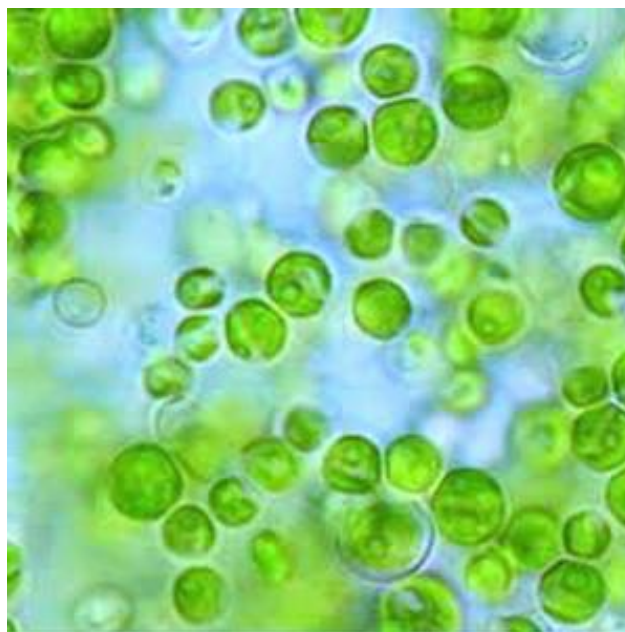




INTEGRATION AF DSUP I NANNOCHLOROPSIS OCEANICA

NAT-Projekt Forskerspirer 2021



KONRAD BASSE FISKER
ROSKILDE KATDERALSKOLE



INDHOLDFORTEGNELSE	
INDLEDNING.....	2
PROBLEMFORMULERING, FORMÅL OG RELEVANS	2
AFGRÆNSNING.....	3
TEORI.....	3
Mars' overfladestråling og ioniserende stråling.....	3
Dsup: Et skjold og en rygrad	4
METODE.....	4
Elektroporation: DNA'et indføres i cellen.....	4
Homolog rekombination: DNA'et indsættes i genomet.....	5
FREM GANGSMÅDE.....	6
Fase 1	6
Fase 2	6
Fase 3	7
Fase 4	7
BUDGET	7
TIDSRAMME.....	8
KONKLUSION OG PERSPEKTIVERING.....	8
KONTAKT OG TAK.....	9
LITTERATURLISTE	10
BILAG:	12



INDLEDNING

D. 20. juli, 1976 landede Viking 1 som det første menneskeskabte objekt på Mars overflade [1]. Siden da er 48 missioner sendt afsted mod vores røde nabo, hvoraf mindst 14 missioner succesfuldt har sat fod på selve overfladen og målt, vejret og observeret planeten ned til mindste detalje. Otte af disse missioner har fundet sted inden for de seneste 10 år [2] og både NASA og Kina har nu planer om at realisere den første bemandede mission til Mars så snart som i 2030'erne [3] [4], mens SpaceX vil sende mennesker til Mars inden for dette årti [21]. Kort sagt, så går udviklingen inden for udforskningen og forståelsen af Mars rivende stærkt, hvilket samtidig rejser en mur af udfordringer, der skal overkommes [5].

Herunder er en af de afgørende udfordringer at fremskaffe og forvalte fødevarer til en bemanded mission.

Mars er et utroligt barskt sted at dyrke afgrøder. Traditionelle afgrøder som korn, kartofler og majs kræver plads og jord, mens meget af planten ikke kan spises. Algedyrkning kan i vid udstrækning løse ovenstående udfordringer. De kan dyrkes i små tanke under kunstigt lys, de vokser hurtigt og alt ved algen kan spises.

Ydermere dækker alger en bred vifte af vores nødvendige næringsindtag. De kan indeholde vitaminer, essentielle fedt- og aminosyre samt en masse proteiner og kulhydrater [10] (Bilag 1).

Den største udfordring for mars-afgrøder, vil dog blive den store mængde modtaget ioniserende stråling (IR), der også kan ionisere vandet i cellerne til reaktive iltforbindelser (ROS) så som brintoverilte.

Begge dele er meget skadeligt for plantecellerne [16].

I dette projekt, vil jeg derfor undersøge, om det er muligt at genmodificere algen *Nannochloropsis Oceanica* til at blive særligt tolerant overfor de hårde forhold på Mars overflade, med udgangspunkt i bjørnedyrets *Ramazzottius varieornatus*' evne til at modstå IR ved hjælp af proteinet Dsup. Genmodificeringen skal foregå med henblik på udvikling af en stabil og næringsrig fødekilde til den første besætning på Mars.

PROBLEMFORMULERING, FORMÅL OG RELEVANS

Proteinet Dsup (kort for damage suppressor), lokaliseret i bjørnedyrsarten *R. varieornatus*, har ifølge flere studier vist en op til 40% reducere i celleskaden hos bjørnedyr, planteceller samt humane celler, forårsaget af IR og ROS [6] [7] [8] [9].

Ovenstående studier er udført ved at introducere genet for Dsup på mRNA-form i cellerne, hvorefter cellernes ribosomer udtrykker Dsup-proteinet så længe, mRNA'et er til stede, hvilket i ovenstående forsøg har været 2-4 dage. I dette tidsrum er cellerne blevet behandlet med stråling, hvorefter man har kigget på efterfølgende skade effekter.

Effekten af at inkorporere genet permanent i organismens genom er dog endnu ikke blevet undersøgt.

Derfor vil jeg gå skridtet videre med problemformuleringen:

*"Er det muligt at integrere Dsup-genet permanent i modelalgen *N. Oceanicas* genom, for at se, om dette vil kunne få den selv og dens efterkommere til at udtrykke Dsup, og vil dette gøre algecellerne mere tolerante over for et strålingstungt miljø, som vi finder det på Mars?"*

Formålet med mit forsøg er dermed at indsætte Dsup-genet et relevant sted i *N. Oceanicas* genom og se, om genet forbliver i algen og dens efterkommere, og samtidig se om algen udtrykker den aktive form af Dsup. Herefter vil jeg undersøge, om en øget tolerance over for IR kan observeres.



Da en bemanded mission til Mars er meget nærtstående, har denne forskning en stor relevans for de rumskibe, som ønsker at realisere dette. Man er nødt til at udvikle stabile og hårdføre næringskilder, og til dette vil en hårdfør algestamme være en både næringsrig og praktisk fødekilde.

Min personlige tilknytning til emnet ligger i min fascination af bjørnedyr som mikroorganisme, som jeg har brugt mange timer på at betragte under mit mikroskop. Bjørnedyrene indsamler jeg i lavprøver fra min have (Figur 1).



Figur 1: Bjørnedyr under mit mikroskop. Forstørret 200 gange.

AFGRÆNSNING

Da Dsups skadesreducerende effekter allerede flere gange er blevet bevist, er hovedformålet med mit forsøg derved ikke at genbevise dette. Mit fokus har jeg afgrænset til hovedsageligt at kigge på Dsups integration i *N. Oceanica*. Dog rækker mit budget og interesse også til at kunne udføre eksperimenter angående IR-bestråling, hvorfor jeg vil inddrage dette, som et understøttende eksperiment.

Til sidst vil jeg gøre det klart, at jeg ikke forsøger at fremstille en alge, der kan vokse ubeskyttet på Mars' overflade, ligesom jeg heller ikke videre vil beskæftige mig med selve dyrkningsmetoden. Ethiske aspekter ved genmodificering samt økonomiske såvel som juridiske aspekter ved godkendelse af disse er ligeledes ikke en del af mit projekt.

TEORI

Mars' overfladestråling og ioniserende stråling

I modsætning til Jorden har Mars hverken et magnetfelt eller en tæt atmosfære, hvilket resulterer i en 50 gange højere ækvivalent overfladestråling pr. tidsenhed end på Jorden [12].

Ifølge Curiosity Roverens målinger er den gennemsnitlige, daglige strålingsdosis 210 $\mu\text{Gy}/\text{dag}$ (Bilag 2), mens radiationen består af $\sim 90\%$ protoner¹ [13].

Ved at beskytte sig med jord, metal og glas vil man kunne sænke strålingsintensiteten markant, men en given mængde IR vil stadig kunne nå algerne, især hvis sollys bruges til algedyrkningen [12].

IR er stråling, hvis kinetiske energi er høj nok til at kunne ionisere atomer eller molekyler. IR kan fx ionisere vand til ROS. Begge dele er særligt skadeligt for liv, da både IR og ROS inducerer skader i DNA.

Udover at kunne lave forskellige basepar-relaterede mutationer i genomet, kan IR med høj nok energi også forårsage enkelt- såvel som dobbeltstrengede brud på DNA'et, hvilke kan være svære for cellen at reparere igen [16]. Alt dette kan i mange tilfælde lede til cellens død.

Dette er Dsup-proteinet dog et fantastisk værn imod.

¹ Mars er udsat for kosmisk baggrundsstråling, hvilket består af 90% protoner.

Dsup: Et skjold og en rygrad

DNA er grundet fosfatgruppen i DNA-vangen negativt ladet og Dsup er et DNA-associeret protein, der binder sig til DNA-helixen og derved fungerer som ydre skjold og rygrad [6].

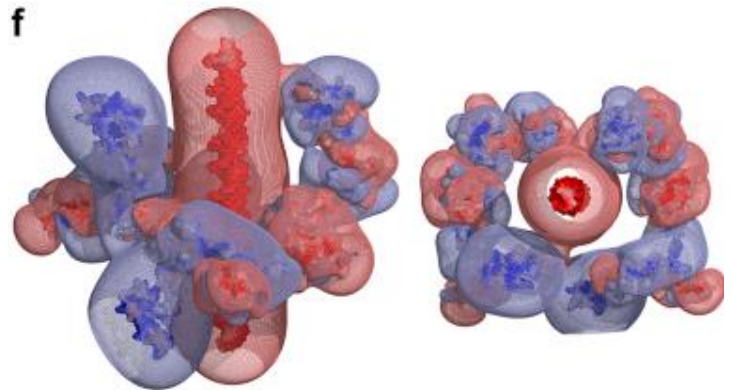
Dsup's tredimensionelle struktur minder om et "S", der er svagt buet om sin vandrette akse. På indersiden af buen, er proteinet positivt ladet. Her binder det sig til DNA'et.

Samtidig sørger S-formen for, at Dsup's ender kan binde sig som en krog til andre Dsup-proteiner og derved danne en stærk kæde, der omslutter og støtter DNA-helixen [7] (Figur 2) (Bilag 3 og 4). Når Dsup har bundet sig til DNA'et, spiller det her to vigtige roller.

For det første absorberer Dsup ioniseringen fra IR samtidig med, at det reagerer med ROS i stedet for, at DNA'et gør det. Dsup pådrager sig altså en stor del af den skade, der ellers ville have nedbrudt DNA'et.

For det andet holder Dsup-kæden DNA'et i en langt mere fastlåst struktur. Hvis et brud på helixen skulle forekomme, enten enkelt- eller dobbeltstrengt, vil Dsup holde de to DNA-ender sammen samtidig med at det forhindrer enderne i at reagere med andre stykker DNA. På denne måde kan den iboende DNA-

polymerase lettere reparere bruddet og DNA-reparationen lykkes derved oftere [7].



Figur 2: Billedet viser DNA-helix (rød cylinder), omgivet af Dsup (skiftevis rød og blå). Dsup's evne til at danne kæde rundt om DNA'et ses tydeligt.

METODE

Til indførelse af Dsup i *N. Oceanicas* genom er der særligt to metoder, jeg gør brug af, hvilke er uddybet i nedenstående afsnit.

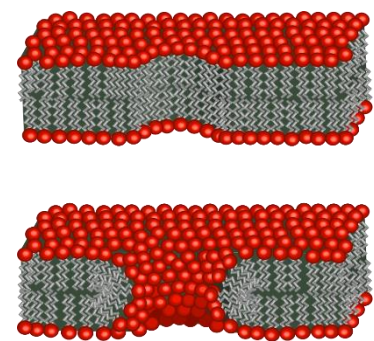
Elektroporation: DNA'et indføres i cellen

Den hydrofobe cellemembran, som omgiver *N. Oceanica*, tillader ikke store polære molekyler, som DNA, at trænge igennem sig.

Ved elektroporation laver man en opløsning, bestående af algeceller og DNA, der tilføjes til en elektroporationskuvette.

En elektrisk impuls, af et par mikrosekunders varighed, tilføres over kuvetten med en spænding på 2500V. Dette forstyrrer de dobbeltlagte fosforlipider, hvorved fosfatgrupperne på ydersiden af membranen kan binde sig til fosfatgrupperne på indersiden, hvilket resulterer i en åben pore i cellemembranen, hvor igennem store, hydrofobe molekyler kan diffundere (Figur 3).

Samtidig stiger cellens membranpotentiale, hvilket har en tiltrækkende effekt på det ladede DNA, og DNA'et vil have større tendens til at blive trukket ind gennem poren på samme måde, som under en elektroforese [14]. Når DNA'et først er inde for cellemembranen, kan det diffundere ind i nukleus.



Figur 3:
Øverst: lukket cellemembran
Nederst: Hydrofil pore i cellemembran, forårsaget af elektroporation.

Homolog rekombination: DNA'et indsættes i genomet

Et rekombinant stykke DNA, bestående af de forskellige gener og dertilhørende promotorer og terminatorer, som jeg gerne vil have udtrykt i algen, kaldes for et DNA-konstrukt.

Når DNA-konstruktet først er kommet ind i nukleus, skal det integreres i selve genomet. Til dette gør jeg brug af et homologt rekombinationssite.

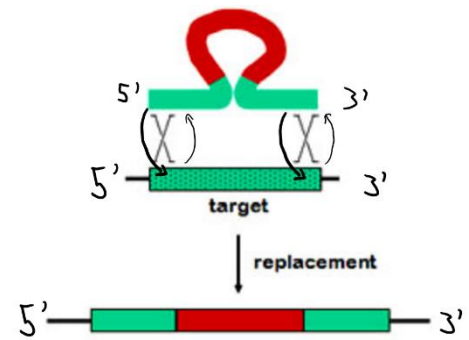
Under cellens meiose, foregår homolog rekombination naturligt. Her byttes enskodende gener ud mellem de allele kromosompar. Ved at benytte sig af denne proces, kan man, under cellens meiose, få et nyt gen sat ind på et til to af de to mulige alleler i genomet.

Metoden består af, at man først vælger en bestemt gensekvens fra genomet. Denne sekvens deles over på midten, hvorefter de to halvdele placeres som de endestillede gensekvenser i DNA-konstruktet. Når DNA-konstruktet således befinder sig i nukleus

under en meiotisk deling, kan det byttes ud med genet i kromosomet, som derved bliver integreret i hele genomet (Figur 4) [20].

Man skal dog være opmærksom på, at genet, der bruges som rekombinationssite, bliver knockoutet efter indsættelsen, og genet skal derfor ikke spille en vital rolle i organismen.

En ulempe ved begge metoder er, at de baserer sig på en vis form for tilfældighed, fx om DNA'et kommer inden for cellemembranen eller om DNA-konstruktet overhovedet reagerer i den homologe rekombination. Dog er begge metoder billige i forhold til andre, mere sikre metoder, så som CRISPR. Hvis man ydermere har tilstrækkeligt med algeceller, bliver uheldige udfald langt mindre sandsynlige.



Figur 4: DNA-konstrukt (grøn og rød) laver, grundet de allele gener, homolog rekombination med rekombinationssitet (grønt med prikker). De to sekvenser bytter dermed plads.



FREMGANGSMÅDE

Nedenstående forsøg, hvor jeg integrerer Dsup i *N. Oceanicas* genom, har jeg delt op i fire faser. Fremgangsmåden og metoden bygger på grundige samtaler med min forskerkontakt Johan Andersen-Ranberg samt på artiklen Poliner et al. (2020) [15].

Laboratorium med elektroporator, centrifuge osv. kan lånes af KU til forsøget.

Yderligere vil hver fase af forsøget være uddybet i bilag 5 til 8.

<p>Fase 1: Bilag 5 DNA-konstrukt og opsummering</p>	<p>Et DNA-konstrukt designes for at integrere Dsup i <i>N. Oceanica</i>. Som skabelon til mit DNA-konstrukt benyttede jeg mig af et allerede succesfuld testet konstrukt på <i>N. Oceanica</i> fra artiklen Poliner et al. (2020) (Figur 5). Hygr-genet koder for immunitet overfor antibiotikummet Hygromycin B, hvilket jeg bruger som selektionsmiddel. Via DNA-databasen addgene.org [7] henter jeg skabelon-konstruktet og bytter GFP-genet ud med Dsup-sekvensen (Bilag 5.a). Genet hlr1 benyttes som homolog rekombinationssite. DNA-konstruktet er vist skematisk herunder (Bilag 5.b).</p> <div style="text-align: center;"> <p>Figur 5 viser skabelon-konstruktet, indeholdende den dobbeltrettede promotor (Ribi) og to gener med en terminator hver.</p> </div> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>h1r1-del 1</td> <td>HSt terminator</td> <td>HygR</td> <td>Ribi</td> <td>Dsup</td> <td>LDSP terminator</td> <td>h1r1-del 2</td> </tr> </table> <p>DNA-konstrukt og Dsup-primær (Bilag 5.c) bestilles hos Genscript. DNA-konstruktet opsummeres gennem <i>E. Coli</i>, hvorefter jeg har en relativt ubegrænset mængde DNA til rådighed.</p>	h1r1-del 1	HSt terminator	HygR	Ribi	Dsup	LDSP terminator	h1r1-del 2
h1r1-del 1	HSt terminator	HygR	Ribi	Dsup	LDSP terminator	h1r1-del 2		
<p>Fase 2: Bilag 6 Genintegration ved Elektroporation</p>	<p><i>N. Oceanica</i> dyrkes i et saltvandskar med en salinitet på 3,5%. For at elektroporatoren ikke skal kortslutte under elektroporationen, skal alt salt fjernes fra algerne. Dette gøres ved fremstilling af et elektroporationsmedium, bestående af 384 mM sorbitol opløst i ionbyttet vand. Sorbitol tilsættes elektroporationsmediet for at undgå algedød forårsaget af osmotisk stress, når saltet fjernes fra algerne. Algerne renses for salt ved at centrifugere og fortynde algeopløsningen med elektroporationsmediet fire gange. DNA-konstrukt, restriktionsenzymet NotI og alger tilsættes elektroporationsmediet. Elektroporationen gennemføres ved et enkelt stød på 2500V. Algerne overføres til en saltvandsholdig kolbe med lys og næring, hvor de kan gro i et døgn tid. Under første meiotiske deling, kan DNA-konstruktet homologt rekombineres med algens genom.</p>							



<p>Fase 3: Bilag 7 <i>Selektion</i></p>	<p>De ikke muterede alger fraselekteres ved fremstilling af et selektionsmedium, bestående af en agar-saltvandsblanding med en koncentration af Hygromycin B på 50 µg/L. Efter endnu en centrifugering og overførsel til selektionsmediet, vokser algerne i 3-4 uger. Herefter vil kun alger, der udtrykker Hygr være tilbage som kolonier. Ved brug af koloni- PCR, testes hver algekoloni for aktive Dsup-gener. Hver algeprøve lyses med varme, hvorefter Dsup-primer, restriktionsenzymet NotI og DNA-polymerase tilsættes opløsningen. Hvis DNA-konstruktet er indsat korrekt, vil man kunne identificere Dsup-mRNA i opløsningen via PCR. Hver Dsup-positive koloni overføres til en saltvandsfyldt beholder for at gro. Hvis Dsup-mRNA detekteres via PCR, har man på dette stadie succesfuldt integreret Dsup i <i>N. Oceanica</i> og da algekolonierne er vokset frem på selektionsmediet, har man sikret sig, at de genmodificerede celler har nedarvet Dsup-genet til deres afkom, da celledeling må have fundet sted i denne proces. Hermed er hovedformålet med mit forsøg nu opnået.</p>
<p>Fase 4: Bilag 8 <i>Ioniserende stråling</i></p>	<p>For at eftervise effekten af aktive Dsup-gener, vil jeg udsætte to genmodificerede og to naturlige algekolonier for IR. Gennem mit gymnasium har jeg adgang til otte γ-kilder. Ved at udsætte en algepodet petriskål for fire γ-kilder i fem døgn, vil jeg i teorien kunne pådrage algerne en strålingsdosis på 0,5Sv, hvilket svarer til 230 dage under Mars-lignende IR-forhold (Bilag 8.a). Herefter kan koncentrationen af algeceller i hver bestrålede koloni bestemmes ved pladespredning, da det forventes, at de ikke genmodificerede alger vil have en lavere cellekoncentration grundet højere dødelighed under IR. Herefter kan man begynde på databehandling.</p>

BUDGET

Materialer*	Original valuta	Pris i DKK	Reference
DNA-konstrukt <i>Fra Genscript</i>	1900 \$	12.180 kr.	https://www.genscript.com/gene_synthesis.html
Primer <i>Fra Genscript</i>	95\$	612 kr.	https://www.genscript.com/gene_synthesis.html
NotI 300 units (10U/µL) <i>Fra ThermoFischer</i>		475 kr.	https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ER0591
Plasmid preparation kit <i>Fra ThermoFischer</i>		578 kr.	https://www.addgene.org/protocols/purify-plasmid-dna/ https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0502
Hygromycin B 20 mL <i>Fra ThermoFischer</i>		2.020 kr.	https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/10687010
E. coli-stamme <i>Fra Homesceincetools.com</i>	15.95\$	102 kr.	https://www.homesceincetools.com/product/escherichia-coli-bacteria/
N. Oceanica <i>Skaffes gennem KU</i>		0 kr.	
I alt *materialer, der ikke er opskrevet på denne liste, lånes af KU udgiftsfri.		15.967 kr.	



TIDSRAMME

Procedure	Forventet tid
Bestilling af syntetiseret DNA	5 hverdage
DNA-opsummering med <i>E. coli</i>	1 dag
Elektroporation	1 dag
Algevækst	1 dag
Overførsel til samt vækst på selektionsmedium	24 dag
Koloni PCR	1 dag
Bestråling med IR	10 dage
I alt	43 dage

KONKLUSION OG PERSPEKTIVERING

Efter forsøget forventer jeg at have fundet ud af, hvorvidt det med ovenstående metode er lykket at integrere den aktive form af Dsup i *N. Oceanicas* genom eller ej.

Uanset resultatet, lægger forsøget op til yderligere forskning.

Hvis det med koloni-PCR ikke lykkes at påvise Dsup i algen, vil det være relevant at undersøge, om der kan være særlige omstændigheder omkring Dsup-sekvensen, der har ført til komplikationer under gentransplantation, da selve metoden og DNA-konstruktet nøje er baseret på Poliner et al. (2020). Flere forskellige codoner koder for samme aminosyre, hvilket kan føre til komplikation under transskriptionen, hvis to forskellige organismer bruger forskellig codon-hyppighed til samme aminosyre [23]. Man kunne derfor kigge på, om Dsup-sekvensen skal optimeres til at passe til *N. Oceanicas* codon-standarder.

Hvis Dsup vises integreret i *N. Oceanica* med koloni-PCR, men en skadesreducerende effekt overfor IR udebliver, vil det være oplagt at kigge på mængden af Dsup-proteiner i algen. Man vil her kunne prøve at overudtrykke Dsup-genet via genamplifikation. Dette kunne gøres ved enten at lave et nyt DNA-konstrukt med en mere aktiv promoter, eller ved at tilføje Dsup-primer til algekolonien under bestrålingen.

Hvis forsøget derimod lykkes, vil det være oplagt at arbejde videre med denne metode. Det vil være relevant at rekonstruere forsøget og lave yderligere målinger på celledskadesreduktionen.

Jeg mener, at det vil være yderst relevant at benytte denne forskning i samarbejde med rumorganisationer som NASA og SpaceX, da man her vil kunne teste algen på dens evne til at producere nok næring og modstå IR under Marsbase-forhold, med henblik på videre udvikling af en stabil fødekilde på Mars.



KONTAKT OG TAK

Min forskerkontakt:

Adjunkt Johan Andersen-Ranberg

Institut for Plante- og Miljøvidenskab, København Universitet.

Først og fremmest en kæmpe tak til min forskerkontakt Johan Andersen-Ranberg for vejledning til metode og DNA-konstruering.

Derudover en stor tak til Daniel Huertes, postdoc ved Københavns Universitet, og min biologilærer på Roskilde Katedralskole Christoffer Harder for utrolig interesse og fagligt bidrag ved gensammensætningen.

Tak til KU og koordinatorene fra Projekt Forskerspirer for professionel undervisning og vejledning.



LITTERATURLISTE:

- [1]: **Cool Cosmos**. When did we first land a spacecraft on Mars? Findes gennem linket:
<https://coolcosmos.ipac.caltech.edu/ask/71-When-did-we-first-land-a-spacecraft-on-Mars->
- [2]: **NASA**. Historical Log. Findes gennem linket:
<https://mars.nasa.gov/mars-exploration/missions/historical-log/>
- [3]: **NASA**. NASA's Journey to Mars. Findes gennem linket:
<https://www.nasa.gov/content/nasas-journey-to-mars>
- [4]: **Reuters**. China plans its first crewed mission to Mars in 2033. Findes gennem linket:
<https://www.reuters.com/business/aerospace-defense/china-plans-its-first-crewed-mission-mars-2033-2021-06-24/>
- [5]: **DR.dk**. Småsten gemmer på Mars' hemmeligheder. Findes gennem linket:
<https://www.dr.dk/nyheder/viden/teknologi/smaa-sten-gemmer-paa-mars-hemmeligheder-derfor-henter-vi-dem-hjem-til-jorden>
- [6]: **UniProt-KB**. P0DOW4 (DSUP_RAMVA). Findes gennem linket:
<https://www.uniprot.org/uniprot/P0DOW4>
- [7]: **Minguez-Toral, M., Cuevas-Zuviria, B., Garrido-Arandia, M. & Pacios, L. F. (2020)** A computational structural study on the DNA-protecting role of the tardigrade-unique Dsup protein. IN *Nature.com/SCIENTIFIC REPORTS/* 10:13424.
- [8]: **Kirke, J., Jin, X. L., Zhang, X. H. (2020)** Expression of a Tardigrade Dsup Gene Enhances Genome Protection in Plants. IN *Molecular Biotechnology* 62(11-12):536-571
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32955680/>
- [9]: **Hashimoto, T., Horikawa, D. D., Kunieda, T. (2016)** Extremotolerant tardigrade genome and improved radiotolerance of human cultured cells by tardigrade-unique protein. IN *Nature Communication* 7, 12808
<https://www.nature.com/articles/ncomms12808>
- [10]: **Kusmayadi, A., Leong, Y. K., Yen, H. W., Huang, C. Y., Chang, J. S. (2021)** Microalgae as sustainable food and feed sources for animals and humans e Biotechnological and environmental aspects. IN *Chemosphere* 271 (2021) 129800
- [11] **Space.com**. Toxic Mars. Findes gennem linket:
<https://www.space.com/21554-mars-toxic-perchlorate-chemicals.html>
- [12]: **Kurzgesagt- In a Nutshell**. Sources-Mars. Findes gennem linket:
<https://sites.google.com/view/sourcesmars/>
- [13]: **Hassler, D. M., Zeitlin, C., Wimmer-Schweingruber, R. F. et al (2014)** Mars' Surface Radiation Environment Measured with the Mars Science Laboratory's Curiosity Rover. IN *Science VOL* 343
- [14]: **ThermoFisher**. How elektroporation works. Finde gennem linket:
<https://www.thermofisher.com/dk/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/transfection-methods/electroporation.html>



[15]: **Poliner, E., Clark, E., Cummings, C., Benning, C., Farre, E. M. (2020)** A high-capacity gene stacking toolkit for the oleaginous microalga, *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779. IN *Algal Research* 45 (2020) 101644.

[16]: **Christensen, Brian Krog (2005)** *Medicinsk Fysik-om stråling og kræft*. Fysikforlaget

[17]: **Addgene.org**. Findes gennem linket:

<https://www.addgene.org/>

[18]: **Genscript.com**. Findes gennem linket:

https://www.genscript.com/gene_synthesis.html

[19]: **Froger, A., Hall, J. H. (2007)** Transformation of Plasmid DNA into E. Coli using the Heat Shock method. IN *Journal of visualized experiments* (6):253

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18997900/>

[20]: **Egebo, Lone als (2015)** *Genetikbogen A+B, genetik, genteknologi og evolution*. Nucleus, 1. udgave, 3.oplag 2015.

[21]: **Inverse.com**. SpaceX Starship. Findes gennem linket:

<https://www.inverse.com/innovation/spacex-starship-launch-schedule>

[22]: **ThermoFisher**. NotI. Findes gennem linket:

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ER0591>

[23]: **Sharp, P. M. (2001)** Codon Usage Bias. IN *Encyclopedia of Genetics*.

<https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/codon-usage-bias>



BILAG:

BILAGSOVERSIGT

Bilag 1: Nutrient Compositions in different microalgae species	13
Bilag 2: Average dose rate on Mars' surface	14
Bilag 3: A computational structural study on the Dsup protein	15
Bilag 4: Tardigrade Dsup protects DNA from ROS	16
Bilag 5: Fase 1: DNA-konstrukt og opsummering.....	17
Bilag 5.a: Skabelon-konstrukt på plasmidform.....	18
Bilag 5.b: DNA-konstrukt-sekvens.....	19
Bilag 5.c: Dsup-Primer-sekvens	22
Bilag 6: Fase 2: Genintegration ved elektroporation	23
Bilag 7: Fase 3: Selektionen	24
Bilag 8: Fase 4: Ioniserende stråling.....	25
Bilag 8.a: Strålingsdosis fra fire γ -kilder over 5 døgn.	26



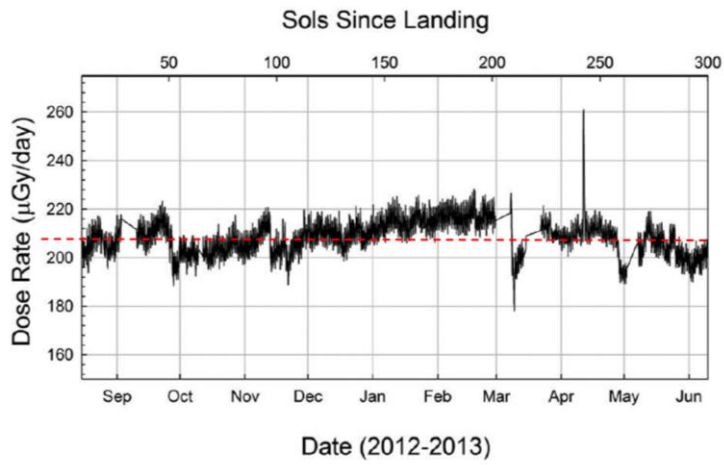
Bilag 1: Nutrient Compositions in different microalgae species

Table 1
Nutrient compositions in different microalgae species.

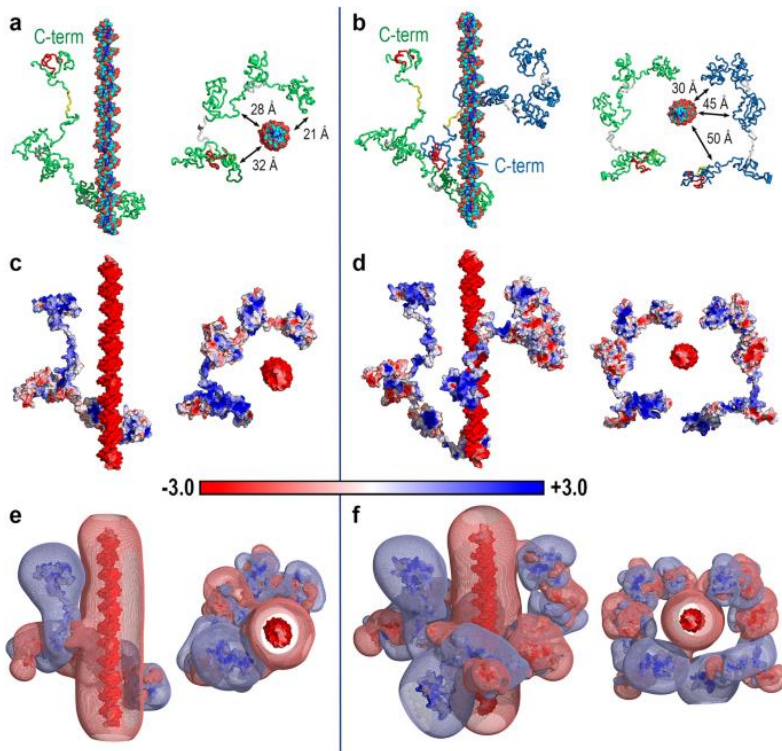
Microalgae species	Composition (%)			References
	Lipids	Protein	Carbohydrates	
<i>Botryococcus braunii</i>	33	39.61	2.38	Sydney et al. (2010)
<i>Chlorella vulgaris</i>	14–22	51–58	12–17	Wolkers et al. (2011)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	15	48	27	Bleakley and Hayes (2017)
<i>Isochrysis galbana</i>	12–14	50–56	10–17	Milledge (2011)
<i>Nannochloropsis</i> sp.	22–31	33–44	8–14	Xu et al. (2004)
<i>Porphyridium cruentum</i>	5.78–7.55	27.7–40.8	22.8–39.3	Fuentes et al. (2000)
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	1.9	47	21–52	VanKrimpen et al. (2013)
<i>Spirulina maxima</i>	6–7	60–71	13–16	Milledge (2011)
<i>Synechococcus</i> sp.	11	63	15	Becker (1994)
<i>Tetraselmis maculata</i>	3	52	15	VanKrimpen et al. (2013)



Bilag 2: Average dose rate on Mars' surface

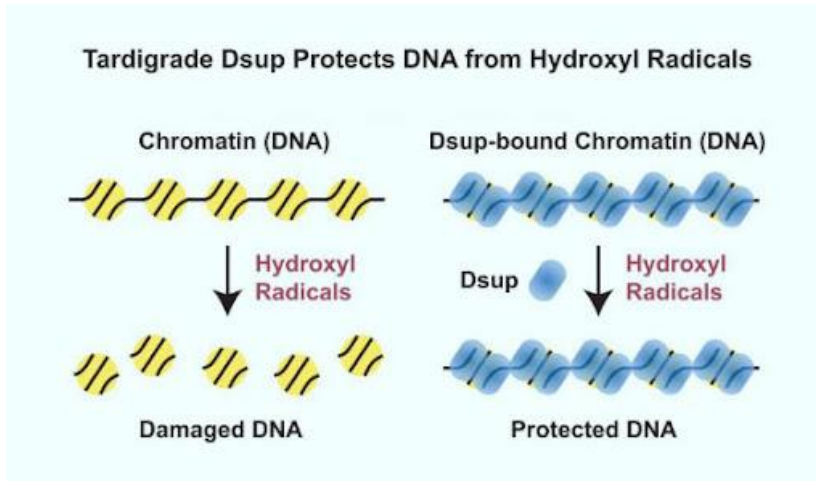


Bilag 3: A computational structural study on the Dsup protein





Bilag 4: Tardigrade Dsup protects DNA from ROS





Bilag 5: Fase 1: DNA-konstrukt og opsummering

Førend jeg kan integrere Dsup i *N. Oceanica*, skal jeg først have designet et passende DNA-konstrukt, indeholdende en række forskellige gener, der tilsammen vil kunne skabe en succesfuld genrekombination. Som skabelon til mit DNA-konstrukt benyttede jeg mig af et allerede succesfuld testet konstrukt på *N. Oceanica* fra artiklen Poliner et al. (2020) (Figur 5)

HygR-genet i skabelon-konstruktet er et antibiotikaresistent gen, der gør algen immun over for antibiotikummet Hygromycin B. Kun de genmodificerede alge-transformanter vil være resistente over for Hygromycin B, hvilket jeg derfor bruger til at selektere ikke-genmodificerede alger fra de genmodificerede individer.



Figur 6 viser skabelon-konstruktet, indeholdende den dobbeltrettede promotor (Ribi) og to gener med en terminator hver.

For at danne mit eget konstrukt, bytter jeg GFP-genet ud med mit Dsup-gen.

Til dette brugte jeg DNA-databasen addgene.org [17], hvor jeg fandt skabelon-konstruktet på plasmidform, og klippede de nødvendige basesekvenser ud (Bilag 5.a). Derefter fandt jeg Dsup-sekvensen fra DNA-databasen Uniprot.org [6] og satte ind på GFP-genets plads.

Til sidst brugte jeg det *N. Oceanica* specifikke gen "h1r1" som homologt rekombinationsite, hvilket jeg havde fået anbefalet fra Daniel Huertes, postdoc ved KU, på baggrund af hans forskning inden for emnet. Ved at tage h1r1-sekvensen, dele den op i to, og placere en del i hver ende af mit DNA-konstrukt, er konstruktet nu færdigt og vist skematisk herunder (Bilag 5.b):

h1r1-del 1	HSt terminator	HygR	Ribi	Dsup	LDSP terminator	h1r1-del 2
-------------------	-----------------------	-------------	-------------	-------------	------------------------	-------------------

Hos DNA-syntesefirmaet Genscript's danske underafdeling [18], bestiller jeg mit DNA-konstrukt, samt en designet Dsup-primer (Bilag 5.c) på plasmidform. Inkluderet i deres Economy tilbud er et restriktionsenzym site til restriktionsenzymet NotI i plasmidet. NotI bestilles hos science-firmaet ThermoFisher [22].

Det er tjekket, at NotI ikke klipper noget sted i mit DNA-konstrukt.

Konstruktet tilsendes i en 1 ml DNA-buffer opløsning, med en plasmidkoncentration på $4\mu\text{g/ml}$ [18]. Plasmidet indsættes nu i en *E. coli* bakteriekoloni, ved brug af heat shock [19]. Efter at have ladet *E. coli* kolonien vokse, opsummeres DNA-konstruktet på plasmidform fra kolonien, ved brug af plasmid preparation kittet. En guide til brug af kittet findes her:

<https://www.addgene.org/protocols/purify-plasmid-dna/>

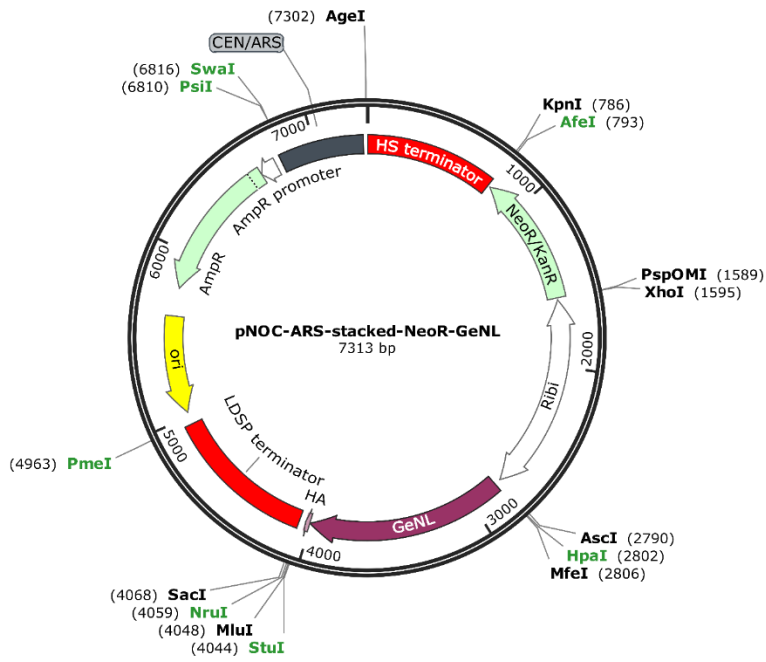
Nu har jeg dermed en relativt ubegrænset mængde af mit DNA-konstrukt til rådighed, hvilket kan oprenses fra *E. coli* kolonien.

Herefter kan genmodificeringen begynde.



Bilag 5.a: Skabelon-konstrukt på plasmidform

Created with SnapGene®





Bilag 5.b: DNA-konstrukt-sekvens

Hlr1-del 1

atgaaagtcaccgcggtgctctgtttgctcgcgccctcttctggcatccgcgtttattgctcccgcaccaagg
tacgcgtacaagctagccacttgccagatttgattcgcgatgcttcagaatatgtccggagggcttcaataataggct
gtctttcgtaaagaaaccttttcacgcccgcataagtgtatgatgaaagacttcacttcgtctgccgatctcggact
tgctgtcgtcgtcctaacttcttttctttttgttccacgcacaggccaccgcgccgcggcggtgatgtcgatg
gcgagtcgaaggcccttcttttctcaaggctcccgcgaagctggatggaagccttgcaggagactttggttcg
accccatgggaatttcggaccaggtaggcgaagattttggtaggagccaggaggaaggcggttaggaaggagg
cgcgaccgagaccagtggtcactggtgaaggtgtttccaagccgtttggttttgcgagagcaagtatagtcaat
taaaacttatccttatcctctcttggctcgtccctccttactcccaggtcgccaacctcaaatacgtccgtgcccg
gagctcaagcactgccgcgtggcgatgcttgggttcttggctgggttggtgcagcaatatgtccacctcccggag
agatc

HS Terminator

taatggatgggaagtcggttaagtgaaaagggtttgtgtaaggtggatgtcaaattttgccaacccgtgcctc
tgtgttcgcagtgtagcaaggaagccacaccaccgcctcatattcaaatacgaatcatcgaagaaatcggcg
aggatctcatgccccaaagctgtcatcaaagtgtgtcccaccacacgaagatgccgagtaaatacgtgagttg
tcctatgattggcaggatgtggcatttaaagtccaaaaggccctgcttggctcggtcaccttttgcctcctcc
cctcccgtcacaccctaaacacgaatgcagaagaaaatcatgtgggaagcaacgatttagaaatgggaatg
gaggtccttacttctgaatctgaccaagctggcggacacaaccgtagagggatctttgacctgcatcaata
caccgacatgtaataaaatcgagtaccaaagaaaagctactgaagtcagtttcggattgtgtttagaatctt
ttgagtcgtcactggaatgctatgctcgttcaatcgctcgatttagctttgtaaattatttctggtggcaaggc
ggggttcaagtagcaagtgggggcatggcagcaccctccgagcctcgttcgttcaggtgtttttgggacctt
tcctcccttctgtcttcagacgcttttattttccttccgttttctactagtgacaaaaaaggggcacaca
ctctttactcgtcacaccctcgtactcggacacgcgctgttaccgactctggtac

HygR

atgaaaaagcctgaactcaccgcgacgtctgtcgcagaagtttctgatcgaagtttcgacagcgtc
tccgacctgatgcagctctcggagggcgaagaatctcgtgctttcagcttcgatgtaggagggcg
ggatagtcctgcgggtaaatagctgcgccgatggtttctacaaagatcgttatgtttatcggcac
tttgcatcggccgcgctcccgatcccggaagtgttgacattgggggaattcagcagagacctgacc
tattgcatctcccgcggtgcacaggggtgtcacggttgaagacctgcctgaaaccgaactgccgct
gttctgcagccggctcgcggaggccatggatgcgatcgtcgcggccgatcttagccagacgagcggg
ttcggcccatcggaccgcaaggaatcgggtcaatacactacatggcgtgatttcatatgcgcgatt
gctgatccccatgtgtatcactggcaaactgtgatggacgacaccgtcagtgctcgcgtcgcgcag
gctctcgatgagctgatgctttgggcccaggactgccccgaagtccggcacctcgtgcacgcggat
ttcggctccaacaatgtcctgacggacaatggccgcataacagcgggtcattgactggagcagggcg
atggtcggggattcccaatacagaggtcgccaacatcttcttctggaggccgtggttggcttgatg
gagcagcagacgcgctacttcgagcggaggcatccggagcttgaggatcgcgcggctccgggcg
tatatgctccgcattgggtcttgaccaactctatcagagcttgggttgacggcaatttcgatgatgca
gcttgggcgagggctcgatgcgacgcaatcgtccgatccggagccgggactgtcgggctacacaa
atcgcccgcagaagcgcggccgtctggaccgatggctgtgtagaagtactcgccgatagtggaaac
cgacgccccagcactcgtccgagggcaaggaatag

Ribi

catggctcagctgctcagagggttgcgtgtgtatctgtgtgcagtgatattgttaccgagtttgggtgagcgtga



gtccgttagtgccctgggtgggtggattaggagagtggggtgactcgggtgtccatggctttcttcgctcatta
taggaggggaaaggaatgagggaggggtgggagaccgctctgttgaccaccgatttacttcttgcctcc
cttccccctccctccccctcaatccgtacgacacaaatagtagccgagtgctctgctgcagagcgcacatgattagtg
tggtagacaacgagggaggggaaggatgtacagggcatggcacggagaagcgcgatgggtggccaggaagaggagag
gtcgtgagaacaggatgtgttgcaatggataaaaaacagaaagcgcgatggctctgggcttcgaaagcaggggac
attaggacgtgtagaccatctcgacggatccctctgtatctctgttgctgctgcaatgttttctgtgcacgtgt
agtgtgtgagagtagaaccgggaactcgaacagagaaaagcatgggtggctgtgggtgtggaggcttcggtcc
caccacatgcccttctccttcgctcgcctctccctgccttcttcacgcacccttgcccccctcgttctcaa
tacctggctcacttccaccattcaaacaccatcacgatacaggcatttatctatcgttgaagacttcttct
ccggtagatccttagccaaggtagaagaggggcatgcagcaaggagaaagaaatgatgcatgatgaggaatag
aaggggagggagggagggatgatggaagcgaagcgcacatattctgggtgctgctgcctgatggggagtct
agctgtgacactgaggacgggtggctgctgggtggctgcgggcgctgccttgggtgatcaatgggagtaaagggag
ggaaggaggtagcgtgaacggatgacgcggagaagttaggggtctctttacgtatcgccccctgccgcccgcc
tctctgcgataaatgtgctgttaccctgcagcctctattcttcaactgtgttccctgttttccaacagcctcta
ttcttccctgtcttttgggtgagtgccgtcatcctctctttgccccagtcgctgcttctctcgactcactcact
ccccccctccttccctccctccatccac

Dsup

atggcatccacacaccaatcatccacagaaccctcttccacaggtaaatctgaggaaacgaagaagatg
cttcgcaagggagcgggcaagactccaagaacgtaaccgttaccaaaggtaccggttctctccgccacctc
agctgccattgtcaagacagggagatcccaaggcaagattcctctactacagcgggctcttctagtact
cagggacagaagttcagtactacacctaccgacccgaaaactttcagctctgaccaaaggagaaatcca
aaagcccagccaaagaagtccgctctgggtggcgatagtaagtccaaggtgacaccaagtctcaaagcga
cgccaaatcttctggacaaagtcagggccagctctaaagacagcggcaaatcatcttccgacagtagcaag
agtcactctgtcatcggagctgtcaaagacgctgcttgacggcgccaaagatgtcgcaggaaaagccgctg
aggatgctcctagcatcatgcatactgcagtcgatgctgtgagaacgcagccacgactgtgaaaggatgt
ggcatcgtcggctgcatcgcactgtggcgagagaaggtagtcgatgcttaccacagtggtggggagacaag
acggacgacaagaagagggcgagcacagcggcgacaagaaggacgactccaaagctggaagtggctctg
gacaaggtgggtgacaacaagaagtctgaaggagagacttctggccaagcagaatccagctctggcaacga
aggagctgctccagccaaagccggtggctgctggacggcctccagcagctgctaaaggagttgctaagggg
gctgcaaagggcgctgccgctccaaaggagccaagagcgggtgctgaatcctccaaggaggagaaacagt
cgtcaggagatatcgagatggcagatgcttccctccaaggaggctcggaccagagggtattccgcgggcag
cgttggcgaaggtgggtgcatcagggcagtgaggggtggagctaagaaaggcagagggcgggcgctggtaag
aaagcggatgccccgtgatacgtccgctgagccgctcggcggtcgtcccgcctgacgtcttccaggtacag
gggccccgttccgctccagctgcagcgaaggcggagcgaagcgtgctgcttcttccctccagtacacctc
caacgctaagaagcaagcagactggaggtgctggcaagctgctgccaccaagcaactgctgccaatcg
gcagcctctaagctccccagaatggcgaggtgccaagaagaaggaggaaaggctggaggacggaaga
ggaagtaa

LDSP Terminator

gcatgagctcgaaagatccaagagagacgagtagagatTTTTTTTTTgggattgatgtttgtcgcttcttga
gttgctgctcaggttacgccttttgtaagaatgttccgcaggagagggaggatggcatgagtgaggggtgag
agggcttggccgcttttttttttaaaaacgctgaagacgtgggtgtcaaacaaacccccatagaaacgattt
tgttacggtgccccccagcgtcacttgaatggctccgcggaaaggccagggaggggaaggggggagggaggaa
acatgaaacatggtgaaacggtcaacagggtttgggggacaagagaggttagcgcctgatggactgctccctc
ccctccttccctcaatgtctcattcatccatgcttcccccttctctctccccctccgttccatcccccgcg
ggcgtggtagtgccgtgatgggatccactaaaatgtacgtgtaagaaaagccgggtgagcttacgcttttgtga
aagtgggagtagcagtggtgtgtgtgtgtgtagtggtttcagaccccagacagaggcgaagcagaaaagcag
acgatgaagacgacgaagaatgagcagctatTTTTTatcgtggaaacagaagaggtgatatcgtctcgttct



ttgttatcacctacccccgctgcatgtacatgcagcctttttattttgtaatctttcccgaaaaatcaaccgc
cacctcccccccgcttctctcaccatcatcttctcctgtttatcttctactttacactagatcgcatggca
catctccctcgcaatccatcggtgcaaccatcatcgatcccactcctccctccctccctccctccctccctcc
atctcttctaagaaatccgctagtgtt

H1r1-del 2

Tacgcagagagcaaccctctcaaggccctgaccagcgtgcccctcttaagccagattcagatcttctgttca
tcggcgcgattgagctggcgacattagaccagacctacacggcggacaagccgtgggatttgggctttgacc
gcttaacttttagcaaggtgagttagttagtcagcaagcaagtgcattagtggtacgcaagagtgtagagtg
tgtgctgtagtgagagagaatgtgtgcatatgaaggtatttttgtcttgagctggaaaaggcatatcataatt
gtgatccccctccacgtttcacaagtttacggctttcttctggtcgtttctgaatccctgcagtatcggcc
ttccttatgctcatggctcctcctgcctttcctccaattcaacctacagggcaagtccgagcagcagatgaagg
atgtggaagtgaaggagctcaaaaacggacgcggttgccatggttaggtaattccttcttttctctcctcattca
gtcctgagcttctgaagaagaatcttatatcagttttactctactttttattttttttacctcaaagtgttt
tccttctgagcaggtcaataatcgtttccctccctccttccctcccgcactccctccatccctccctcccc
agatcgccatcatgggtttgattgccagaccctttacaccggtgttccccttttctcttaa



Bilag 5.c: Dsup-Primer-sekvens

Dsup-primer

atggcatccacacaccaatcatccacagaaccctcttccacaggtaaactctgaggaaacgaagaaagatg
cttcgcaagggagcgggcaagactccaagaacgtaaccgttaccaaaaggtaccggttctcctccgccactc
agctgccattgtcaagacaggaggatcccaaggcaaagattcctctactacagcgggtcttctagtact
cagggacagaagttcagtactacacctaccgacccgaaaactttcagctctgaccaaaaggagaaatcca
aaagcccagccaaagaagtcccgtctggtggcgatagtaagtcccaagggtgacaccaagtctcaaagcga
cgccaaatcttctggacaaagtcagggccagtctaaagacagcggcaaatactcttccgacagtagcaag
agtcactctgtcatcggagctgtcaaagacgtcgttgaggcgccaaagatgtcgcaggaaaagccgtcg
aggatgctcctagcatcatgcatactgcagtcgatgctgtgaagaacgcagccacgactgtgaaggatgt



Bilag 6: Fase 2: Genintegration ved elektroporation

Da *N. Oceanica* naturligt er en marinealge, dyrkes en koloni af disse i et saltvandsbad med en salinitet svarende til havets saltindhold på 35 promille.

For at elektroporatoren ikke skal kortslutte under elektroporationen, skal alt salt dog fjernes fra alger og elektroporationsmedium.

Elektroporationsmediet består af 384 mM sorbitol opløst i ionbyttet vand.

Sorbitol tilsættes elektroporationsmediet for at undgå algedød forårsaget af osmotisk stress, når saltet fjernes fra algerne.

Algerne renses for salt ved at centrifugere algeopløsningen, hvorefter den nu øverste væske frahelles og det tilbageværende algekoncentrat fortyndes med elektroporationsmediet.

Dette gentages fire gange, så man er sikker på at alt salt er fjernet.

Nu tilsættes restriktionsenzymet NotI til plasmidopløsningen, hvorved mit DNA-konstrukt bliver klippet ud af plasmidet og dermed er klar til at blive indsat i algen på lineær form.

DNA-konstrukt og algeceller tilsættes elektroporationsmediet i en elektroporator-kuvette, hvilken indsættes i selve elektroporatoren.

Elektroporationen udføres ved et enkelt stød på 2500 V. Her åbnes porer i cellemembranerne, og DNA'et vil kunne diffundere ind i cytoplasmaet.

Algerne i elektroporationsmediet overføres til en saltvandsholdig kolbe med lys og næring, hvor de kan gro i et døgn tid. Under første meiotiske deling, kan DNA-konstruktet homologt rekombineres med algens genom.



Bilag 7: Fase 3: Selektionen

Under elektroporationen er det kun en meget lille del af algecellerne der har optaget DNA-konstruktet i deres genom. Omkring 0,5%. Dette er dog rigeligt, da der let kunne havde været millioner af algeceller under elektroporationen.

De ikke muterede alger selekteres ved fremstilling af et selektionsmedium, bestående af en blanding af agar og saltvand.

Hygromycin B tilsættes agar-saltvandsblanding, indtil koncentrationen er på $50 \mu\text{g}/\text{L}$, hvilket er nok til at slå de ikke-resistente celler ihjel.

Selektionsmediet opvarmes og tilsættes en petriskål, der derefter stilles til afkøling.

Algerne, der nu har vokset i et døgn, centrifugeres igen, hvorefter algekoncentratet påsmøres selektionsmediet.

Efter at have groet på selektionsmediet i 3 til 4 uger, vil nu kun alger, der har optaget mit DNA-konstrukt og dermed udtrykker Hygr, være tilbage på selektionsmediet som små kolonier.

Hver koloni overføres til en mærket dyrkningskolbe for at gro.

En prøve fra hver koloni udtages, for at se om DNA-constructet er indsat det korrekte sted i genomet, og derved udtrykker Dsup, ved brug af koloni-PCR.

Hver algeprøve lyseres med varme, hvorefter Dsup-primer, restriktionsenzymet NotI og DNA-polymerase tilsættes hver algeprøve. Hvis genet er indsat korrekt, vil Dsup-genet være til stede i PCR-opløsningen, hvilket vil kunne skannes af et PCR-program.

Hvis Dsup er til stede i PCR-opløsningen, har man på dette stadie succesfuldt integreret Dsup i *N. Oceanica* og da algekolonierne er vokset frem på selektionsmediet, har man sikret sig, at de genmodificerede celler har nedarvet Dsup-genet til deres afkom, da celledeling må have fundet sted i denne proces. Hermed er hovedformålet med mit forsøg nu opnået.



Bilag 8: Fase 4: Ioniserende stråling

For at eftervise indsættelsen af Dsup i *N. Oceanica*, vil jeg udsætte to genmodificerede og to naturligt forekommende kolonier for IR.

På mit gymnasium har jeg adgang til 8 radioaktive kilder af typen γ -stråling. Selvom strålingen på Mars bestod af 90% protoner, kan γ -stråling stadig være repræsentativt, da det blot er forskellen i respons på en given mængde IR hos algekolonierne, jeg kigger efter.

Ved bestråling, smøres 5 g algekoncentrat fra hver koloni på en agarplade fordelt over 10 cm^2 , hvorefter fire radioaktive kilder vil blive rettet mod pladen.

Ved at udsætte hver prøve for fire kilder i 5 døgn, vil disse, i teorien, have modtaget omkring 0,5 Sv.

Ved at udregne den ækvivalente strålingsdosis for Mars' overflade, ses det, at algeprøverne bliver udsat for en ækvivalent strålingsdosis svarende til et ophold på ca. 230 dage på Mars' overflade (Se Bilag 8.a for beregninger). Det skal dog gøres klart, at det på ingen måde kan sammenlignes med et ophold på Mars' overflade, da mange andre biologiske, skadelige faktorer også vil spille ind.

Dog burde det være en tilstrækkelig dosis IR, til at se forskelle i de forskellige algekoloniers vækst.

Man kan nu kvalitativt kigge på størrelsen og tætheden af algekolonierne og kvantitativt optælle algeceller pr overfladeareal under et mikroskop.

Herefter kan man begynde på databehandling.



Bilag 8.a: Strålingsdosis fra fire γ -kilder over 5 døgn.

Energi pr. sekund for hver af skolens γ -kilde i år 2021 er givet ved $\frac{3,6 \cdot 10^{-8} J}{s}$

Joule pr. kg i sekundet findes ved at gange $\frac{1}{kg}$ på energien pr sekund. Algerne vejede 5 g:

$$\frac{3,6 \cdot 10^{-8} J}{s} \cdot \frac{1}{0,005 kg} \approx 7,2 \cdot 10^{-6} \cdot \frac{Gy}{s}$$

Dog udgør min algeprøve kun en lille del af den kugle, som kilden sender stråling ud i. Energien der rammer prøven findes ved at dele arealet af algeprøven med arealet af kuglen.

Ved at placere hver kilde 4,5 cm fra den 10 cm^2 store algeprøve, modtager algerne:

$$\frac{10 \text{ cm}^2}{4 \cdot \pi \cdot (4,5 \cdot \text{cm})^2} \approx 4\% \text{ af hver kildes samlede udstråling.}$$

Dette svarer til

$$7,2 \cdot 10^{-6} \cdot \frac{Gy}{s} \cdot 0,04 = 2,88 \cdot 10^{-7} \cdot \frac{Gy}{s} \text{ fra hver kilde.}$$

Efter 5 døgn, må en algekoloni derved modtage:

$$\left(2,88 \cdot 10^{-7} \cdot \frac{Gy}{s} \cdot 4\right) \cdot (60 \cdot s \cdot 60 \cdot 24 \cdot 5) \approx 0,49 Gy$$

Gammastråling har en kvalitetsfaktor, Q, på 1, hvorfor den ækvivalente strålingsdosis, som algeprøverne modtager fra fire gammakilder over fem døgn, bliver på:

$$Gy \cdot Q = Sv$$

$$0,49 Gy \cdot 1 = 0,49 Sv$$

Den daglige stråling på Mars' overflade var blevet målt til gennemsnitlig $210 \frac{\mu Gy}{dag}$.

Bestrålingen består 90% af protoner, hvilket har en kvalitetsfaktor på 10. Derved bliver den ækvivalente strålingsdosis man modtager i døgnet på Mars rundt regnet:

$$210 \frac{\mu Gy}{dag} \cdot 10 = 2100 \frac{\mu Sv}{dag}$$

Hvor mange dage en ækvivalent strålingsdosis på 0,49 Sv svare til på Mars' overflade beregnes:

$$\frac{0,49 \cdot Sv}{2100 \cdot 10^{-6} \cdot \frac{Sv}{dag}} \approx 233,33 dag$$

Algeprøverne modtager altså en ækvivalent strålingsdosis svarende til et ophold på cirka 230 døgn på Mars' overflade.