Fiolin plott for PA-Rac1, av følgende 1) Sfærisitet og 2) Volum til nevronene. Kontrollen er PA RAC OFF.

Tabell 11. Oppsummerte resultater for PACR og PA-Rac1: Rød: signifikant lavere verdi (økning), grønn: signifikant høyere verdi (minking), hvit: ingen signifikant endring.

	Area	Bounding Box Length A	Bounding Box Length B	Bounding Box Length C	Elipsoid Axis Length A	Elipsoid Axis Length B	Elipsoid Axis Length C	Ellipticity oblate	Ellipticity prolate	Sphericity	Volume
PACR ON vs. PACR OFF	X	X		X	X	X		X	X		
PA RAC OFF vs. PA RAC ON								X	X		

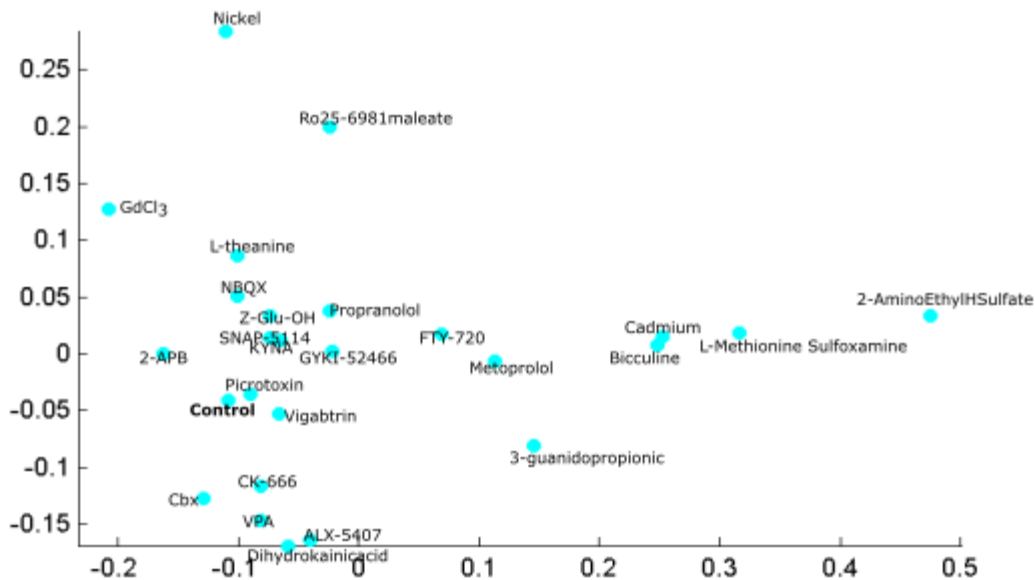
4.2. Analyse av fenotypiske endringer på organismen

De utvalgte kjemiske stoffene vil også påvirke utviklingen av nervesystemet, som igjen vil påvirke utviklingen av organismen. En fenotypeanalyse ble dermed utført for å se om det observeres en fenotypeendring på utviklingen av tarmsekkdyr ved benyttelse av disse stoffene. Det ble analysert 499 tarmsekkdyr med programvaren PhenoRipper, bestående av organismer brukt for kontroll og organismer tilsatt ulike kjemiske stoffer. PhenoRipper hjelper til med å karakterisere de ulike fenotypene samt gruppere de som ligner på hverandre.

Fenotyperesultatet ble brukt for å se på hva slags effekt de utvalgte kjemiske stoffene har på organismene, ettersom at man vet at de enten blokkerer eller inhiberer forskjellige signalveier og kanaler. Resultatet blir presentert på to forskjellige måter: et todimensjonalt plott, og representative bilder av larvene for kontroll og larver med utvalgte kjemiske stoffer. Det todimensjonale plottet viser fenotyper som endres på den vertikale og horisontale akse sammenlignet med kontrollen. Fenotypen som endres blir dermed vurdert etter hvor på akse den befinner seg (Figur 10). De mest deformerte organismene vil befinne seg lengst fra kontrollen.

Det neste trinnet er å visuelt observere hvordan larvene med de kjemiske stoffene ser ut sammenlignet med kontrolldyrene. Det ble benyttet omtrent 18 larver for kontroll og for hvert kjemisk stoff. Av alle disse larvene, ble det valgt ut representative larver for både kontroll og larver tilsatt de ulike kjemiske stoffene. Kontrollen er et normalt utviklet larve, som benyttes til å sammenligne med larvene utviklet med de ulike kjemiske stoffer. Dette er for å finne ut om det har dannet endring i fenotyper.

Hensikten med analysen er å se utviklingen av nervesystemet. ETR1-GFP er DNA som markerer nervesystemet med et grønt fluorescerende lys. Det grønne signalet representerer dermed både nevronene og det samlede nervesystemet. Først blir den generelle anatomien til de utviklede larvene vurdert. Det neste som blir vurdert er signalet i nervesystemet, hvor man forventer et sammenhengende signal. Deretter blir utviklingen av de forskjellige organene i nervesystemet vurdert, som hjernevesiklene og nevrallrøret.



Figur 10: Et todimensjonalt plott med kontrollorganismen og organismer tilsatt de ulike kjemiske stoffene. Fenotypene endres betraktelig jo høyere på y-aksen, og jo mer til høyre på x-aksen.

I det todimensjonale plottet kan man observere at de organismene som ligger i nærheten av kontrollen på plottet er de med svakest fenotyper, altså de er mest lik kontroll. Larvene har godt utviklede hjernevesikler, og nevrallrøret strekker seg som normalt fra anteriorenden til posteriorenden med et sammenhengende nervesignal. Organismene tilsatt Vigabatrin og PicROTOXIN uttrykker en lignende fenotype som kontrolldyret.

På den vertikale aksen blir larven mer mutert desto lengre opp på aksene man kommer. Nickel som er øverst på aksene har fått en rund form, mens Ro25-6981 maleate viser ingen form for signal på nevrallrøret. Disse regnes som en endret fenotype.

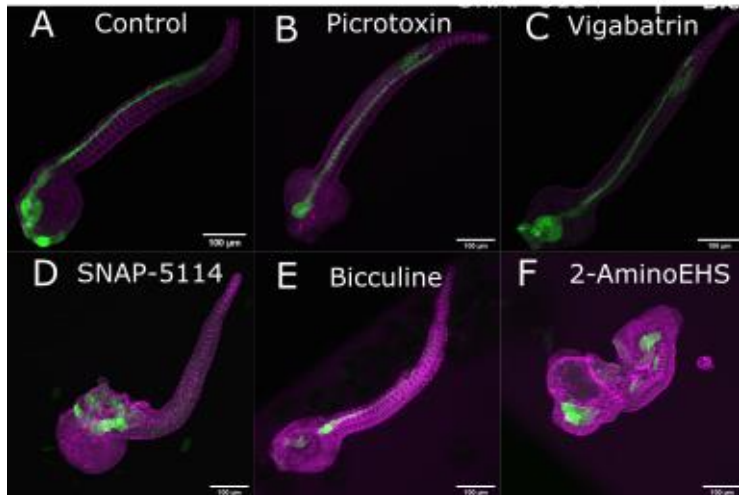
På den horisontale aksene blir larven mer mutert desto mer til høyre på aksene man kommer. Organismer som har blitt utviklet med Cadmium, Bicculine, L-methioninsulfoxamin og 2-aminoethyl hydrogen sulfate har betraktelig endret fenotype.

4.2.1. Nevrotransmittere

4.2.1.1. GABA

Denne gruppen inkluderer tarmsekkdyr (Figur 11 B-F) utviklet med påvirkning av følgende kjemiske stoffer: 2-aminoethyl hydrogen sulfate, Vigabatrin, Bicculine, PicROTOXIN og SNAP-5114. Disse kjemiske stoffene påvirker tilførselen av GABA, som er ett av de viktigste nevrotransmittere.

Generelt sett er de transgene embryoene som ble utviklet ved å blokkere av signalveiene for GABA blitt muterte. Larvene som ble inkubert med 2-aminoethyl hydrogen sulfate og Bicculine fikk de mest deformerte larvene (sterkest fenotype), SNAP-5114 har resultert til en intermediær effekt, mens Picrotoxin og Vigabatrin resulterte til de minst deformerte dyrene (svakest fenotype).

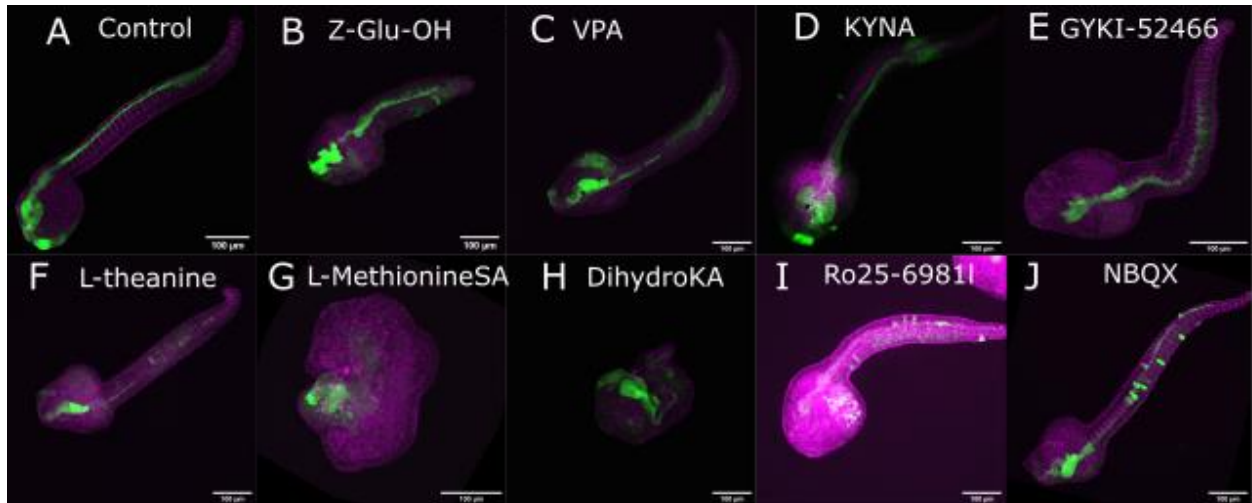


Figur 11: Representative larver for tarmsekkdyr av kontroll (A) og larver tilsatt tilsvarende kjemiske stoffer, Picrotoxin (B), Vigabatrin (C), SNAP-5114 (D), Bicculine (E) og 2-Amino (F).

4.2.1.2. *Glutamat*

Figur 12 B -J representerer larvene utviklet ved bruk av kjemiske stoffer som påvirker glutamatsyklusen på nevronene. Disse kjemiske stoffene blokkerer neurotransmittersyklusen med forskjellige mekanismer (Tabell 2). Ved å blokkere neurotransmitterene for glutamat har det resultert til larver som er fenotypisk forskjellige enn kontrolldyrene. Larvene dannet ved bruk av Ro25-6981 maleate og Dihydrokainic acid har resulterte til sterke mutasjoner. Larvene med L-Methionine sulfoximine er mer runde, og nervesystemet viser ikke til noe tydelig signal. Larvene med L-theanine og NBQX resulterte til intermediære fenotyper, mens

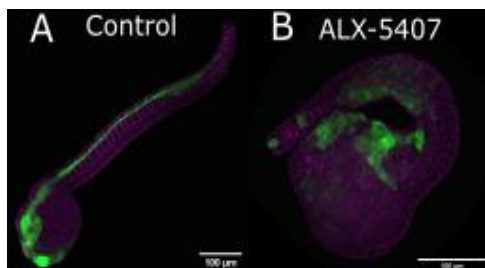
de med GYK-152466, KYNA, VPA og Z-Glu-OH er de minst muterte larvene for denne gruppen.



Figur 12: Representative larver av tarmsekkdyr for kontroll (A) og larver tilsatt tilsvarende kjemiske stoffer, Z-Glu-OH (B), VPA(C), KNYA (D), GYK-152466 (E), L-theanine (F), L-Methionine sulfoximine (G), Dihydrokainic acid (H), Ro25-6981(I) og NBQX (J).

4.2.1.3. Glysin

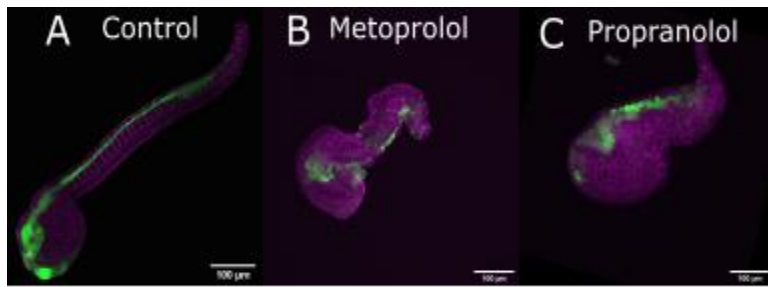
De transgene embryoene utviklet ved ALX-5407 resulterte til en sterk effekt på larvene. De befinner seg nederst på det todimensjonale plottet (Figur 13 B).



Figur 13: Representative larver av tarmsekkdyr for kontroll (A) og larver tilsatt ALX-5407 (B).

4.2.1.4. Adrenalin

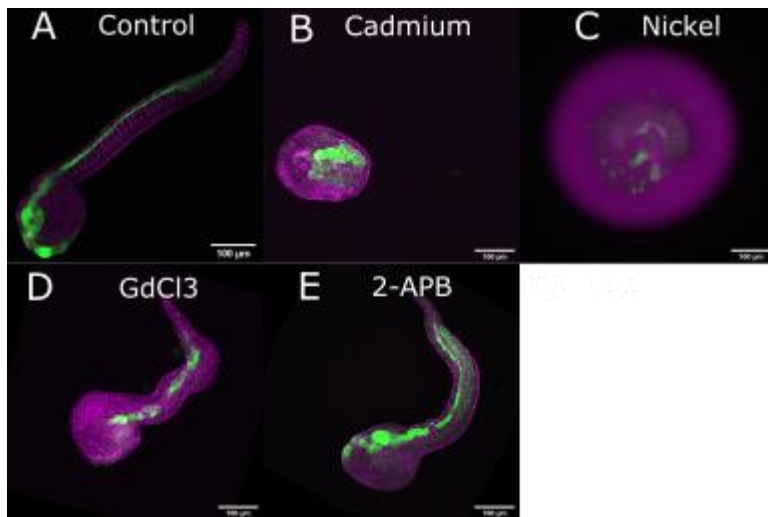
Metoprolol og Propanolol påvirker adrenalin. Larvene som ble dannet ved å blokkere neurotransmitterne for adrenalin var fenotypisk forskjellige enn kontrolldyrene (Figur 14 B og C). Signalet fra nevrallrøret er ikke sammenhengende, og signalet fra hjernevesiklene observeres til å være svake for begge stoffene. Metoprolol og Propanolol ser ut til å gi lik effekt på larvene.



Figur 14: Representative larver av tarmsekkdyr for kontroll (A) og larver tilsatt Metoprolol (B) og Propranolol (C).

4.2.2. Kalsiumkanaler

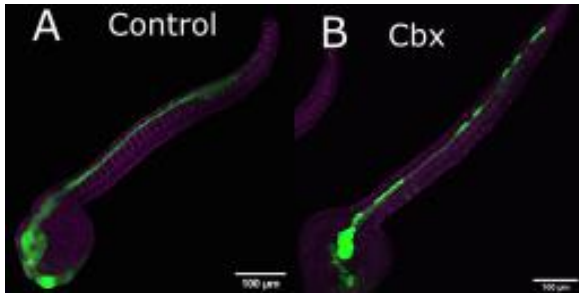
Cadmium, Nickel, GdCl₃ og 2-APB (Figur 15 B-E) påvirker kalsiumforsyningen til cellene. Ved tilsetning av Cadmium og Nickel har resultert til en sterk fenotype ettersom at larvene ble betraktelig muterte. Larvene fra Cadmium fikk en rund form med udifferensiert nervesignal. GdCl₃ har resultert til en intermediær fenotype, mens 2-APB resultert til et godt utviklet nervesystem.



Figur 15: Representative larver av tarmsekkdyr for kontroll (A) og larver tilsatt tilsvarende kjemiske stoffer, Cadmium (B), Nickel (C), Gdc13 (D) og 2-APB (E)

4.2.3. Neksus

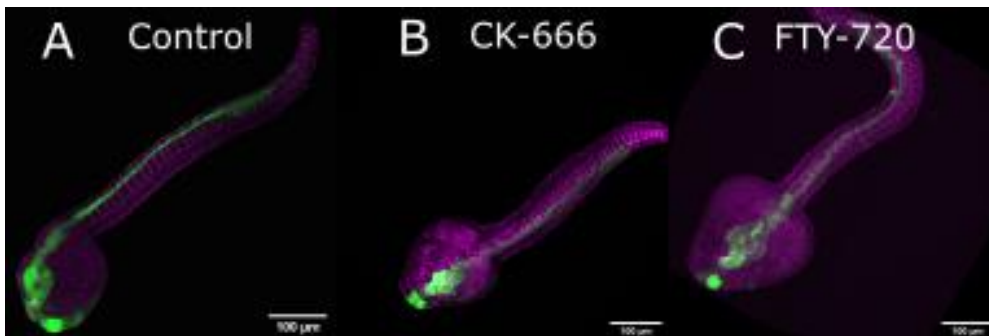
CBX ble brukt til å blokkere neksus (Figur 16 B). Tarmsekkdyrene som ble dannet har resultert til en fenotype. Noen av dem var fullstendig deformerte, noen hadde et svakt signal og andre var godt utviklet. Larvene med CBX er plassert i den nedre delen av den todimensjonale plottet, til venstre av kontrollen.



Figur 16: Representative larver av tarmsekkdyr for kontroll (A) og larver tilsatt CBX (B)

4.2.4. Mobilitet

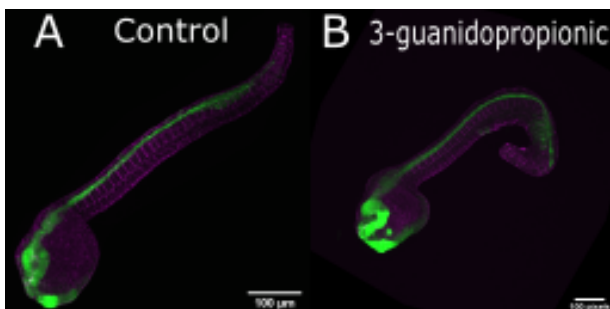
Figur 17 B og C viser larvene som ble utviklet med CK-666 og FTY720 (Fingolimod), og det observeres en mild fenotype for begge. På det todimensjonale plottet er CK-666 plassert under kontrollen, og FTY720 ligger til høyre for kontrollen. FTY720 har påvirket larvenes fenotype mer enn det CK-666 har.



Figur 17: Representative larver av tarmsekkdyr for kontroll (A) og larver tilsatt CK-666 (B) og FTY-720 (C)

4.2.5. ATP-tilførsel

β -guanidopropionic acid er et stoff som hemmer kreatintransportørene i cellene, og vil dermed påvirke ATP-tilførsel. Larvene som ble utviklet ved bruk av dette kjemiske stoffet har resultert til et godt signal fra nervesystemet, men det har derimot dannet muterte larver (Figur 18 B).



Figur 18: Representative larver av tarmsekkdyr for kontroll (A) og larve tilsatt β -guanidopropionic acid (B)

5. Diskusjon

Prosjektet gikk ut på å blokkere eller inhibere forskjellige signalveier, ved å tilsette kjemiske stoffer sammen med ETR1-GFP, som gjorde det mulig å få en oversikt over strukturen og utviklingen av nervesystemet. Det ble utført to typer analyser. Den ene er en morfologisk basert analyse ved hjelp av programvaren Imaris, som gir ulike mål og verdier for nevronene. Den andre er ved å bruke et «deep-learning»-program for å se om fenotypen endres for hele organismen. Analysen forteller hvor like eller forskjellige fenotypene er fra hverandre. Basert på resultatene av fenotypestudien er det vist at neurotransmittere, kalsiumkanaler og andre viktige signalveier som neksus har påvirket nervesystemets utvikling i larven til tarmsekkdyr.

5.1. Signalveier og kalsiumkanalers påvirkning på utviklingen av nervesystemet til tarmsekkdyr

5.1.1. Neurotransmittere

5.1.1.1. GABA

Tilførselen av GABA ble blokkert vha. forskjellige mekanismer (Tabell 2). De kjemiske stoffene tilsatt har følgende virkning: hemming av GABA, blokkering av GABA-reseptorer, GABA-reseptorantagonister og hemming av GABA transaminase.

Morfologien til nevronene endres betraktelig dersom GABA-reseptorer blir blokkert, men utenom denne endres morfologien kun til en viss grad for de andre signalveiene for GABA. Hemming av GABA-transaminase, transportere og blokkering av reseptorer (non-kompetitiv inhibitor) ga like fenotyper. Det at Vigabatrin og Picrotoxin gav like fenotyper har bakgrunn i at begge stoffene blokkerer GABA. Førstnevnte fører til ingen produksjon av GABA, mens sistnevnte hindrer cellene til å reagere på GABA og ta det opp. Ved hemming av GABA og blokkering av GABA-reseptorer (kompetitiv inhibitor) resulterte det i en annen type fenotype.

Dersom man ser på organismene i et helhetlig bilde vil hemming av GABA, hemming av GABA-transportere og blokkering av GABA-reseptorer gi de mest forskjellige fenotypene sammenlignet med kontrollen. Organismene har utviklet hjernevesikler, samt at nevrallrøret dannes. Cellene ser derimot ikke ut til å migrere som normalt. Nevralrøret har ikke et sammenhengende signal gjennom forlengelsen av anteriorenden til posteriorenden på ryggsiden av larvene. Ved å inhibere GABA-transaminase og inhibere reseptorer ved hjelp av antagonister, gav det en svak endring på utviklingen av nervesystemet. De ligner mest på hverandre. Organismene har dannet godt utviklet hjernevesikler, og nevrallrøret har utviklet

som normalt. Effekten av disse stoffene er derimot merkbart sammenlignet med kontrollorganismen.

Tidligere studier viser til at GABA-signalering er kjent for å ha en viktig evne til å påvirke reguleringen i nesten alle trinn av nevralt differensiering og nevralt vevsdannelser (54). Funn på gravide rotter indikerer også på at GABA er viktig for utviklingen av nervesystemet (55).

5.1.1.2. *Glutamat*

Tilførselen av glutamat ble blokkert ved hjelp av forskjellige mekanismer. De utvalgte kjemiske stoffene har en påvirkning på tilførselen av glutamat ved å blokkere signaliseringen, hemme glutaminsyntetasen, blokkere AMPA-reseptorer, blokkere NMDA-reseptorer og ved å hemme transportere.

Ved blokkering av NMDA-reseptorer og AMPA-reseptorer resulterte det i ingen signifikant endring på morfologien til nevronene. Dette kan skyldes at de kjemiske stoffene med disse virkningsmekanismene ble benyttet i for lav konsentrasjon. Resterende av glutamat påvirkende stoffer gav en endring på cellens morfologi, og har dermed resultert i fenotyper. Resultatene i Tabell 4 gav to ulike grupper av morfologiske fenotyper på nevronene. L-methionine sulfoximine (hemmer glutamin) og Dihydrokainic acid (hemmer glutamat transportere) har likhetstrekk ved at begge stoffene er involvert i produksjonen av glutamat. VPA og L-theanine som gir den andre typen morfologisk endring, blokkerer henholdsvis signaliseringen av glutamat og glutamat transportere. Fenotypene til L-methionine sulfoximine og Dihydrokainic acid er utligger ettersom de skiller seg fra resten av stoffene som påvirker glutamat.

Dersom man ser på utviklingen av larvene, vil blokkering av NMDA-reseptorer, blokkering av glutamatsignaler, inhibering av glutamattransportører (GLT-1) (Dihydrokainic acid) og inhibering av glutaminsyntetase resultere i muterte tarmsekkdyr. Blokkering av NMDA-reseptorer påvirker utviklingen av hjernevesiklene og nevralt rør hos de fleste observerte organismene. Tarmsekkdyrene ser ut til å ha utviklet seg normalt, men nervesignalet fra nervesystemet kommer ikke tydelig frem. Det observeres kun små signal fra hjernevesiklene. For de fleste organismene har ikke nevralt rør blitt utviklet, og har dermed ført til at larvene ble muterte. Ved inhibering av glutaminsyntetasen resulterte det i deformerte larver ettersom at de har rullet seg til en ball. For disse organismene har det blitt dannet hjernevesikler, men de mangler derimot nevralt rør og et sammenhengende nervesignal. Tarmsekkdyr som ble utviklet med stoffet som inhiberer glutamat-transportere og med stoffet som blokkerer

glutamatsignaleringsen, har resultert i godt utviklede hjernevesikler. Nevralrøret til disse larvene dannes, men cellene migrerer ikke som normalt. Signalet er ikke tydelig, og den er ikke sammenhengende.

En tidligere studie utført på frosker viser til at glutamatsignalisering under utviklingen av nervesystemet er viktig. Studiet viser at utviklingen av celler i nevralkplaten ved regulering, celleproliferasjon og migrasjon har en sammenheng med intracellulære Ca^{2+} , som er formidlet av glutamat gjennom NMDA-reseptorer (NMDAR) (56). En annet studie viser til at neurotransmittere er viktige i utviklingen av nervesystemet fra tidlig stadium. Dette ble observert ved embryonal utvikling av sporefrosk (*Xenopus*) (57).

5.1.1.3. Glysin

Inhibering av glysin-transportere (GlyT1) korrelerer med NMDA-ekspresjonen. Resultatene gav sterke fenotyper for både morfologien til nevronene og for utviklingen av tarmsekkdyr. Resultatet i Tabell 5 viser til den samme type morfologiske endringen som den ene fenotypegruppen til GABA (Tabell 3). Ved utvikling med inhibitorer av glysin-transportere ble larvene runde. De utviklet udifferensierte hjernevesikler, og har ikke et sammenhengende signal gjennom nevralkrørene. Etersom at glysin har samme effekt som GABA, forventes det å observere likheter mellom disse to neurotransmitterne. Dette stemmer med morfologien til nevronene, mens de derimot viser til en annen fenotype ved utvikling av organismen. Figur 10 viser at de kjemiske stoffene som påvirker glysin og GABA gir ulike posisjoner på plottet. Bildene av larvene ved påvirkning av glysin-transportere viser også til mindre likheter med larvene med GABA påvirkende stoffer.

5.1.1.4. Adrenalin

Adrenalin kan betraktes som essensiell ettersom at blokkeringen av beta reseptorer (β_1 og β_2) har påvirket morfologien til nevronene. Det er derimot noen parametere som er forskjellige fra hverandre, dette gjør at de danner ulike fenotyper. Selv om begge stoffene har like målsignal, så kan det hende at stoffene ikke er helt spesifikke. Det kan være at propranolol har bundet til flere β_2 -reseptorer enn β_1 - reseptorer.

Dersom man ser på organismene i sin helhet, så har stoffene resultert i muterte organismer. Tilsetning av β_1 - og β_2 -adrenerge reseptorblokkere har resultert i larver med udifferensierte hjernevesikler. Nevralrøret har ikke utviklet seg godt sammenlignet med kontrollen, men signalet er observert til å være sammenhengende gjennom forlengelsen. Mange av larvene

har en rund form, noe som kan gjøre det vanskelig å differensiere de ulike delene av nervesystemet.

5.1.2. Kalsiumkanaler

Blokkeringen av kalsiumforsyningen ble utført ved å blokkere to forskjellige signalveier, de spenningsregulerte kalsiumkanalene og intracellulære kalsiumkanaler. Blokkering av T-type og N-type spenningsregulerte kalsiumkanaler gav den tydeligste effekten på tarmsekkdyrene.

Morfologien til nevronene resulterte i små signifikante endringer ved blokkering av de intracellulære kalsiumkanalene. Ved blokkering av T-type og N-type spenningsregulerte kalsiumkanaler derimot ble det observert en rekke svært signifikante morfologiske endringer. Det var en endring over alle parametere, utenom for sfærisiteten til nevronene. Resultatene i Tabell 7 deler påvirkningen på kalsiumkanalene i to ulike morfologiske fenotyper av nevronene. Det resulterte i lik fenotype ved blokkering av de spenningsregulerte kalsiumkanalene, selv om de er av forskjellige typer (T-type og N-type). Dette er på grunn av T-type og N-type kalsiumkanaler påvirker samme signalvei, og vil dermed få lignende morfologi på nevronene. Det samme prinsippet gjelder ved påvirkning av de intracellulære kalsiumkanalene (SOCs), som har resultert i en annen fenotype.

Dersom man ser på organismene i sin helhet, utvikles hjernevesiklene som normalt ved påvirkning av T-type spenningsregulerte kanaler. Nevralrøret derimot utvikles dårlig, som igjen fører til at halen ikke utvides under utviklingen av larvene. Blokkering av N-type spenningsregulerte kalsiumkanaler gir verken godt utviklet hjernevesikler eller nevrالرør, som er grunnen til at organismene ikke utvikles som normalt. Man får derimot godt utviklet nervesystem ved blokkering av de intracellulære kalsiumkanalene, men disse organismene regnes likevel som fenotyper ved sammenligning med kontrolldyret. Kalsium som ble blokkert fra organellene (SOCs), som f.eks. mitokondriene eller endoplasmatiske retikulum, resulterte i deformerte nevrالرør. Dette har igjen ført til at signalet ikke er sammenhengende, og at organismenes hale ikke utvikles som normalt. Ved blokkering av IP3-reseptorer i tarmsekkdyr vil både hjernevesikler og nevrالرøret utvikles, men likevel ble noen av organismene deformerte og regnes dermed som en fenotype.

Ved å inhibere signalveier for kalsium, vil det påvirke et normalt utviklet nervesystem hos tarmsekkdyr. Det har en betydning på hvor disse signalveiene for kalsium påvirkes ettersom at det resulterer i forskjellige fenotyper. Blokkering av spenningsregulerte kalsiumkanaler gir

de sterkeste fenotypene, mens blokkering av intracellulære kalsiumkanaler gir en mindre effekt på utviklingen av nervesystemet.

En tidligere studie på mus viser til at migrering av cerebellar granulatceller på postnatal mus er avhengig av aktivering av N-type kalsiumkanaler og NMDA-klasse glutamatreseptorer (58). En annen studie viser til viktigheten av T-type kalsiumkanaler (TTCC) for lukking av nevrallrøret. Signalveier for lukking av nevrallrøret (neural tube closure, NTC) krever T-type kalsiumkanaler som er konserverte mellom primitive sekkedyr og *Xenopus*. Inhibering eller tap av TTCC vil medføre til feil i NTC (59).

5.1.3. Neksus

Neksus er viktig for overføringer av små molekyler mellom celler, som blant annet neurotransmittorer, ATP og Ca^{2+} . Dersom man blokkerer neksus, vil man samtidig blokkere disse små molekylene. Man forventer dermed å få like fenotyper som ved blokkering av tilførsel av ATP og Ca^{2+} . Dette stemmer med morfologien til nevronene ettersom at mønsteret for CBX i Tabell 8 er lik ATP, og noenlunde likt for stoffene som påvirker intracellært kalsium. Det har også resultert til fenotyper for utviklingen av tarmsekkdyrene ved blokkering av neksus. Det er vanskelig å skille hjernevesiklene og utvidelsen av nevrallrøret i mange av de muterte larvene. Det er også observert et svakt signal hos noen larver.

Basert på resultatene fra morfologiske endringer på nevronene og de muterte dyrene, vil blokkering av neksus påvirke nervesystemet til tarmsekkdyr. En tidligere studie utført på tarmsekkdyr viser til at konneksin er viktig for anterior nevrall-plateutvikling (60).

5.1.4. Mobilitet

Inhibering av arp2/3 (61) og sfingosin 1-fosfat reseptorer (S1P) (62) vil resultere i fenotyper ettersom at disse signalveiene er viktige for cellemigrasjon. Morfologien til nevronene har resultert i like fenotyper ved inhibering med disse to stoffene, og er ulikt fra kontrollen. For utviklingen av larven har inhibering av arp2/3 resultert i en svak fenotype. De fleste av larvene har tydelig differensierte hjernevesikler og nevrallrør. Ved bruk av S1P reseptorantagonist har det derimot resultert i muterte larver.

5.1.5. ATP-tilførsel

Inhibering av kreatin transportører vil påvirke ATP-tilførselen. ATP er viktige for forskjellige metabolske aktiviteter og prosesser som krever høy energibruk. Man forventer dermed fenotyper for både morfologi av nevronene og fenotyper av larvene. Dette stemmer ettersom

at det har ført til en endring i morfologi av nevronene, samt at larvene utviklet er muterte sammenlignet med kontrollen. Nervesystemet i organismene derimot gir et godt signal.

5.2. PACR og PA-Rac1 bekrefter endring i morfologi til nevronene

Morfologien til nevronene i tarmsekkdyr ble signifikant forskjellige fra kontrollen ved å kontrollere og begrense lyskilden for PACR. Denne begrensingen av blått lys førte til en begrensning på Ca^{2+} gjennom de intracellulære kalsiumkanalene. Ved å regulere denne strømmingen, ble det påvist en endring av morfologi på nevronene ved å blokkere/inhibere de intracellulære kalsiumkanalene. PACR er Ca^{2+} bindende proteiner (calmodulin-M13 peptider) med et lyssensitivt proteindomene (LOV2), som befinner seg i cytoplasmaet mellom de intracellulære kalsiumkanalene og de spenningsregulerte kalsiumkanalene i cellemembranen. Fargemønsteret for PACR i Tabell 11 er en mellomting mellom mønstrene til de to nevnte fenotypene til kalsiumkanalene i Tabell 7. Det var forventet at PACR uten tilførsel av lys skulle få lignende morfologisk fenotype på nevronene som ved blokkering av kalsiumkanalene i plasmamembranen, men det er ikke overraskende at det ikke er helt tilsvarende. Resultatet fra dette optogenetiske verktøyet bekrefter viktigheten til Ca^{+2} i utviklingen av nervesystemet. Effekten av å blokkere spenningsregulerte kalsiumkanaler resultere i en mer signifikant effekt på fenotypene for morfologien av nevronene og for utviklingen av larvene.

Ved å konstant påføre blått lys til PA-Rac1 resulterte det i signifikante forskjeller på nevronenes morfologi sammenlignet med kontrollen. Resultatet indikerer at det er en endring av cellebevegelse for nevronene, som også vil påvirke utviklingen av nervesystemet. Dette er på bakgrunn av at PA-Rac1 påvirker bevegelsen til cellen. Man forventer dermed at det dannes fenotyper av nevronene ved tilførsel av blått lys til larvene med PA-Rac1, noe som det gjorde.

5.3. Prosjektets begrensninger

Disse kjemiske stoffene som ble benyttet virker på alle celler i organismen, og på bakgrunn av dette kan man ikke utelukke muligheten av at de påvirker andre celletyper i organismen, ikke kun nevronene. Dette kan ha en betydning på de utviklede fenotypene. Denne begrensingen stemmer med resultatene fra kjemiske stoffene som har neurotransmittere som målsignal. Når det gjelder kalsiumsignalisering ble det utført et utvidet forsøk med optogenetikk ved bruk av plasmidene PACR og PA-Rac1. PACR er et optogenetisk verktøy som brukes til å kontrollere kalsiumstrømmen, og det har resultert i ulike fenotyper av

morfologien til nevronene. Dette resultatet antyder også at resultatene fra kjemiske stoffer som fører til fenotyper ved blokkering av kalsiumsignalisering stemmer. Det samme gjelder for PA-Rac1, som er et optogenetisk verktøy som brukes til å kontrollere cellemotilitet. Resultatet gav ulike morfologiske endringer av nevronene. Fenotypene dannet ved tilsetning av kjemiske stoffet som blokkerer cellenes bevegelighet ble også bekreftet med disse optogenetiske forsøkene.

En annen begrensning er at forsøkene resultater er kun fra fikserte organismer. Dette betyr at man ikke har overvåket prosessen for utviklingen av nevrallrøret, samt at man ikke har kunnskapen om på hvilket stadium og tidspunkt de ulike kjemiske stoffene starter å ha en påvirkning på utviklingen.

Fenotypestudiet for hele organismene og morfologien til nevronene har flere begrensninger ettersom at programvarene benyttet ikke gir fullstendig korrekte resultater. Faktorer som valgstørrelse på bildene, ledig plass (rommet rundt larven), bildenes klarhet og bakgrunnsstøy kan påvirke resultatene. Dette kan for eksempel gi feil verdier på nevronenes parametere, eller at programvaren feiltolker fenotyper, og grupperer de med andre fenotyper de ikke har noe til felles med.

5.4. Fremtidige tiltak

Etttersom at prosjektet var tidsbegrenset, ble resultatene fra studiet også begrenset. Fremtidige tiltak kunne være å følge utviklingen av nervesystemet og nevrallrøret til organismene ved bruk av metoder for direkte overvåkning av tidsløpet. På denne måten kan man observere for eksempel hvilket tidspunkt organismen endrer seg i form, eller på hvilket tidspunkt nevrallrøret dannes.

Videre tiltak i dette prosjektet kunne være å benytte verktøy som gjør det mulig å redigere genomet (CRISPR/Cas9) for å «slette» gener som koder for signalveier for GABA, glutamat og kalsium, evt. andre signalveier som har blitt studert her. Dette for å om det vil bli dannet lignende fenotyper som ved bruk av farmakologisk behandling eller optogenetikk på tarmsekkdyr.

6. Konklusjon

Ved benyttelse av kjemiske stoffer er det påvist at signalisering av neurotransmittere som glutamat og GABA, samt signalveier for kalsium og neksus er viktig for utviklingen av nervesystemet i tarmsekkdyr. Dette er nye funn for tarmsekkdyr, men det stemmer overens med det som er observert i andre organismer, som hos mus, frosk og sporefrosk (*Xenopus*). Resultatene i dette prosjektet viser til både morfologiske endringer av nevronene og fenotypeendringer på larvene. Dette har en betydning for utviklingen av nervesystemet. Det er også observert en endring i fenotype og morfologi på nevronene ved påvirkning av kommunikasjonsveier som neurotransmitteren adrenalin, og signalveier for glysin, ATP og cellemotilitet.

Disse tilnæringsmåtene, ved å inhibere eller blokkere ulike signalveier i tarmsekkdyr, har resultert til en tydelig endring av nervesystemets utvikling på forskjellige måter. Dermed kan man bekrefte at tarmsekkdyr er en god modell for å studere utviklingen av nervesystemet.

7. Litteraturliste

1. Sanes DH, Reh TA, Harris WA, Landgraf M. Development of the Nervous System [Internett]. 4. utg. Elsevier; 2019 [sitert 4. mai 2021]. Tilgjengelig på: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128039960099901>
2. Sanz-Ezquerro JJ, Münsterberg AE, Stricker S. Editorial: Signaling Pathways in Embryonic Development. *Front Cell Dev Biol.* 2017;5.
3. Sullivan AM. Neuronal Signaling: an introduction. *Neuronal Signal* [Internett]. februar 2017 [sitert 4. mai 2021];1(1). Tilgjengelig på: <https://doi.org/10.1042/NS20160025>
4. Ryan K, Lu Z, Meinertzhagen IA. The CNS connectome of a tadpole larva of *Ciona intestinalis* (L.) highlights sidedness in the brain of a chordate sibling. Marder E, redaktør. *eLife* [Internett]. 6. desember 2016 [sitert 6. mai 2021];5. Tilgjengelig på: <https://doi.org/10.7554/eLife.16962>
5. Kourakis MJ, Smith WC. An organismal perspective on *C. intestinalis* development, origins and diversification. *eLife.* 25. mars 2015;4:e06024.
6. Exploring Our Fluid Earth. Phylum Chordata [Internett]. 2021 [sitert 6. mai 2021]. Tilgjengelig på: <https://manoa.hawaii.edu/exploringourfluidearth/biological/invertebrates/phylum-chordata>
7. Sasakura Y, redaktør. *Transgenic Ascidians* [Internett]. Singapore: Springer Singapore; 2018 [sitert 19. mars 2021]. (*Advances in Experimental Medicine and Biology*; bd. 1029). Tilgjengelig på: <http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-7545-2>
8. Passamaneck YJ, Gregorio AD. *Ciona intestinalis*: Chordate development made simple. 2005;19.
9. Sasakura Y, Mita K, Ogura Y, Horie T. Ascidians as excellent chordate models for studying the development of the nervous system during embryogenesis and metamorphosis. *Dev Growth Differ.* april 2012;54(3):420–37.
10. 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. *Dev Dyn.* juli 2007;236(7):1790–805.
11. Cole AG, Meinertzhagen IA. The central nervous system of the ascidian larva: mitotic history of cells forming the neural tube in late embryonic *Ciona intestinalis*. *Dev Biol.* juli 2004;271(2):239–62.
12. Nikolopoulou E, Galea GL, Rolo A, Greene NDE, Copp AJ. Neural tube closure: cellular, molecular and biomechanical mechanisms. *Development.* 15. februar 2017;144(4):552–66.
13. Yagi K, Makabe K. Isolation of an early neural marker gene abundantly expressed in the nervous system of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Dev Genes Evol.* januar 2001;211(1):49–53.

14. Hyman SE. Neurotransmitters. *Curr Biol.* mars 2005;15(5):R154–8.
15. Satoh N. Developmental Genomics of Ascidians: Satoh/Developmental Genomics of Ascidians [Internett]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2013 [sitert 4. mai 2021]. Tilgjengelig på: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118656129>
16. Torráo AS, Britto LRG. Neurotransmitter regulation of neural development: acetylcholine and nicotinic receptors. *An Acad Bras Ciênc.* september 2002;74(3):453–61.
17. Simons TJB. Calcium and neuronal function. *Neurosurg Rev.* juni 1988;11(2):119–29.
18. Wright L, Pope C, Liu J. The Nervous System as a Target for Chemical Warfare Agents. I: Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents [Internett]. Elsevier; 2009 [sitert 8. mai 2021]. s. 463–80. Tilgjengelig på: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123744845000328>
19. What Is Optogenetics and How Can We Use It to Discover More About the Brain? [Internett]. *Frontiers for Young Minds.* [sitert 21. mai 2021]. Tilgjengelig på: <https://kids.frontiersin.org/articles/10.3389/frym.2017.00051>
20. Addgene: Plasmids for Optogenetics Research [Internett]. [sitert 21. mai 2021]. Tilgjengelig på: https://www.addgene.org/collections/optogenetics/?utm_source=1st_ed&utm_medium=ebook&utm_campaign=fluorescent_protein
21. Addgene. Optogenetics Guide [Internett]. u.å [sitert 4. mai 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.addgene.org/guides/optogenetics/#control>
22. Addgene: Optogenetics Guide [Internett]. [sitert 21. mai 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.addgene.org/guides/optogenetics/#control>
23. Fukuda N, Matsuda T, Nagai T. Optical Control of the Ca²⁺ Concentration in a Live Specimen with a Genetically Encoded Ca²⁺-Releasing Molecular Tool. *Am Chem Soc.* 24. mars 2014;9(5):1197–203.
24. Wu YI, Frey D, Lungu OI, Jaehrig A, Schlichting I, Kuhlman B, mfl. A genetically-encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells. *Nature.* 3. september 2009;461(7260):104–8.
25. Okamura Y, Nishino A, Murata Y, Nakajo K, Iwasaki H, Ohtsuka Y, mfl. Comprehensive analysis of the ascidian genome reveals novel insights into the molecular evolution of ion channel genes. *Physiol Genomics.* 11. august 2005;22(3):269–82.
26. 3R - erstatning, reduksjon og forbedring av dyreforsøk [Internett]. Universitetet i Bergen. [sitert 22. mai 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.uib.no/fg/dyreavdelingen/66144/3r-erstatning-reduksjon-og-forbedring-av-dyreforsok>
27. Thermo Scientific. GeneJET Plasmid Miniprep Kit #K0502, #K0503. 11. utg. ThermoFisher Scientific; 2014.

28. ThermoFisher. 1 Kb Plus DNA Ladder [Internett]. u.å. [sisert 11. mai 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/10787018>
29. MACHEREY-NAGEL. Plasmid DNA purification: User manual NucleoBond Xtra Midi. 15. utg. Germany: MACHEREY-NAGEL; 2019.
30. 2-Aminoethyl hydrogen sulfate 06720 [Internett]. 926-39-6. [sisert 13. mai 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/06720>
31. Vigabatrin Y0001400 [Internett]. 68506-86-5. [sisert 13. mai 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/y0001400>
32. Bicuculline 14340 [Internett]. 485-49-4. [sisert 13. mai 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/14340>
33. Picrotoxin P1675 [Internett]. 124-87-8. [sisert 13. mai 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p1675>
34. SNAP-5114 S1069 [Internett]. 157604-55-2. [sisert 13. mai 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s1069>
35. ALX 5407 hydrochloride SML0897 [Internett]. 200006-08-2. [sisert 13. mai 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/sml0897>
36. L-Methionine sulfoximine 91016 [Internett]. 15985-39-4. [sisert 13. mai 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/91016>
37. L-Theanine SMB00395 [Internett]. 3081-61-6. [sisert 13. mai 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/smb00395>
38. Dihydrokainic acid D1064 [Internett]. 52497-36-6. [sisert 13. mai 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d1064>
39. Ro 25-6981 maleate salt SML0495 [Internett]. 1312991-76-6. [sisert 13. mai 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/sml0495>
40. Xu Y, Xiang Z, Bao Y, Zhang J, Dong J, Qu Y. Inhibition of non-NMDA ionotropic glutamate receptors delays the retinal degeneration in rd10 mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 13. juli 2018;59(9):5282–5282.
41. Kynurenic acid K3375 [Internett]. 492-27-3. [sisert 13. mai 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/k3375>
42. NBQX hydrate N171 [Internett]. Sigma-Aldrich. [sisert 13. mai 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/n171>
43. Metoprolol: Side effects, dosage, uses, and more [Internett]. 2018 [sisert 13. mai 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/metoprolol-oral-tablet>
44. Propranolol hydrochloride P0884 [Internett]. 318-98-9. [sisert 13. mai 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p0884>

45. Mikhaleva Y, Tolstenkov O, Glover J. Gap junction-dependent coordination of intercellular calcium signalling in the developing appendicularian tunicate *Oikopleura dioica*. *Dev Biol.* 1. mars 2019;450.
46. 2-Aminoethyl diphenylborinate D9754 [Internett]. 524-95-8. [sitert 13. mai 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/d9754>
47. Connors BW. Tales of a Dirty Drug: Carbenoxolone, Gap Junctions, and Seizures. *Epilepsy Curr.* 2012;12(2):66–8.
48. The effect of the creatine analogue beta-guanidinopropionic acid on energy metabolism: a systematic review. | Sigma-Aldrich [Internett]. [sitert 13. mai 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/papers/23326362>
49. Arp2/3 Complex Inhibitor I, CK-666 - CAS 442633-00-3 - Calbiochem 182515 [Internett]. 442633-00-3. [sitert 13. mai 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/182515>
50. FTY720 SML0700 [Internett]. 162359-56-0. [sitert 13. mai 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/sml0700>
51. Bitplane AG. Imaris V7.5 Reference Manual. 7.5. Switserland: Bitplane AG; 2012.
52. Floersch J. Roundness, Sphericity and Microproppants [Internett]. MS Industries. 2020 [sitert 23. mai 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.msind.com/blog/roundness-sphericity-and-microproppants/>
53. Helbæk M. Statistikk for kjemikere. 2. utg. Trondheim: Tapir Akademisk Forlag; 2008.
54. Jelitai M, Madarasz E. The Role of GABA in the Early Neuronal Development. I: *International Review of Neurobiology* [Internett]. Elsevier; 2005 [sitert 12. mai 2021]. s. 27–62. Tilgjengelig på: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0074774205710023>
55. Briner W. The effect of GABA receptor ligands in experimental spina bifida occulta. *BMC Pharmacol.* 2001;6.
56. Sequerra EB, Goyal R, Castro PA, Levin JB, Borodinsky LN. NMDA Receptor Signaling Is Important for Neural Tube Formation and for Preventing Antiepileptic Drug-Induced Neural Tube Defects. *J Neurosci.* 16. mai 2018;38(20):4762–73.
57. Root CM, Velazquez-Ulloa NA, Monsalve GC, Minakova E, Spitzer NC. Embryonically Expressed GABA and Glutamate Drive Electrical Activity Regulating Neurotransmitter Specification. *J Neurosci.* 30. april 2008;28(18):4777–84.
58. Spitzer NC. Electrical activity in early neuronal development. *Nature.* desember 2006;444(7120):707–12.
59. Abdul-Wajid S, Morales-Diaz H, Khairallah SM, Smith WC. T-type Calcium Channel Regulation of Neural Tube Closure and EphrinA/EPHA Expression. *Cell Rep.* oktober 2015;13(4):829–39.

60. Hackley C, Mulholland E, Kim GJ, Newman-Smith E, Smith WC. A transiently expressed connexin is essential for anterior neural plate development in *Ciona intestinalis*. *Development*. 1. januar 2013;140(1):147–55.
61. Swaney KF, Li R. Function and regulation of the Arp2/3 complex during cell migration in diverse environments. *Curr Opin Cell Biol*. oktober 2016;42:63–72.
62. Kumar A, Saba J. Regulation of Immune Cell Migration by Sphingosine-1-Phosphate. *Cell Mol Biol*. 2018;23.

8. Vedlegg

8.1. Antall analyser

Antall tarmsekkdyr (larvastadie) analysert på de ulike programvarene:

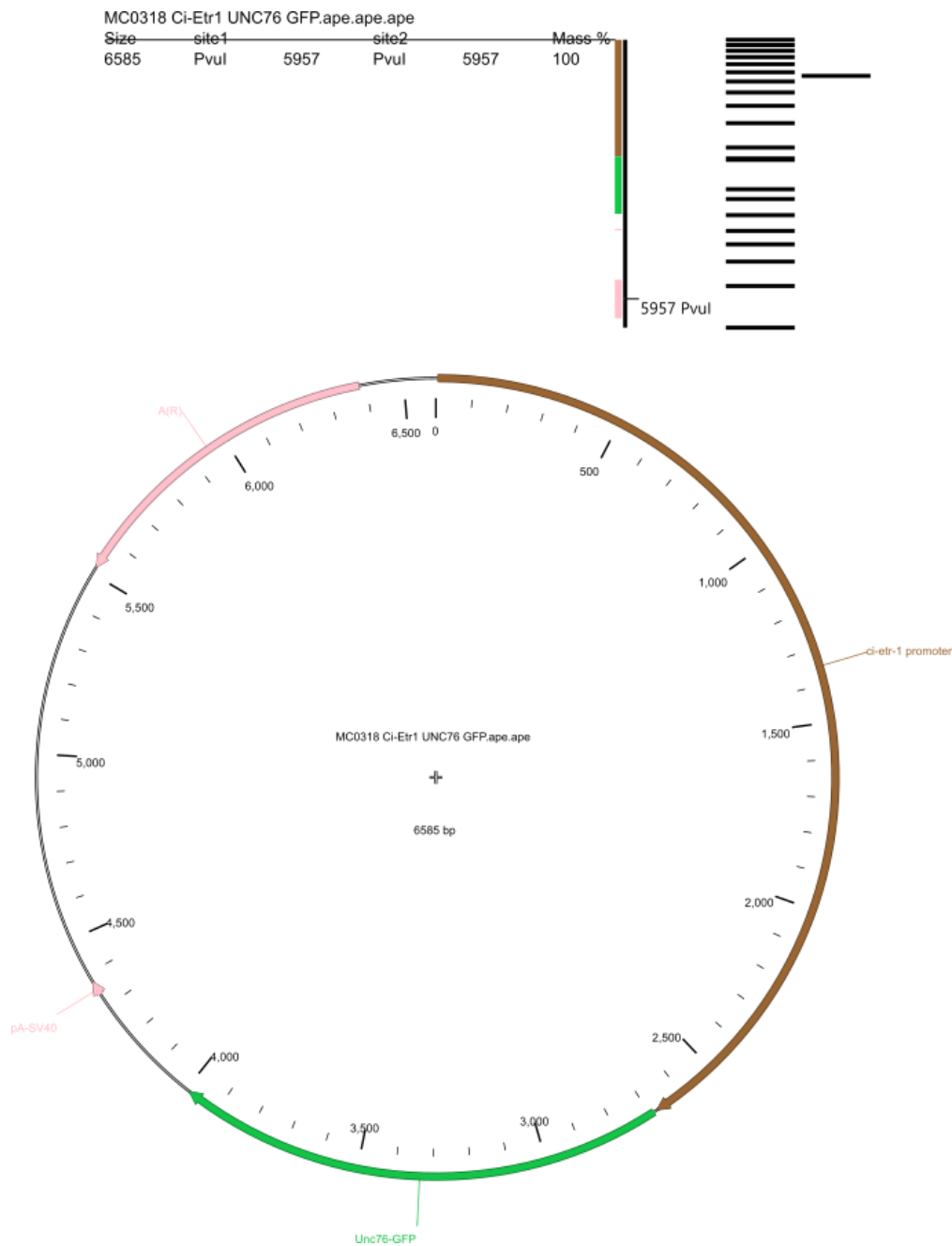
Kjemiske stoffer	Antall dyr analysert på PhenoRipper	Antall dyr analysert på Imaris
2-Aminoethyl hydrogen sulfat/Ethanolamine-O-sulfate	26	15
2-APB (2-Aminoethoxydiphenyl borat)	16	15
ALX-5407	13	14
Bicculine	6	10
Cadmium	13	13
CBX (Carbenoxolone)	30	15
CK-666	15	15
Dihydrokainic acid	21	15
FTY720 (Fingolimod)	15	15
GdCl ₃ (Gadolinium chloride)	24	15
β-guanidinopropionic acid	15	15
GYKI-52466 (1-(4-aminophenyl)-4-methyl-7,8-methylenedioxy-5H-2,3-benzodiazepine)	14	14
KYNA (Kynurenic acid)	8	8
L-Methionine sulfoximine	8	9
L-theanine	9	9
Metoprolol	19	15
NBQX (2,3-dioxo-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxaline)	23	15
Nickel	31	15
Picrotoxin	12	11
Propranolol	15	15
Ro25-6981 maleate	24	15

SNAP-5114 ((S)-1-[2-[Tris(4-methoxyphenyl)methoxy]ethyl]-3-piperidinecarboxylic acid)	38	15
Valproic Acid (VPA)	7	8
Vigabatrin	39	15
Z-Glu-OH (N-(Carbobenzyloxy)-L-glutamic acid, Z-L-Glutamic acid)	34	15
Control	24	15
Totalt	499	351
Optogenetic tools		
PACR ON	13	10
PACR OFF	10	16
PA-RAC1 On (Photoactivatable Rac1)	16	17
PA-RAC1 OFF (Photoactivatable RAC1)	17	17
Total	56	60

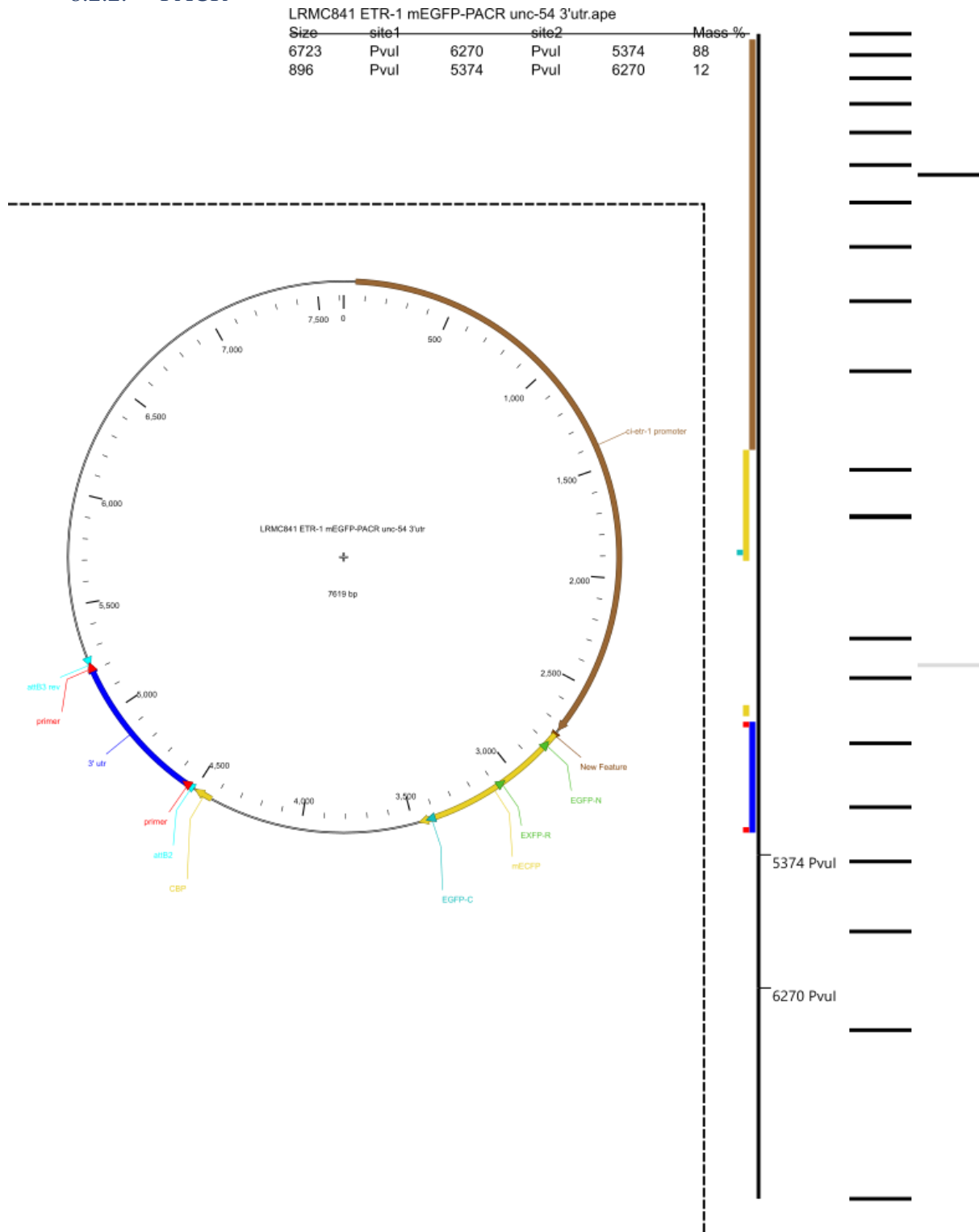
8.2. Gelelektroforese

Det ble ikke utført gelelektroforese for plasmidene som ble benyttet under hele oppholdet, ettersom at det ikke var nødvendig. Figurene under er forventede resultat ved kutting av plasmidene med restriksjonsenzymet PvuI.

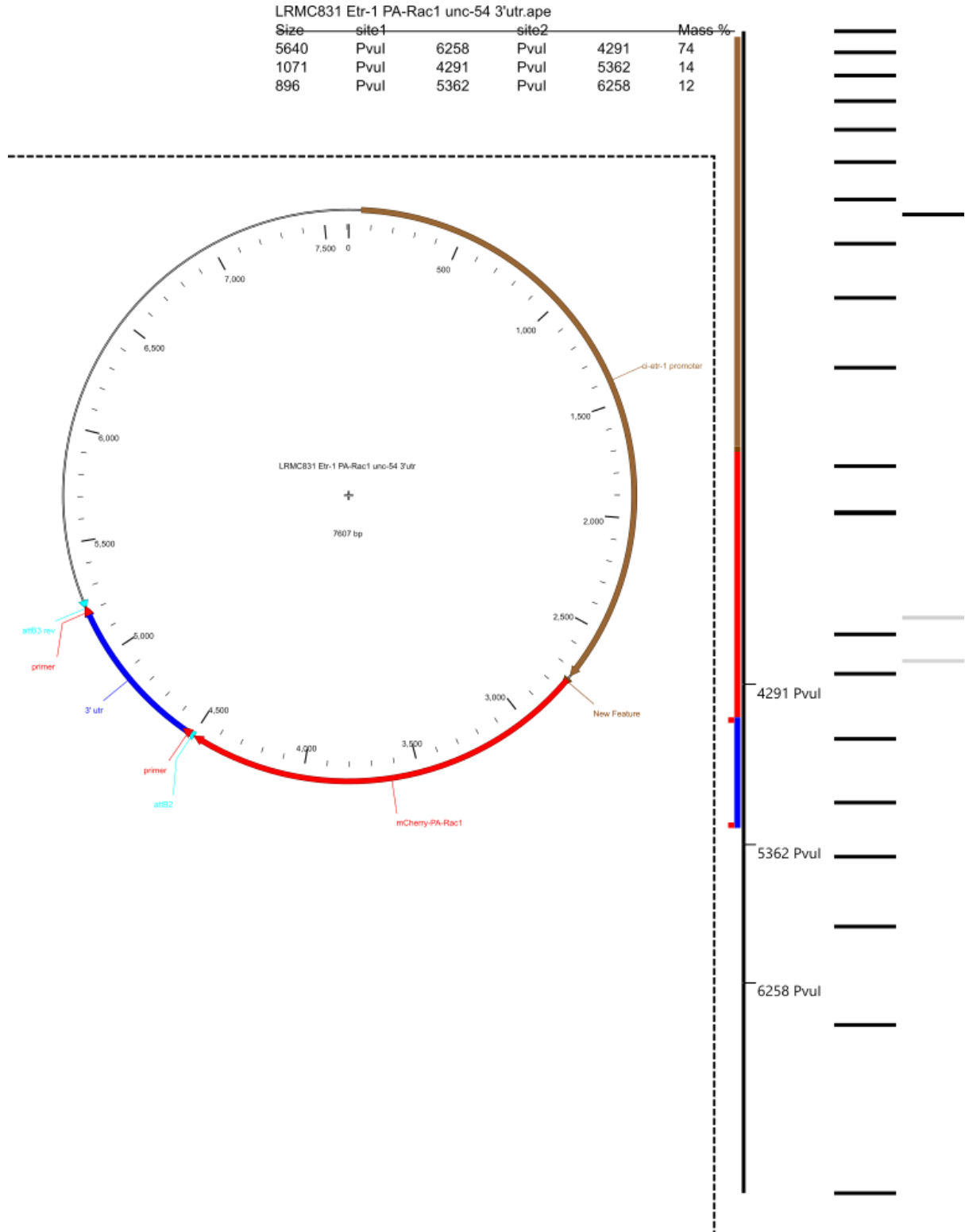
8.2.1. Kontroll



8.2.2. PACR

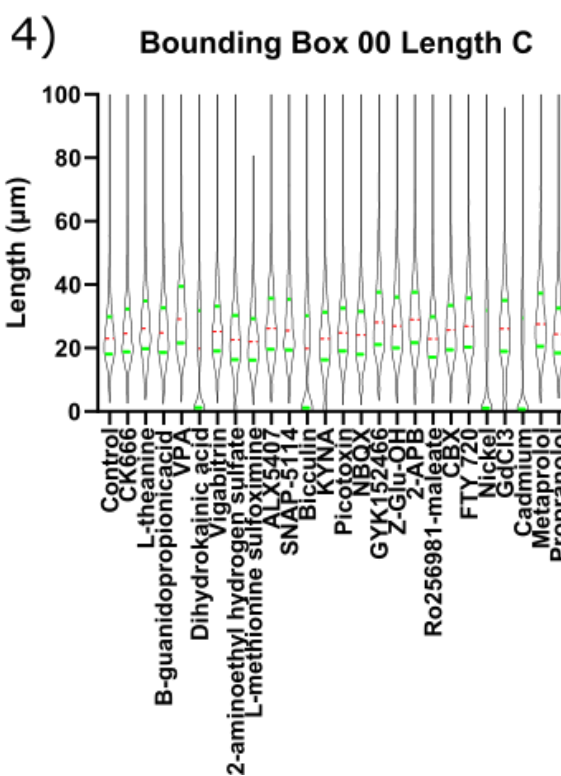
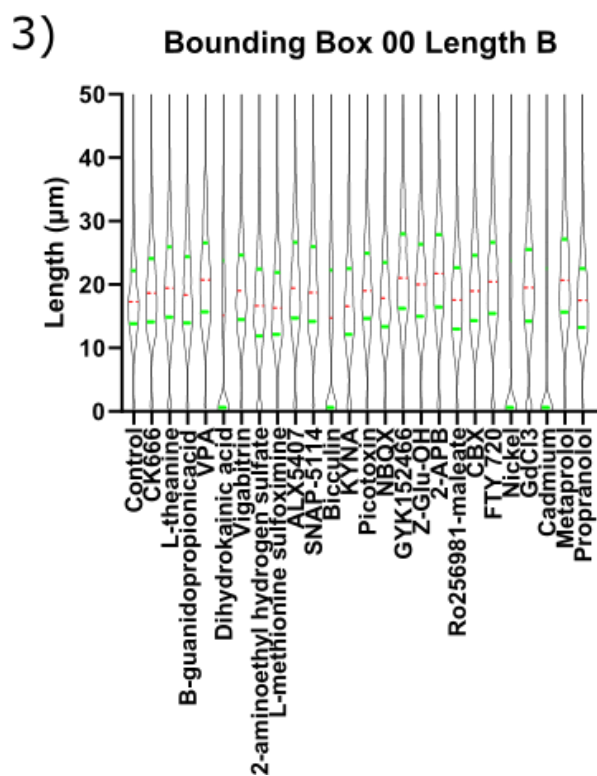
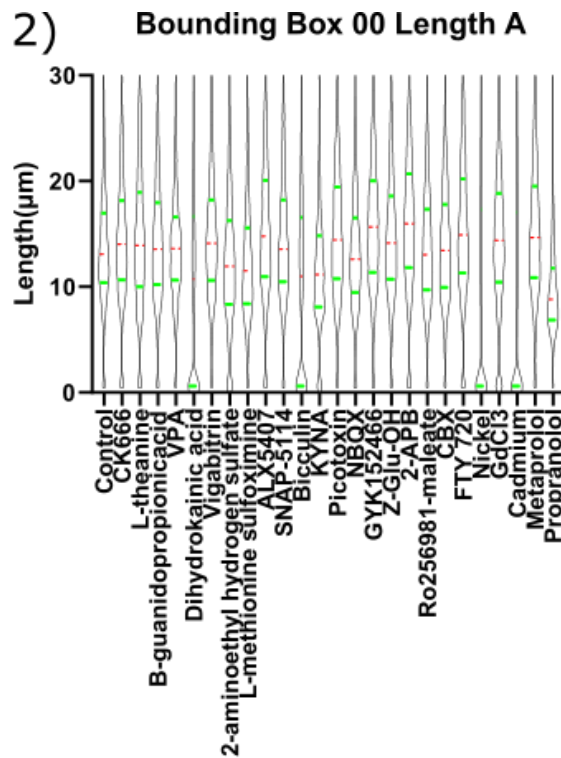
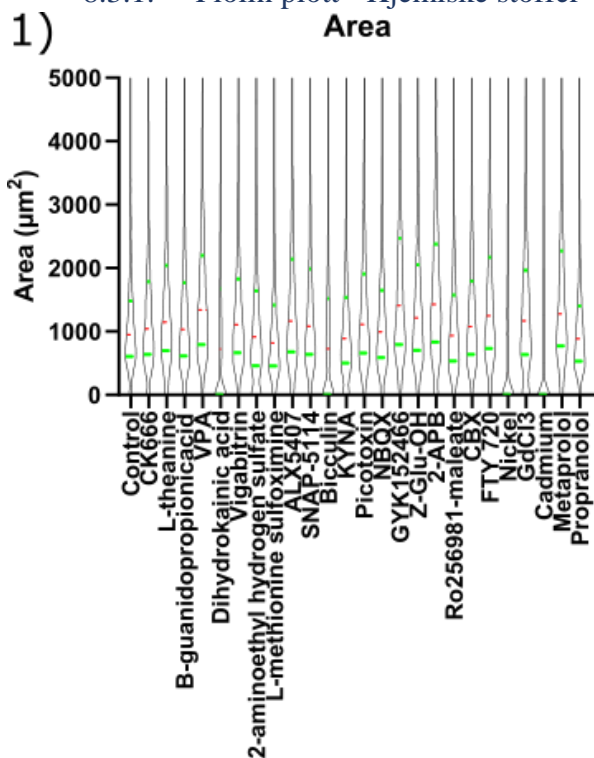


8.2.4. PA-Rac1

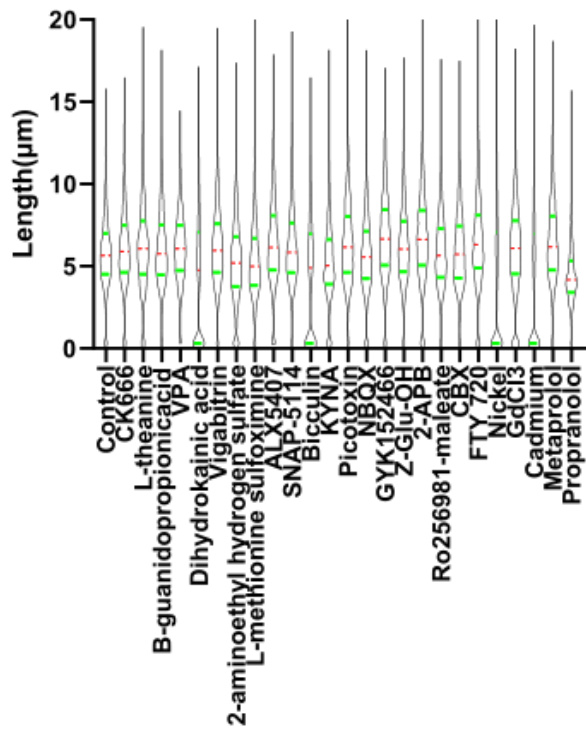


8.3. Imaris

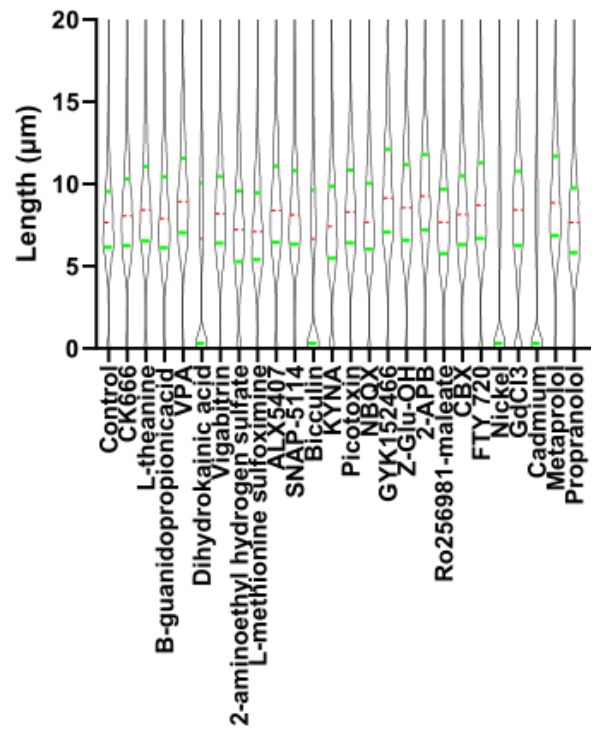
8.3.1. Fiolin plott - Kjemiske stoffer



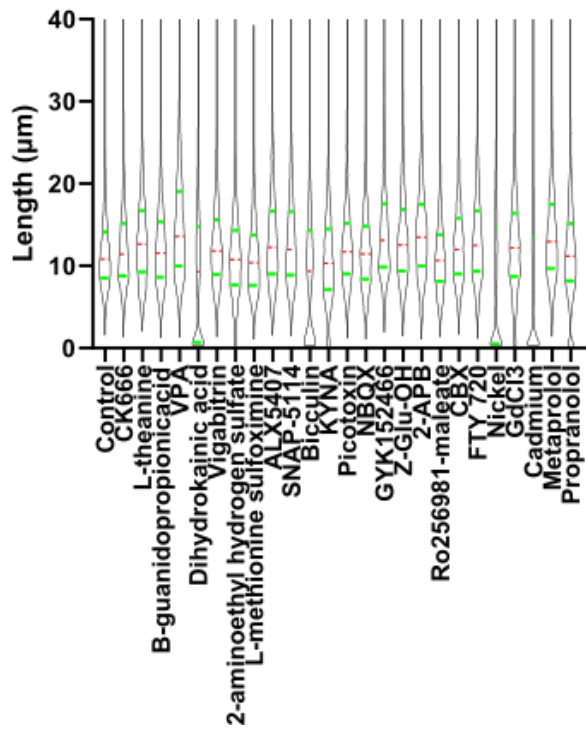
A. Elipsoid Axis Length A

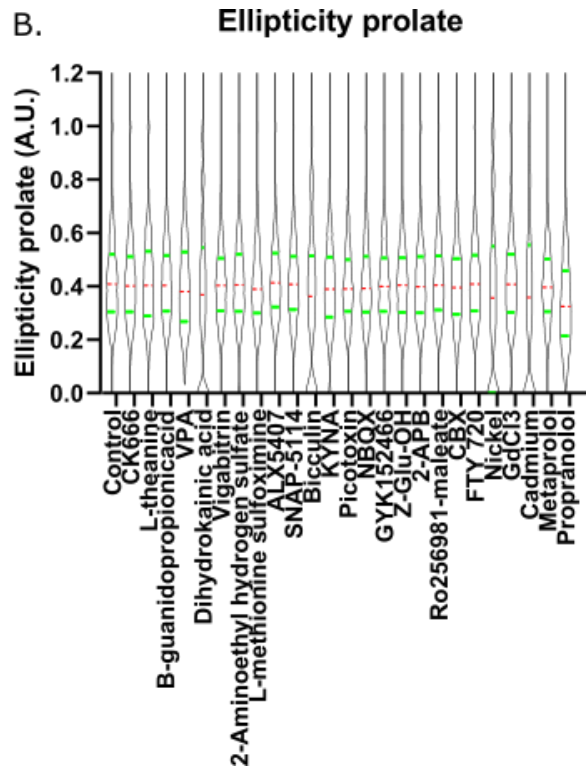
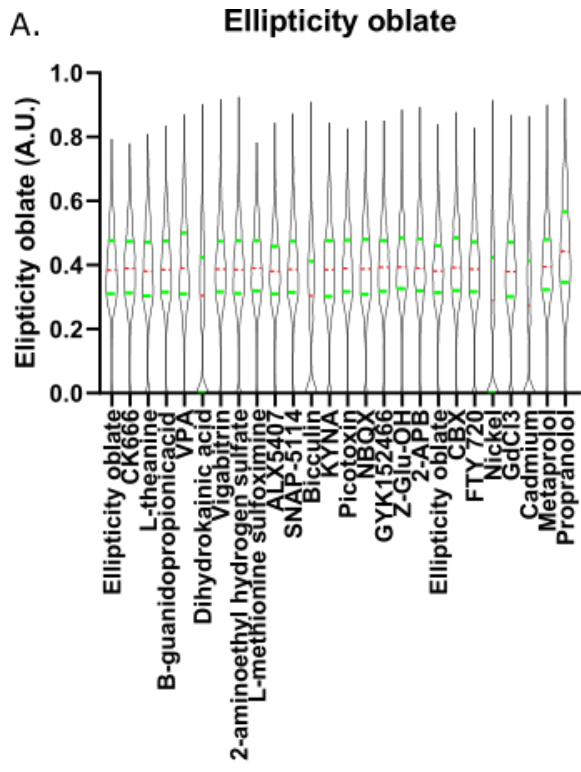


B. Elipsoid Axis Length B



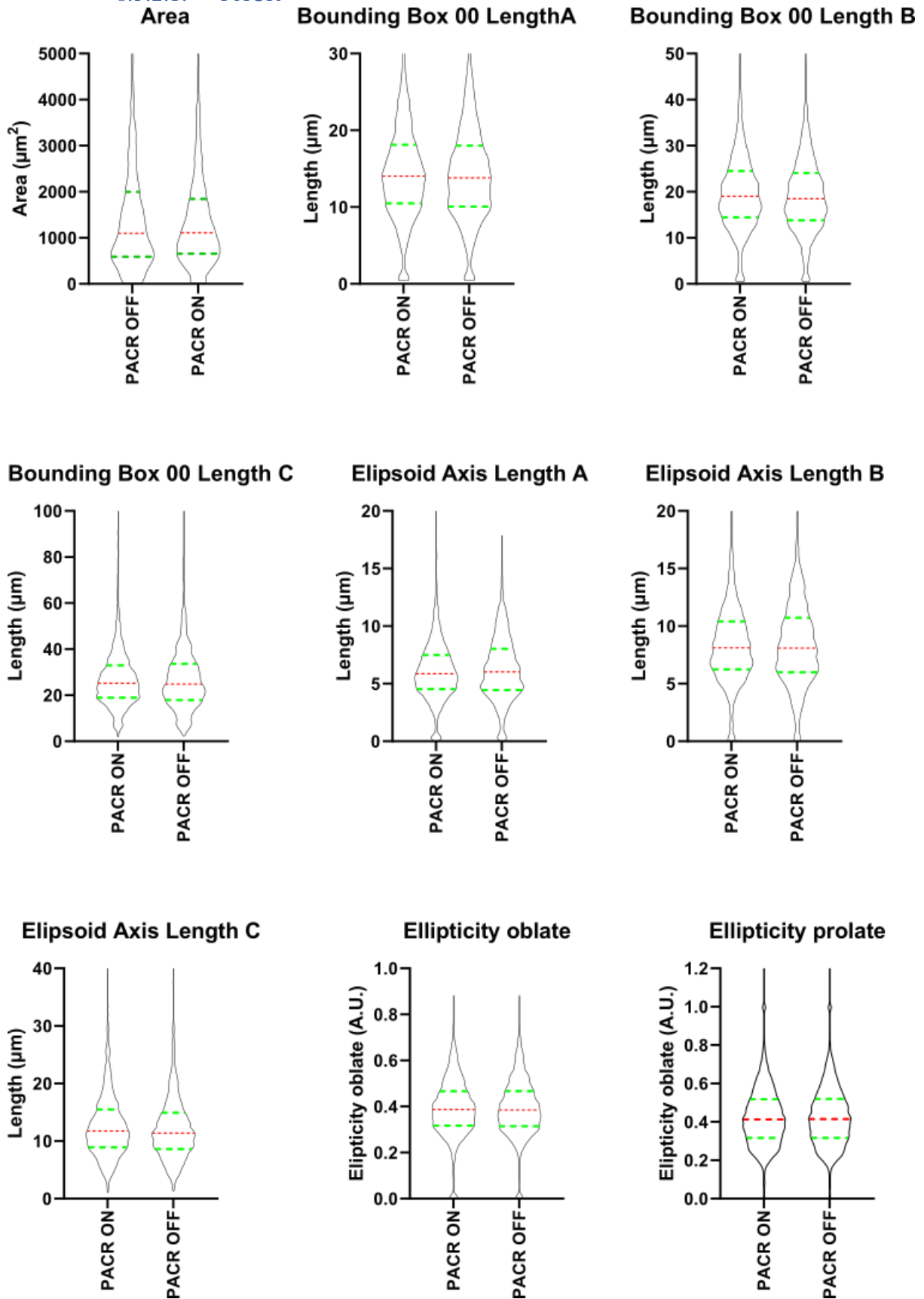
C. Elipsoid Axis Length C



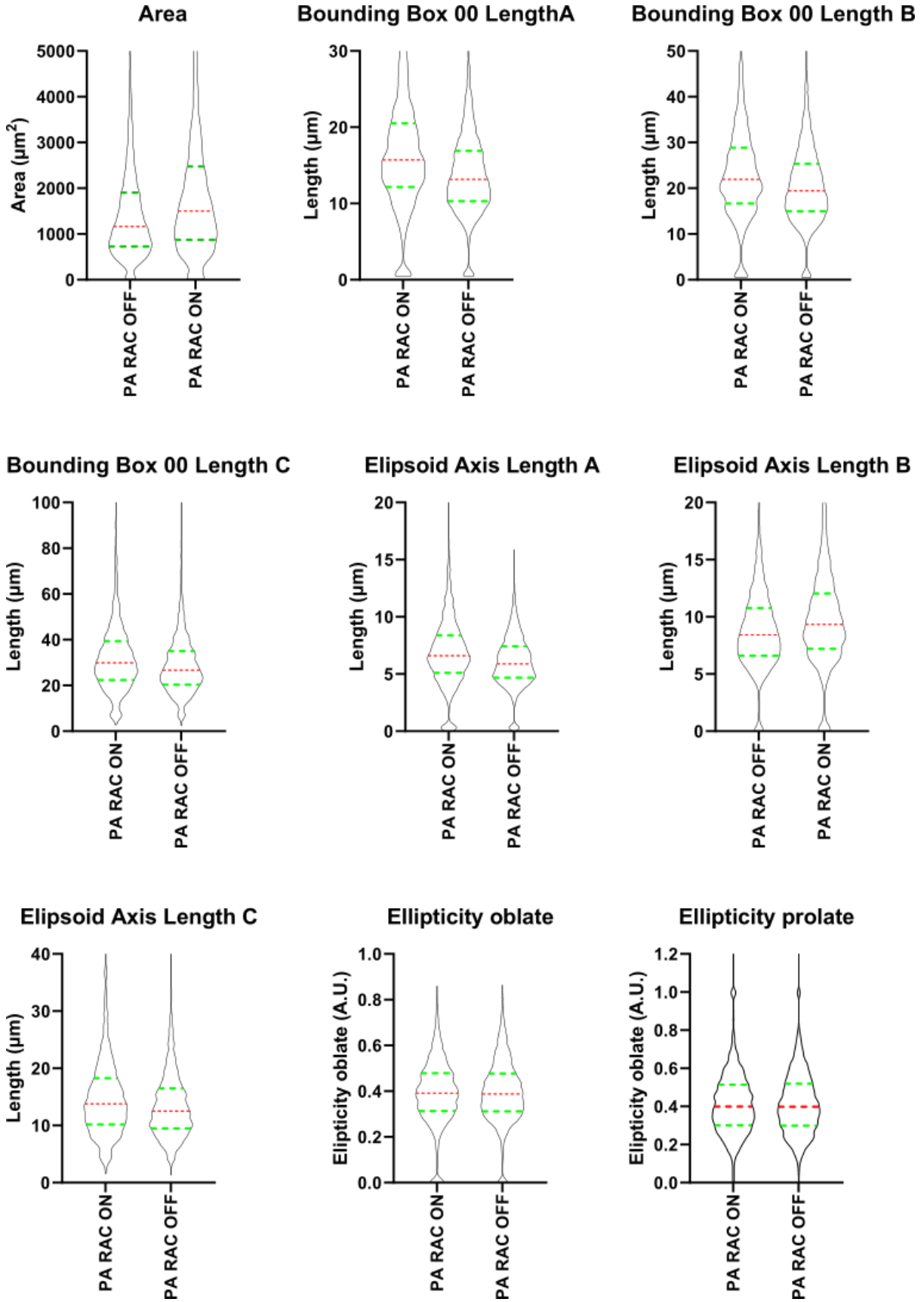


8.3.2. Fiolin plott – Optogenetik

8.3.2.1. PACR



8.3.2.2. *PA-Rac1*



8.3.3. Statistikk – Tabeller

8.3.3.1. *Kruska-wallis test: Kontroll vs kjemiske stoffer*

8.3.3.1.1. Area

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Control vs. CK666	-1982	Yes	**	0.0039	CK666
Control vs. L-theanine	-3513	Yes	****	<0.0001	L-theanine
Control vs. 3-guanidopropionic acid	-1675	Yes	**	0.0052	3-guanidopropionic acid
Control vs. VPA	-5863	Yes	****	<0.0001	VPA
Control vs. Dihydrokainic acid	4748	Yes	****	<0.0001	Dihydrokainic acid
Control vs. Vigabitrin	-2574	Yes	****	<0.0001	Vigabitrin
Control vs. 2-aminoethyl hydrogen sulfate	905.0	No	ns	>0.9999	2-aminoethyl hydrogen sulfate
Control vs. L-methionine sulfoximine	2360	Yes	***	0.0002	L-methionine sulfoximine
Control vs. ALX5407	-3683	Yes	****	<0.0001	ALX5407
Control vs. SNAP-5114	-2917	Yes	****	<0.0001	SNAP-5114
Control vs. Bicculin	5417	Yes	****	<0.0001	Bicculin
Control vs. KYNA	1076	No	ns	>0.9999	KYNA
Control vs. Picotoxin	-2750	Yes	****	<0.0001	Picotoxin
Control vs. NBQX	-535.0	No	ns	>0.9999	NBQX
Control vs. GYK152466	-6297	Yes	****	<0.0001	GYK152466
Control vs. Z-Glu-OH	-3889	Yes	****	<0.0001	Z-Glu-OH
Control vs. 2-APB	-6445	Yes	****	<0.0001	2-APB
Control vs. Ro256981-maleate	366.9	No	ns	>0.9999	Ro256981-maleate
Control vs. CBX	-2122	Yes	***	0.0003	CBX
Control vs. FTY 720	-4565	Yes	****	<0.0001	FTY 720
Control vs. Nickel	6107	Yes	****	<0.0001	Nickel
Control vs. GdCl3	-2712	Yes	****	<0.0001	GdCl3
Control vs. Cadmium	7238	Yes	****	<0.0001	Cadmium
Control vs. Metaprolol	-5034	Yes	****	<0.0001	Metaprolol

Control vs. Propranolol	1397	No	ns	0.0531	Propranolol	
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2	Z
Control vs. CK666	25353	27335	-1982	1867	1415	3.784
Control vs. L-theanine	25353	28866	-3513	1867	802	5.600
Control vs. 3-guanidopropionic acid	25353	27028	-1675	1867	2576	3.709
Control vs. VPA	25353	31217	-5863	1867	795	9.318
Control vs. Dihydrokainic acid	25353	20605	4748	1867	2884	10.76
Control vs. Vigabitrin	25353	27927	-2574	1867	2220	5.516
Control vs. 2-aminoethyl hydrogen sulfate	25353	24448	905.0	1867	2884	2.050
Control vs. L-methionine sulfoximine	25353	22993	2360	1867	1422	4.513
Control vs. ALX5407	25353	29036	-3683	1867	1568	7.236
Control vs. SNAP-5114	25353	28270	-2917	1867	2098	6.170
Control vs. Bicuculin	25353	19937	5417	1867	887	8.939
Control vs. KYNA	25353	24277	1076	1867	1256	1.984
Control vs. Picotoxin	25353	28104	-2750	1867	1683	5.507
Control vs. NBQX	25353	25888	-535.0	1867	2096	1.131
Control vs. GYK152466	25353	31650	-6297	1867	1092	11.12
Control vs. Z-Glu-OH	25353	29243	-3889	1867	1725	7.838
Control vs. 2-APB	25353	31798	-6445	1867	1898	13.31
Control vs. Ro256981-maleate	25353	24986	366.9	1867	2055	0.7723
Control vs. CBX	25353	27476	-2122	1867	1857	4.358
Control vs. FTY 720	25353	29918	-4565	1867	2683	10.19
Control vs. Nickel	25353	19246	6107	1867	3885	14.60
Control vs. GdCl3	25353	28065	-2712	1867	2454	5.943
Control vs. Cadmium	25353	18116	7238	1867	3066	16.59
Control vs. Metaprolol	25353	30387	-5034	1867	1805	10.26

Control vs. Propranolol	25353	23957	1397	1867	2499	3.073
-------------------------	-------	-------	------	------	------	-------

8.3.3.1.2. Bounding box 00 Length A

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Control vs. CK666	-1803	Yes	*	0.0121	CK666
Control vs. L-theanine	-1247	No	ns	>0.9999	L-theanine
Control vs. 3-guanidopropionic acid	-983.8	No	ns	0.6811	3-guanidopropionic acid
Control vs. VPA	-442.7	No	ns	>0.9999	VPA
Control vs. Dihydrokainic acid	6314	Yes	****	<0.0001	Dihydrokainic acid
Control vs. Vigabitrin	-1943	Yes	***	0.0006	Vigabitrin
Control vs. 2-aminoethyl hydrogen sulfate	2925	Yes	****	<0.0001	2-aminoethyl hydrogen sulfate
Control vs. L-methionine sulfoximine	3547	Yes	****	<0.0001	L-methionine sulfoximine
Control vs. ALX5407	-3258	Yes	****	<0.0001	ALX5407
Control vs. SNAP-5114	-1488	Yes	*	0.0356	SNAP-5114
Control vs. Bicculin	6283	Yes	****	<0.0001	Bicculin
Control vs. KYNA	4647	Yes	****	<0.0001	KYNA
Control vs. Picotoxin	-2794	Yes	****	<0.0001	Picotoxin
Control vs. NBQX	1350	No	ns	0.0949	NBQX
Control vs. GYK152466	-4520	Yes	****	<0.0001	GYK152466
Control vs. Z-Glu-OH	-2117	Yes	***	0.0004	Z-Glu-OH
Control vs. 2-APB	-5080	Yes	****	<0.0001	2-APB
Control vs. Ro256981-maleate	377.4	No	ns	>0.9999	Ro256981-maleate
Control vs. CBX	-388.4	No	ns	>0.9999	CBX
Control vs. FTY 720	-3925	Yes	****	<0.0001	FTY 720
Control vs. Nickel	7436	Yes	****	<0.0001	Nickel
Control vs. GdCl3	-1711	Yes	**	0.0036	GdCl3
Control vs. Cadmium	7874	Yes	****	<0.0001	Cadmium

Control vs. Metaprolol	-3117	Yes	****	<0.0001	Metaprolol	
Control vs. Propranolol	10357	Yes	****	<0.0001	Propranolol	
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2	Z
Control vs. CK666	26581	28384	-1803	1866	1415	3.489
Control vs. L-theanine	26581	27828	-1247	1866	802	2.015
Control vs. 3-guanidopropionic acid	26581	27565	-983.8	1866	2576	2.208
Control vs. VPA	26581	27024	-442.7	1866	795	0.7131
Control vs. Dihydrokainic acid	26581	20267	6314	1866	2884	14.50
Control vs. Vigabitrin	26581	28525	-1943	1866	2220	4.221
Control vs. 2-aminoethyl hydrogen sulfate	26581	23656	2925	1866	2188	6.333
Control vs. L-methionine sulfoximine	26581	23034	3547	1866	1422	6.874
Control vs. ALX5407	26581	29839	-3258	1866	1568	6.487
Control vs. SNAP-5114	26581	28069	-1488	1866	2098	3.190
Control vs. Bicuculin	26581	20298	6283	1866	887	10.51
Control vs. KYNA	26581	21934	4647	1866	1256	8.687
Control vs. Picotoxin	26581	29375	-2794	1866	1683	5.670
Control vs. NBQX	26581	25231	1350	1866	2096	2.895
Control vs. GYK152466	26581	31102	-4520	1866	1092	8.094
Control vs. Z-Glu-OH	26581	28699	-2117	1866	1725	4.325
Control vs. 2-APB	26581	31661	-5080	1866	1898	10.63
Control vs. Ro256981-maleate	26581	26204	377.4	1866	2055	0.8053
Control vs. CBX	26581	26970	-388.4	1866	1857	0.8084
Control vs. FTY 720	26581	30507	-3925	1866	2683	8.884
Control vs. Nickel	26581	19145	7436	1866	3885	18.01
Control vs. GdCl3	26581	28292	-1711	1866	2454	3.801
Control vs. Cadmium	26581	18708	7874	1866	3066	18.30

Control vs. Metoprolol	26581	29698	-3117	1866	1805	6.441
Control vs. Propranolol	26581	16225	10357	1866	2499	23.09

8.3.3.1.3. Bounding box 00 Length B

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Control vs. CK666	-2225	Yes	***	0.0004	CK666
Control vs. L-theanine	-3565	Yes	****	<0.0001	L-theanine
Control vs. 3-guanidopropionic acid	-2046	Yes	***	0.0001	3-guanidopropionic acid
Control vs. VPA	-5547	Yes	****	<0.0001	VPA
Control vs. Dihydrokainic acid	4161	Yes	****	<0.0001	Dihydrokainic acid
Control vs. Vigabitrin	-2816	Yes	****	<0.0001	Vigabitrin
Control vs. 2-aminoethyl hydrogen sulfate	1261	No	ns	0.1582	2-aminoethyl hydrogen sulfate
Control vs. L-methionine sulfoximine	1721	Yes	*	0.0213	L-methionine sulfoximine
Control vs. ALX5407	-3755	Yes	****	<0.0001	ALX5407
Control vs. SNAP-5114	-3098	Yes	****	<0.0001	SNAP-5114
Control vs. Bicculin	5098	Yes	****	<0.0001	Bicculin
Control vs. KYNA	1080	No	ns	>0.9999	KYNA
Control vs. Picotoxin	-2927	Yes	****	<0.0001	Picotoxin
Control vs. NBQX	-731.3	No	ns	>0.9999	NBQX
Control vs. GYK152466	-6264	Yes	****	<0.0001	GYK152466
Control vs. Z-Glu-OH	-4251	Yes	****	<0.0001	Z-Glu-OH
Control vs. 2-APB	-6583	Yes	****	<0.0001	2-APB
Control vs. Ro256981-maleate	33.03	No	ns	>0.9999	Ro256981-maleate
Control vs. CBX	-2683	Yes	****	<0.0001	CBX
Control vs. FTY 720	-4870	Yes	****	<0.0001	FTY 720
Control vs. Nickel	5627	Yes	****	<0.0001	Nickel
Control vs. GdCl3	-2922	Yes	****	<0.0001	GdCl3

Control vs. Cadmium	6551	Yes	****	<0.0001	Cadmium	
Control vs. Metoprolol	-5467	Yes	****	<0.0001	Metoprolol	
Control vs. Propranolol	-307.5	No	ns	>0.9999	Propranolol	
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2	Z
Control vs. CK666	24635	26861	-2225	1866	1415	4.307
Control vs. L-theanine	24635	28201	-3565	1866	802	5.761
Control vs. 3-guanidopropionic acid	24635	26682	-2046	1866	2576	4.593
Control vs. VPA	24635	30182	-5547	1866	795	8.935
Control vs. Dihydrokainic acid	24635	20475	4161	1866	2884	9.554
Control vs. Vigabatrin	24635	27451	-2816	1866	2220	6.116
Control vs. 2-aminoethyl hydrogen sulfate	24635	23374	1261	1866	2188	2.730
Control vs. L-methionine sulfoximine	24635	22914	1721	1866	1422	3.336
Control vs. ALX5407	24635	28390	-3755	1866	1568	7.477
Control vs. SNAP-5114	24635	27734	-3098	1866	2098	6.643
Control vs. Bicuculin	24635	19537	5098	1866	887	8.529
Control vs. KYNA	24635	23556	1080	1866	1256	2.019
Control vs. Picotoxin	24635	27563	-2927	1866	1683	5.941
Control vs. NBQX	24635	25367	-731.3	1866	2096	1.567
Control vs. GYK152466	24635	30899	-6264	1866	1092	11.22
Control vs. Z-Glu-OH	24635	28886	-4251	1866	1725	8.683
Control vs. 2-APB	24635	31218	-6583	1866	1898	13.78
Control vs. Ro256981-maleate	24635	24602	33.03	1866	2055	0.07047
Control vs. CBX	24635	27318	-2683	1866	1857	5.583
Control vs. FTY 720	24635	29505	-4870	1866	2683	11.02
Control vs. Nickel	24635	19009	5627	1866	3885	13.63
Control vs. GdCl3	24635	27558	-2922	1866	2454	6.491

Control vs. Cadmium	24635	18084	6551	1866	3066	15.22
Control vs. Metaprolol	24635	30102	-5467	1866	1805	11.30
Control vs. Propranolol	24635	24943	-307.5	1866	2499	0.6857

8.3.3.1.4. Bounding box 00 Length C

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Control vs. CK666	-1772	Yes	*	0.0152	CK666
Control vs. L-theanine	-3825	Yes	****	<0.0001	L-theanine
Control vs. 3-guanidopropionic acid	-1977	Yes	***	0.0002	3-guanidopropionic acid
Control vs. VPA	-6971	Yes	****	<0.0001	VPA
Control vs. Dihydrokainic acid	4352	Yes	****	<0.0001	Dihydrokainic acid
Control vs. Vigabitrin	-2673	Yes	****	<0.0001	Vigabitrin
Control vs. 2-aminoethyl hydrogen sulfate	947.4	No	ns	>0.9999	2-aminoethyl hydrogen sulfate
Control vs. L-methionine sulfoximine	1540	No	ns	0.0712	L-methionine sulfoximine
Control vs. ALX5407	-3708	Yes	****	<0.0001	ALX5407
Control vs. SNAP-5114	-3410	Yes	****	<0.0001	SNAP-5114
Control vs. Bicuculin	5027	Yes	****	<0.0001	Bicuculin
Control vs. KYNA	375.9	No	ns	>0.9999	KYNA
Control vs. Picotoxin	-2120	Yes	***	0.0004	Picotoxin
Control vs. NBQX	-978.6	No	ns	0.8982	NBQX
Control vs. GYK152466	-5973	Yes	****	<0.0001	GYK152466
Control vs. Z-Glu-OH	-4449	Yes	****	<0.0001	Z-Glu-OH
Control vs. 2-APB	-6383	Yes	****	<0.0001	2-APB
Control vs. Ro256981-maleate	566.6	No	ns	>0.9999	Ro256981-maleate
Control vs. CBX	-3052	Yes	****	<0.0001	CBX
Control vs. FTY 720	-4494	Yes	****	<0.0001	FTY 720
Control vs. Nickel	5870	Yes	****	<0.0001	Nickel

Control vs. GdCl3	-2944	Yes	****	<0.0001	GdCl3	
Control vs. Cadmium	7135	Yes	****	<0.0001	Cadmium	
Control vs. Metoprolol	-5384	Yes	****	<0.0001	Metoprolol	
Control vs. Propranolol	-1802	Yes	**	0.0015	Propranolol	
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2	Z
Control vs. CK666	24627	26399	-1772	1866	1415	3.429
Control vs. L-theanine	24627	28452	-3825	1866	802	6.180
Control vs. 3-guanidopropionic acid	24627	26604	-1977	1866	2576	4.436
Control vs. VPA	24627	31598	-6971	1866	795	11.23
Control vs. Dihydrokainic acid	24627	20275	4352	1866	2884	9.995
Control vs. Vigabatrin	24627	27300	-2673	1866	2220	5.807
Control vs. 2-aminoethyl hydrogen sulfate	24627	23680	947.4	1866	2188	2.051
Control vs. L-methionine sulfoximine	24627	23088	1540	1866	1422	2.984
Control vs. ALX5407	24627	28335	-3708	1866	1568	7.383
Control vs. SNAP-5114	24627	28038	-3410	1866	2098	7.312
Control vs. Bicuculin	24627	19600	5027	1866	887	8.410
Control vs. KYNA	24627	24251	375.9	1866	1256	0.7027
Control vs. Picotoxin	24627	26747	-2120	1866	1683	4.302
Control vs. NBQX	24627	25606	-978.6	1866	2096	2.098
Control vs. GYK152466	24627	30601	-5973	1866	1092	10.70
Control vs. Z-Glu-OH	24627	29077	-4449	1866	1725	9.088
Control vs. 2-APB	24627	31010	-6383	1866	1898	13.36
Control vs. Ro256981-maleate	24627	24061	566.6	1866	2055	1.209
Control vs. CBX	24627	27679	-3052	1866	1857	6.352
Control vs. FTY720	24627	29122	-4494	1866	2683	10.17
Control vs. Nickel	24627	18758	5870	1866	3885	14.22
Control vs. GdCl3	24627	27572	-2944	1866	2454	6.540

Control vs. Cadmium	24627	17493	7135	1866	3066	16.58
Control vs. Metaprolol	24627	30011	-5384	1866	1805	11.13
Control vs. Propranolol	24627	26429	-1802	1866	2499	4.018

8.3.3.1.5. Ellipsoid Axis Length A

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Control vs. CK666	-1367	No	ns	0.2025	CK666
Control vs. L-theanine	-1820	No	ns	0.0815	L-theanine
Control vs. 3-guanidopropionic acid	-853.5	No	ns	>0.9999	3-guanidopropionic acid
Control vs. VPA	-2061	Yes	*	0.0223	VPA
Control vs. Dihydrokainic acid	6024	Yes	****	<0.0001	Dihydrokainic acid
Control vs. Vigabatrin	-1785	Yes	**	0.0026	Vigabatrin
Control vs. 2-aminoethyl hydrogen sulfate	3019	Yes	****	<0.0001	2-aminoethyl hydrogen sulfate
Control vs. L-methionine sulfoximine	3275	Yes	****	<0.0001	L-methionine sulfoximine
Control vs. ALX5407	-2890	Yes	****	<0.0001	ALX5407
Control vs. SNAP-5114	-1562	Yes	*	0.0202	SNAP-5114
Control vs. Bicculin	5820	Yes	****	<0.0001	Bicculin
Control vs. KYNA	3263	Yes	****	<0.0001	KYNA
Control vs. Picotoxin	-2615	Yes	****	<0.0001	Picotoxin
Control vs. NBQX	607.0	No	ns	>0.9999	NBQX
Control vs. GYK152466	-5139	Yes	****	<0.0001	GYK152466
Control vs. Z-Glu-OH	-2265	Yes	****	<0.0001	Z-Glu-OH
Control vs. 2-APB	-4760	Yes	****	<0.0001	2-APB
Control vs. Ro256981-maleate	128.9	No	ns	>0.9999	Ro256981-maleate
Control vs. CBX	-218.6	No	ns	>0.9999	CBX
Control vs. FTY 720	-3449	Yes	****	<0.0001	FTY 720
Control vs. Nickel	7613	Yes	****	<0.0001	Nickel

Control vs. GdCl3	-1543	Yes	*	0.0152	GdCl3	
Control vs. Cadmium	8008	Yes	****	<0.0001	Cadmium	
Control vs. Metoprolol	-3075	Yes	****	<0.0001	Metoprolol	
Control vs. Propranolol	9021	Yes	****	<0.0001	Propranolol	
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2	Z
Control vs. CK666	26474	27841	-1367	1866	1415	2.648
Control vs. L-theanine	26474	28294	-1820	1866	802	2.942
Control vs. 3-guanidopropionic acid	26474	27328	-853.5	1866	2576	1.917
Control vs. VPA	26474	28536	-2061	1866	795	3.323
Control vs. Dihydrokainic acid	26474	20451	6024	1866	2884	13.84
Control vs. Vigabatrin	26474	28259	-1785	1866	2220	3.880
Control vs. 2-aminoethyl hydrogen sulfate	26474	23455	3019	1866	2188	6.542
Control vs. L-methionine sulfoximine	26474	23199	3275	1866	1422	6.352
Control vs. ALX5407	26474	29364	-2890	1866	1568	5.760
Control vs. SNAP-5114	26474	28036	-1562	1866	2098	3.351
Control vs. Bicuculin	26474	20654	5820	1866	887	9.743
Control vs. KYNA	26474	23211	3263	1866	1256	6.103
Control vs. Picotoxin	26474	29089	-2615	1866	1683	5.311
Control vs. NBQX	26474	25867	607.0	1866	2096	1.302
Control vs. GYK152466	26474	31613	-5139	1866	1092	9.208
Control vs. Z-Glu-OH	26474	28739	-2265	1866	1725	4.629
Control vs. 2-APB	26474	31234	-4760	1866	1898	9.967
Control vs. Ro256981-maleate	26474	26345	128.9	1866	2055	0.2751
Control vs. CBX	26474	26693	-218.6	1866	1857	0.4554
Control vs. FTY720	26474	29923	-3449	1866	2683	7.812
Control vs. Nickel	26474	18861	7613	1866	3885	18.45
Control vs. GdCl3	26474	28017	-1543	1866	2454	3.429

Control vs. Cadmium	26474	18467	8008	1866	3066	18.62
Control vs. Metaprolol	26474	29550	-3075	1866	1805	6.360
Control vs. Propranolol	26474	17453	9021	1866	2499	20.13

8.3.3.1.6. Ellipsoid Axis Length B

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Control vs. CK666	-1759	Yes	*	0,0165	CK666
Control vs. L-theanine	-3358	Yes	****	<0.0001	L-theanine
Control vs. 3-guanidopropionic acid	-1434	Yes	*	0,0322	3-guanidopropionic acid
Control vs. VPA	-5608	Yes	****	<0.0001	VPA
Control vs. Dihydrokainic acid	4607	Yes	****	<0.0001	Dihydrokainic acid
Control vs. Vigabitrin	-2352	Yes	****	<0.0001	Vigabitrin
Control vs. 2-aminoethyl hydrogen sulfate	1860	Yes	**	0,0014	2-aminoethyl hydrogen sulfate
Control vs. L-methionine sulfoximine	2104	Yes	**	0,0011	L-methionine sulfoximine
Control vs. ALX5407	-3109	Yes	****	<0.0001	ALX5407
Control vs. SNAP-5114	-2618	Yes	****	<0.0001	SNAP-5114
Control vs. Bicculin	5097	Yes	****	<0.0001	Bicculin
Control vs. KYNA	899,1	No	ns	>0.9999	KYNA
Control vs. Picotoxin	-2736	Yes	****	<0.0001	Picotoxin

Control vs. NBQX	-429,6	No	ns	>0.9999	NBQX
Control vs. GYK152466	-6064	Yes	****	<0.0001	GYK152466
Control vs. Z-Glu-OH	-3825	Yes	****	<0.0001	Z-Glu-OH
Control vs. 2-APB	-6008	Yes	****	<0.0001	2-APB
Control vs. Ro256981-maleate	449,9	No	ns	>0.9999	Ro256981-maleate
Control vs. CBX	-2086	Yes	***	0,0004	CBX
Control vs. FTY 720	-4122	Yes	****	<0.0001	FTY 720
Control vs. Nickel	5922	Yes	****	<0.0001	Nickel
Control vs. GdCl3	-2364	Yes	****	<0.0001	GdCl3
Control vs. Cadmium	7012	Yes	****	<0.0001	Cadmium
Control vs. Metoprolol	-4955	Yes	****	<0.0001	Metoprolol
Control vs. Propranolol	-38,05	No	ns	>0.9999	Propranolol

Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2	Z
Control vs. CK666	25045	26805	-1759	1866	1415	3,406
Control vs. L-theanine	25045	28404	-3358	1866	802	5,428
Control vs. 3-guanidopropionic acid	25045	26479	-1434	1866	2576	3,219
Control vs. VPA	25045	30654	-5608	1866	795	9,037
Control vs. Dihydrokainic acid	25045	20438	4607	1866	2884	10,58

Control vs. Vigabitrin	25045	27397	-2352	1866	2220	5,11
Control vs. 2-aminoethyl hydrogen sulfate	25045	23185	1860	1866	2188	4,029
Control vs. L-methionine sulfoximine	25045	22941	2104	1866	1422	4,079
Control vs. ALX5407	25045	28155	-3109	1866	1568	6,194
Control vs. SNAP-5114	25045	27664	-2618	1866	2098	5,615
Control vs. Bicuculin	25045	19948	5097	1866	887	8,53
Control vs. KYNA	25045	24146	899,1	1866	1256	1,681
Control vs. Picotoxin	25045	27781	-2736	1866	1683	5,554
Control vs. NBQX	25045	25475	-429,6	1866	2096	0,9212
Control vs. GYK152466	25045	31109	-6064	1866	1092	10,86
Control vs. Z-Glu-OH	25045	28870	-3825	1866	1725	7,815
Control vs. 2-APB	25045	31053	-6008	1866	1898	12,58
Control vs. Ro256981-maleate	25045	24596	449,9	1866	2055	0,9602
Control vs. CBX	25045	27131	-2086	1866	1857	4,342
Control vs. FTY 720	25045	29167	-4122	1866	2683	9,332
Control vs. Nickel	25045	19124	5922	1866	3885	14,35
Control vs. GdCl3	25045	27410	-2364	1866	2454	5,254
Control vs. Cadmium	25045	18033	7012	1866	3066	16,3

Control vs. Metoprolol	25045	30000	-4955	1866	1805	10,24
Control vs. Propranolol	25045	25084	-38,05	1866	2499	0,08487

8.3.3.1.7. Ellipsoid Axis Length C

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Control vs. CK666	-1687	Yes	*	0.0273	CK666
Control vs. L-theanine	-4030	Yes	****	<0.0001	L-theanine
Control vs. 3-guanidopropionic acid	-1699	Yes	**	0.0034	3-guanidopropionic acid
Control vs. VPA	-6809	Yes	****	<0.0001	VPA
Control vs. Dihydrokainic acid	4748	Yes	****	<0.0001	Dihydrokainic acid
Control vs. Vigabitrin	-2407	Yes	****	<0.0001	Vigabitrin
Control vs. 2-aminoethyl hydrogen sulfate	981.5	No	ns	0.8391	2-aminoethyl hydrogen sulfate
Control vs. L-methionine sulfoximine	1658	Yes	*	0.0329	L-methionine sulfoximine
Control vs. ALX5407	-3460	Yes	****	<0.0001	ALX5407
Control vs. SNAP-5114	-3127	Yes	****	<0.0001	SNAP-5114
Control vs. Bicculin	5249	Yes	****	<0.0001	Bicculin
Control vs. KYNA	1440	No	ns	0.1776	KYNA
Control vs. Picotoxin	-1954	Yes	**	0.0018	Picotoxin
Control vs. NBQX	-955.1	No	ns	>0.9999	NBQX
Control vs. GYK152466	-5564	Yes	****	<0.0001	GYK152466
Control vs. Z-Glu-OH	-4133	Yes	****	<0.0001	Z-Glu-OH
Control vs. 2-APB	-5823	Yes	****	<0.0001	2-APB
Control vs. Ro256981-maleate	777.7	No	ns	>0.9999	Ro256981-maleate
Control vs. CBX	-2706	Yes	****	<0.0001	CBX
Control vs. FTY 720	-4111	Yes	****	<0.0001	FTY 720
Control vs. Nickel	6097	Yes	****	<0.0001	Nickel
Control vs. GdCl3	-2432	Yes	****	<0.0001	GdCl3

Control vs. Cadmium	7607	Yes	****	<0.0001	Cadmium	
Control vs. Metoprolol	-5060	Yes	****	<0.0001	Metoprolol	
Control vs. Propranolol	-416.8	No	ns	>0.9999	Propranolol	
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2	Z
Control vs. CK666	24970	26658	-1687	1866	1415	3.266
Control vs. L-theanine	24970	29000	-4030	1866	802	6.512
Control vs. 3-guanidopropionic acid	24970	26669	-1699	1866	2576	3.813
Control vs. VPA	24970	31779	-6809	1866	795	10.97
Control vs. Dihydrokainic acid	24970	20222	4748	1866	2884	10.91
Control vs. Vigabatrin	24970	27377	-2407	1866	2220	5.230
Control vs. 2-aminoethyl hydrogen sulfate	24970	23989	981.5	1866	2188	2.125
Control vs. L-methionine sulfoximine	24970	23313	1658	1866	1422	3.213
Control vs. ALX5407	24970	28431	-3460	1866	1568	6.892
Control vs. SNAP-5114	24970	28097	-3127	1866	2098	6.705
Control vs. Bicuculin	24970	19721	5249	1866	887	8.781
Control vs. KYNA	24970	23530	1440	1866	1256	2.692
Control vs. Picotoxin	24970	26924	-1954	1866	1683	3.965
Control vs. NBQX	24970	25925	-955.1	1866	2096	2.047
Control vs. GYK152466	24970	30534	-5564	1866	1092	9.964
Control vs. Z-Glu-OH	24970	29104	-4133	1866	1725	8.444
Control vs. 2-APB	24970	30794	-5823	1866	1898	12.19
Control vs. Ro256981-maleate	24970	24193	777.7	1866	2055	1.659
Control vs. CBX	24970	27676	-2706	1866	1857	5.633
Control vs. FTY 720	24970	29081	-4111	1866	2683	9.306
Control vs. Nickel	24970	18873	6097	1866	3885	14.77
Control vs. GdCl3	24970	27402	-2432	1866	2454	5.402

Control vs. Cadmium	24970	17363	7607	1866	3066	17.68
Control vs. Metaprolol	24970	30031	-5060	1866	1805	10.46
Control vs. Propranolol	24970	25387	-416.8	1866	2499	0.9295

8.3.3.1.8. Ellipticity oblate

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant ?	Summary	Adjusted P Value	
Ellipticity oblate vs. CK666	-430,4	No	ns	>0.9999	CK666
Ellipticity oblate vs. L-theanine	455,6	No	ns	>0.9999	L-theanine
Ellipticity oblate vs. 3-guanidopropionic acid	-324,9	No	ns	>0.9999	3-guanidopropionic acid
Ellipticity oblate vs. VPA	-1151	No	ns	>0.9999	VPA
Ellipticity oblate vs. Dihydrokainic acid	8238	Yes	****	<0.0001	Dihydrokainic acid
Ellipticity oblate vs. Vigabitrin	-378,7	No	ns	>0.9999	Vigabitrin
Ellipticity oblate vs. 2-aminoethyl hydrogen sulfate	72,78	No	ns	>0.9999	2-aminoethyl hydrogen sulfate
Ellipticity oblate vs. L-methionine sulfoximine	-775,3	No	ns	>0.9999	L-methionine sulfoximine
Ellipticity oblate vs. ALX5407	679,5	No	ns	>0.9999	ALX5407
Ellipticity oblate vs. SNAP-5114	-355,9	No	ns	>0.9999	SNAP-5114
Ellipticity oblate vs. Bicculin	9040	Yes	****	<0.0001	Bicculin
Ellipticity oblate vs. KYNA	72,95	No	ns	>0.9999	KYNA

Ellipticity oblate vs. Picotoxin	-686,5	No	ns	>0.9999	Picotoxin
Ellipticity oblate vs. NBQX	-164,4	No	ns	>0.9999	NBQX
Ellipticity oblate vs. GYK152466	-666,6	No	ns	>0.9999	GYK152466
Ellipticity oblate vs. Z-Glu-OH	-1370	No	ns	0,1283	Z-Glu-OH
Ellipticity oblate vs. 2-APB	-690,6	No	ns	>0.9999	2-APB
Ellipticity oblate vs. Ellipticity oblate	295,3	No	ns	>0.9999	Ellipticity oblate
Ellipticity oblate vs. CBX	-1238	No	ns	0,2485	CBX
Ellipticity oblate vs. FTY 720	-414,7	No	ns	>0.9999	FTY 720
Ellipticity oblate vs. Nickel	8802	Yes	****	<0.0001	Nickel
Ellipticity oblate vs. GdCl3	717,6	No	ns	>0.9999	GdCl3
Ellipticity oblate vs. Cadmium	9667	Yes	****	<0.0001	Cadmium
Ellipticity oblate vs. Metaprolol	-1164	No	ns	0,4048	Metaprolol
Ellipticity oblate vs. Propranolol	-5682	Yes	****	<0.0001	Propranolol

Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2	Z
Ellipticity oblate vs. CK666	26747	27177	-430,4	1866	1415	0,8331
Ellipticity oblate vs. L-theanine	26747	26291	455,6	1866	802	0,7362
Ellipticity oblate vs. 3-guanidopropionic acid	26747	27072	-324,9	1866	2576	0,7291
Ellipticity oblate vs. VPA	26747	27898	-1151	1866	795	1,854

Ellipticity oblate vs. Dihydrokainic acid	2674 7	18509	8238	1866	2884	18,92
Ellipticity oblate vs. Vigabitrin	2674 7	27126	-378,7	1866	2220	0,8227
Ellipticity oblate vs. 2-aminoethyl hydrogen sulfate	2674 7	26674	72,78	1866	2188	0,1576
Ellipticity oblate vs. L-methionine sulfoximine	2674 7	27522	-775,3	1866	1422	1,503
Ellipticity oblate vs. ALX5407	2674 7	26067	679,5	1866	1568	1,353
Ellipticity oblate vs. SNAP-5114	2674 7	27103	-355,9	1866	2098	0,7632
Ellipticity oblate vs. Bicuculin	2674 7	17707	9040	1866	887	15,12
Ellipticity oblate vs. KYNA	2674 7	26674	72,95	1866	1256	0,1364
Ellipticity oblate vs. Picotoxin	2674 7	27433	-686,5	1866	1683	1,393
Ellipticity oblate vs. NBQX	2674 7	26911	-164,4	1866	2096	0,3524
Ellipticity oblate vs. GYK152466	2674 7	27414	-666,6	1866	1092	1,194
Ellipticity oblate vs. Z-Glu-OH	2674 7	28117	-1370	1866	1725	2,799
Ellipticity oblate vs. 2-APB	2674 7	27437	-690,6	1866	1898	1,445
Ellipticity oblate vs. Ellipticity oblate	2674 7	26452	295,3	1866	2055	0,6301
Ellipticity oblate vs. CBX	2674 7	27985	-1238	1866	1857	2,578
Ellipticity oblate vs. FTY 720	2674 7	27162	-414,7	1866	2683	0,9387
Ellipticity oblate vs. Nickel	2674 7	17945	8802	1866	3885	21,32
Ellipticity oblate vs. GdCl3	2674 7	26029	717,6	1866	2454	1,594

Ellipticity oblate vs. Cadmium	26747	17080	9667	1866	3066	22,47
Ellipticity oblate vs. Metaprolol	26747	27910	-1164	1866	1805	2,405
Ellipticity oblate vs. Propranolol	26747	32428	-5682	1866	2499	12,67

8.3.3.1.9. Ellipticity prolate

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Control vs. CK666	381.4	No	ns	>0.9999	CK666
Control vs. L-theanine	12.70	No	ns	>0.9999	L-theanine
Control vs. 3-guanidopropionic acid	153.5	No	ns	>0.9999	3-guanidopropionic acid
Control vs. VPA	1650	No	ns	0.1963	VPA
Control vs. Dihydrokainic acid	3459	Yes	****	<0.0001	Dihydrokainic acid
Control vs. Vigabatrin	414.9	No	ns	>0.9999	Vigabatrin
Control vs. 2-Aminoethyl hydrogen sulfate	207.3	No	ns	>0.9999	Ellipticity prolate
Control vs. L-methionine sulfoximine	1106	No	ns	0.7998	L-methionine sulfoximine
Control vs. ALX5407	-906.0	No	ns	>0.9999	ALX5407
Control vs. SNAP-5114	229.7	No	ns	>0.9999	SNAP-5114
Control vs. Bicuculin	4196	Yes	****	<0.0001	Bicuculin
Control vs. KYNA	1396	No	ns	0.2260	KYNA
Control vs. Picotoxin	905.4	No	ns	>0.9999	Picotoxin
Control vs. NBQX	588.0	No	ns	>0.9999	NBQX
Control vs. GYK152466	606.3	No	ns	>0.9999	GYK152466
Control vs. Z-Glu-OH	645.2	No	ns	>0.9999	Z-Glu-OH
Control vs. 2-APB	576.6	No	ns	>0.9999	2-APB
Control vs. Ro256981-maleate	-1.473	No	ns	>0.9999	Ro256981-maleate
Control vs. CBX	1089	No	ns	0.5835	CBX
Control vs. FTY 720	-143.1	No	ns	>0.9999	FTY 720
Control vs. Nickel	3904	Yes	****	<0.0001	Nickel

Control vs. GdCl3	93.25	No	ns	>0.9999	GdCl3	
Control vs. Cadmium	3996	Yes	****	<0.0001	Cadmium	
Control vs. Metoprolol	875.6	No	ns	>0.9999	Metoprolol	
Control vs. Propranolol	6432	Yes	****	<0.0001	Propranolol	
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2	Z
Control vs. CK666	26812	26430	381.4	1866	1415	0.7383
Control vs. L-theanine	26812	26799	12.70	1866	802	0.02052
Control vs. Ellipticity prolate	26812	26658	153.5	1866	2576	0.3446
Control vs. VPA	26812	25161	1650	1866	795	2.658
Control vs. Dihydrokainic acid	26812	23353	3459	1866	2884	7.943
Control vs. Vigabitrin	26812	26397	414.9	1866	2220	0.9013
Control vs. 2-aminoethyl hydrogen sulfate prolate	26812	26604	207.3	1866	2188	0.4489
Control vs. L-methionine sulfoximine	26812	25705	1106	1866	1422	2.145
Control vs. ALX5407	26812	27718	-906.0	1866	1568	1.804
Control vs. SNAP-5114	26812	26582	229.7	1866	2098	0.4924
Control vs. Bicuculin	26812	22615	4196	1866	887	7.020
Control vs. KYNA	26812	25415	1396	1866	1256	2.611
Control vs. Picotoxin	26812	25906	905.4	1866	1683	1.838
Control vs. NBQX	26812	26224	588.0	1866	2096	1.260
Control vs. GYK152466	26812	26205	606.3	1866	1092	1.086
Control vs. Z-Glu-OH	26812	26166	645.2	1866	1725	1.318
Control vs. 2-APB	26812	26235	576.6	1866	1898	1.207
Control vs. Ro256981-maleate	26812	26813	-1.473	1866	2055	0.003143
Control vs. CBX	26812	25722	1089	1866	1857	2.268
Control vs. FTY 720	26812	26955	-143.1	1866	2683	0.3240
Control vs. Nickel	26812	22907	3904	1866	3885	9.458
Control vs. GdCl3	26812	26718	93.25	1866	2454	0.2071
Control vs. Cadmium	26812	22816	3996	1866	3066	9.285

Control vs. Metoprolol	26812	25936	875.6	1866	1805	1.810
Control vs. Propranolol	26812	20379	6432	1866	2499	14.34

8.3.3.1.10. Sphericity

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Control vs. CK666	4783	Yes	****	<0.0001	CK666
Control vs. L-theanine	3228	Yes	****	<0.0001	L-theanine
Control vs. 3-guanidopropionic acid	2912	Yes	****	<0.0001	3-guanidopropionic acid
Control vs. VPA	4113	Yes	****	<0.0001	VPA
Control vs. Dihydrokainic acid	102.3	No	ns	>0.9999	Dihydrokainic acid
Control vs. Vigabatrin	3138	Yes	****	<0.0001	Vigabatrin
Control vs. 2-aminoethyl hydrogen sulfate	1279	No	ns	0.1408	2-aminoethyl hydrogen sulfate
Control vs. L-methionine sulfoximine	-1013	No	ns	>0.9999	L-methionine sulfoximine
Control vs. ALX5407	4862	Yes	****	<0.0001	ALX5407
Control vs. SNAP-5114	3200	Yes	****	<0.0001	SNAP-5114
Control vs. Bicculin	-3547	Yes	****	<0.0001	Bicculin
Control vs. KYNA	-45.68	No	ns	>0.9999	KYNA
Control vs. Picotoxin	2046	Yes	***	0.0008	Picotoxin
Control vs. NBQX	570.8	No	ns	>0.9999	NBQX
Control vs. GYK152466	3986	Yes	****	<0.0001	GYK152466
Control vs. Z-Glu-OH	3436	Yes	****	<0.0001	Z-Glu-OH
Control vs. 2-APB	7330	Yes	****	<0.0001	2-APB
Control vs. Ro256981-maleate	-330.5	No	ns	>0.9999	Ro256981-maleate
Control vs. CBX	4185	Yes	****	<0.0001	CBX
Control vs. FTY 720	6330	Yes	****	<0.0001	FTY 720
Control vs. Nickel	639.1	No	ns	>0.9999	Nickel
Control vs. GdCl3	4188	Yes	****	<0.0001	GdCl3

Control vs. Cadmium	-39.28	No	ns	>0.9999	Cadmium	
Control vs. Metoprolol	5473	Yes	****	<0.0001	Metoprolol	
Control vs. Propranolol	6694	Yes	****	<0.0001	Propranolol	
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2	Z
Control vs. CK666	27988	23205	4783	1866	1415	9.257
Control vs. L-theanine	27988	24760	3228	1866	802	5.216
Control vs. 3-guanidopropionic acid	27988	25076	2912	1866	2576	6.536
Control vs. VPA	27988	23875	4113	1866	795	6.626
Control vs. Dihydrokainic acid	27988	27886	102.3	1866	2884	0.2348
Control vs. Vigabatrin	27988	24850	3138	1866	2220	6.817
Control vs. 2-aminoethyl hydrogen sulfate	27988	26710	1279	1866	2188	2.768
Control vs. L-methionine sulfoximine	27988	29001	-1013	1866	1422	1.963
Control vs. ALX5407	27988	23126	4862	1866	1568	9.683
Control vs. SNAP-5114	27988	24788	3200	1866	2098	6.862
Control vs. Bicuculin	27988	31535	-3547	1866	887	5.934
Control vs. KYNA	27988	28034	-45.68	1866	1256	0.08538
Control vs. Picotoxin	27988	25943	2046	1866	1683	4.152
Control vs. NBQX	27988	27418	570.8	1866	2096	1.223
Control vs. GYK152466	27988	24002	3986	1866	1092	7.138
Control vs. Z-Glu-OH	27988	24553	3436	1866	1725	7.018
Control vs. 2-APB	27988	20658	7330	1866	1898	15.34
Control vs. Ro256981-maleate	27988	28319	-330.5	1866	2055	0.7051
Control vs. CBX	27988	23804	4185	1866	1857	8.710
Control vs. FTY 720	27988	21658	6330	1866	2683	14.33
Control vs. Nickel	27988	27349	639.1	1866	3885	1.548
Control vs. GdCl3	27988	23801	4188	1866	2454	9.302

Control vs. Cadmium	27988	28028	-39.28	1866	3066	0.09127
Control vs. Metaprolol	27988	22515	5473	1866	1805	11.31
Control vs. Propranolol	27988	21294	6694	1866	2499	14.93

8.3.3.1.11. Volume

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Control vs. CK666	-1328	No	ns	0.2535	CK666
Control vs. L-theanine	-3316	Yes	****	<0.0001	L-theanine
Control vs. 3-guanidopropionic acid	-1198	No	ns	0.1789	3-guanidopropionic acid
Control vs. VPA	-5602	Yes	****	<0.0001	VPA
Control vs. Dihydrokainic acid	5137	Yes	****	<0.0001	Dihydrokainic acid
Control vs. Vigabatrin	-2114	Yes	***	0.0001	Vigabatrin
Control vs. 2-aminoethyl hydrogen sulfate	2203	Yes	****	<0.0001	2-aminoethyl hydrogen sulfate
Control vs. L-methionine sulfoximine	2559	Yes	****	<0.0001	L-methionine sulfoximine
Control vs. ALX5407	-3172	Yes	****	<0.0001	ALX5407
Control vs. SNAP-5114	-2507	Yes	****	<0.0001	SNAP-5114
Control vs. Bicuculin	5212	Yes	****	<0.0001	Bicuculin
Control vs. KYNA	1275	No	ns	0.4294	KYNA
Control vs. Picotoxin	-2470	Yes	****	<0.0001	Picotoxin
Control vs. NBQX	-399.3	No	ns	>0.9999	NBQX
Control vs. GYK152466	-6172	Yes	****	<0.0001	GYK152466
Control vs. Z-Glu-OH	-3549	Yes	****	<0.0001	Z-Glu-OH
Control vs. 2-APB	-5791	Yes	****	<0.0001	2-APB
Control vs. Ro256981-maleate	502.8	No	ns	>0.9999	Ro256981-maleate
Control vs. CBX	-1459	No	ns	0.0596	CBX
Control vs. FTY 720	-3845	Yes	****	<0.0001	FTY 720

Control vs. Nickel	6699	Yes	****	<0.0001	Nickel	
Control vs. GdCl3	-2166	Yes	****	<0.0001	GdCl3	
Control vs. Cadmium	7823	Yes	****	<0.0001	Cadmium	
Control vs. Metoprolol	-4504	Yes	****	<0.0001	Metoprolol	
Control vs. Propranolol	2898	Yes	****	<0.0001	Propranolol	
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2	Z
Control vs. CK666	25495	26824	-1328	1866	1415	2.571
Control vs. L-theanine	25495	28811	-3316	1866	802	5.357
Control vs. 3-guanidopropionic acid	25495	26694	-1198	1866	2576	2.690
Control vs. VPA	25495	31098	-5602	1866	795	9.024
Control vs. Dihydrokainic acid	25495	20359	5137	1866	2884	11.80
Control vs. Vigabatrin	25495	27609	-2114	1866	2220	4.592
Control vs. 2-aminoethyl hydrogen sulfate	25495	23292	2203	1866	2188	4.771
Control vs. L-methionine sulfoximine	25495	22936	2559	1866	1422	4.960
Control vs. ALX5407	25495	28668	-3172	1866	1568	6.318
Control vs. SNAP-5114	25495	28002	-2507	1866	2098	5.374
Control vs. Bicuculin	25495	20284	5212	1866	887	8.718
Control vs. KYNA	25495	24221	1275	1866	1256	2.383
Control vs. Picotoxin	25495	27966	-2470	1866	1683	5.014
Control vs. NBQX	25495	25895	-399.3	1866	2096	0.8560
Control vs. GYK152466	25495	31667	-6172	1866	1092	11.05
Control vs. Z-Glu-OH	25495	29044	-3549	1866	1725	7.249
Control vs. 2-APB	25495	31286	-5791	1866	1898	12.12
Control vs. Ro256981-maleate	25495	24993	502.8	1866	2055	1.073
Control vs. CBX	25495	26955	-1459	1866	1857	3.038
Control vs. FTY720	25495	29341	-3845	1866	2683	8.703
Control vs. Nickel	25495	18797	6699	1866	3885	16.23

Control vs. GdCl3	25495	27662	-2166	1866	2454	4.812
Control vs. Cadmium	25495	17673	7823	1866	3066	18.18
Control vs. Metoprolol	25495	30000	-4504	1866	1805	9.308
Control vs. Propranolol	25495	22598	2898	1866	2499	6.462

8.3.3.2. Mann-Whitney test: PACR ON vs PACR OFF

8.3.3.2.1. Area

P value	0.5781		
Exact or approximate P value?	Approximate		
P value summary	ns		
Significantly different (P < 0.05)?	No		
One- or two-tailed P value?	Two-tailed		
Sum of ranks in column A	B	2830292	6628783
Mann-Whitney U	1970276		
Difference between medians			
Median of column A	1098	n=1311	
Median of column B	1109	n=3038	
Difference: Actual	10.71		
Difference: Hodges-Lehmann	14.81		

8.3.3.2.2. Bounding Box Length 00 A

P value	0.0997		
Exact or approximate P value?	Approximate		
P value summary	ns		
Significantly different (P < 0.05)?	No		
One- or two-tailed P value?	Two-tailed		
Sum of ranks in column A	B	9343511	9118416
Mann-Whitney U	4502175		
Difference between medians			
Median of column A	14.03	n=3038	
Median of column B	13.81	n=3038	
Difference: Actual	-0.2196		
Difference: Hodges-Lehmann	-0.2473		

8.3.3.2.3. Bounding Box Length 00 B

P value	0.0075		
Exact or approximate P value?	Approximate		
P value summary	**		
Significantly different (P < 0.05)?	Yes		
One- or two-tailed P value?	Two-tailed		
Sum of ranks in column A	B	9413672	9048255
Mann-Whitney U	4432014		
Difference between medians			
Median of column A	19.00	n=3038	
Median of column B	18.47	n=3038	
Difference: Actual	-0.5352		
Difference: Hodges-Lehmann	-0.5390		

8.3.3.2.4. Bounding Box Length 00 C

P value	0.3653		
Exact or approximate P value?	Approximate		
P value summary	ns		
Significantly different (P < 0.05)?	No		
One- or two-tailed P value?	Two-tailed		
Sum of ranks in column A	B	6642052	2817024
Mann-Whitney U	1957008		
Difference between medians			
Median of column A	25.22	n=3038	
Median of column B	24.77	n=1311	
Difference: Actual	-0.4465		
Difference: Hodges-Lehmann	-0.3421		

8.3.3.2.5. Ellipsoid Axis Length A

P value	0.1512		
Exact or approximate P value?	Approximate		
P value summary	ns		
Significantly different (P < 0.05)?	No		
One- or two-tailed P value?	Two-tailed		
Sum of ranks in column A	B	6553115	2905961

Mann-Whitney U	1936874		
Difference between medians			
Median of column A	5.857	n=3038	
Median of column B	6.020	n=1311	
Difference: Actual	0.1625		
Difference: Hodges-Lehmann	0.1157		

8.3.3.2.6. Ellipsoid Axis Length B

P value	0.9342		
Exact or approximate P value?	Approximate		
P value summary	ns		
Significantly different (P < 0.05)?	No		
One- or two-tailed P value?	Two-tailed		
Sum of ranks in column A	B	6610789	2848286
Mann-Whitney U	1988270		
Difference between medians			
Median of column A	8.121	n=3038	
Median of column B	8.097	n=1311	
Difference: Actual	-0.02345		
Difference: Hodges-Lehmann	-0.007985		

8.3.3.2.7. Ellipsoid Axis Length C

P value	0.0026		
Exact or approximate P value?	Approximate		
P value summary	**		
Significantly different (P < 0.05)?	Yes		
One- or two-tailed P value?	Two-tailed		
Sum of ranks in column A	B	9436625	9025302
Mann-Whitney U	4409061		
Difference between medians			
Median of column A	11.76	n=3038	
Median of column B	11.39	n=3038	
Difference: Actual	-0.3694		
Difference: Hodges-Lehmann	-0.3806		

8.3.3.2.8. Ellipticity oblate

P value	0.7604		
Exact or approximate P value?	Approximate		
P value summary	ns		
Significantly different (P < 0.05)?	No		
One- or two-tailed P value?	Two-tailed		
Sum of ranks in column A	B	9251811	9210116
Mann-Whitney U	4593875		
Difference between medians			
Median of column A	0.3868	n=3038	
Median of column B	0.3849	n=3038	
Difference: Actual	-0.001914		
Difference: Hodges-Lehmann	-0.0008390		

8.3.3.2.9. Ellipticity prolate

P value	0.8765		
Exact or approximate P value?	Approximate		
P value summary	ns		
Significantly different (P < 0.05)?	No		
One- or two-tailed P value?	Two-tailed		
Sum of ranks in column A	B	9220334	9241592
Mann-Whitney U	4604093		
Difference between medians			
Median of column A	0.4126	n=3038	
Median of column B	0.4145	n=3038	
Difference: Actual	0.001946		
Difference: Hodges-Lehmann	0.0005330		

8.3.3.2.10. Sphericity

P value	<0.0001		
Exact or approximate P value?	Approximate		
P value summary	****		
Significantly different (P < 0.05)?	Yes		
One- or two-tailed P value?	Two-tailed		
Sum of ranks in column A	B	8958424	9503502

Mann-Whitney U	4342183		
Difference between medians			
Median of column A	0.6541	n=3038	
Median of column B	0.6631	n=3038	
Difference: Actual	0.008958		
Difference: Hodges-Lehmann	0.009610		

8.3.3.2.11. Volume

P value	0.0056		
Exact or approximate P value?	Approximate		
P value summary	**		
Significantly different (P < 0.05)?	Yes		
One- or two-tailed P value?	Two-tailed		
Sum of ranks in column A	B	9420541	9041386
Mann-Whitney U	4425145		
Difference between medians			
Median of column A	1844	n=3038	
Median of column B	1712	n=3038	
Difference: Actual	-132.5		
Difference: Hodges-Lehmann	-112.0		

8.3.3.3. Mann-Whitney test: PA-Rac1 ON vs PA-Rac1 OFF

8.3.3.3.1. Area

P value	<0.0001		
Exact or approximate P value?	Approximate		
P value summary	****		
Significantly different (P < 0.05)?	Yes		
One- or two-tailed P value?	Two-tailed		
Sum of ranks in column A	B	7310861	8568570
Mann-Whitney U	3227024		
Difference between medians			
Median of column A	1502	n=2367	
Median of column B	1164	n=3268	
Difference: Actual	-337.5		
Difference: Hodges-Lehmann	-275.7		

8.3.3.3.2. Bounding Box Length 00 A

P value	<0.0001		
Exact or approximate P value?	Approximate		
P value summary	****		
Significantly different (P < 0.05)?	Yes		
One- or two-tailed P value?	Two-tailed		
Sum of ranks in column A	B	7606665	8272765
Mann-Whitney U	2931219		
Difference between medians			
Median of column A	15.72	n=2367	
Median of column B	13.17	n=3268	
Difference: Actual	-2.556		
Difference: Hodges-Lehmann	-2.478		

8.3.3.3.3. Bounding Box Length 00 B

P value	<0.0001		
Exact or approximate P value?	Approximate		
P value summary	****		
Significantly different (P < 0.05)?	Yes		
One- or two-tailed P value?	Two-tailed		
Sum of ranks in column A	B	7323791	8555639
Mann-Whitney U	3214093		
Difference between medians			
Median of column A	21.94	n=2367	
Median of column B	19.45	n=3268	
Difference: Actual	-2.493		
Difference: Hodges-Lehmann	-2.493		

8.3.3.3.4. Bounding Box Length 00 C

P value	<0.0001		
Exact or approximate P value?	Approximate		
P value summary	****		
Significantly different (P < 0.05)?	Yes		
One- or two-tailed P value?	Two-tailed		

Sum of ranks in column A	B	7202278	8677153
Mann-Whitney U	3335607		
Difference between medians			
Median of column A	29.85	n=2367	
Median of column B	26.67	n=3268	
Difference: Actual	-3.185		
Difference: Hodges-Lehmann	-2.872		

8.3.3.3.5. Ellipsoid Axis Length A

P value	<0.0001		
Exact or approximate P value?	Approximate		
P value summary	****		
Significantly different (P < 0.05)?	Yes		
One- or two-tailed P value?	Two-tailed		
Sum of ranks in column A	B	7110734	8768696
Mann-Whitney U	3427150		
Difference between medians			
Median of column A	13.78	n=2367	
Median of column B	12.52	n=3268	
Difference: Actual	-1.260		
Difference: Hodges-Lehmann	-1.121		

8.3.3.3.6. Ellipsoid Axis Length B

P value	<0.0001		
Exact or approximate P value?	Approximate		
P value summary	****		
Significantly different (P < 0.05)?	Yes		
One- or two-tailed P value?	Two-tailed		
Sum of ranks in column A	B	7242135	8637296
Mann-Whitney U	3295750		
Difference between medians			
Median of column A	9.336	n=2367	
Median of column B	8.427	n=3268	
Difference: Actual	-0.9087		
Difference: Hodges-Lehmann	-0.8678		

8.3.3.3.7. Ellipsoid Axis Length C

P value	<0.0001		
Exact or approximate P value?	Approximate		
P value summary	****		
Significantly different (P < 0.05)?	Yes		
One- or two-tailed P value?	Two-tailed		
Sum of ranks in column A	B	7110734	8768696
Mann-Whitney U	3427150		
Difference between medians			
Median of column A	13.78	n=2367	
Median of column B	12.52	n=3268	
Difference: Actual	-1.260		
Difference: Hodges-Lehmann	-1.121		

8.3.3.3.8. Ellipticity oblate

P value	0.7916		
Exact or approximate P value?	Approximate		
P value summary	ns		
Significantly different (P < 0.05)?	No		
One- or two-tailed P value?	Two-tailed		
Sum of ranks in column A	B	6686131	9193300
Mann-Whitney U	3851754		
Difference between medians			
Median of column A	0.3915	n=2367	
Median of column B	0.3880	n=3268	
Difference: Actual	-0.003538		
Difference: Hodges-Lehmann	-0.0008450		

8.3.3.3.9. Ellipticity prolate

P value	0.9871		
Exact or approximate P value?	Approximate		
P value summary	ns		
Significantly different (P < 0.05)?	No		
One- or two-tailed P value?	Two-tailed		

Sum of ranks in column A	B	6671184	9208247
Mann-Whitney U	3866701		
Difference between medians			
Median of column A	0.3994	n=2367	
Median of column B	0.3987	n=3268	
Difference: Actual	-0.0007060		
Difference: Hodges-Lehmann	-5.300e-005		

8.3.3.3.10. Sphericity

P value	<0.0001		
Exact or approximate P value?	Approximate		
P value summary	****		
Significantly different (P < 0.05)?	Yes		
One- or two-tailed P value?	Two-tailed		
Sum of ranks in column A	B	5432542	10446888
Mann-Whitney U	2630014		
Difference between medians			
Median of column A	0.6383	n=2367	
Median of column B	0.6906	n=3268	
Difference: Actual	0.05234		
Difference: Hodges-Lehmann	0.05223		

8.3.3.3.11. Volume

P value	<0.0001		
Exact or approximate P value?	Approximate		
P value summary	****		
Significantly different (P < 0.05)?	Yes		
One- or two-tailed P value?	Two-tailed		
Sum of ranks in column A	B	7156942	8722489
Mann-Whitney U	3380943		
Difference between medians			
Median of column A	2791	n=2367	
Median of column B	2183	n=3268	
Difference: Actual	-608.6		
Difference: Hodges-Lehmann	-473.6		

