

Reducering af DNA- skade i planter

*Philip Kierstein Kjærside
Sankt Annæ Gymnasium
NAT – Projekt Forskerspirer 2019*

Indholdsfortegnelse:

1. Indledning	3
2. Problemformulering og afgrænsning	3
3. Teori	4
3.1 Strålings påvirkning af planter	4
3.2 Dsup – Et protein, som øger tolerancen overfor IR	5
4. Metode	5
4.1 Optimering af gensekvens	5
4.2 Agroinfiltration	6
4.3 Påføring af DNA-skade	7
4.4 Måling af DNA-skade	7
5. Udførelse af projektet	8
5.1 Del 1	8
5.2 Del 2	9
5.3 Del 3	9
6. Budget og tidsramme	10
7. Kontakt og tak til	11
8. Konklusion	11
Litteraturliste	11
BILAG	14

1. Indledning:

Da SpaceX tidligere på året formåede at opsende raketten Falcon Heavy med genbrugte løfteraketter, blev en milepæl rundet, og drømmen om en kolonisering af Mars kom et skridt tættere på. Dog er drømmen om bemandede missioner og kolonisering af vores naboplanet stadig langt væk. Der er mange udfordringer, som skal løses (1). En af dem er det ekstremt høje strålingsniveau på Mars, et alment kendt problem, som skyldes planetens mangel på magnetfelt og atmosfære (2). Grundet det høje strålingsniveau er niveauet af reaktive iltforbindelser (ROS) så højt ved overfladen, at organisk stof ikke kan overleve i overfladen (3). For at en kolonisering er mulig, bliver det sandsynligvis nødvendigt at kunne dyrke planter på Mars. Her er strålings- og ROS-niveauet en udfordring, og netop dette er, hvad jeg vil beskæftige mig med i mit projekt.

Modsat planter har ekstremofilen tardigraden – også kendt som bjørnedyret - en yderst høj tolerance overfor ioniserende stråling (IR). Ifølge Hashimoto et al. 2016 er årsagen et protein kaldet DamageSuppressor (Dsup), som er unikt for tardigrader. Da Dsup blev udtrykt i en human cellekultur, steg tolerancen overfor ioniserende stråling og ROS betragteligt (4). Jeg ser store perspektiver i Dsup, og måske kan dette være en del af løsningen til at overkomme strålingsniveauet på Mars.

2. Problemformulering og afgrænsning:

Kosmisk stråling består både af IR og UV-stråling (UV). Som beskrevet i [afsnit 3.1](#) kan både IR og UV skade DNA direkte – ved absorption i selve DNA'et – og indirekte via dannelsen af ROS. Hashimoto et al. 2016 undersøgte Dsup's effekt på skader forårsaget af γ -stråling – dvs. IR – og af ROS men ikke af UV (4). I 2007 blev tardigrader sendt i kredsløb om Jorden og havde en høj overlevelseshastighed (5). Dette indikerer, at tardigrader ligeledes må have en høj UV-tolerance. Det er nærliggende at antage, dette skyldes Dsup.

Jeg vil gerne undersøge effekten af Dsup i planteceller. Det vil være nærliggende at undersøge både ved behandling med ROS og ved bestråling med henholdsvis IR og UV. For at kunne lave en kontrolleret bestråling kræves udstyr, som jeg ikke har adgang til. Derudover vurderes ROS som den største udfordring – med tanke på dyrkning af planter på Mars – da både IR og UV danner ROS, og ROS-niveauet på Mars allerede er ekstremt

højt. Af disse grunde har jeg valgt udelukkende at beskæftige mig med Dsup's effekt på ROS-inducerede skader i mit projekt. Min problemformulering lyder:

I hvor høj grad kan DNA-skade i planter forårsaget af ROS reduceres ved, at proteinet Dsup udtrykkes i cellerne?

Jeg har valgt at bruge tobaksplanten *Nicotiana benthamiana* som modelorganisme. Den er valgt, da planten ofte er benyttet som modelorganisme i litteraturen (6), og den er nem at bruge til agroinfiltration (beskrevet i [afsnit 4.2](#)) Desuden har min forskerkontakt stor erfaring med denne plante og kan derved råde mig. Ydermere er denne plante let tilgængelig og billig at købe. For at besvare problemstillingen vil resultaterne fra modelorganismen generaliseres til at dække for alle planter. Dette kan selvfølgelig ikke bekræftes af projektet.

For at undersøge hvorvidt Dsup har den ønskede effekt, benyttes en transient metode til at udtrykke proteinet. Altså integreres Dsup-genet ikke i plantens genom men bliver blot udtrykt. Således undersøges udelukkende effekten af Dsup og ikke, hvorvidt det overhovedet er muligt at skabe en stabil, Dsup-modificeret genetisk linje, som vil være nødvendig, hvis en Dsup-udtrykkende plante skal dyrkes. Den transiente metode er væsentlig mindre resource- og tidskrævende og passer dermed bedre til et forskerspirerprojekt (7).

Før en GMO-afgrøde kan sendes på markedet, skal den godkendes og dermed igennem mange tests. Det anslås, det gennemsnitligt tager 13 år og koster 130 mio. USD før en enkelt GMO-afgrøde kommer på markedet (8). Jeg beskæftiger mig ikke med sådanne test, da det er alt for ressourcekrævende.

Der er en stor etisk debat omkring brug af genteknologi. Jeg går ikke ind i denne debat i mit projekt, men som udgangspunkt anser jeg mit projekt som værende etisk korrekt.

3. Teori:

3.1 Strålings påvirkning af planter:

IR skader DNA på to måder. Direkte, hvor selve strålingen absorberes i DNA'et, og dermed skader det. Det skaber bl.a. brud i DNA-strengenes rygrad – både single-stranded breaks (SSB) og double-stranded breaks (DSB) – og abasic sites, dvs. steder på DNA'et, hvor der ikke er en purin/pyrimidin. Den anden er indirekte. IR kan forårsage vandradio-lyse. Herved skabes stærkt reaktive iltforbindelser (ROS), fx frie OH-radikaler. ROS er

som sagt yderst reaktive og skader DNA'et. Skaderne indebærer bl.a. SSB, DSB, oxide-rede baser og abasic sites (9,10).

UV kan opdeles i tre kategorier - henholdsvis UV-A, UV-B og UV-C. UV-C-stråling under 100 nm er energirig nok til at

kunne ionisere, og det betragtes derved som IR og ikke som UV(10). UV-A er ikke energirig nok til at kunne blive absorberet direkte i DNA'et. Det kan dog stadig skade DNA indirekte via dannelsen af ROS men i begrænset omfang (9) UV-B og UV-C kan ligesom IR skade DNA både direkte og indi-



rekte. Ved absorption i DNA'et skabes oftest pyrimidin-dimere - dannelsen af bindinger mellem to pyrimidiner siddende ved siden af hinanden. Andre mindre hyppige skader inkluderer bl.a. oxiderede baser og SSBs. UV-B og UV-C kan ligeledes generere ROS (9).

3.2 Dsup – Et protein, som øger toleransen overfor IR:

Tardigrader har deres egen række i dyreriget (*Tardigrada*). De er små segment-delte dyr med en størrelse på 0,05 – 1,5 mm. Tardigrader er ekstremophiler. Bl.a. er deres strålings-tolerance yderst høj, nogle arter tåler over 1000 gange så meget IR som et menneske (11).

Forskere fra Tokyo Universitet sekventerede i 2016 genomet for arten *Ramazzottios var-rieornatus*, hvilket er en af de mest stress- og strålingstolerante bjørnedyrarter. Det var forventet, at det høje toleranceniveau skyldtes proteiner, som enten virkede som en effektiv DNA-reparations- eller en for-

BILLEDE 1: Her ses en tardigrad. Citeret: (12) i litteraturlisten.

svarsmekanisme. Et sådant protein blev identificeret og kaldt Damage Supressor (Dsup). En human cellekultur blev modificeret til at udtrykke Dsup for at undersøge proteinets egenskaber. Efter bestråling med γ -stråling var andelen af skadet DNA formindsket med omtrent 40% i de Dsup-udtrykkende celler. Desuden mistede de modificerede celler ikke prolifereringsevnen efter en dosis på 4 Gy γ -stråling, som pattedyrsceller ellers normalt gør.

Ydermere var der en markant nedgang i DNA-skade ved udsætning for oxidativt stress (13).

4. Metode:

Projektet er et eksperimentelt studie, og der vil blive brugt flere eksperimentelle metoder.

4.1 Optimering af gensekvens:

Der findes flere forskellige codons, som koder for den samme aminosyre, såkaldte synonyme codons. Dog er frekvensen af synonyme codons forskellig fra organisme til organisme, det kaldes codon usage bias (CUB), og codonbruget kan påvirke proteinekspressionen. Det betyder, hvis en organisme modificeres med et gen fra en organisme med en meget anden CUB, kan det medføre forkert eller forringet proteinekspression. Derfor kan gensekvensen med fordel optimeres til at passe bedre til en anden organisme. Codon application Index (CAI) er et udtryk for, hvor godt en gensekvens passer til en organisms CUB (14).

Applikationen OPTIMIZER bruges til at optimere Dsup-genet til udtryk i *N. benthamiana* (15). Gensekvensen i standard genetisk kode indsættes. Herefter udtrækkes et Codon Usage Table for *N. benthamiana* fra Hive-Cuts database(14) og indsættes. Standard genetisk kode vælges som typen af genetisk kode. Der vælges at optimere til en CAI på 1.000. Det optimerede Dsup-gen købes fra Gene Universal.

4.2 Agroinfiltration:

For at få *N. benthamiana*-cellerne til at udtrykke Dsup benyttes agroinfiltration via sprøjte. Her udnyttes bakterien *Agrobacterium tumefaciens*' evne til at overføre en del af sit DNA til en plante. Agroinfiltration er en transient metode, altså integreres Dsup-genet ikke i plantens genom, men bliver blot udtrykt. Jeg lægger mig op ad studiet Leuzinger et al. 2013 og gengiver deres metode, dog med en anden vektor (16).

Beskrevet, først plantes *N. benthamiana*-frø og dyrkes indtil, de er 6-uger på samme måde som i Leuzinger et al. 2013 (16).

Herefter klargøres bakterierne. Vektoren pCambia1302 – se [BILAG 2](#) - indeholdende det optimerede Dsup-gen overføres til *A. tumefaciens*-bakterierne. Dette gøres via elektropo-

rering. Bakterierne udplades herefter på agarplade indeholdende selektionsfaktoren kanamycin (100 μ L/mL) – Der er et gen for kanamycinresistans i vektoren. Den inkuberes ved 30 °C i 48 timer. En enkelt koloni overføres til 3 mL YENB-medie indeholdende selektionsfaktor (100 μ L/mL), og den inkuberes natten over. Absorbansen ved 600nm (OD₆₀₀) måles via et spektrofotometer. Den volumen, som kræves til en ny kultur i 10 mL YENB-medie med OD₆₀₀ lig 0,025 beregnes via formlen: $V_{\text{sub}} \text{ (mL)} = 10 \text{ mL} \cdot 0,025 / \text{OD}_{600}$. V_{sub} overføres til 10mL-målekolbe, og der fyldes op med YENB-medie indeholdende kanamycin (100 μ L /mL). Den nye kultur inkuberes til OD₆₀₀ er lig 1,7-2,0. Herefter beregnes volumen til en ny kultur med OD₆₀₀ lig 0,12 i 50mL infiltrationsbuffer, $V_{\text{infiltration}} \text{ (mL)} = 50 \text{ mL} \cdot 0,12 / \text{OD}_{600}$. $V_{\text{infiltration}}$ centrifugeres ved 12000 G i 2 min. Supernatanten fjernes, og bakterierne resuspenderes i 50mL infiltrationsbuffer.

Herefter kan bladene på to 6-uger gamle *N. benthamiana*-planter infiltreres. Der prikkes hul i epidermis på bladets bagside med en nål. *A. tumefaciens*-opløsningen injiceres via hullet med en sprøjte uden nål. Bladet bliver tydeligere mørkere grønt. Der forsættes, indtil den grønne cirkel af mørkere grøn stopper med at ekspandere. Herefter prikkes et nyt hul, og der injiceres igen. Der injiceres i nye huller, indtil hele bladet har ændret farve (16)

4.3 Påføring af DNA-skade:

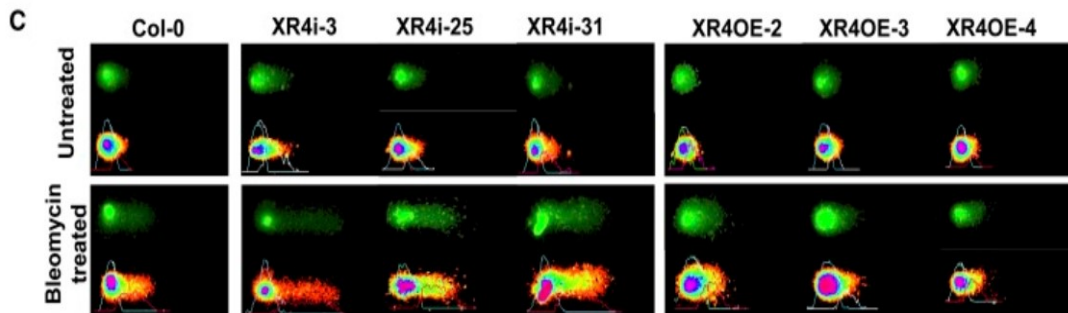
Til at inducere DNA-skade benyttes behandling med hydrogenperoxid (H₂O₂). Samme metode som i Hashimoto et al. 2016 benyttes, dog med flere koncentrationer (13). Beskrevet, prøverne fra de to planter behandles med enten 50, 100 eller 200 μ M H₂O₂ ved 4 °C i 30 min.

4.4 Måling af DNA-skade:

Til måling af DNA-skade benyttes alkalisk enkelt-celle-gelelektroforese (SCGE-assay) – også kendt som alkaline comet assay. Det er en udbredt metode, som kan detektere og kvantificere mange typer DNA-skade heriblandt DSB og SSB. Princippet er, at skadet DNA vandrer hurtigere under en elektroforese grundet fragmentation og tab af super-coil-strukturen. Længden af den skadede DNA's vandring er proportional med mængden af DNA-skade i cellen. Det bliver visualiseret via fluorescerende mikroskopi (17). Metoden er blevet kritiseret for at have dårlig reproducerbarhed (17). Jeg har dog valgt at bruge metoden stadigvæk, da jeg lægger mig op ad Hashimoto et al. 2016, hvor metoden også benyttes (13).

Der benyttes et standard kit fra Trevigen (CometAssay® Kit (20 well, 2 slides))(18) med et par modifikationer. Da der arbejdes med planteceller, er nuclei sværere at isolere grundet cellevæggen. Dette gøres mekanisk som i Vaghchhipawala et al. 2012 (19).

Beskrevet, ca. 100 mg blade skæres i småstykker i 300 µL PBS-buffer. Plantevævsrester fjernes med et 50 µm nylon-net (19). 30 µL blandes med 300 µL Comet LMAgarose. 10 µL af denne blanding pipetteres ud på et Comet-Well-Slide (CWS). Efterfølgende placeres



BILLEDE 2: Her er et eksempel på analyse af SCGE-assay via CometScore IV. Fra Vaghchhipawala et al. 2012.

CWS i mørkerum ved 4 °C. Efter 10 min i mørkerum nedsænkes CWS i lysis-solution ved 4 °C i 60 min. Bagefter drænes CWS for lysis-solution, og det nedsænkes i nylavet Alkaline-Unwinding-solution i 20 min ved stuetemperatur. Bagefter nedsænkes CWS i elektroforesekarret, som fyldes med Alkaline-Unwinding solution. Strømforsyningen sættes til 21 V. Elektroforesen startes og kører i 30 min. Når elektroforesen er færdig tages CWS op og nedsænkes i demineraliseret vand i 2 x 5 min efterfulgt af 5 min i 70% ethanol. Prøverne tørres ved 37 °C i 15 min. Herefter placeres 50 µL SYBR® Gold per cirkel på CWS (Der behøves ikke at blive påført SYBR® Gold på alle cirkler på CWS, da der vil være nok nuclei at analysere i et par cirkler). Efter 30 min tages SYBR® væk, og CWS vaskes kort. Når CWS er helt tørt, kan prøverne ses i et epifluorescerende mikroskop (18). Herefter skal DNA-skaden i prøverne kvantificeres. Dette gøres via softwaren CometScore IV. Et eksempel på analyse af SCGE-assay via CometScore IV ses på BILLEDE 2.

5. Udførelse af projektet:

Projektet vil blive udført på Plante- og Miljøinstituttet ved Københavns Universitet i samarbejde med min forskerkontakt Bodil Jørgensen. Her er der GMO-laboratorier og det udstyr, der er brug for, for at projektet kan realiseres. Da projektet arbejder med GMO, skal der søges tilladelse hos Arbejdsstyrelsen. Da det omhandler GMO-bakterier i risikogruppe 1,

og projektet udføres på Institut for Plante- og Miljøvidenskab, må projektet startes samtidig med, at ansøgningen sendes (20).

Projektet består overordnet af tre dele. Den første, hvor *N. benthamiana*-planterne infiltreres til at udtrykke Dsup. Den anden, hvor der induceres DNA-skade i prøverne. Den tredje, hvor DNA-skaden måles og sammenlignes mellem de Dsup-udtrykkende og ikke-udtrykkende celler.

5.1 Del 1:

Dsup-gensekvensen optimeres til udtryk i *N. benthamiana* – se [afsnit 4.1](#). Codon Usage Table for *N. benthamiana*, den optimerede sekvens og ændringer i forhold til det originale Dsup-gen kan ses på [BILAG 1](#). Det optimerede gen købes fra Gene Universal.

Næste punkt startes, når det optimerede DNA modtages. Først opformeres DNA'et, og det indsættes via elektroporering i vektoren pCambia1302 – se [BILAG 2](#). Jeg har valgt at benytte pCambia1302-vektoren i samråd med min forskerkontakt. GFP er valgt som markørgen, da jeg tidligere har arbejdet med dette. Kanamycin er selektionsfaktor. To 6-uger gamle *N. benthamiana*-planter udvælges. Plante 1's celler infiltreres ikke, mens Plante 2 skal infiltreres til at udtrykke Dsup. Der benyttes agroinfiltration – se [afsnit 4.2](#) – med vektor pCambia1302 på Plante 2's blade.

Herefter følges ekspresionen af Dsup i Plante 2 via detekteringen af GFP. En gang om dagen flyttes Plante 2 til et mørkerum og belyses med langbølget-UV-lys, da GFP lyser kraftigere ved langbølget-UV-lys (16). Når en tilfredsstillende mængde GFP detekteres, kan del 2 startes. Der sørges for at holde UV-bestrålingen på et minimalt niveau, da det potentielt kan skade plantens DNA, og dermed kan påvirke forsøgets resultater.

5.2 Del 2:

For at inducere DNA-skade benyttes behandling med hydrogenperoxid – se [afsnit 4.3](#). 3 prøver fra hver af de to planter udtages og behandles med hver sin koncentration. Herefter kan del 3 påbegyndes.

5.3 Del 3:

Planter har flere enzymer, hvis funktion er at reparere DNA-skader (9). For at undgå de inducerede DNA-skader repareres, skal del 3 udføres lige efter del 2. Hvis dette ikke er

praktisk muligt, opbevares prøverne i køleskab indtil start på del 3 for at dæmpe enzymaktiviteten.

DNA-skaderne i Plante 1 og Plante 2 undersøges via alkalisk enkelt-celle-gelelektroforese – se [afsnit 4.4](#). SCGE-assay udføres 6 gange. En for hver af prøverne fra de to planter – henholdsvis tre for Plante 1 og tre for Plante 2. Der benyttes et 20 Well-Comet-Slide til hver prøve.

Resultaterne analyseres via softwaren Comet Score IV – se [afsnit 4.4](#). Mindst 100 nuclei analyseres fra hver prøve, og resultaterne for prøverne sammenlignes for at vurdere Dsup's effekt.

Dermed er projektet afsluttet.

6. Budget & tidsramme:

BUDGET*

PRODUKT	PRIS ORIGINAL VALUTA	PRIS I DKK
Optimeret Dsup-gen Fra Gene Universalsal	255 USD	1708 DKK
pCambia1302-vektor (20µg) Fra Markergene	142 USD	950 DKK
<i>N. benthamiana</i> -frø Købes gennem KU	10 DKK	10 DKK
H ₂ O ₂ (30% in Water), Fisher BioReagents (500mL) Fra Fischer Scientific	105 DKK	105 DKK
SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain (2 x 500µL) Fra Fischer Scientific	3284 DKK	3284 DKK
Comet Assay® Reagent kit 2 x 20 well slides Fra Trevigen	247 USD	1652 DKK
Comet Well slides (2 x 2 stk.) Fra Trevigen	98 USD	655,50 DKK
Comet Score IV (software)** Fra Instem	0 DKK	0 DKK

I alt

-

8364,50 DKK

* Udstyr og materialer mm., som der ikke er redegjort for i budgettet, vil blive stillet til rådighed på Institut for Plante- og Miljøvidenskab, og der vil derfor ikke være nogle udgifter forbundet med disse.

** Comet Score IV er et betalingsprogram. Der er dog en gratis prøveperiode på 7 dage, som jeg vil benytte til projektet. Dermed er det ikke en udgift.

TIDSRAMME

PROCEDURE	FORVENTET TID
Dyrkning af <i>N. benthamiana</i> Materialer til resten af forsøget leveres undervejs	6 uger (42 dage)
Klargøring af bakterier til agroinfiltration	4 dage
Ventetid efter infiltration	3-5 dage
Behandling med H ₂ O ₂ + SCGE-assay	1-2 dage
Dataanalyse af SCGE-assay	1-2 dage

I alt

51-54 dage (ca. 7,5 uger)

7. Kontakt og tak til:

Min forskerkontakt:
Lektor Bodil Jørgensen
Institut for Plante- og Miljøvidenskab, Københavns Universitet.

En yderst stor tak til Bodil Jørgensen. Tak for at engagere sig i mit projekt og for at tage sig tid til at hjælpe mig. Også tak for at jeg, hvis projektet skal realiseres, kan udføre det på Institut for Plante- og Miljøvidenskab. Desuden tak til Hans Marker, forskerspirer-koordinatoren på Sankt Annæ Gymnasium. Til slut, også tak til KU, AU og alle bag Projekt Forskerspirer for at give os spirere denne enestående mulighed.

8. Konklusion:

Uanset projektets resultat vil det lægge op til yderligere forskning.

Hvis der ses en positiv effekt, vil det være oplagt at undersøge Dsup's effekt på skader induceret af IR og UV, og ikke mindst også hvorvidt en stabil, Dsup-modificeret genetisk linje kan skabes. Desuden hvorvidt Dsup kan optimeres til en større effekt, dette vil sandsynligvis kræve en bedre forståelse af, hvorledes Dsup fungerer.

Hvis ikke der ses en positiv effekt af Dsup, er det oplagt at undersøge, hvorfor effekten udebliver, når den ses i humane celler i Hashimoto et al. 2016. Altså hvad der er forskel på Dsup i planteceller og i humane celler.

Litteraturliste:

1. Wall M. Astronauts Will Face Many Hazards on a Journey to Mars [Internet]. Space.com. 2019 [henvist 13. oktober 2019]. Tilgængelig hos: <https://www.space.com/crewed-mars-mission-astronaut-dangers.html>
2. Morten Garly Andersen. Mars i forhold til Jorden - DTU Space [Internet]. <https://www.space.dtu.dk>. 2019 [henvist 27. oktober 2019]. Tilgængelig hos: https://www.space.dtu.dk/forskning/solsystemet/mars_magnetfelt/mars_i_forhold_til_jorden
3. Aarhus Universitet. Planeten Mars [Internet]. [henvist 15. maj 2019]. Tilgængelig hos: <http://projects.au.dk/da/marslab-dansk/planeten-mars/>
4. Hashimoto T, Horikawa DD, Saito Y, Kuwahara H, Kozuka-Hata H, Shin-I T, m.fl. Extremotolerant tardigrade genome and improved radiotolerance of human cultured cells by tardigrade-unique protein. Nat Commun. 20. september 2016;7:12808.

5. Sørensen AM. Forsker: Bjørnedyrene kan sagtens overleve på Månen [Internet]. videnskab.dk. 2019 [henvist 17. oktober 2019]. Tilgængelig hos: <https://videnskab.dk/naturvidenskab/forsker-bjoernedyrene-kan-sagtens-overleve-paa-maanen>
6. Kourelis J, Kaschani F, Grosse-Holz FM, Homma F, Kaiser M, Hoorn RAL van der. Re-annotated *Nicotiana benthamiana* gene models for enhanced proteomics and reverse genetics. *bioRxiv*. 27. juli 2018;373506.
7. Smith C. Stable vs. Transient Transfection of Eukaryotic Cells [Internet]. 2013 [henvist 27. oktober 2019]. Tilgængelig hos: <http://www.biocompare.com/Editorial-Articles/126324-Transfection/>
8. Dorbert R. Think GMOs Aren't Regulated? Think Again [Internet]. Forbes. 2015 [henvist 15. maj 2019]. Tilgængelig hos: <https://www.forbes.com/sites/gmo-answers/2015/12/21/how-are-gmos-regulated/>
9. Gill SS, Anjum NA, Gill R, Jha M, Tuteja N. DNA Damage and Repair in Plants under Ultraviolet and Ionizing Radiations [Internet]. *The Scientific World Journal*. 2015 [henvist 13. maj 2019]. Tilgængelig hos: <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2015/250158/>
10. Caplin N, Willey N. Ionizing Radiation, Higher Plants, and Radioprotection: From Acute High Doses to Chronic Low Doses. *Front Plant Sci* [Internet]. 26. juni 2018 [henvist 16. oktober 2019];9. Tilgængelig hos: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6028737/>
11. Bruun A. Ekstremt væsen vakt til live efter 30 år [Internet]. *Illvid.dk*. 2016 [henvist 15. maj 2019]. Tilgængelig hos: <https://illvid.dk/dyr/bjoernedyr-dybfrosset-bjoernedyr-vakt-til-live-efter-30-aar>
12. Priemé A. Bjørnedyr: De levende døde [Internet]. *Illvid.dk*. 2018 [henvist 27. oktober 2019]. Tilgængelig hos: <https://illvid.dk/dyr/bjoernedyr-de-levende-doede>
13. Hashimoto T, Horikawa DD, Saito Y, Kuwahara H, Kozuka-Hata H, Shin-I T, m.fl. Extremotolerant tardigrade genome and improved radiotolerance of human cultured cells by tardigrade-unique protein. *Nat Commun*. 20. september 2016;7:12808.
14. Athey J, Alexaki A, Osipova E, Rostovtsev A, Santana-Quintero LV, Katneni U, m.fl. A new and updated resource for codon usage tables. *BMC Bioinformatics* [Internet]. 2. september 2017 [henvist 6. juli 2019];18. Tilgængelig hos: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5581930/>
15. Puigbo P. OPTIMIZER [Internet]. *genomes.urv.es*. 2007 [henvist 6. juli 2019]. Tilgængelig hos: <http://genomes.urv.es/OPTIMIZER/>
16. Leuzinger K, Dent M, Hurtado J, Stahnke J, Lai H, Zhou X, m.fl. Efficient Agroinfiltration of Plants for High-level Transient Expression of Recombinant Proteins. *JoVE J Vis Exp*. 23. juli 2013;(77):e50521.

17. Ge J, Prasongtanakij S, Wood DK, Weingeist DM, Fessler J, Navasummrit P, m.fl. CometChip: A High-throughput 96-Well Platform for Measuring DNA Damage in Microarrayed Human Cells. *J Vis Exp*. 18. oktober 2014;(92):50607.
18. Trevigen, inc,. CometAssay - Reagent Kit for Higher Throughput Single Cell Gel Electrophoresis Assay. 2012.
19. Vaghchhipawala ZE, Vasudevan B, Lee S, Morsy MR, Mysore KS. Agrobacterium May Delay Plant Nonhomologous End-Joining DNA Repair via XRCC4 to Favor T-DNA Integration[W]. *Plant Cell*. oktober 2012;24(10):4110–23.
20. Industriens Branchearbejdsmiljøråd. Biologisk arbejdsmiljø: vejledning om laboratorier i procesindustrien. 2. Kbh.: Industriens Branchearbejdsmiljøråd; 2012.
21. SnapGene. pCAMBIA1302 Sequence and Map [Internet]. SnapGene. [henvist 20. oktober 2019]. Tilgængelig hos: https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=plant_vectors&plasmid=pCAMBIA1302

BILAG:

BILAG 1:

Nedenunder ses først Codon Usage Table for *Nicotiana benthamiana*, dernæst resultaterne for optimeringen af Dsup-genet fra OPTIMIZER.

Nicotiana benthamiana (4100) Codon Usage Table

Table contains 811 CDSs (370399 codons), taken from GenBank.

TTT	26.80	(9928)	TCT	23.44	(8684)	TAT	17.58	(6512)	TGT	8.75	(3242)
TTC	18.03	(6678)	TCC	10.37	(3841)	TAC	11.90	(4407)	TGC	6.83	(2531)
TTA	13.09	(4850)	TCA	20.17	(7472)	TAA	0.61	(225)	TGA	0.76	(280)
TTG	23.69	(8774)	TCG	5.45	(2020)	TAG	0.38	(141)	TGG	12.32	(4565)
CTT	25.95	(9611)	CCT	19.37	(7173)	CAT	13.79	(5106)	CGT	7.23	(2679)
CTC	11.90	(4408)	CCC	6.22	(2303)	CAC	7.67	(2840)	CGC	3.94	(1461)
CTA	9.39	(3479)	CCA	17.73	(6566)	CAA	20.36	(7541)	CGA	5.19	(1923)
CTG	11.93	(4419)	CCG	4.83	(1789)	CAG	17.14	(6350)	CGG	3.96	(1466)
ATT	26.75	(9907)	ACT	20.18	(7476)	AAT	27.78	(10289)	AGT	14.87	(5509)
ATC	13.06	(4838)	ACC	9.03	(3343)	AAC	15.93	(5902)	AGC	11.00	(4073)
ATA	13.24	(4904)	ACA	17.07	(6322)	AAA	28.53	(10569)	AGA	16.53	(6123)
ATG	23.21	(8598)	ACG	4.33	(1605)	AAG	32.99	(12221)	AGG	12.79	(4739)
GTT	28.22	(10451)	GCT	31.99	(11850)	GAT	38.50	(14260)	GGT	22.95	(8499)
GTC	10.86	(4021)	GCC	10.94	(4053)	GAC	15.87	(5880)	GGC	10.69	(3961)
GTA	10.89	(4035)	GCA	23.32	(8639)	GAA	36.46	(13503)	GGA	22.83	(8456)
GTG	15.87	(5877)	GCG	5.18	(1918)	GAG	30.55	(11317)	GGG	10.79	(3997)

CDU for *Nicotiana benthamiana*. Fra Hive-Cuts database. Citeret: Athey et al. 2017. (14) I litteraturlisten.

(DNA / One AA - one codon)
Reference table: DNA

Type	Sequences	CAI	ENc	%GC	%AT
Query	ATGGCATCCACACACCAATCATCCACAGAACCCTCTTCCACAGGTAATCTGAGGAAACG AAGAAAGATGCTTCGCAAGGGAGCGGGCAAGACTCCAAGAACGTAACCGTTACCAAAGGT ACCGGTTCCCTCCGCCACCTCAGCTGCCATTGTCAAGACAGGAGGATCCCAAGGCCAAGAT TCCTCTACTACAGCGGGCTCTTCTAGTACTCAGGGACAGAAGTTTCACTACTACACCTACC GACCCGAAAACCTTTCAGCTCTGACCAAAGGAGAAATCCAAAGCCAGCCAAAGAAAGTC CCGTCTGGTGGCGATAGTAAGTCCCAAGGTGACACCAAGTCTCAAAGCGACGCCAAATCT TCTGGACAAAGTCAAGGCCAGTCTAAAGACAGCGGCAAAATCATCTTCCGACAGTAGCAAG AGTCACTCTGTATCGGAGCTGTCAAAGACGTCGTTGCAGGCGCCAAAGATGTGCGCAGGA AAAGCCGTCGAGGATGCTCCTAGCATCATGCATACTGCAGTTCGATGCTGTGAAGAACGCA GCCACGACTGTGAAGGATGTGGCATCGTCCGCTGCATCGACTGTGGCGGAGAAGGTAGTC GATGCTTACCACAGTGTGGTGGGAGACAAGACGGGACGACAAAGAAAGAGGGCGAGCACAGC GGCGACAAGAAGGACGACTCCAAAGCTGGAAGTGGCTCTGGACAAGGTGGTGACAACAAG AAGTCTGAAGGAGAGACTTCTGGCCAAGCAGAATCCAGCTCTGGCAACGAAGGAGCTGCT CCAGCCAAAGGCCGCTGGTCTGGAGCGGCCTCCAGCAGCTGCTAAAGGAGTTGCTAAGGCT GCTGCAAGGGGCGCTCCGCCTCCAAAGGAGCCAAAGAGCGGTGCTGAATCCTCCAAAGGGA GGAGAACAGTCTGTCAGGAGATATCGAGATGGCAGATGCTTCTCCAAAGGGAGGCTCGGAC CAGAGGGATTCGCGCGGACCGTTCGGCAAGGTGGTGCATCAGGCAGTGAAGGTTGGAGCT AAGAAAGGCAGAGGGCGGGCGCTGGTAAGAAAGCGGATGCGGGTGTACGTCGCGCTGAG CCGCCTCGGCGGTGCTCCGCCTGACGCTTTCAGGTACAGGGGCGGGTTCGCTCCAGCT GCAGCGAAAGGGCGGAGCGAAGCGTCTGCTTCTTCTCCAGTACACCTTCCAACGCTAAG AAGCAAGCGACTGGAGGCTGCTGGCAAGCTGCTGCCACCAAAGCAACTGCTGCCAAATCG GCAGCTCTAAAGCTCCCAAGATGGCGCAGGTGCCAAGAAGGAGGAAAGGCTGGA GGACCGAAGAGGAAGTAA	0.663	52	56.3	43.7
Optimized	ATGGCTTCTACTCATCAATCTTCTACTGAACCTTCTTCTACTGGTAAGTCTGAAGAACT AAGAAGGATGCTTCTCAAGGTTCTGGTCAAGATTCTAAGAATGTTACTGTTACTAAGGGT ACTGGTCTTCTGCTACTTCTGCTGCTATTGTTAAGACTGGTGGTCTCAAGGTAAGGAT TCTTCTACTACTGCTGGTCTTCTTCTACTCAAGGTCAAAGTTTTCTACTACTCCTACT GATCCTAAGACTTTTTCTTCTGATCAAAGGAAAAGTCTAAGTCTCCTGCTAAGGAAGTT CCTTCTGGTGGTGATTCTAAGTCTCAAGGTGATACTAAGTCTCAATCTGATGCTAAGTCT TCTGGTCAATCTCAAGGTCAATCTAAGGATCTGGTAAGTCTTCTTCTGATTCTTCTAAG TCTATTCTGTTATTGGTCTGTTAAGGATGTTGTTGCTGGTCTAAGGATGTTGCTGGT AAGGCTGTTGAAGATGCTCCTTCTATTATGCATACTGCTGTTGATGCTGTTAAGAATGCT GCTACTACTGTTAAGGATGTTGCTTCTTCTGCTGCTTCTACTGTTGCTGAAAAGGTTGTT GATGCTTATCATTCTGTTGTTGGTGATAAGACTGATGATAAGAAGGAAAGGTGAACATTCT GGTGATAAGAAGGATGATTCTAAGGCTGGTCTGTTCTGGTCAAGGTGGTGATAATAAG AAGTCTGAAGGTGAAACTTCTGGTCAAGCTGAATCTTCTTCTGGTAATGAAGGTGCTGCT CCTGCTAAGGGTAGAGGTAGAGGTAGACCTCCTGCTGCTAAGGGTGTGCTAAGGCT GCTGCTAAGGGTGTGCTGCTTCTAAGGGTGTGCTAAGTCTGGTGTGCTGAATCTTCTAAGGGT GGTGAACAATCTTCTGGTGATATTGAAATGGCTGATGCTTCTTCTAAGGGTGGTCTGAT CAAAGAGATCTGCTGCTACTGTTGGTGAAGGTGGTGTCTTCTGTTCTGAAGGTGGTGTCT AAGAAGGGTAGAGGTAGAGGTGCTGGTAAGAAGGCTGATGCTGGTGATACTTCTGCTGAA CCTCCTAGAAGATCTTCTAGACTTACTTCTTCTGGTACTGGTGTGTTCTGCTCCTGCT GCTGCTAAGGGTGGTGTGCTAAGAGAGCTGCTTCTTCTTCTACTCCTTCTAATGCTAAG AAGCAAGCTACTGGTGGTCTGGTAAGGCTGCTGCTACTAAGGCTACTGCTGCTAAGTCT GCTGCTTCTAAGGCTCCTCAAATGGTGTGGTGTGCTAAGAAGAAGGGTGGTAAGGCTGGT GGTAGAAGAGAAAGTAA	1.000	20	43.9	56.1

Den originale Dsup-sekvens overfor den optimerede sekvens. De er 1338 nukleotider lang. Der er 1016 matches, 171 transversions (pyrimidin ↔ purin) og 151 transitions (purin ↔ purin eller pyrimidin ↔ pyrimidin)

CAI: Codon Application Index

ENx: Effective number of codons

Resultat fra OPTIMIZER. Citeret: Puigbo 2007. (15) i litteraturlisten.

ALIGNMENT	
	M A S T H Q S S T E P S S T G K S E E T
Query	ATG GCA TCC ACA CAC CAA TCA TCC ACA GAA CCC TCT TCC ACA GGT AAA TCT GAG GAA ACG
	* # * # * # * # # * # # *
Optimized	ATG GCT TCT ACT CAT CAA TCT TCT ACT GAA CCT TCT TCT ACT GGT AAG TCT GAA GAA ACT
	K K D A S Q G S G Q D S K N V T V T K G
Query	AAG AAA GAT GCT TCG CAA GGG AGC GGG CAA GAC TCC AAG AAC GTA ACC GTT ACC AAA GGT
	# * * **# * # # # * # # #
Optimized	AAG AAG GAT GCT TCT CAA GGT TCT GGT CAA GAT TCT AAG AAT GTT ACT GTT ACT AAG GGT
	T G S S A T S A A I V K T G G S Q G K D
Query	ACC GGT TCC TCC GCC ACC TCA GCT GCC ATT GTC AAG ACA GGA GGA TCC CAA GGC AAA GAT
	# # # # # * # # * * * # # #
Optimized	ACT GGT TCT TCT GCT ACT TCT GCT GCT ATT GTT AAG ACT GGT GGT TCT CAA GGT AAG GAT
	S S T T A G S S S T Q G Q K F S T T P T
Query	TCC TCT ACT ACA GCG GGC TCT TCT AGT ACT CAG GGA CAG AAG TTC AGT ACT ACA CCT ACC
	# * * # ** # * # # ** * #
Optimized	TCT TCT ACT ACT GCT GGT TCT TCT TCT ACT CAA GGT CAA AAG TTT TCT ACT ACT CCT ACT
	D P K T F S S D Q K E K S K S P A K E V
Query	GAC CCG AAA ACT TTC AGC TCT GAC CAA AAG GAG AAA TCC AAA AGC CCA GCC AAA GAA GTC
	# * # # **# # # # # # # **# * # # #
Optimized	GAT CCT AAG ACT TTT TCT TCT GAT CAA AAG GAA AAG TCT AAG TCT CCT GCT AAG GAA GTT
	P S G G D S K S Q G D T K S Q S D A K S
Query	CCG TCT GGT GGC GAT AGT AAG TCC CAA GGT GAC ACC AAG TCT CAA AGC GAC GCC AAA TCT
	* # ** # # # # # # #
Optimized	CCT TCT GGT GGT GAT TCT AAG TCT CAA GGT GAT ACT AAG TCT CAA TCT GAT GCT AAG TCT
	S G Q S Q G Q S K D S G K S S S D S S K
Query	TCT GGA CAA AGT CAG GGC CAG TCT AAA GAC AGC GGC AAA TCA TCT TCC GAC AGT AGC AAG
	* ** # # # # # **# # # * # # ** **#
Optimized	TCT GGT CAA TCT CAA GGT CAA TCT AAG GAT TCT GGT AAG TCT TCT TCT GAT TCT TCT AAG
	S H S V I G A V K D V V A G A K D V A G
Query	AGT CAC TCT GTC ATC GGA GCT GTC AAA GAC GTC GTT GCA GGC GCC AAA GAT GTC GCA GGA
	** # # # * # # # # * # # # # * *
Optimized	TCT CAT TCT GTT ATT GGT GCT GTT AAG GAT GTT GTT GCT GGT GCT AAG GAT GTT GCT GGT
	K A V E D A P S I M H T A V D A V K N A
Query	AAA GCC GTC GAG GAT GCT CCT AGC ATC ATG CAT ACT GCA GTC GAT GCT GTG AAG AAC GCA
	# # # # **# # * # * # *
Optimized	AAG GCT GTT GAA GAT GCT CCT TCT ATT ATG CAT ACT GCT GTT GAT GCT GTT AAG AAT GCT
	A T T V K D V A S S A A S T V A E K V V
Query	GCC ACG ACT GTG AAG GAT GTG GCA TCG TCG GCT GCA TCG ACT GTG GCG GAG AAG GTA GTC
	# * * * * * * * * * * # * #
Optimized	GCT ACT ACT GTT AAG GAT GTT GCT TCT TCT GCT GCT TCT ACT GTT GCT GAA AAG GTT GTT
	D A Y H S V V G D K T D D K K E G E H S
Query	GAT GCT TAC CAC AGT GTG GTG GGA GAC AAG ACG GAC GAC AAG AAA GAG GGC GAG CAC AGC
	# # ** * * * # * # # # # # # # **#
Optimized	GAT GCT TAT CAT TCT GTT GTT GGT GAT AAG ACT GAT GAT AAG AAG GAA GGT GAA CAT TCT
	G D K K D D S K A G S G S G Q G G D N K
Query	GGC GAC AAG AAG GAC GAC TCC AAA GCT GGA AGT GGC TCT GGA CAA GGT GGT GAC AAC AAG
	# # # # # # * ** # * # #
Optimized	GGT GAT AAG AAG GAT GAT TCT AAG GCT GGT TCT GGT TCT GGT CAA GGT GGT GAT AAT AAG

Forskellen på den originale Dsup-sekvens og den optimerede sekvens. * betyder transversion change (pyrimidin ⇌ purin) og # betyder transition change (purin ⇌ purin eller pyrimidin ⇌ pyrimidin.)

Resultat fra OPTIMIZER. Citeret: Puigbo 2007. (15) i litteraturlisten.

Forsættes på næste side

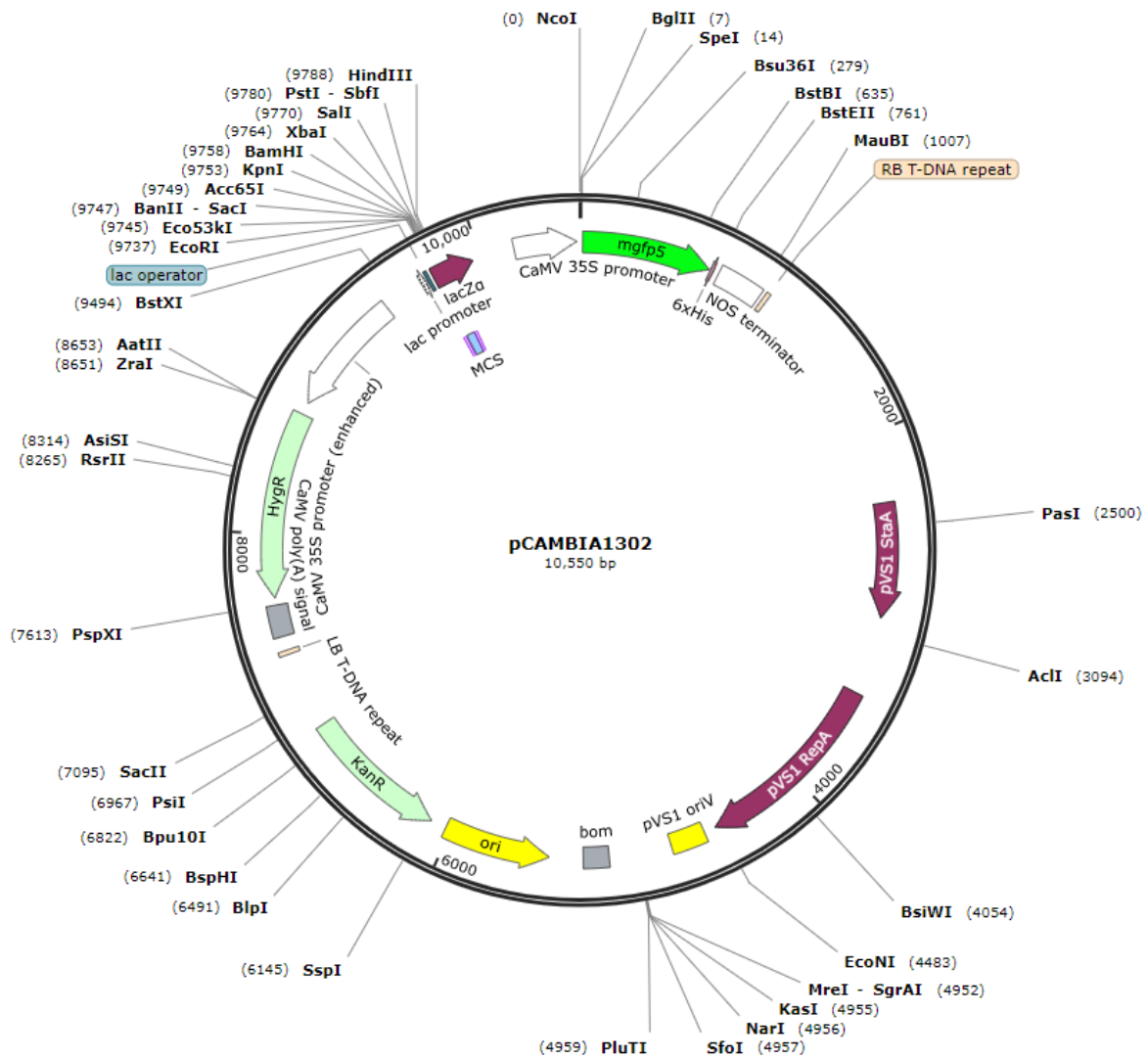
	K	S	E	G	E	T	S	G	Q	A	E	S	S	S	G	N	E	G	A	A
Query	AAG	TCT	GAA	GGA	GAG	ACT	TCT	GGC	CAA	GCA	GAA	TCC	AGC	TCT	GGC	AAC	GAA	GGA	GCT	GCT
				*	#			#		*		#	**#		#	#		*		
Optimized	AAG	TCT	GAA	GGT	GAA	ACT	TCT	GGT	CAA	GCT	GAA	TCT	TCT	TCT	GGT	AAT	GAA	GGT	GCT	GCT
	P	A	K	G	R	G	R	G	R	P	P	A	A	A	K	G	V	A	K	G
Query	CCA	GCC	AAA	GGC	CGT	GGT	CGT	GGA	CGG	CCT	CCA	GCA	GCT	GCT	AAA	GGA	GTT	GCT	AAG	GGT
	*	#	#	#	* *		* *	*	* #		*	*			#	*				
Optimized	CCT	GCT	AAG	GGT	AGA	GGT	AGA	GGT	AGA	CCT	CCT	GCT	GCT	GCT	AAG	GGT	GTT	GCT	AAG	GGT
	A	A	K	G	A	A	A	S	K	G	A	K	S	G	A	E	S	S	K	G
Query	GCT	GCA	AAG	GGC	GCT	GCC	GCC	TCC	AAA	GGA	GCC	AAG	AGC	GGT	GCT	GAA	TCC	TCC	AAG	GGA
		*		#		#	#	#	#	*	#		**#				#	#		*
Optimized	GCT	GCT	AAG	GGT	GCT	GCT	GCT	TCT	AAG	GGT	GCT	AAG	TCT	GGT	GCT	GAA	TCT	TCT	AAG	GGT
	G	E	Q	S	S	G	D	I	E	M	A	D	A	S	S	K	G	G	S	D
Query	GGA	GAA	CAG	TCG	TCA	GGA	GAT	ATC	GAG	ATG	GCA	GAT	GCT	TCC	TCC	AAG	GGA	GGC	TCG	GAC
	*		#	*	*	*		#	#		*			#	#		*	#	*	#
Optimized	GGT	GAA	CAA	TCT	TCT	GGT	GAT	ATT	GAA	ATG	GCT	GAT	GCT	TCT	TCT	AAG	GGT	GGT	TCT	GAT
	Q	R	D	S	A	A	T	V	G	E	G	G	A	S	G	S	E	G	G	A
Query	CAG	AGG	GAT	TCC	GCG	GCG	ACC	GTT	GGC	GAA	GGT	GGT	GCA	TCA	GGC	AGT	GAG	GGT	GGA	GCT
	#	#		#	*	*	#		#				*	*	#	**	#		*	
Optimized	CAA	AGA	GAT	TCT	GCT	GCT	ACT	GTT	GGT	GAA	GGT	GGT	GCT	TCT	GGT	TCT	GAA	GGT	GGT	GCT
	K	K	G	R	G	R	G	A	G	K	K	A	D	A	G	D	T	S	A	E
Query	AAG	AAA	GGC	AGA	GGG	CGG	GGC	GCT	GGT	AAG	AAA	GCG	GAT	GCG	GGT	GAT	ACG	TCC	GCT	GAG
		#	#		*	* #	#				#	*		*			*	#		#
Optimized	AAG	AAG	GGT	AGA	GGT	AGA	GGT	GCT	GGT	AAG	AAG	GCT	GAT	GCT	GGT	GAT	ACT	TCT	GCT	GAA
	P	P	R	R	S	S	R	L	T	S	S	G	T	G	A	G	S	A	P	A
Query	CCG	CCT	CGG	CGG	TCG	TCC	CGC	CTG	ACG	TCT	TCA	GGT	ACA	GGG	GCG	GGT	TCC	GCT	CCA	GCT
	*		* #	* #	*	#	* *	*	*		*		*	*	*		#		*	
Optimized	CCT	CCT	AGA	AGA	TCT	TCT	AGA	CTT	ACT	TCT	TCT	GGT	ACT	GGT	GCT	GGT	TCT	GCT	CCT	GCT
	A	A	K	G	G	A	K	R	A	A	S	S	S	S	T	P	S	N	A	K
Query	GCA	GCG	AAA	GGC	GGA	GCG	AAG	CGT	GCT	GCT	TCT	TCC	TCC	AGT	ACA	CCT	TCC	AAC	GCT	AAG
	*	*	#	#	*	*		* *				#	#	**	*		#	#		
Optimized	GCT	GCT	AAG	GGT	GGT	GCT	AAG	AGA	GCT	GCT	TCT	TCT	TCT	TCT	ACT	CCT	TCT	AAT	GCT	AAG
	K	Q	A	T	G	G	A	G	K	A	A	A	T	K	A	T	A	A	K	S
Query	AAG	CAA	GCG	ACT	GGA	GGT	GCT	GGC	AAA	GCT	GCT	GCC	ACC	AAA	GCA	ACT	GCT	GCC	AAA	TCG
			*		*			#	#			#	#	#	*			#	#	*
Optimized	AAG	CAA	GCT	ACT	GGT	GGT	GCT	GGT	AAG	GCT	GCT	GCT	ACT	AAG	GCT	ACT	GCT	GCT	AAG	TCT
	A	A	S	K	A	P	Q	N	G	A	G	A	K	K	K	G	G	K	A	G
Query	GCA	GCC	TCT	AAA	GCT	CCC	CAG	AAT	GGC	GCA	GGT	GCC	AAG	AAG	AAG	GGA	GGA	AAG	GCT	GGA
	*	#		#		#	#		#	*		#				*	*			*
Optimized	GCT	GCT	TCT	AAG	GCT	CCT	CAA	AAT	GGT	GCT	GGT	GCT	AAG	AAG	AAG	GGT	GGT	AAG	GCT	GGT
	G	R	K	R	K	.														
Query	GGA	CGG	AAG	AGG	AAG	TAA														
	*	* #		#																
Optimized	GGT	AGA	AAG	AGA	AAG	TAA														

Forskellen på den originale Dsup-sekvens og den optimerede sekvens. * betyder transversion change (pyrimidin ⇌ purin) og # betyder transition change (purin ⇌ purin eller pyrimidin ⇌ pyrimidin.)

Resultat fra OPTIMIZER. Citeret: Puigbo 2007. (15) i litteraturlisten.

BILAG 2:

Nedenunder ses pCambia1302-vektoren. Billede fra Snapgene.com. (21).



pCambia1302-vektoren. Citeret: (21) i litteraturlisten.