

Funksjonell karakterisering av  
østrogenreseptor  $\alpha$  fra atlantehavstorsk  
(*Gadus morhua*);

kloning, ligandaktivering og induksjon av østrogenreseptor-  
signalveien i presisjonskuttete leverskiver

Masteroppgave i miljøtoksikologi

Oline Marie Steinkopf



Institutt for biologi

UNIVERSITETET I BERGEN

Oktober 2017



## **Forord**

Masteroppgaven er utført i miljøtoksikologigruppa ved institutt for biologi, UiB, som en del av forskningsprosjektene iCod 2.0 (prosjektnummer 244564) og dCod 1.0 (prosjektnummer 248840) som finansieres av Norges Forskningsråd og Universitetet i Bergen.

Jeg vil rette en stor takk til mine veiledere Odd André Karlsen og Anders Goksøyr. Takk for god hjelp og gode råd og tips, både under det praktiske arbeidet og under skriveprosessen. Takk til Roger Lille-Langøy som har kommet med gode forslag, tips og triks som har bidratt til å komme i mål med oppgaven. Tusen takk til Fekadu Yadetie som har vært en av leverskiveguruene mine og vært behjelpelig både på laboratoriet og i skriveprosessen. Tusen takk til Siri Goksøyr som ga meg god opplæring på laboratoriet, og dessuten alltid var behjelpelig hvis jeg hadde spørsmål. Takk til Libe Aranguren for at du ga meg god opplæring på qPCR, og for å ha hjulpet meg med statistiske analyser. Takk til Mari Kolås som hjalp meg i gang med slicingen av leverskiver. Takk til Sofie Söderstöm for god opplæring på luciferasebaserte genreportersystemer, og for at du alltid har vært behjelpelig og engasjert når jeg har hatt problemer på laboratoriet. Tusen takk til Pål Olsvik som har hjulpet meg med å normalisere data i geNorm. Sist, men ikke minst, takk til dere andre i miljøtoksikologigruppa. Jeg har kost meg masse i deres selskap.

Jeg vil også takke alle de fine menneskene jeg har møtt på min vei gjennom fem fantastiske år her på UiB! Tusen takk til «klassen» for det unike samholdet vi har hatt (takk til deg også, Kjersti Slettemark, som har blitt en del av «biologiklassen» til tross for at du hører til feil fakultet). Jeg vil også takke fiskefolka for mange fine stunder. Takk til roomiene mine Karen O. Kverme og kattene Kjellmar Steinkopf og Harald Kverme for verdens beste og morsomste kollektiv. Jeg vil også rette en takk til familien min, som jeg alltid kan regne med. Takk til vennene mine i Stavanger for fine avbrekk i ferier. Spesielt takk til deg, Silje Paulsen, som regelmessig har besøkt meg i Bergen og gitt meg god underholdning med dine artige påfunn.

Bergen, oktober 2017

Oline Marie Steinkopf



# Innholdsfortegnelse

Forord .....	I
Sammendrag .....	VII
Forkortelsesliste .....	VIII
1 Introduksjon .....	1
1.1 Bakgrunn .....	1
1.2 Atlanterhavstorsk ( <i>Gadus morhua</i> ) .....	1
1.3 Miljøgifter .....	3
1.3.2 Persistente organiske forbindelser (POP-er) .....	4
1.3.2. Hormonforstyrrende forbindelser (EDC-er) .....	5
1.4 Kjernereseptorer .....	6
1.4.1 VTG som biomarkør .....	13
1.4.2 Eksogene ER-ligander .....	13
1.5 Presisjonskuttete leverskiver (PKLS) .....	15
1.6 Gal4/UAS-luciferase-genreportersystem .....	15
1.7 Mål for oppgaven .....	17
2 Materialer .....	18
2.1 Kjemikalier .....	18
2.2 Kommersielle kit .....	22
2.3 Celler .....	23
2.4 Plasmid .....	23
2.5 Primere .....	24
2.6 Medium .....	26
2.7 Løsninger .....	27
2.8 Instrumenter .....	30
2.9 Programvare .....	31
3 Metoder .....	32
3.1 Oversikt over metoder .....	32
3.2 Prøvetaking .....	33
3.3 Protokoll for PKLS .....	33
3.4 Eksperimentelt design for eksponering av leverskiver .....	34
3.5 RNA-ekstraksjon .....	35
3.6 Agarosegelelektroforese .....	36

3.6.1 RNA-elektroforese .....	36
3.6.2 DNA-elektroforese .....	36
3.7 cDNA-syntese .....	36
3.8 Polymerasekjedereaksjon (PCR).....	38
3.8.1 qPCR .....	39
3.9 Viabilitets- og cytotoxissitetstest av PKLS .....	43
3.9.1 MTT-analyse .....	43
3.9.2 LDH-analyse .....	43
3.9.3 Analyser av data fra MTT- og cytotoxissitetstester .....	44
3.10 Primerdesign.....	44
3.11 Rask amplifisering av cDNA-ender (RACE).....	45
3.12 Ampifikasjonsbetingelser .....	49
3.13 Kloning.....	50
3.13.1 Rensing av nukleinsyrer fra agarosegel.....	50
3.13.2 Transformering av Escherichia coli .....	50
3.13.3 Identifikasjon av ønskede kloner (screening).....	51
3.13.4 Plasmidresing .....	51
3.14 Sangersekvensering .....	52
3.15 Setespesifikk mutagenese.....	53
3.16 Konstruksjon av plasmidet pCMX-Gal4-ER $\alpha$ .....	53
3.16.1 Kuttsetter for restriksjonsenzymmer.....	54
3.16.2 Partiell kutting med restriksjonsenzymmer .....	54
3.16.3 Kutting av DNA .....	54
3.16.4 Defosforylering .....	55
3.16.5 Ligering .....	56
3.17 Luciferasebasert genreportersystem .....	56
3.17.1 Kultivering av COS-7-celler .....	57
3.17.2 Utsåing av COS-7-celler .....	57
3.17.3 Transfeksjon av COS-7-celler .....	57
3.17.4 Eksponering.....	58
3.17.5 Lysering og enzymaktivitetsmåling .....	59
3.17.6 Databehandling og statistikk .....	59
4 Resultater.....	60

4.1 Induksjon av esr1 i PKLS eksponert for EE2 .....	60
4.2 Rask amplifisering av cDNA-ender (RACE).....	61
4.2.1 RACE-reaksjoner med PCR-additiver .....	62
4.2.2 Design av primere .....	64
4.2.3 Nukleotidinnhold.....	64
4.3 Kloning av ER $\alpha$ .....	65
4.4 Konstruksjon av reseptorplasmid .....	68
4.5 Luciferasebaserte genreporteranalyser .....	71
4.6 Ex vivo-eksponering med leverskiver .....	73
4.6.1 Viabilitets- og cytotoxicitetsanalyse .....	73
4.6.2 Eksponering og qPCR .....	75
5 Diskusjon.....	79
5.1 Oppregulering av ER $\alpha$ i PKLS eksponert for EE2.....	79
5.2 Vanskelige templatere for PCR-amplifikasjon .....	79
5.3 Ligandaktivering av ER $\alpha$ .....	80
5.3.1 Ligandaktivering ved eksponering for MXC .....	81
5.3.2 Ligandaktivering ved eksponering for END .....	82
5.3.3 Ligandaktivering ved eksponering for MIKS .....	82
5.4 Miljøgifteksponering av PKLS for å undersøke effekter på esr1 og vtg .....	84
5.4.1 Eksponering av PKLS for MXC for å undersøke effekt på esr1 og vtg.....	84
5.4.2 Eksponering av PKLS for END for å undersøke effekt på esr1 og vtg.....	86
5.4.3 Eksponering av PKLS for MIKS for å undersøke effekt på esr1 og vtg.....	87
5.5 Vurdering av metoder.....	88
5.5.1 Genreportersystemet brukt i denne oppgaven .....	88
5.5.2 Eksponering av PKLS .....	89
5.6 Konklusjon .....	90
5.7 Forslag til fremtidig arbeid.....	90
6 Referanser.....	93
Vedlegg A .....	104
Vedlegg B.....	106





## Sammendrag

Østrogenreseptor  $\alpha$  ( $ER\alpha$ ) er en steroidreseptor som spiller en viktig rolle i regulering av genuttrykning under kjønnsutvikling og vitellogenese hos teleoster. Den aktiveres naturlig av endogene østrogener, men kan også aktiveres av en rekke eksogene forbindelser. Av spesiell bekymring er persistente organiske miljøgifter (POP-er) som er lite nedbrytbare og kan transporteres over store avstander i miljøet. Atlanterhavstorsken (*Gadus morhua*) blir i økende grad benyttet som en modellorganisme for å studere effekten av slike forbindelser. Aktivering av  $ER\alpha$  fra torsk av eksogene forbindelser kan forstyrre kjønnsutvikling og føre til en feminisering av hannfisk. Deler av denne reseptoren fra torsk er tidligere klonet og sekvensert, men fremdeles er 3'-enden av genet ukjent.

I denne oppgaven har fokuset vært å klonere og sekvensere den ukjente 3'-enden til  $ER\alpha$ , for videre å etablere et luciferasebasert genreportersystem for å karakterisere reseptoren med hensyn på ligandaktivering av miljøgifter, inkludert metoksyklor (MXC), endosulfan (END) og en kombinasjon av disse (MIKS). Videre ble presisjonskuttete leverskiver (PKLS) fra tosk eksponert for de samme forbindelsene for å studere aktivering av  $ER\alpha$ -signalveien *ex vivo*. Responser i PKLS ble undersøkt ved å måle genuttrykket av østrogenreseptor  $\alpha$  (*esr1*) selv, og  $ER\alpha$ -målgenet vitellogenin (*vtg*) ved bruk av kvantitativ sanntids-polymerasekjedereaksjon (qPCR).

I denne oppgaven ble det vist med det luciferasebaserte genreportersystemet at både MXC, END og MIKS evner å aktivere  $ER\alpha$  fra torsk *in vitro*, der END ga kraftigst aktivering blant de undersøkte eksponeringsforbindelsene. I motsetning aktiverte ikke END  $ER\alpha$ -signalveien *ex vivo*, men derimot både MXC og MIKS oppregulerte uttrykkningen av *vtg*. Forskjeller i respons observert mellom *in vitro*- og *ex vivo*-forsøkene kan være en følge av at biotransformasjoner i større grad fant sted i leverskivene sammenlignet med i cellene brukt i genreportersystemet.

## Forkortelsesliste

Forkortelser	Fullt navn
AGE	Agarosegelelektroforese
<i>arp</i>	Arginin-rikt protein
$\beta$ -gal	$\beta$ -galaktosidase
bp	Basepar
CALUX	Kjemisk aktivert luciferase-genuttrykningsanalyse
CAR	Konstitutiv androstanereseptor
cDNA	Komplementært DNA
$C_t$	Terskelverdi
CYP	Cytokrom P450
DBD	DNA-bindende domene
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
dNTP	Deoksynukleotider
DTT	Ditiotreitol
E2	17 $\beta$ -østradiol
EC50	Halv maksimal effektiv konsentrasjon
EDC	Hormonforstyrrende forbindelse
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
EE2	17 $\alpha$ -etynyløstradiol
EGTA	Etylene glykol-bis(2-aminoetyleter)-N,N,N',N'-tetraeddiksyre
END	Endosulfan
ER	Østrogenreseptor
ER $\alpha$	Østrogenreseptor $\alpha$

<b>Forkortelser</b>	<b>Fullt navn</b>
ER $\beta$	Østrogenreseptor $\beta$
ER $\beta$ -I	Østrogenreseptor $\beta$ 1
ER $\beta$ -II	Østrogenreseptor $\beta$ 2
ERE	Østrogenresponselement
<i>esr</i>	Østrogenreseptor
<i>esr1</i>	Østrogenreseptor $\alpha$
<i>esr2</i>	Østrogenreseptor $\beta$
<i>esr2,1</i>	Østrogenreseptor $\beta$ 1
<i>esr2,2</i>	Østrogenreseptor $\beta$ 2
FBS	Fetalt kalveserum
FRET	Fluorescensresonansenergitransfer
GC	Guanin-cytosin
gsp	Genspesifikk primer
HPG	Hypotalamus-hypofyse-gonade
HPGL	Hypotalamus-hypofyse-gonade-lever
HPTE	2,2-bis(p-hydroksyfenyl)-1,1,1-trikloretan
HRE	Hormonresponselement
HSP70	Varmesjokk-protein 70
HSP90	Varmesjokk-protein 90
LBD	Ligandbindende domene
LC50	Dødelig konsentrasjon, 50 %
LDH	Laktatdehydrogenase
LOEC	Lavest observerte effektkonsentrasjon
MIKS	En blanding av metoksyklor og endosulfan
MTT	Thiazolyblåtetrazoliumbromid
MXC	Metoksyklor

<b>Forkortelser</b>	<b>Fullt navn</b>
NR	Kjernerreseptor
ONPG	2-Ntrofenyl $\beta$ -D-galaktopyranosid
PBS	Fosfatbufret løsning
PCR	Polymerasekjedereaksjon
PKLS	Presisjonskuttete leverskiver
POP-er	Persistente organiske forbindelser
PXR	Promiskuøs xenobiotikareseptor
qPCR	Kvantitativ sanntids-polymerasekjedereaksjon
RNA	Ribonukleinsyre
<i>rpl22</i>	Ribosomalt protein L22
RPM	omdreininger per minutt
RT	Romtemperatur
RXR	Retinoid X-reseptor
SAP	Alkalisk fosfatase fra reke
SEM	Standardfeil av gjennomsnittet
TBE	Tris-borsyre-EDTA
T <sub>m</sub>	Smeltetemperatur
UAS	Oppstrøms aktiveringssekvenser
VTG	Vitellogenin

I oppgaven er proteiner angitt med STORE bokstaver, og gener med små bokstaver i *kursiv* i henhold til retningslinjer gitt av HUGO Gene Nomenclature Committee.



# 1 Introduksjon

## 1.1 Bakgrunn

Nye miljøgifter blir stadig oppdaget i biota, også i avsidesliggende områder som arktiske og polare strøk. De biologiske effektene til mange av disse miljøgiftene er foreløpig ukjente, men flere av stoffene ser ut til å ha egenskaper som gjør dem resistente mot fysisk, kjemisk og biokjemisk degradering, og de kan dermed akkumulere i miljøet og i organismer (Halsall, 2004).

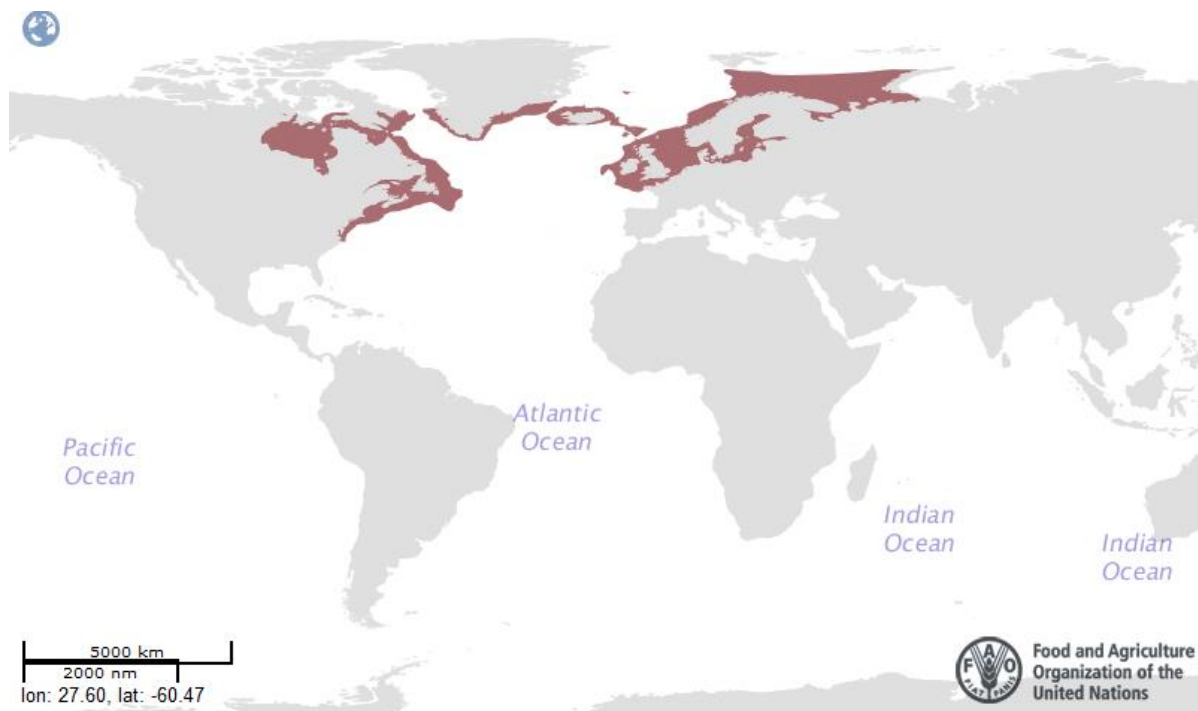
Det har blitt vist at en rekke menneskeskapte forbindelser kan virke hormonforstyrrende, selv ved lave konsentrasjoner (Eroschenko et al., 1996, Wu et al., 2008, WHO, 2012). Disse stoffene kan interferere med syntesen, transporten, sekresjonen, virkemåten eller elimineringen av naturlige hormoner i kroppen. Resultatet av dette kan være nedsatt reproduksjonsevne, forstyrrelser i utvikling og vekst og/eller endringer i adferd (Campbell et al., 2006). Forstyrrelser av det endokrine systemet hos både mennesker og dyr er av global bekymring. Hormonforstyrrende forbindelser (EDC-er) ender gjerne opp i akvatiske miljøer hvor blant annet fisk er spesielt utsatt for eksponering gjennom utslipp som stammer fra avløp og landbruk (Tohyama et al. 2016). I nyere tid har menneskeskapte stoffer som perfluoreerte sulfonsyrer, en rekke bromerte flammehemmere, og forskjellige siloksaner har blitt funnet i atlantehavstorsk (*Gadus morhua*) (Herzke et al. 2013).

## 1.2 Atlanterhavstorsk (*Gadus morhua*)

Atlanterhavstorsk er en teleost i torskefamilien (Gadidae). Den har både signifikant økonomisk, kulturell og økologisk betydning (Link et al., 2009). I 2011 var atlantehavstorsk Norges kommersielt viktigste villfangede fiskeart (Julshamn et al., 2013a). Geografisk befinner atlantehavstorsken seg fra Cape Hatteras (Nord-Carolina, USA) til Ungava Baya (Canada) langs den nordamerikanske kysten, og den strekker seg videre langs øst- og vestkysten av Grønland. Den befinner seg rundt Island, og langs kystene i Europa fra Biscayabukta til Barentshavet, inkludert området rundt Bjørnøya (Drinkwater, 2005) (Figur 1). Atlanterhavstorsken kan deles inn i kysttorsk og havtorsk (skrei). Ved bruk av DNA-markører, har det blitt fastslått at bestandene av kysttorsk og skrei skiller seg fra hverandre genetisk. De genetiske forskjellene gjenspeiles i ulik atferd og tilpasninger til ulike miljøer. Dessuten er den genetiske variasjonen mindre blant skrei enn blant kysttorsk (Hemmer-Hansen et al., 2013, Kirubakaran et al., 2016). Kysttorsk er langt mer stedbunden enn skrei. Skreien lever mesteparten av livet sitt pelagisk i Barentshavet. Når den er kjønnsmoden vandrer den til kysten

for å gyte. Atlanterhavstorsk, særlig kysttorsk da denne holder til nærmere kysten, er blant annet utsatt for avrenning fra urbane strøk (Julshamn et al., 2013b). Mange olje- og gassplattformer i finnes i områder der torsk holder til. Oljeutslipp i disse områdene kan påvirke torskeindivider over lange perioder, også ved sårbare livsstadier som tidlig i utviklingen (Bohne-Kjersem et al., 2009, Hutchings et al., 1993). Grunnet torskens omfattende utbredelse blir den ofte brukt som indikatorart for miljøgifter i marine økosystemer (Karl et al., 2016), blant annet av Oslo-Paris-kommisjonen (OSPAR) (Ospar, 2009).

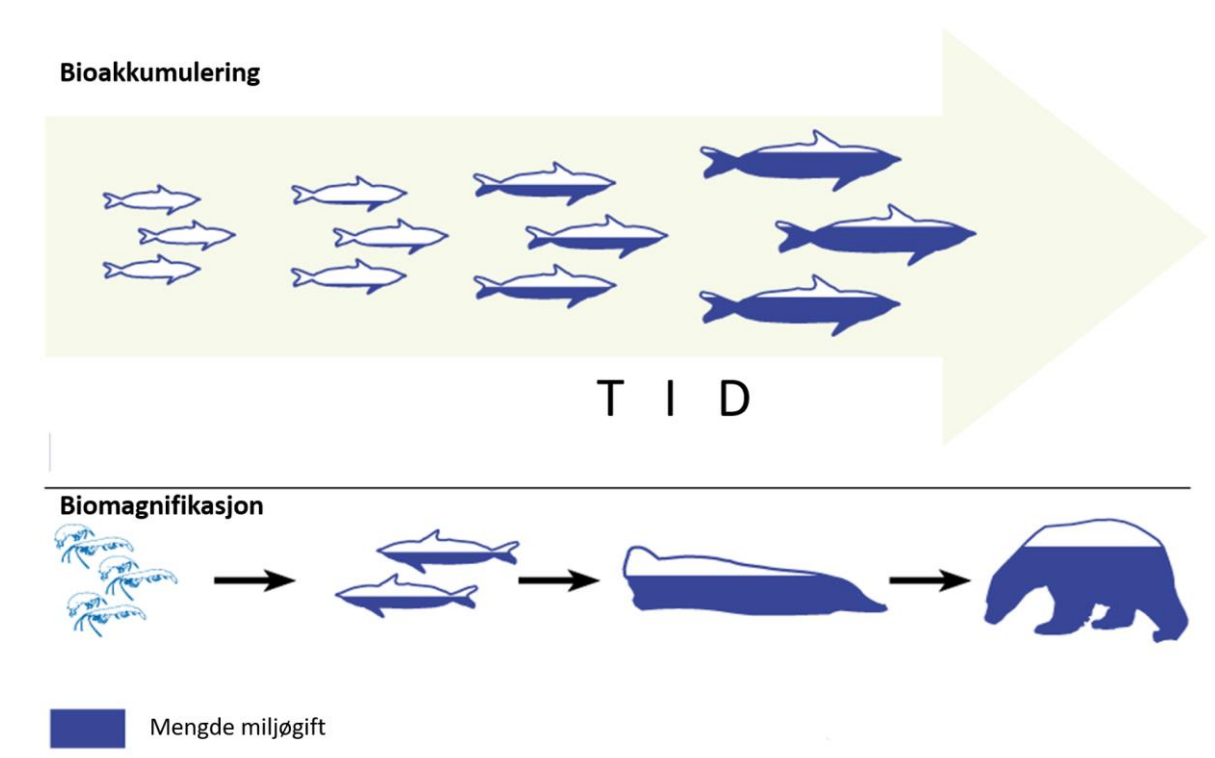
I 2011 ble atlanterhavstorskens genom kartlagt gjennom «The cod genome project» (Star et al., 2011). Gjennom kartleggingen av genomet ble det identifisert 22 154 gener. Genomsekvenseringen åpner opp for å bruke toksikogenomiske metoder (genomikk, proteomikk og metabolomikk) for å kartlegge hvordan atlanterhavstorsken responderer på miljøgifter, og bidrar til å etablere torsk som en modellorganisme i toksikologiske studier (Karlsen et al., 2011, Yadetie et al., 2013).



**Figur 1. Atlanterhavstorskens (*Gadus morhua*) utbredelse.** De rødlige områdene indikerer atlanterhavstorskens utbredelse nord i Atlanterhavet. Illustrasjonen er hentet fra FAO (2017).

### 1.3 Miljøgifter

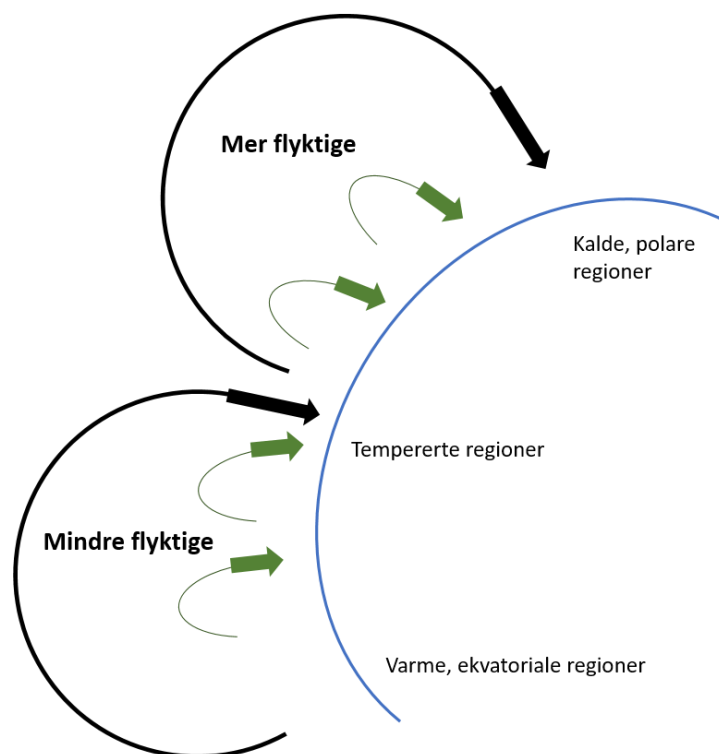
Miljøgifter er en samlebetegnelse på menneskeskapt stoffer som er, eller antas å være giftige selv i svært lave konsentrasjoner. I naturen kan miljøgifter brytes ned til ufarlige forbindelser, men mange stoffer er persistente og har dermed svært lang nedbrytningstid. Miljøgifter kan derfor være tilstede i naturen lenge etter at utslippene har opphørt. Noen miljøgifter er akutt giftige, mens andre har en mer langvarig og kronisk effekt. Effekten av miljøgifter varierer også stort i omfang, der noen blant annet kan være kreftfremkallende, føre til nedsatt reproduksjonsevne og/eller føre til DNA-skader (Šrám et al. 1999). Mange miljøgifter er også fettløselige, og kan dermed avsettes og lagres i fettvev hos dyr. Spesielt miljøgifter som er lite nedbrytbare er et problem da disse kan akkumulere i levende organismer. Når miljøgifter hopper seg opp i organismer kalles dette bioakkumulering, og forekommer når absorpsjonsraten av forbindelsen er høyere enn ekskresjonsraten. Persistente miljøgifter kan samtidig øke i konsentrasjon med økende trofiske nivåer i næringskjedene, dette kalles biomagnifikasjon (Figur 2) (Kelly and Gobas, 2001).



**Figur 2. Bioakkumulering og biomagnifikasjon.** Persistente og fettløselige forbindelser kan over tid oppkonsentreres i organismer (bioakkumulering) og øke i mengde mellom trofiske nivåer (biomagnifikasjon). Bildet er modifisert fra Olenick (2013).



Miljøgifter er som regel et biprodukt av forbruk, avfallshåndtering, industriell produksjon, transport og energiproduksjon. Miljøgiftene kan frigjøres til miljøet på ulike måter, enten gjennom utslipp til atmosfæren, vannsystemer eller jordsmonnet, og kan forbli i omgivelsene i generasjoner (Wong et al., 2012). Persistente miljøgifter transporteres til fjerne strøk gjennom atmosfæren og med havstrømmer. For de fleste miljøgiftene er atmosfæren den raskeste transportformen. Flyktige miljøgifter som slippes ut i varmere områder fordamper. På den nordlige halvkule vil luftstrømmene bevege seg mot Arktis. Miljøgiftene blir med luftstrømmene til kaldere strøk, kondenserer og avsettes i miljøet ved de lave temperatuere over polare områder, denne effekten kalles «gresshoppeeffekten» (Figur 3) (Gouin et al. 2004).

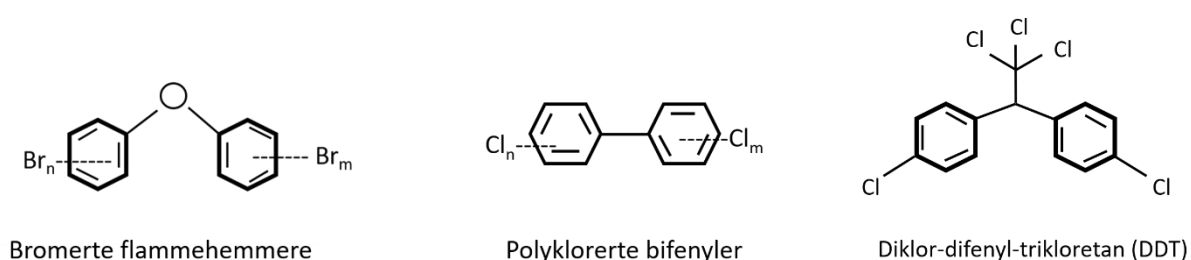


**Figur 3.** «Gresshoppeeffekten». Flyktige forbindelser som slippes ut i varmere regioner fordamper og fraktes med luftstrømmer til kaldere strøk hvor de kondenserer og avsettes i miljøet.

### 1.3.2 Persistente organiske forbindelser (POP-er)

Persistente organiske forbindelser (POP-er) er en samlebetegnelse på karbonholdige miljøgifter som er motstandsdyktige mot nedbrytning via biologiske, kjemiske og fotolytiske prosesser. Grunnet denne egenskapen er POP-er utsatt for langtransport og kan forflytte seg langt fra der de ble avsatt. Det kan derfor være vanskelig å spore disse stoffene til den opprinnelige kilden til utslipp. En annen egenskap for POP-er er deres lipofile karakter. Disse forbindelsene er derfor spesielt utsatt for bioakkumulering og biomagnifisering (Harrad, 2009).

I 2001 signerte en rekke land Stockholm-konvensjonen som et ledd i utfasingen av flere POP-er. Denne konvensjonen inkluderte kjemikaliene aldrin, klordan, DDT, dieldrin, endrin, heptaklor, heksaklorbenzen, mirex, polyklorerte bifenyler, polyklorerte dibenzo-p-dioksiner, polyklorerte dibenzofuraner og toksafen (også kjent som "the dirty dozen"). Mange av disse er nå utfaset grunnet forbud og restriksjoner mot anvendelse og produksjon. I dag har flere kjemikalier blitt klassifisert som POP-er og omfavnet av Stockholm-konvensjonen, blant annet enkelte karsinogene polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH-er), bromerte flammehemmere og noen organometalliske forbindelser som tributyltinn (TBT) (Figur 4) (Karlagnis et al., 2001).



**Figur 4. Eksempel på strukturer til noen POP-er**

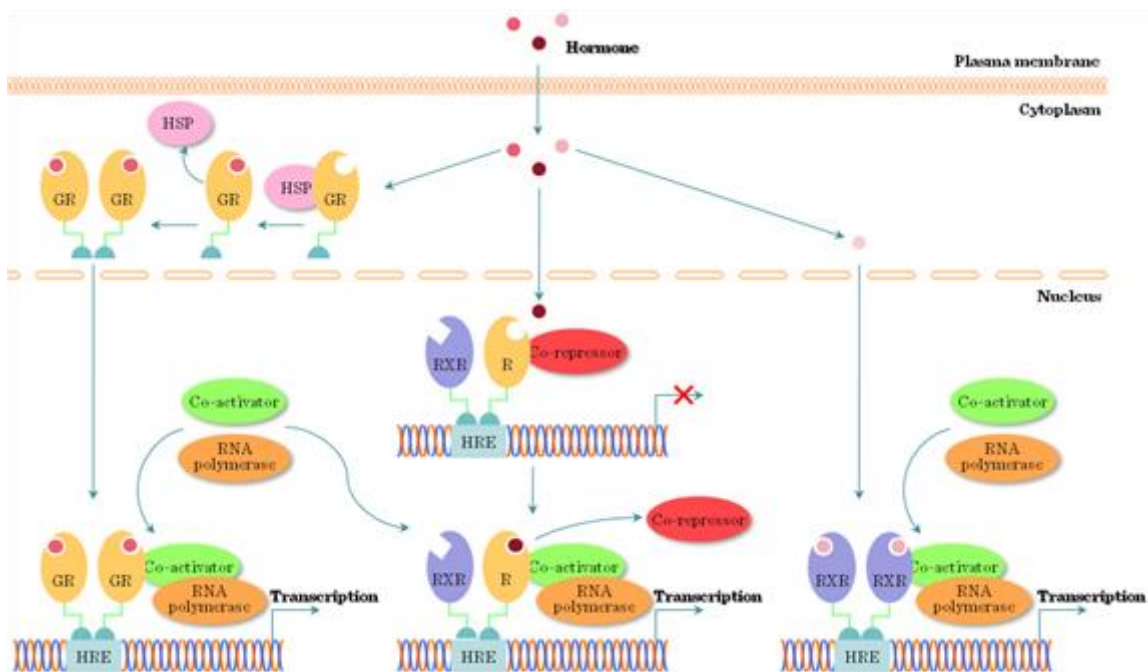
### 1.3.2. Hormonforstyrrende forbindelser (EDC-er)

Organoklorerte pesticider, alkylfenolforbindelser, ftalater og PCB-er er miljøgifter som tidligere har blitt indentifisert som hormonforstyrrende stoffer (Crisp et al., 1998, Meerts et al., 2001). Hormonforstyrrende forbindelser (EDC-er) er eksogene kjemikalier som kan forstyrre hormonreguleringen av det endokrine systemet. Eksponering for slike kjemikalier kan skape alvorlige effekter på dyr ved at de kan innvirke på forskjellige molekulære mekanismer som produksjon, metabolisme og eliminering av hormoner, og etterligne hormonfunksjoner ved avgjørende utviklingsstadier (Tabb and Blumberg, 2006).

Hos vertebrater kontrollerer hypotalamus-hypofysen-gonade-aksen (HPG-aksen) utvikling og reproduksjon. Fordi denne aksen i stor grad kontrolleres av hormoner, er den et potensielt mål for mange EDC-er. Leveren er et viktig organ i metaboliseringen av steroider, legemidler og xenobiotika, og er derfor sterkt knyttet til HPG-aksen. I eggleggende organismer syntetiseres mange eggeplomme- og eggeskall-proteiner i leveren. Transkripsjonen av disse proteinene reguleres gjennom østrogenreseptoren (ER), som er en ligandaktivert transkripsjonsfaktor. I disse organismene refereres ofte HPG-aksen til som hypotalamus-hypofyse-gonade-leveraksen (HPGL-aksen) (Hachfi et al., 2012).

## 1.4 Kjernereseptorer

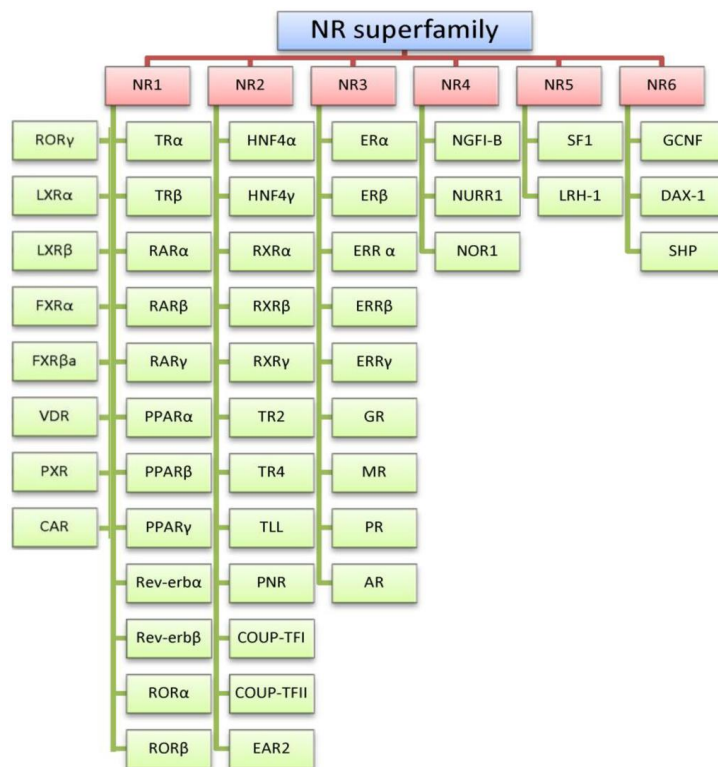
Kjernereseptorer (NR-er) er proteiner i en superfamilie av ligandaktiverte transkripsjonsfaktorer. Avhengig av hvor godt tilpasset en ligands struktur er til en reseptors ligandbindende lomme, kan ligand enten aktivere reseptoren og mediere en respons (agonist) eller binde til en reseptor uten å mediere respons, og dermed blokkere dens funksjon (antagonist) (Moras and Gronemeyer, 1998). De ulike kjernereseptorene har forskjellige ligandbindende egenskaper, og gjenkjenner derfor ulike ligander (Bourguet et al., 2000). Når en agonist binder til en kjernereseptor, aktiveres reseptoren ved at den forandrer dens strukturelle konformasjon. Dette fører til binding til, eller frigjøring fra, spesifikke responselementer i DNA som resulterer i enten opp- eller nedregulering av transkripsjonen av kjernereseptorens målgener (Figur 5) (Bertrand et al., 2007).



**Figur 5. Eksempel på virkemåte for noen kjernereseptorer.** Når agonister ikke er tilstede vil noen kjernereseptorer danne et kompleks med stabiliserende varmesjokk-proteiner. Når reseptoren aktiveres av ligand, vil reseptoren dissosiere fra komplekset og transporteres til cellekjernen for å initiere transkripsjon av målgener. Andre kjernereseptorer finnes allerede i kjernen. Når reseptoren aktiveres av ligand vil ko-repressorer dissosiere / ko-aktivatorer assosiere og transkripsjon av målgener initieres. Figuren er hentet fra Berki et al. 2011.

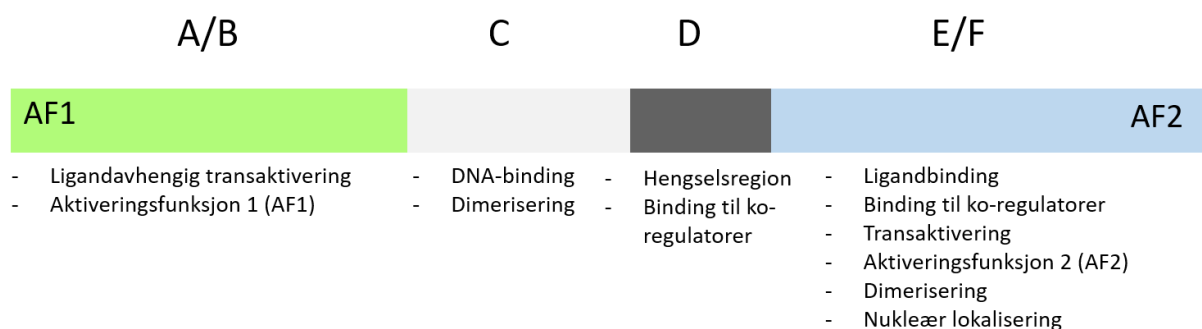
NR-ene deles inn i seks evolusjonære grupper (Figur 6). I gruppe 1 finnes blant annet konstitutiv androstanreseptor (CAR) og promiskuøs xenobiotikareseptor (PXR). Disse reseptorene dimeriserer med retinoid X-reseptoren (RXR) når de aktiveres. CAR og PXR er av spesiell

interesse da det er vist at begge kan aktiveres av en rekke legemidler og miljøgifter. Teleoster mangler CAR (Krasowski et al., 2005) og PXR ser ut til å være fraværende i torsk (Eide et al., manuskript under utarbeidelse). I pattedyr er begge høyt uttrykt i leveren. Rollen til disse reseptorene er blant annet å regulere transkripsjon av cytokrom P450-enzymmer (CYP-enzymmer), som bidrar i biotransformasjonen av fremmedstoffer. Reseptorene har også viktige roller i metabolismen av endogene forbindelser og er med på å regulere viktige fysiologiske funksjoner som syntese av kolesterol, steroider og andre lipider (Yang and Wang, 2014, Lehmann et al., 1998). Gruppe 3 inkluderer steroidreseptorer som østrogenreseptor (ER) og androgenreseptor (AR) (Germain et al., 2006). Disse reseptorene er en del av HPG-aksen og regulerer en rekke gener som er essensielle for normal kjønnsutvikling og reproduksjon. Naturlig aktiveres steroidreseptorene av endogene forbindelser, men de er også et potensielt mål for en rekke eksogene EDC-er (Rudel et al., 2003, Andersen et al., 2002, Hachfi et al., 2012).

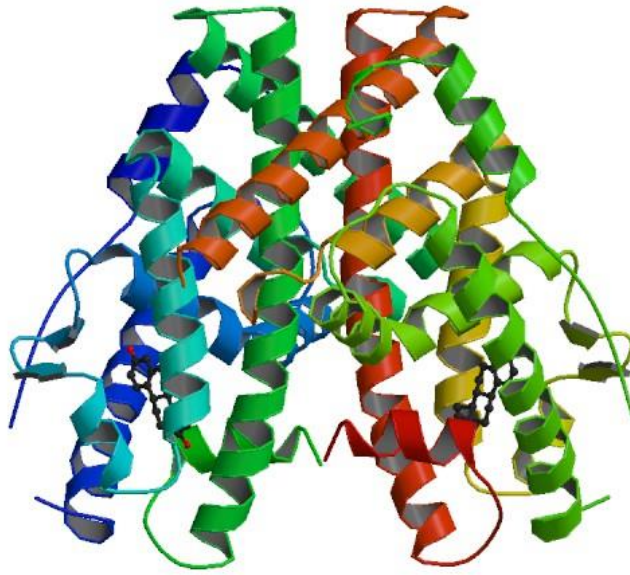


**Figur 6. Oversikt over de ulike familiene og subfamiliene av kjernereseptorene** Bildet er hentet fra Ng et al. 2014.

De aller fleste kjernereseptorene er bygd opp av fem ulike regioner (Figur 7). N-terminalt består de av A/B-domenet. Dette domenet innehar en aktiveringsfunksjon, kalt aktiveringsfunksjon 1 (AF1), som har en rolle i en liganduavhengig aktivering av reseptoren (Germain et al., 2006). Den neste regionen, C-domenet, inneholder det DNA-bindende domenet (DBD). Dette domenet binder spesifikke DNA-sekvenser kjent som hormonresponselementer (HRE) i promotorområdet oppstrøms for målgenene reseptoren kontrollerer. DBD er den mest konserverte regionen mellom kjernereseptorene i de ulike subfamiliene. DBD består av to svært konserverte sinkbindende motiv («sinkfingre») som er nødvendig for at DBD skal folde seg korrekt. DNA-gjenkjenning skjer av aminosyrer assosiert med det første sinkionet i et område kalt P-boksen. Aminosyrer assosiert med det andre sinkionet bidrar til reseptordimerisering i et område kalt D-boksen (Schwabe et al., 1995, Mangelsdorf et al., 1995, Klug and Rhodes, 1987). Kjernereseptorer har også en hengselsregion, kalt D-domenet. Domenet kobler sammen DBD og det ligandbindende domenet (LBD) og bidrar til strukturell fleksibilitet. D-domenet er lite konservert mellom kjernereseptorer, og innehar ofte nukleære lokaliseringssignaler for transport gjennom kjernemembranen (Ham and Parker, 1989, Nelson and Habibi, 2013). E-domenet, eller LBD, innehar aktiveringsfunksjon 2 (AF2) som induseres når ligand binder i ligandbindingslommen. LBD består av 12  $\alpha$ -helikser (H1-H12) med en  $\beta$ -sving mellom H5 og H6. I midten av strukturen dannes en hydrofob lomme der liganden assosierer til proteinet (Figur 8). (Brzozowski et al., 1997). LBD er også viktig for reseptor-dimerisering, og interaksjon med varmesjokk-proteiner og ko-regulatorer (Aranda and Pascual, 2001, Nelson and Habibi, 2013). Helt C-terminalt finner man F-domenet. Ikke alle kjernereseptorer har dette domenet, og domenet innehar foreløpig ingen kjent funksjon. Sekvensen til F-domenet varierer i stor grad mellom de ulike kjernereseptorene (Huang et al., 2010).



**Figur 7. Generell oppbygning av en kjernereseptor.** N-terminalt befinner A/B-regionen seg med den liganduavhengige aktiveringsfunksjonen AF1. D-domenet er det DNA-bindende domenet som binder hormonresponselementer (HRE) i DNA. Hengselsregionen, eller D-domenet, kobler sammen C- og E-domenet. E-domenet, eller det ligand-bindende domenet, gjenkjenner liganden og «skruer på» reseptoren når agonist binder. Denne regionen innehar den ligandavhengige aktiveringsfunksjonen AF2. C-terminalt finner man F-domenet, som i stor grad varierer i ulike kjernereseptorer. Figuren er modifisert fra Huss and Kelly (2004).

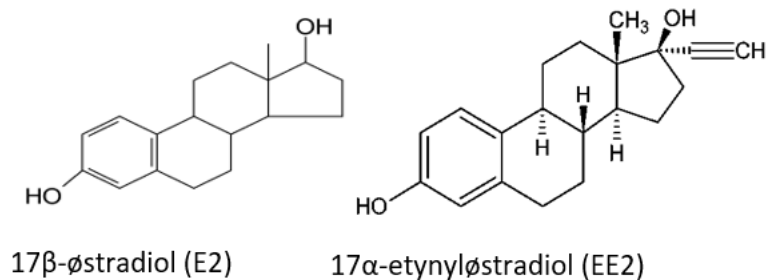


**Figur 8. Krystallstrukturen til ER-LBD fra menneske.** Her vises ER-LBD bundet til østradiol (E2). Figuren er hentet fra Brzozowski et al. (1997).

Selv om NR-ene sin struktur er evolusjonært svært konserverv, er det stor variasjon i funksjon og virkemåte mellom transkripsjonsfaktorene. Enkelte NR-er binder DNA som monomerer, men de fleste virker som homo- eller heterodimerer. Noen NR-er, som for eksempel vitamin D-reseptoren (VDR), kan enten danne homodimerer, eller danne heterodimerer sammen med retinoid X-reseptoren. Østrogenreseptoren (ER) derimot, binder enten som homodimerer, eller som heterodimer mellom isoformene ER $\alpha$  og ER $\beta$ , til et palindromisk bindingssete med seks inverterende basepar (AGGTCAnnnTGACCT) (Weigel, 1996, Schwabe et al., 1993b, Schwabe et al., 1993a).

#### **1.4.1 Østrogenreseptor $\alpha$ (ER $\alpha$ ), dens ligander og funksjon**

Østrogenreseptoren (ER) er en kjernereseptor som er medlem av subfamilie 3A. Den er essensiell for kjønnsutvikling og reproduktive funksjoner. Reseptorens mest potente endogene ligand er 17 $\beta$ -østradiol (E2) (Figur 9), men den kan også aktiveres av en rekke andre forbindelser som for eksempel 17 $\alpha$ -etynylostradiol (EE2), som er et syntetisk derivat av E2 (Heldring et al., 2007). Det er tidligere vist at noen miljøgifter evner å aktivere ER, blant annet metoksyklor, endosulfan, bisfenol A, nonylfenol og DDT (Laws et al., 2000, Hemmer et al., 2001, Versonnen et al., 2004, Hoekstra et al., 2001)



**Figur 9. Typiske ER-ligander.** Strukturen til den endogene ER-liganden 17β-østradiol er vist til venstre, mens strukturen til det syntetiske østrogenet 17α-etynyløstradiol er vist til høyre i figuren.

I pattedyr finnes det to varianter av ER (ERα og ERβ) som kodes fra to forskjellige gener. Disse subtypene er svært like i DBD (96 % aminosyreidentitet), men har en signifikant forskjell i LBD med omtrent 59 % aminosyreidentitet. Selv om 17β-østradiol (E2), som er reseptorens naturlige ligand, har omtrent lik affinitet for begge subtypene, binder de noen syntetiske ligander med ulike affiniteter (Harrington et al., 2003). Den eksakte funksjonen av østrogensignalisering i mange biologiske prosesser er fremdeles uklar. Forsøk med knockout-mus (KO-mus) har vist at både hannlige og hunnlige ERα-KO-mus er infertile. For ERβ-KO-mus er det vist at hunner har nedsatt fruktbarhet mens hanner har normal fruktbarhet (Chen et al., 2008). Det er også vist at ERα-KO-mus har redusert frigjøring av prolaktin, mens dette ikke er tilfellet i ERβ-KO-mus. I pattedyr uttrykkes ERα generelt i alle vev, mens ERβ hovedsakelig uttrykkes i eggstokker, lunger og prostata (Couse et al., 1997). I motsetning til pattedyr, har strålefinnefisker (*Actinopterygii*) minst tre subtyper av ER. Disse er navngitt ERα, ERβ-I og ERβ-II (Hawkins et al., 2000, Ma et al., 2000). ERα fra fisk er ortolog til ERα i pattedyr og andre vertebrater. ERβ-II i fisk er ortolog til ERβ i pattedyr. ERβ-I i fisk har ingen ortolog blant pattedyrene, men er nært beslektet (paralog) med ERβ-II og har oppstått som følge av en genduplisering (Hawkins and Thomas, 2004; Hawkins et al., 2000; Tohyama et al., 2015).

En studie utført på regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) har undersøkt funksjonelt bidrag fra ERα sammenlignet med ERβ-former på VTG-syntesen, og konkluderte med at ERβ er hovedmediatoren for vitellogeninproduksjon (Leaños-Castañeda and Van Der Kraak, 2007). Videre har forsøk på gullfisk (*Carassius auratus*) vist at ved å sette ERα ut av spill ble VTG-induksjonen senket hos begge kjønn, mens å sette ERβ-I eller ERβ-II ut av spill totalt hemmet VTG-induksjon hos hannindivider, men bare reduserte induksjonen hos hunnindivider (Nelson and Habibi, 2010). Nagasawa et al. (2014) har tidligere klonet en del av hver av de tre ER-variantene hos atlanterhavstorsk. I tillegg har de vist uttrykkningen av de tre paraloge

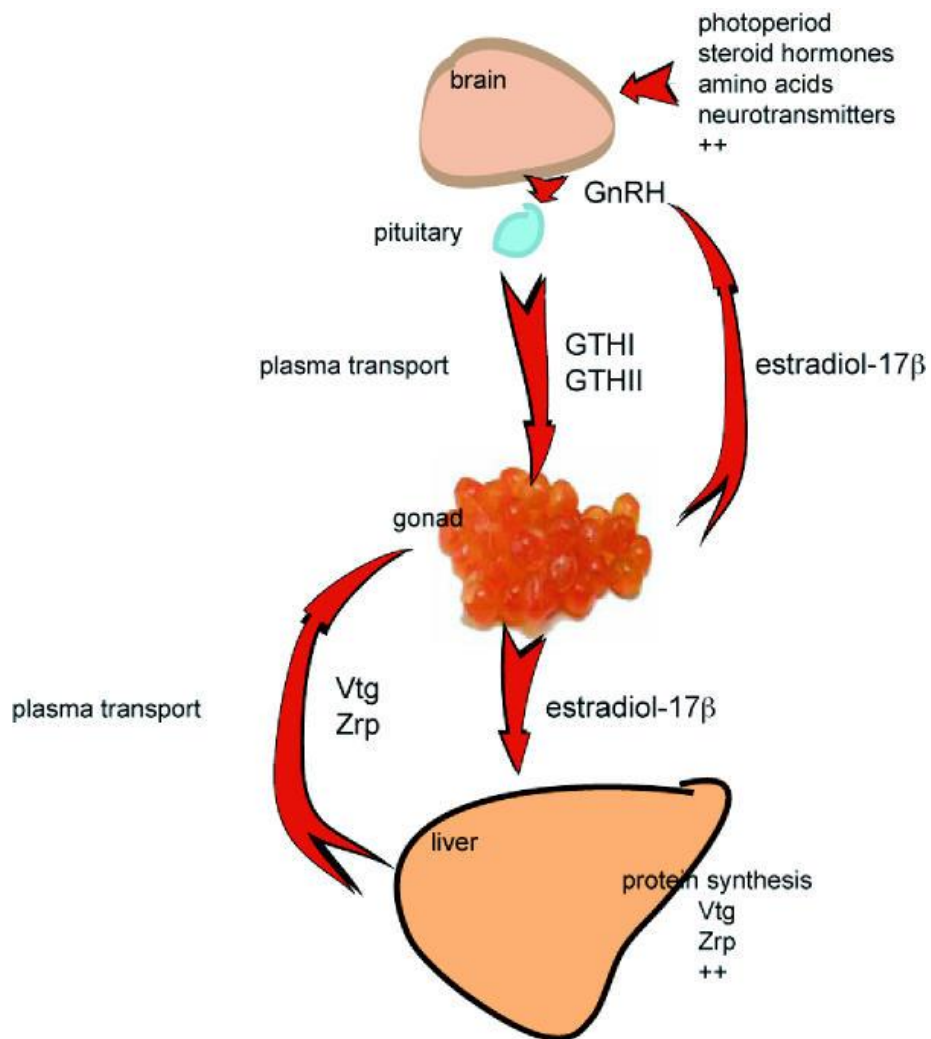
østrogenreseptorgenene (*esr*-paralogene) i ulike vev. Hos hunntorsk er *esr1* hovedsakelig uttrykt i lever, men også noe uttrykt i gonader. Hos hanntorsk ser det ut til at *esr1* har høyest uttrykning i gonader, men at det også er relativt høy uttrykning i lever og nyre. Uttrykning av *esr* er først oppdaget i teleoster ved embryonalt stadium, og indikerer at østrogensignalisering har en essensiell rolle under larveutvikling (Lassiter et al., 2002). Studier har vist at uttrykning av de ulike *esr*-variantene varierer i løpet av livet. Hos hunnfisk er *esr1* hovedsakelig uttrykt i ferdig utviklede gonader, *esr2,1* er hovedsakelig uttrykt under utviklingen av gonadene, mens uttrykning av *esr2,2* varierer i stor grad (Chen et al., 2011, Ding et al., 2016).

Når ligand ikke er til stede, finnes ER hovedsakelig i cytoplasma i kompleks med inhiberende varmesjokk-proteiner (HSP70 og HSP90). Når en ligand som aktiverer reseptoren er tilstede, forsvinner HSP-komplekset, reseptoren danner enten en homodimer eller en heterodimer med andre ER-subtyper, og transporteres til kjernen der den binder til østrogenresponselementer (ERE) i målgener (Figur 5) (Nelson and Habibi, 2013; Weigel, 1996).

Østrogen spiller en viktig rolle i reproduktiv utvikling hos hunner. I pattedyr er de viktige i oogenesisen og utvikling av livmor (Huet-Hudson et al., 1990, Bukovsky et al., 2005). Hos fisk (og andre eggleggende organismer) er de særdeles viktige for å stimulere produksjonen av vitellogenin (VTG) og eggeskallprotein (zona radiata-protein/koriogenin) i leveren, som er viktige proteiner i oogenesisen (Figur 10). Disse østrogenresponsene medieres gjennom østrogenreseptorer (Tohyama et al., 2015). Det er også vist at ER $\alpha$  oppreguleres av østrogen, og at oppreguleringen i stor grad korrelerer med induksjon av VTG-syntesen (MacKay et al., 1996, Nelson and Habibi, 2013). ER kan også aktiveres av eksogene substanser, og forstyrre kjønnsutviklingen hos både hos mennesker og dyr. Forsøk og studier fra både felt og laboratorium har tidligere vist at aktivering av østrogenreseptor hos hannfisk kan føre til en feminisering (Gimeno et al., 1998, Filby et al., 2007, Gross-Sorokin et al., 2006). Hannfisk eksponert for østrogene substanser kan bli infertile og begynne å produsere VTG og egg i testikkelvev. I et forsøk i the Experimental Lakes Area (ELA) (Canada) ble storhodet ørekyte (*Pimephales promelas*) kronisk eksponert for 5-6 ng/L EE2, et derivat av E2 som brukes i en rekke p-piller, over en periode på tre år. Det ble vist at hannfisk begynte å produsere VTG, og individer fra den eksponerte innsjøen hadde en VTG-konsentrasjon tretti ganger høyere enn ueksponerte hanner, og over ti ganger så høy som ueksponerte hunner. Det ble også vist påvirkning på utviklingen av gonader hos både hunn- og hannfisk, der hannfisk viste en feminisering og hunnfisk viste endret oogenese. Under forsøket ble arten nesten utryddet fra



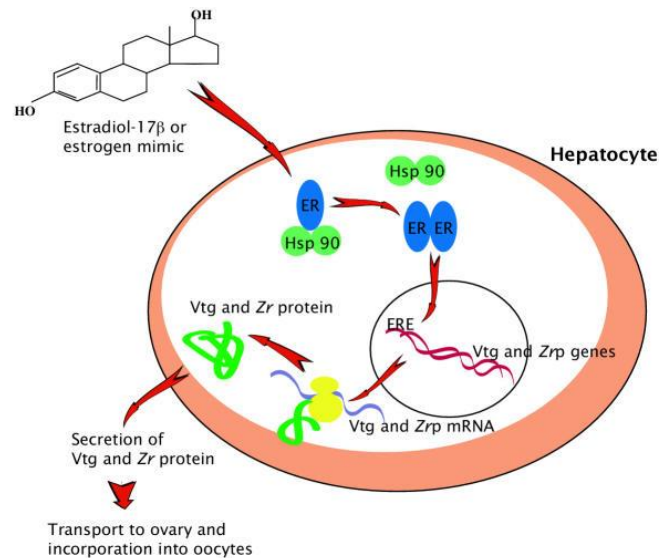
innsjøen grunnet nedsatt reproduttiv suksess som følge av EE2-eksponeringen (Kidd et al., 2007).



**Figur 10. Syntesen av vitellogenin (VTG).** Syntesen av VTG og andre proteiner essensielle i oogenesen medieres gjennom HPGL-aksen i hunnlige teleoster. I leveren binder E2 til ER og induserer transkripsjonen av blant annet *vtg* og zona radiata-protein (*zrp*). Proteinene fraktes til gonadene hvor de inkorporeres i modne oocytter. Figuren er hentet fra Arukwe and Goksøyr (2003).

### 1.4.1 VTG som biomarkør

Biomarkører er målbare indikatorer for en biologisk tilstand. Biomarkører brukes ofte for å undersøke biologiske prosesser, patogene prosesser eller farmakologiske responser. Fordi *vtg* er det primære målgenet for ER i fisk og andre eggleggende organismer, er den en velegnet biomarkør for å påvise aktivering av ER av eksogene ligander (Figur 11) (Sumpter and Jobling, 1995, Arukwe and Goksøyr, 2003).

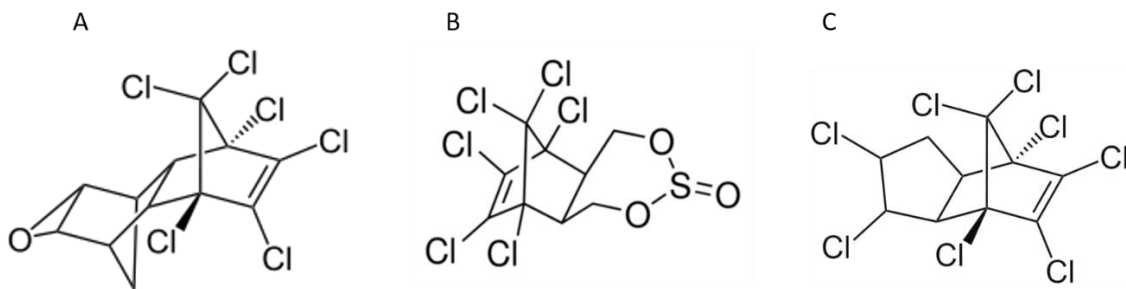


**Figur 11. VTG som biomarkør for EDC-er.** Syntese av VTG og zona radiata-protein medieres gjennom aktivering av ER, og kan derfor brukes som biomarkører for aktivering av ER av xenobiotiske stoffer. Figuren er hentet fra Arukwe og Goksøyr (2003).

### 1.4.2 Eksogene ER-ligander

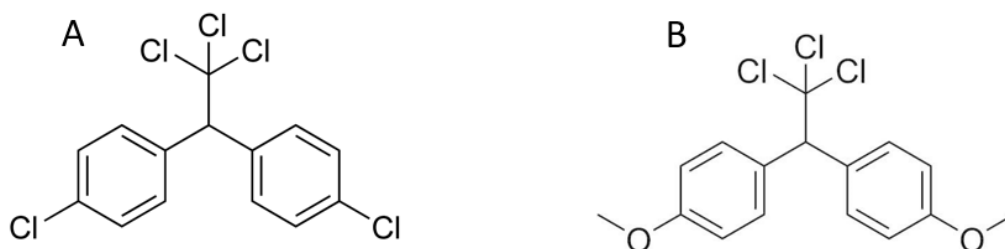
ER har vist seg å kunne aktiveres av en rekke eksogene forbindelser som for eksempel av pesticidene dieldrin, toksafen og DDT (Soto et al., 1994, Seeger et al., 2016), overflatebehandlingsmidler som alkylfenoletoksyler (Ying et al., 2002), og industrielle forbindelser som bisfenol A (Krishnan et al., 1993). I denne oppgaven har POP-ene endosulfan og metoksyklor blitt studert. Endosulfan har lignende struktur som dieldrin og klordan (Figur 12). Det er et insekticid som blant annet brukes som et sprøytemiddel under produksjonen av kaffe, te, frukter og grønnsaker. I miljøet kan endosulfan oksideres til endosulfansulfat eller hydrolyseres til endosulfandiol. Endosulfan påvises i dag over hele verden, og  $\alpha$ -isomerer er mest utbredt. I den arktiske atmosfæren er  $\alpha$ -endosulfan det mest utbredte organoklorpesticidet etter heksaklorbenzen og heksaklorsykloheksan (Weber et al., 2010). En studie utført på Grønland har tidligere påvist endosulfan i både torsklever, i huden hos narhval (*Monodon monoceros*) og i spekket til grønlandssel (*Phoca groenlandica*) (Vorkamp et al., 2004).

Endosulfan har østrogene egenskaper både i pattedyr og teleoster. En rekke *in vitro*-forsøk med ER fra menneske har vist at endosulfan evner å aktivere reseptoren (Soto et al., 1994, Legler et al., 1999, Wu et al., 2008). Forsøk med primære hepatocytter fra laks (*Salmo salar*) viste at endosulfan fører til en oppregulering av *vtg* (Krøvel et al., 2010).



**Figur 12.** Den kjemiske strukturen til henholdsvis dieldrin (A), endosulfan (B) og Klordan (C)

Metoksyklor ligner strukturelt på DDT (Figur 13). Forbindelsen ble utviklet for å erstatte DDT i anvendelsen som insekticid. I rotter har både metoksyklor og en av dens metabolitter, 2,2-bis(p-hydroksyfenyl)-1,1,1-trikloretan (HPTE), vist seg å hemme bindingen av E2 til østrogenreseptoren, der HPTE har vist seg å ha høyest affinitet for østrogenreseptoren av disse to (Cummings, 1997, Nelson, 1974). Et kjemisk aktivert luciferase-genuttrykningsanalyse (ER-CALUX-analyse) utført med ER $\alpha$  fra menneske har vist at metoksyklor evner å aktivere reseptoren ved konsentrasjoner under 1  $\mu$ M (Legler et al., 1999). Et forsøk utført på sebrafisk (*Danio reiro*) viste at eksponering for 5  $\mu$ g/L endosulfan over en periode på 14 dager førte til økt VTG-konsentrasjon i blodet hos voksne hannindivider (Versonnen et al., 2004).



**Figur 13.** Den kjemiske strukturen til henholdsvis diklor-difenyl-trikloretan (DDT) (A) og metoksyklor (B)

## 1.5 Presisjonskuttete leverskiver (PKLS)

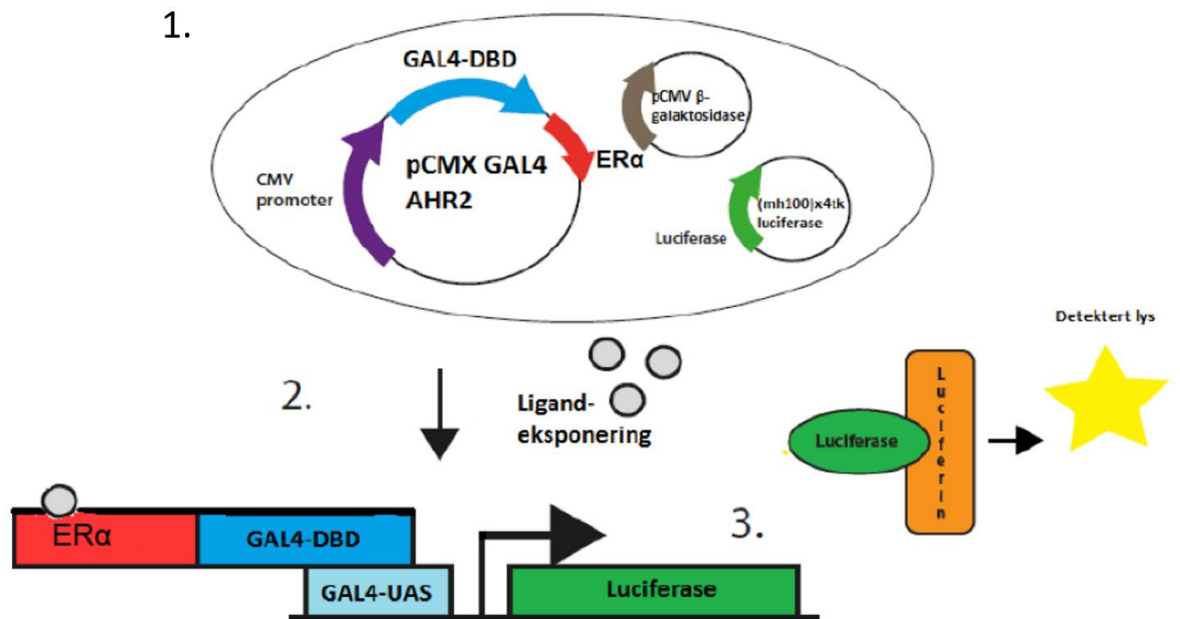
Leveren er det viktigste organet for biotransformasjonen av fremmedstoffer da den inneholder reseptorer og enzymer som er essensielle i reaksjonsveier som bidrar til detoksifisering av disse. Miljøgifter tenderer til å akkumulere i fettrike vev. Torskeleveren skiller seg fra andre vertebrater ved at hepatocytene har større cellulært volum og inneholder mer fett, noe som legger til rette for akkumulering av lipofile miljøgifter i dette vevet (Fujita et al., 1986, Segner, 1998, Eide et al., 2014).

Presisjonskuttete leverskiver (PKLS) er en teknikk som kan brukes til *ex vivo*-eksponeringsstudier. Denne teknikken ble nylig etablert på torsk hvor vevsbiter med en diameter på 8 mm og en tykkelse på 250 µm prepareres ved hjelp av en vibratom (Eide et al., 2014). Leverskivene er levedyktige i kultur opp til flere dager (72 timer) (Eide et al., 2014). PKLS kan eksponeres for kjemikaler på samme måte som andre celledsystemer, som primære hepatocytter og cellelinjer, men i leverskiver beholdes cellenes normale fordeling og celle-celle-interaksjoner opprettholdes. Selv om hepatocytene er den celletypen som responderer mest ved eksponering for miljøgifter, vil også andre celletyper, som endotelceller, fettlagringsceller og erytrocytter, indirekte eller direkte bidra i leverskiver, på samme måte som de ville gjort i en *in vivo*-situasjon (Eide et al., 2014).

## 1.6 Gal4/UAS-luciferase-genreportersystem

For å studere *in vitro*-aktivering av transkripsjonsfaktorer kan luciferasebaserte genreportersystemer benyttes (Brasier et al., 1989). Et av disse systemene baserer seg på at man kotransfekerer eukaryote celler med et reporter- og reseptorplasmid. Reporterplasmidet inneholder genet som koder for luciferase som er under kontroll av én eller flere aktiveringssekvenser (UAS). Reseptorplasmidet inneholder reseptoren man ønsker å studere fusjonert sammen med DBD til gjærsopproteinet Gal4. Ved uttrykning vil reseptor-Gal4-DBD være det resulterende fusjonsproteinet. Når reseptoren aktiveres av en ligand vil fusjonsproteinet via Gal4-DBD binde til UAS oppstrøms for luciferasegenet i reporterplasmidet og dermed initiere transkripsjon. Når luciferin tilsettes til cellene, vil den enzymatiske aktiviteten fra luciferase sørge for at oxyluciferin dannes og at lys emitteres og kvantifiseres (Figur 14). Fordelen med et slikt system er at det er uavhengig av reseptorens naturlige dimeriseringspartnere og endogene responselement. Systemet har tidligere i forskningsgruppa vært brukt til å studere ligandaktivering av en rekke transkripsjonsfaktorer, blant annet PXR fra

isbjørn (*Ursus maritimus*) og VDR $\alpha$ , VDR $\beta$ , PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$ , PPAR $\gamma$ , AhR1b og AhR2 fra atlanterhavstorsk (Endresen, 2016, Lille-Langøy et al., 2015, Madsen, 2016).



**Figur 14. Illustrasjon av luciferase genreportersystemet benyttet i masteroppgaven.** 1. Transfeksjon av reporter-, reseptor- og kontrollplasmid inn i COS-7-celler. 2. Ligandeksponering av Cos-7-celler for MXC, END og MIKS. 3. Ligandaktivering av ER $\alpha$  fører til transkribering av gen som koder for luciferase. Luciferaseproteinet omdanner luciferin til oxiluciferin i en reaksjon hvor lys dannes og kan kvantifiseres. Modifisert fra Ueland (2013).

## 1.7 Mål for oppgaven

Det overordnede målet for denne oppgaven er å funksjonelt karakterisere ER $\alpha$  i atlantehavstorsk med tanke på dens evne til å aktiveres av ulike ligander (miljøgifter). Dette skal gjøres ved å klonere ER $\alpha$  fra torskellever og etablere et luciferasebasert genreportersystem med det ligandbindende domenet fra reseptoren fusjonert til Gal4-DBD. Det skal undersøkes hvordan ER $\alpha$  aktiveres av endosulfan, metoksyklor og en blanding av disse. Videre vil PKLS fra torsk eksponeres for de samme forbindelsene, og aktivering av ER $\alpha$ -signalveien skal følges ved å studere endring i uttrykning av *esr1* og *vtg* ved bruk av qPCR. Selv om torskegenomet er sekvensert, mangler det fremdeles en komplett kartlegging av gensekvensen til *esr1*. For å klonere ER $\alpha$ -LBD er det nødvendig å identifisere slutten av gensekvensen til reseptoren ved hjelp av en metode kalt «rask amplifisering av cDNA-ender» (RACE).

Delmålene for oppgaven er å:

1. Oppregulere uttrykningen av *esr1* ved å eksponere PKLS fra juvenil torsk for EE2
2. Kartlegge slutten av sekvensen til *esr1*-transkriptet ved bruk av rask amplifisering av cDNA-ender (RACE)
3. Måle ligandaktivering av ER $\alpha$  ved bruk av et luciferasebasert genreportersystem
4. Måle oppregulering av *esr1* og *vtg* fra leverskiver eksponert for de samme ligandene brukt i genreporteranalysene

## 2 Materialer

### 2.1 Kjemikalier

**Tabell 1:** Oversikt over kjemikalier

Navn	Formel	Leverandør / produktnummer
2-Mercaptoethanol	$C_2H_6OS$	Aldrich / M6250
2-Nitrofenyl $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG)	$H_{12}C_{15}NO_8$	Sigma / N1127
2-log DNA-standard (0,1 – 10,0 kb)		New England Biolabs / N3200s
Adenosin 5'-trifosfat dinatrium salt hydrat (ATP)	$C_{10}H_{14}N_5Na_2O_{13}P_3$	Sigma / A2383
Agar-agar		Merck / 101614
Agarose		Sigma / 2A9539
Agarose (ultra-low melt)		Sigma / A2576
Ampicillin-natriumsalt	$C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$	Sigma / A9518
Betain	$C_5H_{11}NO_2$	Sigma / B0300
Borsyre	$H_3BO_3$	Merck / 100165
Bovin Serum Albumin (BSA)		Sigma / A9647
Dimetyl sulfoksid (DMSO)	$C_2H_6SO$	Sigma / D8418
Dinatriumhydrogenfosfat dihydrat	$Na_2HPO_4$	Sigma / 30435
DL-Dithiothreitol (DTT)	$C_4H_{10}O_2S_2$	Sigma / D0632
D-luciferin Firefly	$C_{11}H_8N_2O_3S_2$	Biosynth / L-8200
Dulbecco's Modified Eagle's Medium – høy glukose (med fenol rød)		Sigma / D5671

Navn	Formel	Leverandør / produktnummer
Dulbecco's Modified Eagle's Medium – høy glukose (uten fenol rød)		Sigma / D1145
Endosulfan	$C_9H_6Cl_6O_3S$	<b>Sigma / PS81</b>
Etanol	$C_2H_6O$	Sigma / 32221
Etidiumbromid	$C_{21}H_{20}BrN_3$	Sigma / E1510
Etylen glycol-bis(2-aminoetyler)N,N,N',N'-tetraedikksyre (EGTA)	$C_{14}H_{24}N_2O_{10}$	Sigma / E3889
Etylendiamintetraeddiksyre (EDTA)	$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$	Merck / 108418
Formamid	$CH_3NO$	Sigma / F9037
Fosfatbufret løsning (PBS) 10X		Sigma / P5493
Fatalt bovint serum (FBS)		Sigma / F7524
GelRed		Biotium / 41003
GelGreen		Biotium / 41005
Gjærekstrakt		Fluka / 92144
Glycerol	$C_3H_8O_3$	Sigma / G5516
Isopropanol	$C_3H_8O$	Kemetyl / 603-117-00-0
Kaliumklorid	KCl	Sigma / P9541
Kloroform	$CHCl_3$	Sigma-Aldrich / 650498
Koenzym A trilithiums salt	$C_{21}H_{33}Li_3N_7O_{16}P_3S$	Sigma / C3019
L-Glutamin	$C_5H_{10}N_2O_3$	Sigma / G7513
Leibovitzs 1-15-medium, uten fenolrødt		TermoFisher / 21083-027



Navn	Formel	Leverandør / produktnummer
Magnesium-karbonathydroksid pentahydrate	$Mg_5C_4O_{14}H_2$	Sigma / M5671
Magnesiumklorid	$MgCl_2$	Sigma / M8266
Magnesiumsulfat	$MgSO_4$	Sigma / M2643
Metoksyklor	$C_{16}H_{15}Cl_3O_2$	Sigma / <b>49054</b>
Monobasisk Natriumfosfat	$NaH_2PO_4$	Sigma / S0751
Natriumklorid	$NaCl$	Merck / 106404
Natriumpyruvat	$C_3H_3NaO_3$	Sigma / S8636
Opti-MEM® I Reduced Serum Medium		Life Technologies / 31985-062
Phenylmethanesulfonyl fluorid (PMSF)	$C_7H_7FO_2S$	Sigma / P7626
Qiazol		Qiagen / 79306
SOC vekstmedium		New England Biolabs / B9020S
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Difenyltetrazoliumbromide (MTT)	$C_{18}H_{16}BrN_5S$	Sigma / M5655
TransIT®-LT1 Transfeksjonsreagens		Mirus / MIR 2300
Tricine	$H_{13}O_5C_6N$	Sigma / T0377
Tris-PO <sub>4</sub> (Trizma® fosfat dibasisk)	$C_8H_{25}N_2O_{10}P$	Sigma / T4258
Trizma® base	$NH_{11}C_4O_3$	Sigma / T1503
Trypan Blue løsning	$C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$	Fluka / 93595

<b>Navn</b>	<b>Formel</b>	<b>Leverandør / produktnummer</b>
Trypsin-EDTA løsning 1X (0,05% trypsin, 0,02% EDTA)		Sigma / 59417c
Trypton		Merck / 111931

## 2.2 Kommersielle kit

**Tabell 2:** Liste over kommersielle kit brukt i oppgaven

Navn	Beskrivelse	Leverandør / produktnummer
BigDye® Terminator v3.2 Cycle Sequencing Kit	Sanger sekvensering	ThermoFisher Scientific / 4337456
Cytotoxicity detection kit (LDH)	Cytotoksisitet (PKLS)	Roche / 11644793001
Enhanced Avian First Strand Synthesis Kit	Revers transkripsjon	Sigma / STR1
GoTaq® Green Master Mix	Amplifisering av DNA	Promega / M7122
iScript cDNA synthesis kit	Revers transkripsjon	Bio-Rad / 1708891
Lightcycler® 480 SyBR green i mastermiks	Kvantitativ sanntids-PCR (qPCR)	Roche / 04887352001
NucleoBond® Xtra Midi kits	Plasmidrensing	MACHEREY-NAGEL / 740410.100
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Gelrensing av DNA	MACHEREY-NAGEL / 740609.250
NucleoSpin® Plasmid EasyPure	Plasmidrensing	MACHEREY-NAGEL / 740727.250
Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit	Mutering av DNA-sekvens	New England Biolabs / E0554S
RNeasy Plus universal Mini Kit	RNA-ekstraksjon	Qiagen / 73404
SAP 10 X Reaction Buffer	Defosforylering	Affymetrix / 70103
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Defosforylering	Affymetrix / 78390
SMARTer® RACE 5'/3' Kit	RACE	Takara / 634859
StrataClone PCR Cloning Kit	Transformerings	Agilent Technologies / 240205
T4 NDA-ligase	Ligering	Takara / 2011A

Navn	Beskrivelse	Leverandør / produktnummer
TaKaRa Ex Taq® DNA Polymerase	Amplifisering av DNA-fragment	Takara / RR001B

## 2.3 Celler

**Tabell 3:** Liste over celler brukt i oppgaven

Celler	Beskrivelse	Leverandør / opphav
StrataClone solopack competent cells	Kompetente <i>Escherichia coli</i> -celler	Agilent / 240205
COS-7-celler	Nyrecellelinje fra afrikansk grønnappe	(Gluzman, 1981)

## 2.4 Plasmid

**Tabell 4:** Liste over plasmid brukt i oppgaven

Plasmid	Beskrivelse	Opphav
Mh(100)x4tk luc	reporterplasmid	(Forman et al., 1995)
pCMV- $\beta$ -gal	kontrollplasmid	(Blumerg et al., 1998)
pCMX-Gal4-ER $\alpha$ -LBD	reseptorplasmid	

## 2.5 Primere

**Tabell 5:** *Primere brukt i oppgaven*

ID	Navn	Sekvens (5'-3')	lokalisering
MT41*	T3	ATTAACCCTCACTAAAGGGA	pSC-A
MT43*	T7_rev	GTAAAACGACGGCCAG	pSC-A
MT533	3A'-RACECDSPimerA	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT VN	
MT535	Universal primer long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGC AGTGGTATCAACGCAGAGT	
MT536	Universal primer short	CTAATACGACTCACTATAGGGC	
MT357	Nestet universal primer	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	
MT1033	rpl22 fwd	AGAAGTCCAAAAAAGGAGCTTCCT	
MT1034	rpl22 rev	GTTACCGGTCTTCCCGTTGA	
MT1999	arp rev	CAGGGCCTTGCGAAGA	
MT1200	arp fwd	TGATCCTCCACGACGATGAG	
MT1077*	pCMX Fwd/Gal4N_fwd	TGCCGTCACAGATAGATTGG	pCMX
MT1078*	pCMX Rev	ATTCTCTCTAGGTAGTTTGTC	pCMX
MT1233	VTG $\alpha$ fwd	AGACTGGCCTGGTCGTCAA	
MT1234	VTG $\alpha$ rev	GCGAGGATAGAGGCAGGGAT	
MT1245	cERad1	CTTGAGCTGTCCCTTCATGACC	903-924
MT1246	cERar1	AGTGGATGGACCTCCAGATGAG	972-993
MT1266	cod_esrl_BodoelF	TGCAGTCCCTGGGCAGTGGGTCCACC A	1-27
MT1267	cod_esrl_BodoelR	TGACCTCGGTGTACGGCCGGTTCATCT	796-822
MT1268	cod_esrl_Bodoe2F	AGGCAGCTGGAGAACAGGACGTCGCC	603-924
MT1269	cod_esrl_Bodoe2R	TGGGCGTCCAGCATCTCCAGCAGCAG GT	1414- 1441
MT1270	cod_esrl_Bodoe3F	AAAGGAGGTATGCGCAAGG	516-534

<b>ID</b>	<b>Navn</b>	<b>Sekvens (5'-3')</b>	<b>lokalisering</b>
MT1271	cod_esr1_Bodoe3R	TGACCTCGGTGTACGGCCGGTTCATCT	796-822
MT1310	gm_er1_3RACE_FWD	ACGACAGCCTGGCCGTTTCAGGGCA	1210- 1233
MT1311	gm_er1_3RACE_FWD2	GCCGTTTCAGGGCATGCTCGACACCA	1221- 1245
MT1312	gm_er1_3RACE_FWD3	CGACACCATCACGGACGCCCTCA	1238- 1260
MT1313	gm_er1_3RACE_FWD4	CAGGGCATGCTCGACACCATCACG	1227- 1250
MT1314	gm_er1_3RACE_FWD5	CCTTCACGACAGCCTGGCCGTTCA	1205- 1228
MT1315	gm_er1_3RACE_FWD6	GCACCATGGAGGCCCTTCACGACA	1192- 1215
MT1316	gm_er1_3RACE_FWD7	TGGGGCCTTCTCGTTCTGCACCA	1169- 1191
MT1324	cod_Esr1_hinge_fwd_EcorI	gaattcATGAAAGGAGGTATGCGCAAGG	513-534
MT1325	cod_Esr1_rev_Bam_HI	ggatccTCAGACGGACGCACACTCGTG	1629- 1649
MT1347	Q5SDM_codEsr_F	CCGCAGGACGGGAGGAGGAAC	630-650
MT1348	Q5SDM_codEsr_R	GGGCGACGTCCTGTTCTC	612-629

Alle primerne ble levert av Sigma-Aldrich. Små bokstaver indikerer sekvens med kuttsete.

## 2.6 Medium

**Tabell 6:** *LB-medium*

<b>Komponent</b>	<b>Konsentrasjon</b>
NaCl	10 g / L
Trypton	10 g / L
Gjærekstrakt	5 g / L
MilliQ-vann	-

**Tabell 7:** *Frysemedium for cos-7-celler*

<b>Komponent</b>	<b>Konsentrasjon</b>
DMEM-10% FBS (neste Tabell)	1 X
DMSO	5 % (v / v)

**Tabell 8:** *Dyrkningsmedium for Cos-7-celler*

<b>Komponent</b>	<b>Konsentrasjon</b>
DMEM	0,87 X
Pencillin-Streptomycin	86,96 U / mL
Fatalt kalveserum (FBS)	8,70 %
Natriumpyruvat	0,87 mM
L-Glutamin	3,48 mM

Ved ligandeksponering ble det brukt DMEM uten fenolrødt og superstrippet FBS

**Tabell 9:** Medium brukt i forbindelse med PKLS

Komponent	Konsentrasjon
Føtalt kalveserum, super-stripped	10 %
Pencillin-Streptomycin	1 %
L15-media (uten fenolrødt)	-

## 2.7 Løsninger

Agarosegel

5 x Tris-borsyre-EDTA-buffer (TBE-buffer)

**Tabell 10:** 5 X Tris-borsyre-EDTA-buffer (TBE-buffer)

Komponent	Konsentrasjon
Tris	0,45 m
Borsyre	0,45 m
EDTA	0,01 m
MilliQ-vann	-

**Tabell 11:** Tillaging av agarosegel

Komponent	Konsentrasjon
TBE-buffer	0,5 X
Agarose	0,7-1,2 %
Gelred / Gelgreen	0,0002 %



## Lyseringsbuffer

**Tabell 12:** Basebuffer lysering

Komponent	Konsentrasjon
Tris-PO <sub>4</sub> , pH 7,8	25 mM
Glycerol	15 %
CHAPS	2 %
L- $\alpha$ -Phosphatidylcholine	1 %
BSA	1 %

**Tabell 13:** Lyseringsbuffer

Komponent	Konsentrasjon
Basebuffer lysering	1 X
EGTA	8 mM
MgCl <sub>2</sub>	4 mM
DTT	1 mM
PMSF	0,4 mM

## $\beta$ -galaktosidasebuffer

**Tabell 14:**  $\beta$ -galaktosidase basebuffer

Komponent	Konsentrasjon
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> • 2H <sub>2</sub> O	40 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O	60 mM
KCl	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM

**Tabell 15:**  $\beta$ -galaktosidasebuffer

Komponent	Konsentrasjon
Basebuffer $\beta$ -galaktosidase	1 X
B-mercaptoetanol	52,9 nM
ONPG	8,6 mM

## Luciferasebuffer

**Tabell 16:** Luciferase basebuffer

Komponent	Konsentrasjon
Tricin	80 mM
EDTA	0,4 mM
(MgCO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> •Mg(OH) <sub>2</sub> •5H <sub>2</sub> O	4,28 mM
MgSO <sub>4</sub>	10,68 mM

**Tabell 17:** *Luciferasebuffer*

<b>Komponent</b>	<b>Konsentrasjon</b>
Basebuffer Luciferase (pH 7,8)	1 X
DTT	5 mM
ATP	0,5 mM
Koenzym A	0,15 mM
D-luciferin	0,5 mM
MilliQ-vann	-

**Tabell 18:** PKLS-buffer

<b>Komponent</b>	<b>Konsentrasjon</b>
NaCl	122 mM
KCl	4,8 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 2H <sub>2</sub> O	11 mM
MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	1,2 mM

PKLS-buffer holdes på 4°C og sterilfiltreres (0,22 µM porer) over på en autoklavert flaske

## 2.8 Instrumenter

Tabell 19: *Instrumenter*

Instrument	Beskrivelse	Leverandør
Buerker haemocytometer	Telling av celler	Marienfeld
C1000™ Thermal Cycler	qPCR	BioRad
ChemiDoc	Fremkalling av geler	BioRad
CT15RE	Sentrifuge	Hitachi
DM IL inverted microscope	Telling av celler	Leica
EnSpire™ 2300 Multilabel Reader	Plateleser	PerkinElmer
GD100	Varmebad	Grant
Heraeus multifuge x3r	Sentrifuge	Thermo scientific
HERMLE	Sentrifuge	Heco Laboratoireutstyr as
HS 501 Digital	Risteplate	IKA® - Werke
MilliQ A10 Advantage	Deionisert H <sub>2</sub> O	Merck Millipore
MP220	pH-meter	Bergman
Nanodrop 1000 Spectrophotometer	Spektrofotometer	Thermo Scientific
PowerPac™ HC	Strømforsyning til gelelektroferese	BioRad
Precellys® 24	Homogenisering av vev	Bertin instruments
VT 1200 vibratome line	Presisjonskutter for vevssnitt	LEICA

## 2.9 Programvare

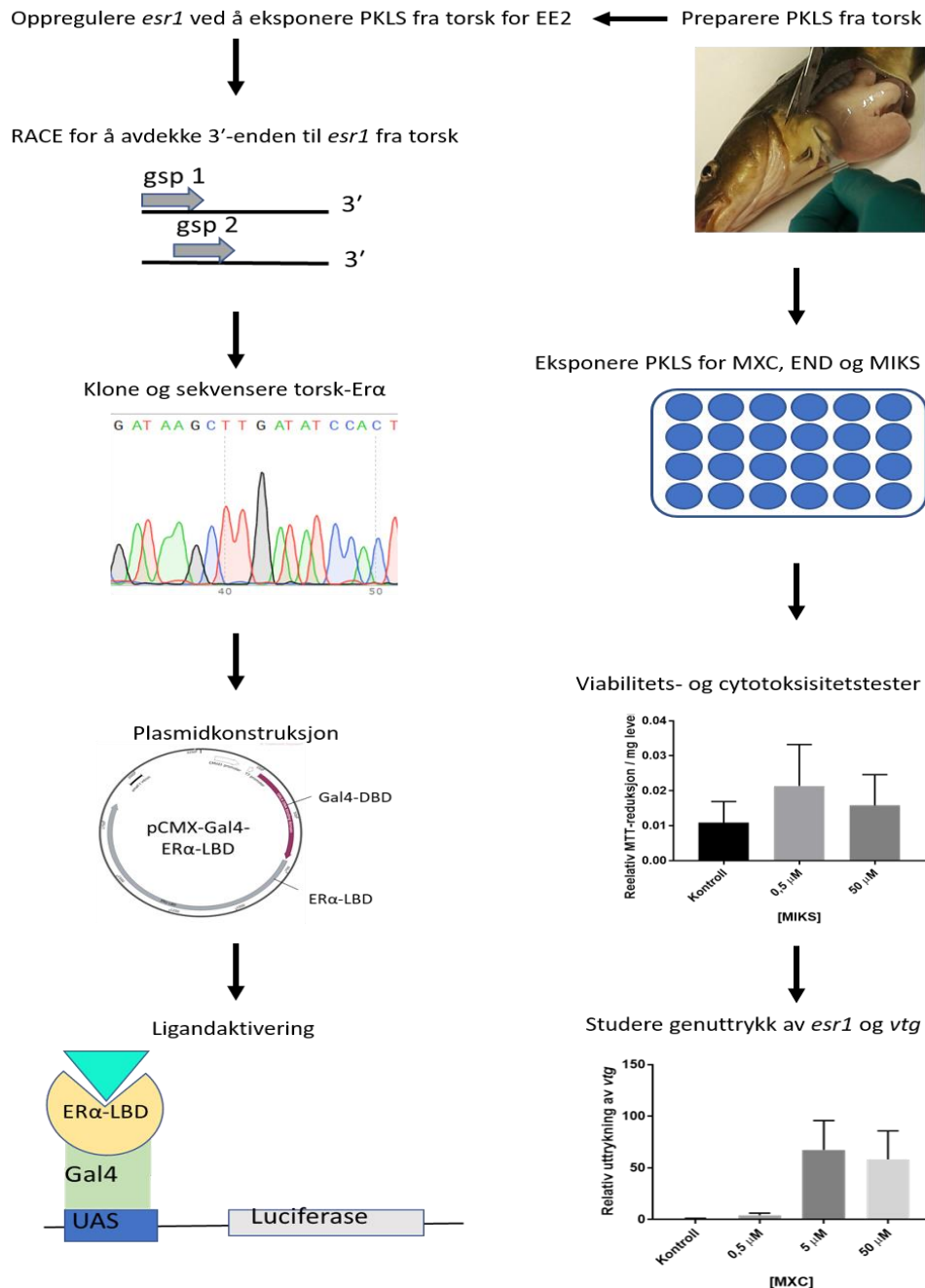
Tabell 20: Programvare / verktøy

Programvare / verktøy	Beskrivelse	Leverandør / produsent
CAP3 sequence assembly Program	sette sammen DNA-sekvenser	Prabi
Clustal Omega	Multipel sekvenssammenstilling	EMBL-EBI
EndNote	Kildelisteverktøy	Thomson
EnSpire Manager	Plateleser	PerkinElmer
Excel 2016	Statistiske analyser	Microsoft®
ExSpasy translate tool	Translatere DNA til protein	Bioinformatics Resource Portal
GeneSnap Image	Visualisering av agarosegeler	SynGene
GraphPad Prism 7	Tillaging av grafer/diagrammer	GraphPad software
ND-1000	Bestemmelse av plasmid-, RNA- og DNA-konsentrasjon og renhet	Thermo Scientific
PowerPoint 2016	Illustrasjoner	Microsoft®
RStudio	Statistiske analyser	
SnapGene Viewer	Visualisering av DNA-sekvenser	Biotech
Word 2016	Tekstbehandling	Microsoft®

## 3 Metoder

### 3.1 Oversikt over metoder

I oppgaven ble det benyttet forskjellige metoder. Blant annet rask amplifisering av cDNA-ender (RACE), luciferasebaserte ligandaktiveringsanalyser og eksponeringsstudier med leverskiver fra torsk. En oversikt over noen av metodene brukt i oppgaven er vist i Figur 15.



**Figur 15. Oversikt over metodene brukt i oppgaven.** Leverskiver fra torsk ble eksponert for EE2 for å oppregulere uttrykket av *esr1*. RNA fra leverskivene ble brukt som templat i RACE-reaksjoner for å amplifisere den ukjente 3'-enden til *esr1*. Videre ble torsk-ERα-LBD klonet og sekvensert. Det ble konstruert et reseptorplasmid, pCMX-Gal4-ERα-LBD, som ble transfektert inn i COS-7-celler og brukt i luciferasebaserte genreporteranalyser med metoksyklor (MXC), endosulfan (END) og en blanding av disse (MIKS). Videre ble PKLS fra torsk eksponert for de samme forbindelsene, før uttrykk av *esr1* og *vtg* ble undersøkt. Det ble gjennomført viabilitets- og cytotoxicitetstester på leverskivecellene.

### 3.2 Prøvetaking

Atlantehavstorsken (*Gadus morhua*) som ble brukt i oppgaven ble anskaffet fra Austevoll havbrukstasjon (Havforskningsinstituttet (HI), Bergen, Norge) og røktet hos Industrielaboratoriet (ILAB; Universitetet i Bergen (UiB), Norge). Totalt ble det brukt fire fisk i denne masteroppgaven. Disse ble avlivet med et hardt slag mot hodet og bløgget. Fiskene ble brukt i eksponeringsforsøk ved bruk av presisjonskuttete leverskiver (PKLS). Det ble totalt utført fire eksponeringsforsøk. I forsøk 0 ble det eksponert for etynyløstradiol (EE2). Til dette forsøket ble det brukt én fisk. I forsøk 1 ble det eksponert for metoksyklor (MXC), i forsøk 2 ble det eksponert for endosulfan (END) og i forsøk 3 ble det eksponert for en blanding av metoksyklor og endosulfan (MIKS). Tre individer ble brukt til både forsøk 1, 2 og 3. De samme fiskene ble brukt i de tre forsøkene (Tabell 21).

**Tabell 21:** Oversikt over fiskene brukt i oppgaven. Tabellen viser kjønn, vekt og i hvilke forsøk fiskene ble brukt.

Fisk	Kjønn	Vekt (g)	Vekt lever (g)	Forsøk
0	K	700	64	0
1	M	594	44	1, 2 og 3
2	K	553	61	1, 2 og 3
3	K	439	33	1, 2 og 3

### 3.3 Protokoll for PKLS

Metoden brukt i dette forsøket tar utgangspunkt i metoden beskrevet av Eide et al. (2014). Før forsøkene ble utført ble arbeidsbenken vasket med 70 % etanol, og redskapene brukt til disseksjon ble autoklavert. Bufferne ble sterilfiltrert gjennom filter med porer på 0,22 µm, og oppbevart på autoklaverte flasker på 4 °C.

Etter avliving ble fisken veid og åpnet ventralt fra gattåpningen mot gjellene. Leveren ble vasket med kald PKLS-buffer før den ble veid. Leveren ble holdt på kald PKLS-buffer da sylindereformede leverbiter ble boret ut med et kjernebor med en diameter på 8 mm. Leverkjernene ble lagt i en ny petriskål med PKLS-buffer. Både lever, leverkjerner og leverskiver ble holdt på is under hele prosedyren.

Leica VT1200 S vibrating blade microtome (LEICA biosystem, Nussloch, Tyskland) ble brukt for å preparere leverskivene. Leverkjernen ble støpt i 3,75 % ultra-low melting-agarose før den

ble limt fast med Loctite Superlim Super Glue Precision til en plattform (magnet) som ble festet i bunnen av et kar dekket av PKLS-buffer. Rundt dette karet var det is. Levreskivene ble skjært ut med en tykkelse på 250  $\mu\text{m}$ , med en frekvens på 2,5 mm og en hastighet på 0,30 mm/sek. Leverskivene ble deretter oppbevart i PKLS-medium. Når tilstrekkelig mengde leverskiver var preparert ble skivene aklimatisert i 2 timer på 10 °C med risting.

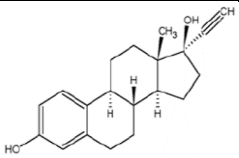
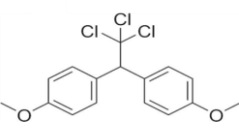
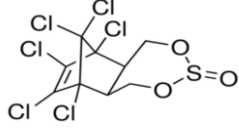
Leverskivene ble eksponert enkeltvis i en 24-brønnsplate tilsatt 1 mL medium og ønsket konsentrasjon av testforbindelse løst i DMSO (0,1 % endelig DMSO-konsentrasjon). Leverskivene ble inkubert i 48 timer på 10 °C med risting. Etter eksponeringen ble leverskivene direkte homogenisert. Medium ble samlet inn etter 48 timer og lagret på -40 °C.

### **3.4 Eksperimentelt design for eksponering av leverskiver**

Forsøksoppsettet var basert på Eide et al. (2014). For hvert forsøk (med unntak av forsøk 0 der det kun ble brukt én fisk) ble det brukt tre individer i eksponeringsforsøkene. For hver fisk ble det brukt seks separate leverskiver for hver eksponeringsdose. Før RNA-ekstraksjon ble to og to leverskiver slått sammen for å sikre nok RNA-mengde for videre analyser. For hver testforbindelse ble det 0.1 % DMSO brukt som kontroll, og tre ulike konsentrasjoner av testforbindelsen ble benyttet.

Til sammen ble det gjennomført fire eksponeringsforsøk. I eksponeringsforsøk 0 ble det brukt EE2, i forsøk 1 MXC, i forsøk 2 END og i forsøk 3 en blanding av MXC og END (MIKS) (Tabell 22).

**Tabell 22:** forbindelser og konsentrasjon benyttet i eksponeringsforsøkene. Testforbindelsene var løst i DMSO med endelig konsentrasjon på 0,1 % i alle forsøkene.

	Forbindelse	Struktur	Konsentrasjon (µM)
<b>Eksponeringsforsøk 0</b>	EE2		0, 10, 100
<b>Eksponeringsforsøk 1</b>	MXC		0, 0,5, 5, 50
<b>Eksponeringsforsøk 2</b>	END		0, 0,5, 5, 50
<b>Eksponeringsforsøk 3</b>	MIKS		0, 0,5, 5, 50

\* Konsentrasjon oppgitt for MIKS er total molaritet av MXC og END i et ekvimolart forhold

### 3.5 RNA-ekstraksjon

Til ekstrahering av total-RNA fra leverskivene ble kittet RNasy plus Universal Mini Kit (Qiagen) brukt etter produsentens anbefalinger. Leverskivene ble tilsatt qiazol, som fremmer lysing av alle typer vev og hemmer RNase-aktivitet, og 2-3 lyseringskuler (diameter 2,8 mm) før de ble homogenisert i en Precellys 24-homogenisator (Bertin instruments) på 5000 rpm i 15 sekunder. qDNA-elimineringssløsning ble tilsatt for å fjerne genomisk DNA. Kloroform ble tilsatt slik at blandingen ble separert i tre faser, med RNA i den øverste fasen, DNA og proteiner i interfasen, og proteiner i den nedre fasen. Den øverste fasen ble pipettert over i nytt rør. Etanol ble tilsatt og lastet i en RNeasy Mini spin-kolonne. For å vaske RNA ble først buffer RWT og deretter buffer RPE tilsatt. RNA ble eluert i 30 µL RNasefritt vann.

RNA-konsentrasjon og renhet ble bestemt spektrofotometrisk ved bruk av NanoDrop 1000. RNA har maksimal absorpsjon ved 260 nm. For å måle renhet av RNA kan forholdet mellom A<sub>260</sub> og A<sub>280</sub> (A<sub>260/280</sub>) brukes. Proteiner absorberer hovedsakelig lys ved 280 nm. A<sub>260/280</sub> under 1,8 indikerer proteinkontaminering. A<sub>260/280</sub>-verdien bør ligge mellom 1,8 og 2, med forbehold om at pH og ionestyrke kan påvirke målingene (Wilfinger et al., 1997). En annen måte å måle renhet på er A<sub>260/230</sub>. Kaotriske salter og fenol absorberer lys ved 230 nm, og en



lav  $A_{260/230}$ -verdi (under 1,8) kan indikere kontaminering med noen av disse. For å vurdere integriteten til RNA ble det brukt agarosegelelektroforese (AGE) (metode 3.6.1). Total-RNA domineres av ribosomalt RNA. Intakt RNA vil derfor ha synlige bånd fra de to ribosomale subenhetene på gel etter AGE. Båndet til 28S-RNA vil ha om lag dobbel så høy intensitet som 18S-RNA.

### **3.6 Agarosegelelektroforese**

Agarosegelelektroforese (AGE) brukes for å separere molekyler. Agarosegeler er horisontale geler som ved tilførsel av elektrisk strøm, kan separere molekyler med hensyn på størrelse og ladning. Nukleinsyrer (DNA/RNA) er negativt ladde molekyler dermed vil separasjon av disse hovedsakelig være basert på størrelse. Når elektrisk strøm tilsettes gelen, vil molekylene bevege seg med ulik hastighet mot den positivt ladde polen. Små molekyler vil bevege seg raskere enn større molekyler, fordi større molekyler har høyere friksjon mot porene i gelen og møter dermed mer motstand (Fallell and Taylor, 2006).

#### **3.6.1 RNA-elektroforese**

Til RNA-AGE ble det bruk 1 % agarosegel. Det ble tilsatt 0,1 % GelRed eller GelGreen som binder til DNA og lyser under UV-lys. Gelen ble dekket av 0,5 % TBE-buffer etter at gelen hadde stivnet. RNA-prøvene (200 ng) ble tilsatt formamid (50 % v / v), MilliQ-vann og 10 x lastebuffer. Prøvene ble varmebehandlet på 65 °C i 5 min før de ble lastet på gelen. Formamid og varmebehandling denaturerer RNA ved å bryte opp sekundærstrukturer. Gelen ble kjørt på 100 v i 30 min. og visualisert ved bruk av Gel Doc™ EX Imager (Bio-Rad).

#### **3.6.2 DNA-elektroforese**

Ved DNA-elektroforese ble det brukt agarosegeler på 0,7 – 2 %, avhengig av hvor store fragment som skulle separeres. 0,5 X TBE-buffer ble benyttet under tillaging av gelen og til å dekke gelen under elektroforesen (Tabell 10). For å farge nukleotidene ble GelRed eller GelGreen tilsatt enten til gelen under støping eller til en bufferløsning som gelen ble inkubert i etter at gelelektroforesen var ferdig. For å få prøvene til å synke ned i bunnen av brønnene, ble de blandet med 10 X-lastebuffer. Gel Doc™ EX Imager (Bio-Rad) ble brukt for å ta bilde av gelene.

### **3.7 cDNA-syntese**

cDNA lages ved å bruke enkeltrådet RNA som templat og syntetiseres av enzymet revers transkriptase. Det ble syntetisert cDNA på ulike måter. For prøvene som skulle brukes til qPCR ble iScript™ synthesis kit (Bio-Rad) brukt (Tabell 23 og 24). Reaksjonssettet inneholdt en

revers transkriptase, reaksjonsmiks og en RNase-inhibitor. Reaksjonsmiksen er en optimal blanding av komponentene som trengs for at revers transkriptase skal kunne utføre cDNA-syntese fra total-RNA, og består blant annet av dNTP, primere og en revers transkriptase-spesifikk buffer. Reaksjonsmiksen inneholder to typer primere, en oligo(dT)-primer som består av 20 tymin-baser (T) som binder poly(A)-halen til mRNA, og en random heksamer-primer som består av tilfeldige oligonukleotider bestående av seks baser som binder mRNA på ulike steder. For hver prøve ble 500 ng RNA revers transkribert.

**Tabell 23:** *Komponenter for iScript<sup>TM</sup> synthesis kit (Bio-rad).*

Reagens	Volum
5 x iScript Reaction mix	4 µL
iScript RT	1 µL
MilliQ-vann	Til 20 µL
RNA-templat	500 ng
Totalt volum	20 µL

**Tabell 24:** *temperaturprogram for iScript<sup>TM</sup> synthesis kit (Bio-rad).*

program	Temperatur (°C)	Tid (minutt)
inkubering	25	5
Revers transkribering	46	20
RT-inaktivering	95	1
Hold	4	-

For prøver som ikke ble brukt til qPCR ble Enhanced Avian First Strand Synthesis Kit (AMV) (sigma) brukt. Den eAMV-reverse transkriptasen har en økt evne til å transkribere gjennom vanskelige sekundærstrukturer ved økt temperatur. Den er godt egnet til å transkribere lengre målgener (opptil 9 kb). Kittet inneholdt en forankret oligo(dT)-primer bestående 23 tyminbaser og et C-, A- eller G-residu (anker). Ankeret sørger for at oligo(dT)-primeren binder i slutten av genet. I denne cDNA-syntesen ble det brukt 1 ng RNA (Tabell 25).

**Tabell 25:** Komponenter tilsatt for eAMV-RT (del 1)

Reagens	Volum
RNA-templat	1 µg
dNTP	1 µL (500 µM endelig konsentrasjon for hver)
Oligo(dT)-primer	1 µL (3,5 µM)
MilliQ-vann	Til 10 µL

PCR-røret ble varmet på 70 °C i 10 min for å denaturere eventuelle sekundærstrukturer før røret ble plassert på is og resten av komponentene ble tilsatt (Tabell 26).

**Tabell 26:** Komponenter tilsatt for eAMV-RT (del 2)

Reagens	Volum
10X buffer for eAMV-RT	2 µL
Enhanced avian RT	1 µL
MilliQ-vann	Til 20 µL

Blandingen ble inkubert på 42 °C i 50 minutter.

### 3.8 Polymerasekjedereaksjon (PCR)

Ved PCR amplifiseres en DNA-sekvens gjennom tre sykliske steg. I det første denatureringssteget separeres de to DNA-trådene ved å øke temperaturen til rundt 95 °C. I det neste steget, annealingsteget, senkes temperaturen slik at to spesialdesignede primere kan binde til komplementære sekvenser i endene i hver av de to DNA-trådene til fragmentet som skal amplifiseres. I elongeringssteget økes temperaturen til en temperatur, vanligvis 72 °C, som aktiverer DNA-polymerasen. DNA-polymerasen syntetiserer nye DNA-tråder ved å hekte baser på 3'-enden til hver av de to primerne. Disse tre stegene gjentas til ønsket mengde av DNA-fragmentet er oppnådd (Saiki et al. 1988). I denne oppgaven ble revers transkripsjon-PCR brukt til å validere at *esr1*-transkriptet var til stede i prøvene og til å utføre RACE-PCR for å avdekke den ukjente 3'-enden (metode 3.11).

### 3.8.1 qPCR

Kvantitativ polymerasekjedereaksjon (qPCR) og vanlig polymerasekjedereaksjon (PCR) baserer seg på samme prinsipp. Ved tradisjonell PCR detekteres vanligvis produktet etter at reaksjonen er ferdig ved å kjøre produktet på en agarosegel. Ved sanntids-PCR kan akkumulert produkt detekteres i det det dannes mens reaksjonen pågår. For å kunne detektere produkt brukes et fluorescerende molekyl som rapporterer mengde amplifisert DNA med en proporsjonal økning i fluorescerende lys. Sanntids-PCR kan enten være kvalitativ (måle tilstedeværelse eller fravær av en sekvens) eller kvantitativ (måler antall kopier av DNA). Kvantitativ sanntids-PCR betegnes ofte som qPCR (BIO-RAD, 2006).

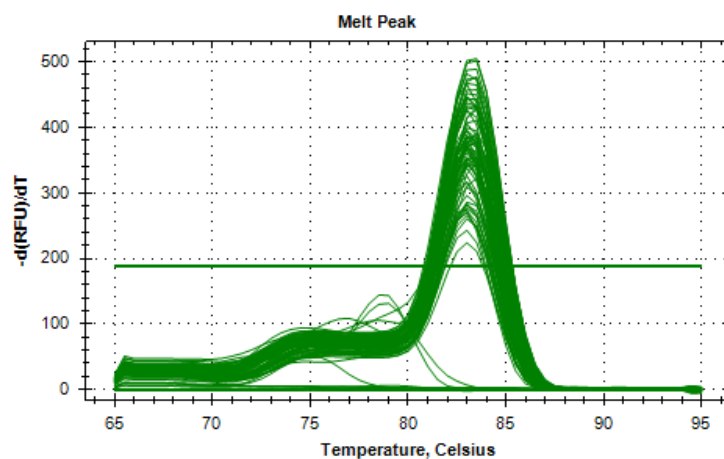
For hver syklus vil ønsket gen ideelt sett ha en 2 folds økning. I dette forsøket ble SYBR Green brukt som fluorescerende reporter molekyl. Terskel-syklusen ( $C_t$ ) er ved den syklusen der det fluorescerende signalet er sterkt nok til å passere bakgrunnsignalet (BIO-RAD, 2006).

I denne oppgaven ble LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Rocher) brukt. Som anbefalt fra produsenten ble hver brønn tilsatt 20  $\mu\text{L}$  reaksjonsmiks; primer (0,5  $\mu\text{M}$  total forward og revers), cDNA (5  $\mu\text{L}$ ) og 10  $\mu\text{L}$  mastermiks (2x). Programmet brukt er vist i Tabell 27. Det ble først laget en standardkurve i en egen plate for å avgjøre effektiviteten til primerparene. For hver plate som ble kjørt ble det i tillegg tatt med tre ulike konsentrasjoner av cDNA for å validere standardkurven. For hvert primerpar ble det også tatt med ikke-templatkontroller (ITK, negativ kontroll). Alle prøvene ble kjørt i triplikater. Det ble i denne oppgaven undersøkt uttrykkningen av genene som koder for østrogenreseptor  $\alpha$  (*esr1*) og vitellogenin (*vlg*).

**Tabell 27: Sanntids-qPCR-program**

Steg	Temperatur (°C)	Tid	Antall sykluser
Denaturering	95	3 min	-
Denaturering	95	10 sek	
Annealing	55	10 sek	40
Elongering	72	30 sek	
	95	10 sek	-
Smeltekurve	65	5 sek	-
	95	kontinuerlig	-

For å undersøke renheten til qPCR-produktene ble det brukt en smeltekurveanalyse (Figur 16). Prøver med samme produkt forventes å ha samme smeltepunkt. Analysen brukes også til å validere spesifisiteten til primerne. Uspesifikk binding kan føre til dannelse av uønskede produkter med annen smeltetemperatur enn det forventede produktet. Dette vil føre til flere topper i smeltekurven.



**Figur 16. Smeltekurve** For å illustrere smeltekurven til PCR-produktet vises her produkt kjørt med primere for *esr1* for prøver er eksponert for MXC og END. De små toppene til venstre for den store toppen viser uspesifikk primerbinding. Den høye toppen viser spesifikk primerbinding.

### 3.8.1.1 Referansegen

Optimale referansegen har stabil uttrykning under alle eksponeringsregimene og hos kontrollgruppen. Olsvik et al. (2008) har tidligere vist at genene som koder for ubiquitin, arginin-rikt protein (*arp*) og ribosomalt protein L22 (*rpl22*) har de tilsynelatende mest stabile uttrykningene i lever. I denne oppgaven ble *arp* og *rpl22* brukt som referansegen. Disse ble også brukt i Eide et al. (2014).

### 3.8.1.2 Standardkurve

For å bestemme amplifikasjonseffektivitetene til primerparene ble det laget en standardkurve med relative konsentrasjonsforhold. For å lage standardkurven ble det valgt ut RNA fra 10 ulike prøver fra de ulike fiskene. Det ble valgt ut prøver fra forskjellige forbindelser og konsentrasjoner. RNA ble blandet sammen og 500 ng ble brukt i cDNA-syntese. cDNA ble fortynnet 1/10 og brukt til å lage en 2-foldsfortynningsserie.

### 3.8.1.3 Behandling av qPCR-data

Standardkurven ble brukt til å bestemme amplifikasjonseffektiviteten (E) for hvert primerpar. Dette ble gjort ved å plote logaritmen til konsentrasjonene mot Ct-verdiene fra qPCR-dataene. Formel 1 ble brukt til å regne ut E (Bio-Rad, 2006)

$$(1) \quad E = 10^{\frac{-1}{slope}}$$

I en perfekt PCR vil antall produkt doubles for hver syklus, i en slik situasjon vil E være 2. Ulike faktorer kan påvirke E-verdien, blant annet interaksjonen mellom primerne og templatsekvensen, konsentrasjonene til de andre komponentene i reaksjonen og komponenter som har blitt med fra tidligere behandling av prøvene, som fra RNA-ekstraksjonen eller cDNA-syntesen. E-verdien indikerer den faktiske mengden templat som amplifiseres for hver syklus. E-verdien bør være mellom 1,9 og 2,1 (Bio-Rad, 2006).

**Tabell 28:** Oversikt over effektiviteten til primerparene brukt i eksponeringsforsøkene

Primer	Eksponeringsforsøk 0		Eksponeringsforsøk 1, 2 og 3	
	Effektivitet	Prosent	Effektivitet	Prosent
<i>apr</i>	1,901	90,1	2,116	111,6
<i>esr1</i>	2,020	102,0	2,049	104,9
<i>rpl22</i>	2,245	124,5	2,136	113,6
<i>vtg</i>	1,878	87,8	2,214	121,4

Primereffektiviteten bestemmer hvilken metode som brukes for videre utregning av den relative mRNA-endringen. Er  $E = 2$  brukes Livak-metoden. Hvis  $E$  er forskjellig fra 2 brukes Pfaffl-metoden (Formel 2) (Bio-Rad, 2006).

$$(2) \quad \text{Forhold} = \frac{(E_{\text{målgen}})^{\Delta CT_{\text{målgen}}(\text{kontroll-prøve})}}{(E_{\text{referansegen}})^{\Delta CT_{\text{referansegen}}(\text{kontroll-prøve})}}$$

Forholdet er det relative forholdet mellom målgenet ( $E_{\text{målgen}}$ ) og referansegenet ( $E_{\text{referansegen}}$ ), der det er tatt hensyn til primerparets effektivitet ( $E$ ). Differansen mellom gjennomsnittet av kontrollgruppen og hver enkeltprøve er angitt ved  $\Delta Ct$  (BIO-RAD, 2006).

#### 3.8.1.4 Analyser av qPCR-data

GeNorm ble brukt for å normalisere uttrykkningen av *vtg* og *esr1* mot *arp* og *rpl22*. Gjennomsnittsverdien for hvert triplikat ble delt på gjennomsnittsverdien for kontrollgruppen. R ble brukt for å fjerne uteliggere i datasett og for å gjennomføre en generalisert lineær modell (glmm) for å teste signifikans av foldendring i genuttrykk i gruppene behandlet med MXC, END og MIKS opp mot kontrollgruppen. For å teste signifikans av foldendring i genuttrykk for gruppen behandlet med EE2 ble det brukt en énveis-ANOVA med Dunnets test. Dataene ble visualisert i GraphPad Prism 7.01.

## 3.9 Viabilitets- og cytotoksisitetstest av PKLS

### 3.9.1 MTT-analyse

En måte å vurdere viabilitet/cytotoksiske effekter i PKLS etter eksponering for kjemikalier er å undersøke endringer i metabolsk aktivitet. Dette kan gjøres ved å måle evnen en leverskive har til å redusere 3-(4,5-dimetylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid (MTT) til et lilla, uløselig formazan-produkt via suksinatdehydrogenase. Mengden formazanprodukt som dannes antas å være direkte proporsjonalt med antall levende celler (van Meerloo et al., 2011).

Leverskiver i duplikater ble eksponert for høyeste og laveste konsentrasjon av hver testforbindelse løst i 0,1 % DMSO i 48 timer (Tabell 2). Det ble også inkludert en løsemiddelkontroll med leverskiver som kun ble eksponert for 0,1 % DMSO.

Etter eksponering ble eksponeringsmediet fjernet, og leverskivene ble vasket to ganger med 1 mL fosfatbufret saltvann (PBS). Leverskivene ble veid før 500  $\mu$ L MTT (2 mg / mL) ble tilsatt. Platen ble dekket med aluminiumsfolie og satt til inkubering i 1,5 time ved 10 °C på en ristepate. Leverskivene ble vasket med 1 mL PBS før 1 mL DMSO (100 %) ble tilsatt. Platen ble dekket med aluminiumsfolie og plassert på ristepate i 20 minutter. Formazan løst i DMSO ble i triplikater overført til en 96-brønnsplate. Absorbans ved 570 nm ble målt ved bruk av Perkin Elmer Enspire 2300 Multilable Plate Reader.

### 3.9.2 LDH-analyse

Laktatdehydrogenase (LDH) er et cytosolisk enzym som via NADH katalyserer reduksjonen av pyruvat til laktat. Hos døde celler mister cellemembranen sin integritet, og enzymet lekker ut av cellen. Dette ble brukt til å teste den toksiske effekten til forbindelsene i leverskiveeksponeringene (Legrand et al., 1992).

I det første steget vil frigitt LDH redusere  $\text{NAD}^+$  til  $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$  ved oksidering av laktat til pyruvat. I den andre enzymatiske reaksjonen blir  $2\text{H}^+$  overført fra  $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$  til det gule tetrazoliumsaltet INT (2-[4-iodofenyl]-3-[4-nitrofenyl]-5-fenyltetrazoliumklorid) av katalysatoren diaforase. En økning i antall døde- eller plasmamembranskadede celler resulterer i en økning i mengden LDH-enzymaktivitet i media. Økningen i enzymaktivitet er direkte korrelert med mengden formazan dannet i en begrenset periode. Mengden farge dannet i analysen er proporsjonal med antallet lyserte celler. Formazanfargen viser et bredt absorpsjonsmaksimum ved 500 nm. Tetrazoliumsaltet viser ikke signifikant absorpsjon ved disse bølgelengdene (Sigma-Aldrich, 2016). Analysen ble utført basert på protokoll fra Bizarro et al. (2016) ved bruk av Cytotoxicity detection kit LDH (Roche).



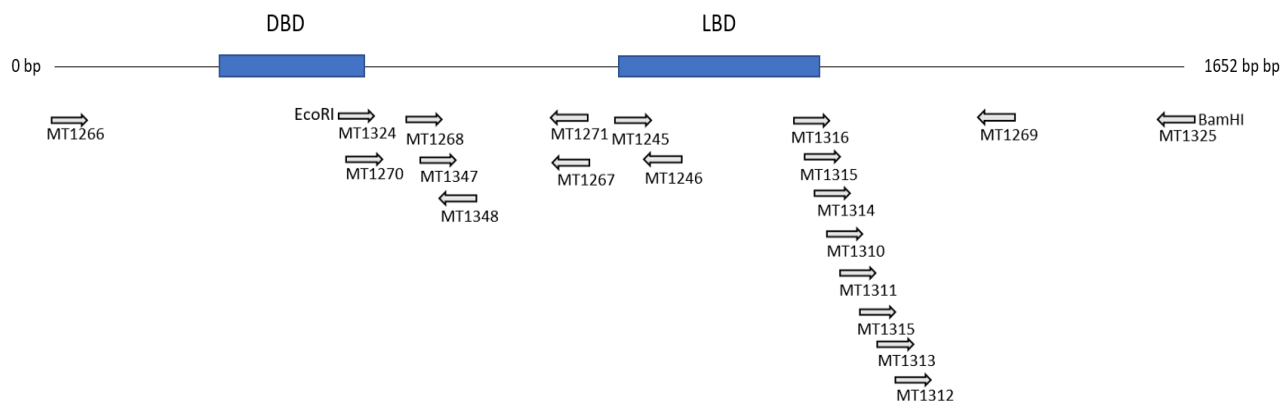
Medium ble fra alle leverskivene samlet etter 48 timer og oppbevart på  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  til det ble analysert. Media ble tint til romtemperatur, og overført i triplikater til en 96-brønnsplate (50  $\mu\text{L}$  i hver brønn) før 50  $\mu\text{L}$  reaksjonsmiks ble tilført. Platen ble dekket med aluminiumsfolie og inkubert på risteplate i 20 minutter. Med Perkin Enspire 2300 Multilabel Plate Reader ble absorbans målt ved 490 nm. Absorbans ved 650 nm ble brukt som referansemåling.

### **3.9.3 Analyser av data fra MTT- og cytotoxissitetstester**

For analysering av data fra MTT-analysen ble gjennomsnittsabsorbansen fra hver leverskive delt på vekten til leverskiven. Denne verdien ble videre delt på gjennomsnittsverdien av kontrollgruppen. For cytotoxissitetsanalysen ble referanseabsorbansen trukket fra absorbansen målt ved 490 nm. Det ble brukt en énveis-ANOVA med Dunnett's test for å undersøke signifikans av endringen i viabilitet og cytotoxissitet. Dataene ble visualisert ved bruk av GraphPad Prism 7.01

### **3.10 Primerdesign**

I denne oppgaven ble det brukt en rekke forskjellige primere (Figur 17). Det ble brukt forskjellige kriterier ut i fra om primerne ble designet til bruk i RACE-reaksjonene eller om de ble brukt til tradisjonell PCR og / eller qPCR. Ved design av genspesifikke RACE-primere ble anbefalingene fra protokollen SMART™ RACE cDNA Amplification Kit User Manual fulgt. Primerne ble designet til å ha en  $T_m > 70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 50-70 % GC-innhold og en lengde på 23 – 28 nt (Tabell 5). De andre primerne ble designet til å bestå av 18 – 22 nt, ha et GC-innhold på 40 – 60 % og til å ha en  $T_m$  som ikke varierte mer enn  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  mellom primerparene (Tabell 5). Alle primerne ble designet slik at de siste fem basene i 3'-enden besto av én til tre guanin- eller cytosinbaser.



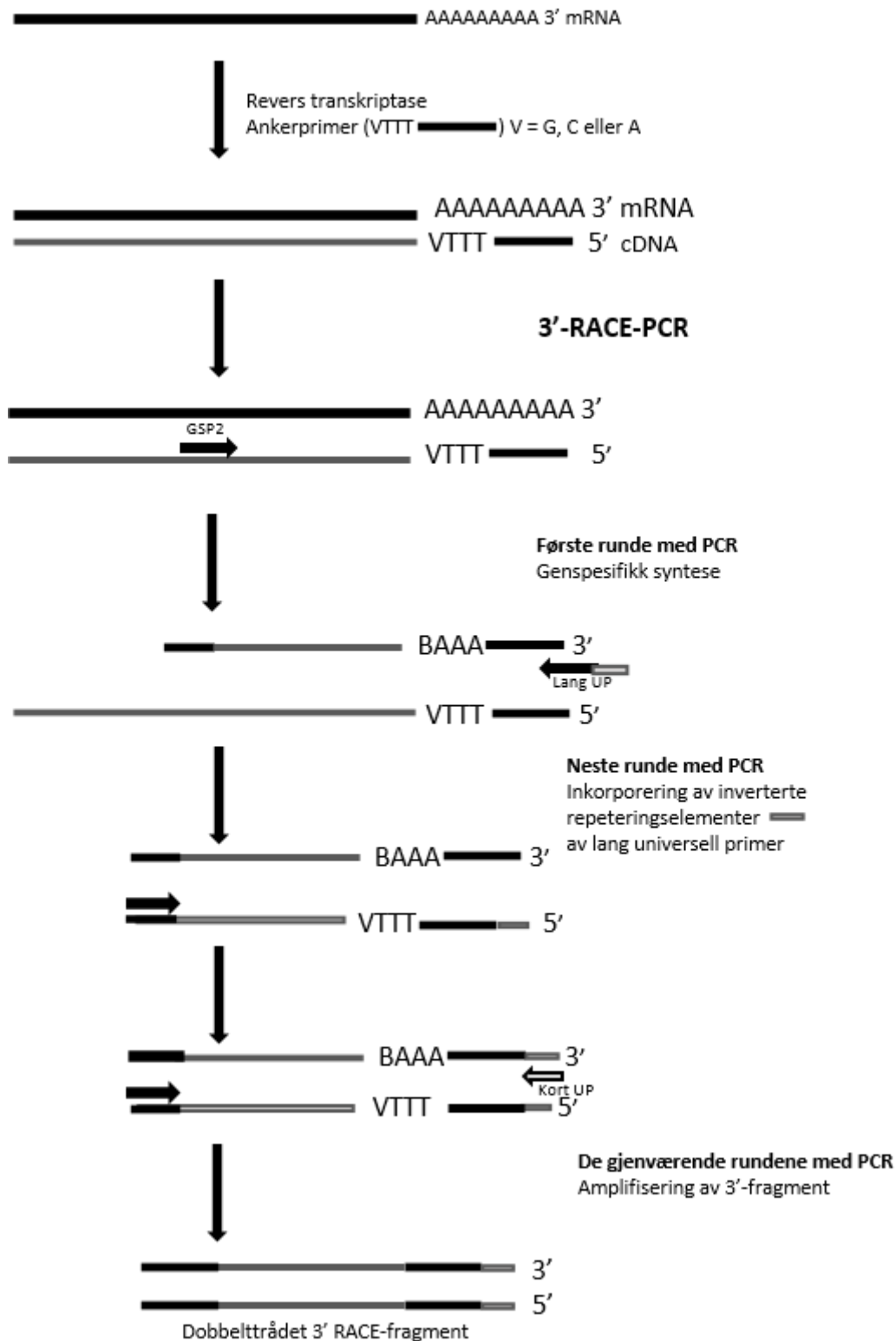
**Figur 17. Oversikt over primere for amplifisering av *toskERα*.** Identifikasjonsnummeret for primerene er angitt under primerene. Kuttsetter for restriksjonsenzymet er angitt ved siden av de aktuelle primerene. For primersekvenser se Tabell 5.

### 3.11 Rask amplifisering av cDNA-ender (RACE)

RACE er en metode som kan brukes for å sekvensere ender av transkripter når deler av sekvensen er ukjent. Ved bruk av revers transkripsjon lages først et cDNA fra RNA-sekvensen som skal undersøkes. cDNA brukes videre i genspesifikk amplifisering før produktet blir sekvensert (Borson et al. 1992).

RACE kan brukes til å finne sekvensen mot 5'-enden (5' RACE-PCR) eller 3'-enden (3' RACE-PCR) til et RNA-transkript selv når bare en liten del av sekvensen er kjent. Teknikken er også kjent som ensidig- eller forankret PCR (Borson et al. 1992).

Fremgangsmåten varierer litt ut i fra om 5' RACE-PCR eller 3' RACE-PCR skal utføres. I denne oppgaven ble 3' RACE-PCR utført. Ved 3' RACE-PCR brukes den naturlige polyA-halen som finnes i 3'-enden i alle eukaryote mRNA for priming under revers transkripsjon. I cDNA-syntesen brukes en oligo(dT)-adapter-primer som binder polyA-halen samt legger til en adaptersekvens i 5'-enden til hvert cDNA. PCR brukes videre til å amplifisere 3'-cDNA fra en kjent region ved bruk av en genspesifikk forward-primer og en revers universell primer (Figur 18) (Borson et al. 1992).



**Figur 18. Oversikt over 3'-RACE-reaksjon.** Produkt fra den RACE-spesifikke cDNA-syntesen brukes som templat i den første RACE-reaksjonen (touchdown-reaksjonen). I denne reaksjonen brukes en genspesifikk forward-primer (gsp) kombinert med en revers primermiks bestående av en lang og en kort universell primer. Produktet fra touchdown-reaksjonen brukes videre som templat i den neste PCR-reaksjonen (nestet-reaksjonen). I denne reaksjonen brukes en gsp som ligger nedstrøms for den brukt i touchdown-reaksjonen. Den reverse primeren binder til inverterte repeteringselementer inkorporert av lang universell primer i touchdown-reaksjonen. Figuren er modifisert fra Clontech (2007).

I cDNA-syntesen ble Enhanced Avian revers transkriptase (sigma) brukt. Generert cDNA ble videre brukt i til sammen to PCR-reaksjoner. I den første reaksjonen (touchdown-PCR) (Tabell 29 og 30) ble det brukt en genspesifikk forward primer (GSP) (Tabell 5) og en universell revers primermiks (UPM) (Tabell 5). I de første syklusene brukes en annealingtemperatur som er høyere enn smeltetemperaturen ( $T_m$ ) til den universelle primermiksen. GSP hadde en  $T_m > 70$  °C slik at bare genspesifikk syntese oppsto. I de neste syklusene ble annealingtemperaturen senket slik at UPM kunne anneale til templatet.

**Tabell 29:** Oversikt over reagenser i touchdown-PCR

Reagens	Volum	Konsentrasjon
MilliQ-vann	8,75 $\mu$ L	-
5X Green GoTaq®Flexi Buffer	10 $\mu$ L	1 X
Betain	10 $\mu$ L	1
DMSO	2,5 $\mu$ L	5 %
MgCl <sub>2</sub>	6 $\mu$ L	3 mM
dNTP	4 $\mu$ L	0,2 mM av hver dNTP
GoTaq Flexi DNA Polymerase	0,25 $\mu$ L	1,25 U
Universal primermiks	5 $\mu$ L	0,4 $\mu$ M
Forward-primer	1 $\mu$ L	0,4 $\mu$ M
Fortynnet cDNA	2,5 $\mu$ L	-
Endelig volum	50 $\mu$ L	

**Tabell 30:** *Temperaturprogram brukt for touchdown-PCR*

<b>Temperatur (°C)</b>	<b>Tid</b>	<b>Antall sykluser</b>
94	30 sek	5
72	5 min	
94	30 sek	
70	30 sek	5
72	5 min	
94	30 sek	
68	30 sek	5
72	5 min	
94	30 sek	
55	30 sek	25
72	5 min	

Etter touchdown-reaksjonen ble det utført en ny PCR (Tabell 31 og 32). I denne nestet-reaksjonen ble en del av det primære PCR-produktet reamplifisert ved å bruke primere (Tabell 5) som ligger innenfor primerene som ble brukt i forrige reaksjon. Anbefalingene er tatt fra protokollen SMART RACE cDNA amplification kit user manual.

**Tabell 31:** Oversikt over reagenser brukt i nestet-PCR.

Reagens	Volum	Konsentrasjon
MilliQ-vann	12,75 µL	-
5X Green GoTaq®Flexi Buffer	10 µL	1 X
Betain	10 µL	1 M
DMSO	2,5 µL	5 %
MgCl <sub>2</sub>	6 µL	3 mM
dNTP	4 µL	0,2 mM av hver dNTP
GoTaq Flexi DNA Polymerase	0,25 µL	1,25 U
Nestet universal primer	1 µL	0,4 µM
Forward-primer	1 µL	0,4 µM
Fortynnet PCR-produkt	2,5 µL	-
Endelig volum	50 µL	-

**Tabell 32:** Temperaturprogram brukt i nestet-PCR.

Temperatur (°C)	Tid	Antall sykluser
94	30 sek	
55	30 sek	23
72	5 min	

### 3.12 Ampifikasjonsbetingelser

GC-rike sekvenser, di-, tri- og tetranukleotidrepetisjoner og korte tandemrepetisjonsekvenser kan skape problemer under amplifiseringen av et DNA-fragment. DNA-polymerasen kan stoppe eller slippe i begynnelsen av regioner med mye sekundærstrukturer som templat-hårnåler. Sekvensdomener med høy smeltetemperatur kan påvirke PCR-reaksjoner ved å fungere som et termineringssete. Dannelse av sekundærstrukturer i enkeltrådede DNA-fragmenter ved intramolekylær Hogsteen-baseparing ved guanin-residuer. En rekke

tilsetningsstoffer i reaksjonsmiksduren har vist seg å forbedre effektiviteten ved amplifisering av GC-rike templat. Dimetylsulfoksid (DMSO) er det mest utbredde tilsetningsstoffet brukt i amplifiseringsreaksjoner. Det er også rapportert at betain kan forbedre amplifikasjon av GC-rike templat ved å redusere eller eliminere baseparsammensetningsavhengig smeltetransisjon. Betain hinder DNA-polymerase-stopp nær hårnål-strukturer (Frackman et al. 1998).

Etter at RACE-reaksjoner med forskjellige genspesifikke primere ikke ga resultat, ble det forsøkt å tilsette betain (1M) og DMSO (5 %). Disse stoffene har vist seg å forbedre DNA-amplifikasjonen for GC-rike produkter ved å senke smeltetemperaturen til DNA.

I tillegg til å tilsette DMSO og Betain, ble det også gjort endringer i PCR-programmer. I RACE-reaksjonene ble det i utgangspunktet brukt en elongeringstid på 3 minutter, men denne ble økt til 5 minutter i tilfelle transkriptet inneholdt en lang 3' untranslated region (UTR).

### 3.13 Kloning

#### 3.13.1 Rensing av nukleinsyrer fra agarosegel

DNA-fragmenter ble renset fra agarosegel ved bruk av NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) etter produsentens anbefalinger. Gelbitene med DNA ble smeltet på 50 °C i NTI-buffer. Buffer med oppløst DNA ble sentrifugert gjennom en silisiummembran før silisiummembranen ble vasket. Til slutt ble DNA-et eluert i tris-HCl-buffer.

#### 3.13.2 Transformerings av *Escherichia coli*

For kloning av PCR-produkter ble StrataClone PCR Cloning kit (Aligent) brukt. PCR-produkt, kloningsbuffer og vektormiks ble blandet sammen (Tabell 33) og inkubert i 5 minutter i romtemperatur.

**Tabell 33:** *StrataClone PCR-kloningssett ble brukt ved transformering av E. coli-celler*

Reagens	Volum
StrataClone Cloning Buffer	3 µL
PCR-produkt	2 µL
StrataClone Vector Mix amp/kan	1 µL

Før transformering har cellene blitt behandlet med saltløsning som gjør at den negative ladningen i cellemembranen og i plasmidet blir nøytralisert slik at bakteriecellene lettere kan ta opp plasmid. Når cellene i tillegg blir varmesjokket øker dette størrelsen på porer i cellemembranen slik at dobbelttvunnet plasmid lettere kan trenge gjennom porene. Når bakteriecellene etterpå blir inkubert på is, minker porestørrelsen i cellemembranen, og plasmid forblir i cellene (Panja et al. 2008).

StrataClone kompetente celler (25 µL) ble tilsatt kloningsmiksdur (1 µL). Cellene ble inkubert på is i 20 minutter før de ble varmesjokket på 42 °C i 45 sekunder, før de deretter ble plassert på is. Det ble tilsatt 250 µL LB-medium før cellene ble inkubert på 37 °C og 250 rpm i 1 time. Cellene ble platet ut på LB-agarplater som inneholdt ampicillin (0,1 mg / mL), før platene ble inkubert på 37 °C over natta.

Før cellene ble platet ut, ble X-gal tilsatt til agarplatene. Dette fordi et fragment av *lacZ*-genet i plasmidet kan komplimentere et annet *lacZ*-gen i cellen. Begge genene produserer ikke-funksjonelle polypeptider alene, men når de uttrykkes sammen, så danner de en funksjonell β-galaktosidase. Tilstedeværelse av en aktiv β-galaktosidase kan detekteres når celler vokser på plater som inneholder X-gal. Produktet som dannes når β-galaktosidase metaboliserer X-gal er blått, og resulterer i blå kolonier. Det multiple kloningssettet er lokalisert i *lacZα*-genet. Har plasmidet fått innsatt DNA vil dette forstyrre *lacZα* og funksjonelt β-galaktosidase dannes dermed ikke. Dette resulterer i hvite kolonier (Mientjes et al. 1996).

### **3.13.3 Identifikasjon av ønskede kloner (screening)**

For å undersøke hvilke kolonier som inneholdt plasmid med ønsket PCR-produkt, ble ulike kolonier screenet. Vektoren satt inn i bakteriene inneholdt et gen som koder for ampicillinresistans, og fordi agarplatene inneholdt ampicillin, vil bare kolonier som inneholder plasmid vokse. Kolonier uten innsatt DNA-fragment var blå (se over), derfor ble hvite kolonier screenet for å sjekke at de hadde innsatt fragment av rett størrelse. Lovende kolonier ble dyrket i LB-medium med ampicillin (0,1 mg / mL) på 37 °C på 250 rpm over natt før plasmid ble rensset og sendt til sekvensering.

### **3.13.4 Plasmidresing**

Før sekvensering og plasmidkonstruksjon ble plasmid-DNA rensset ved hjelp av miniprep (metode 3.13.4.1) eller midiprep (metode 3.13.4.2). Bakteriene med media ble først sentrifugert slik at bakteriene ble samlet i en pellet. Pelleten ble resuspendert i RNase-holdig buffer. Alkalisk og natriumdodecylsulfatholdig (SDS-holdig) buffer ble tilsatt for å lysere bakteriene



og frigjøre DNA fra cellene. Nøytraliseringsbuffer ble tilsatt slik at proteiner, genomisk DNA og andre uønskede cellekomponenter ble felt ut, og for at plasmid-DNA skal kunne binde til silisiummembranen. Til slutt ble DNA eluert i en svak alkalisk buffer (5mM tris-HCl, pH 8,5) eller i sterilt milliQ-vann.

#### **3.13.4.1 Småskalarensing av plasmid ved bruk av miniprep**

Miniprep (småskalarensing) ble brukt til rensing av plasmid-DNA brukt til sekvensering og til konstruksjon av pCMX-Gal4-ER $\alpha$ . 2 mL LB-medium med ampicillin (0,1 mg / mL) ble inokulert med bakterieceller og inkubert på 37 °C på 250 rpm i ca. 16 timer. Plasmid ble rensset ved bruk av Nucleospin Plasmid EasyPure (Macherey-Nagel). Produsentens anbefalinger ble fulgt.

#### **3.13.4.2 Storskalarensing av plasmid ved bruk av midiprep**

For rensing av plasmid brukt til konstruksjon av pCMX-Gal4-ER $\alpha$ -LBD ble det brukt storskalarensing. Det ble opprettet en startkultur med 5 mL LB-medium med ampicillin (0,1 mg / mL) som ble inkubert ved 37 °C på 250 rpm i ca. 16 timer. Kulturen ble inokulert med 100 mL LB-medium med ampicillin (0,1 mg / mL) og oppbevart ved 37 °C på 250 rpm i 16 timer. Plasmid ble rensset fra kulturen ved bruk av NucleoBond® Xtra Midi-kit (Macherey-Nagel) etter anbefalinger fra produsenten. Plasmid ble løst i sterilisert milliQ-vann.

### **3.14 Sangersekvensering**

Sekvenseringen ble utført ved bruk av en kapillær-basert 3730XL Analyzer (Applied Biosystems) ved Molekylærbiologisk institutt (UiB). Den aktuelle DNA-sekvensen blir amplifisert ved bruk av en blanding av deoksynukleotider og fluorescens-merkede dideoksynukleotider. Fordi dideoksynukleotidene mangler en 3' hydroksylgruppe terminerer elongeringen av DNA-molekylene. Når dideoksynukleotider innsettes tilfeldig, blir det avgitt fluorescens. Hvert fragment bestemmer nuklotidens posisjon. Denne sekvenseringsmetoden er begrenset til om lag 900 bp, det ble derfor ved sekvensering av lengre fragmenter benyttet flere primere slik at hele sekvensen ble dekket. I sekvenseringsreaksjonen ble BigDye version 3.2 brukt (Tabell 34). Etter amplifisering (Tabell 35) ble det tilsatt 10  $\mu$ L milliQ-vann før prøvene ble levert til sekvenseringslaboratoriet for analysering.

**Tabell 34:** *Reagenser brukt ved sangersekvensering*

Reagens	Volum	Konsentrasjon
BigDye v. 3.1	1 $\mu$ L	
Sekvenseringsbuffer	1 $\mu$ L	
Templat	-	200 ng
Primer	1,6 $\mu$ L	3,2 pmol
MilliQ-vann	Til 10 $\mu$ L	-

**Tabell 35:** *Temperaturprogram ved sangersekvensering*

Temperatur ( $^{\circ}$ C)	Tid	Antall sykluser
96	5 min	1
96	10 sek	
51	5 sek	35
60	4 min	
4	$\infty$	-

### 3.15 Setespesifikk mutagenese

Substitusjoner er mutasjoner der en base har blitt byttet ut med en annen base. En slik mutasjon kan resultere i endring av aminosyresekvens. Det er mulig å endre den muterte basen tilbake til den opprinnelige ved hjelp av spesialdesignede forward- og reversprimere. Den ønskede nukleotidendringen inkorporeres midt i forwardprimeren.

Sekvensering avdekket at alle sekvenserte *esr1*-transkriptene inneholdt punktmutasjoner på forskjellige steder i de ulike transkriptene. Det ble valgt ut en sekvens med bare én punktmutasjon, der den substituerte basen ble mutert tilbake ved bruk av spesialdesignede primere og Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (BioLabs) etter produsentens anbefalinger.

### 3.16 Konstruksjon av plasmidet pCMX-Gal4-ER $\alpha$

For å konstruere plasmidet pCMX-Gal4-ER $\alpha$ -LBD til bruk i luciferasebaserte ligandaktiveringsanalyser, ble det klonete ER $\alpha$ -LBD-fragmentet ligert inn i et pCMX-Gal4-DBD-plasmid.

### 3.16.1 Kuttsetter for restriksjonsenzymmer

For å konstruere fusjonsproteinet Gal4-ER $\alpha$ -LBD, ble det ved å designe primere som inneholdt kuttsetter i 5'-enden, introdusert kuttsetter i endene til sekvensen til *esr1*. Kuttsetene som ble introdusert var kompatible med kuttsetter i vektoren som ble brukt (pCMX-Gal4-DBD). Det ble introdusert kuttsetter for forskjellige restriksjonsenzymmer (henholdsvis EcoRI og BamHI) i hver ende av sekvensen for å sørge for retningsspesifikk ligering inn i plasmidet.

### 3.16.2 Partiell kutting med restriksjonsenzymmer

Det ble benyttet en partiell kuttreaksjon for konstruksjon av Gal4-ER $\alpha$ -LBD. *Esr1*-LBD inneholder et internt kuttsete for BamHI. For å unngå restriksjonskutting i dette setet, ble det satt opp partielle kuttreaksjoner med *esr1* og en konstant konsentrasjon av EcoRI. BamHI ble tilsatt og fortynnet 1:3 for hver prøve. Bortsett fra dette var komponentene de samme som i Tabell 36. Totalvolumet for reaksjonene var 20  $\mu$ L. Reaksjonene ble inkubert ved 37 °C i 1 time, og produktene ble separert ved AGE. Reaksjon med tilfredsstillende resultat ble gjentatt med større volum (Tabell 36).

### 3.16.3 Kutting av DNA

pCMX-Gal4-DBD og *esr1*-LBD ble kuttet med restriksjonsenzymene EcoRI og BamHI. Kuttreaksjoner ble tillaget (Tabell 36 og 37) og inkubert ved 37 °C i 1 time, før de ble separert på en agarosegel. Produkter av ønsket størrelse ble kuttet ut fra gelen og rensert som beskrevet i 3.5.3.

**Tabell 36:** Protokoll for restriksjonskutting av innsatt DNA

Reagens	Volum	Konsentrasjon
DNA (225 ng/ $\mu$ L)	10 $\mu$ L	45 ng/ $\mu$ L
BamHI (0,02 U/ $\mu$ L)	3,33 $\mu$ L	0,0014 <u>U</u>
EcoRI (15 U/ $\mu$ L)	3,33 $\mu$ L	1 U
10 X Buffer K/M	5 $\mu$ L	1 X
BSA (0,1 %)	5 $\mu$ L	0,01 %
MilliQ-vann	Til 50 $\mu$ L	-

**Tabell 37:** Protokoll for restriksjonskutting av plasmid

Reagens	Volum	Konsentrasjon
DNA	6.18 µL	250 ng/µL
BamHI (15 U/µL)	3,33 µL	1 U
EcoRI (15 U/µL)	3,33 µL	1 U
10 X Buffer K/M	5 µL	1 X
BSA (0,1 %)	5 µL	0,01 %
MilliQ-vann	Til 50 µL	-

### 3.16.4 Defosforylering

For å hindre religering av plasmidet uten innsatt fragment, ble pCMX-Gal4-DBD-vektoren defosforylert med alkalisk fosfatase (SAP) (Affymetrix). SAP fjerner fosfatgruppen 5' i DNA som oppstår når vektoren blir kuttet med restriksjonsenzymmer. Komponentene i reaksjonen er listet opp i Tabell 38. Reaksjonen ble inkubert ved 65 °C i 45 min, før fosfatasen ble inaktivert ved varmebehandling ved 65 °C i 15 min. Formel 3 ble brukt for å regne ut volumet for 1 pmol DNA-ender.

**Tabell 38:** komponenter for defosforylering

Reagens	Volum	Konsentrasjon
Lineært DNA	-	1 pmol DNA-ender
10 X SAP-buffer	2 µL	1 X
SAP (1 U/µL)	1 µL	1 U
MilliQ-vann	Til 20 µL	-

$$(3) \quad \text{pmol DNA - ender} = \mu\text{g DNA} \times \frac{\text{pmol}}{660 \text{ pg}} \times \frac{10^6 \text{ pg}}{1 \mu\text{g}} \times \frac{1}{N}$$

N er antall nukleotider og 660 pg / pmol er gjennomsnittlig molekylær vekt på et nukleotidpar.

### 3.16.5 Ligering

Defosforylert pCMX-Gal4-DBD ble ligert sammen med *esr1*-LBD ved hjelp av T4 DNA-ligase (Takara) (Tabell 39). Reaksjonsmiksen ble inkubert på 12 °C i 12 timer før ligasen ble inaktivert ved inkubering ved 65 °C i 15 min. Det ble brukt et molart forhold mellom innsatt DNA og plasmid på 3:1. Massen innsatt DNA som ble brukt i reaksjonen ble beregnet ut fra Formel 4.

**Tabell 39:** Komponenter i liseringsreaksjon

Reagens	Volum	Konsentrasjon
pCMX-Gal4 (vektor)	-	2,5 ng / $\mu$ L
<i>esr1</i> (insert)	-	Formel 4
T4 DNA-ligase	0,5 $\mu$ L	17,5 U / $\mu$ L
10 X T4 DNA-ligasebuffer	1 $\mu$ L	1 X
MilliQ-vann	Til 10 $\mu$ L	-

$$(4) \quad \text{Masse insert (g)} = \text{Molar ratio} \frac{\text{Insert}}{\text{vektor}} \times \text{Masse vektor (g)} \times \frac{\text{Insertlengde}}{\text{vektorlengde}}$$

### 3.17 Luciferasebasert genreportersystem

Det luciferasebaserte genreportersystemet brukt i denne oppgaven baserer seg på at et reseptor- og et reporterplasmid transfekteres inn i COS-7-celler. Reseptorplasmidet inneholder ER-LBD fusjonert N-terminalt til Gal4-DBD. Reporterplasmidet inneholder et luciferasegen med oppstrøms aktiveringssekvenser (UAS) som gjenkjennes av Gal4-DBD. Når en ligand binder til ER-LBD i fusjonsproteinet vil dette resultere i en konformasjonsendring og Gal4-DBD-delen vil binde til UAS i reporterplasmidet og indusere uttrykkningen av luciferase. Luciferaseproteinet katalyserer dannelsen av oxyluciferin fra luciferin i en reaksjon som også produserer lys (luminescens). Dette lyset kan detekteres og kvantifiseres og gir informasjon om grad av aktivering av reseptoren.

Det ble samtidig korrigert for variasjoner i tranfeksjonseffektivitet inn i COS-7 cellene mellom de ulike brønnene ved å kotransfekte et plasmid som inneholdt genet for  $\beta$ -galaktosidase (pCMX- $\beta$ -Gal) sammen med reporterplasmidet (mh(100)x4tk) og reseptorplasmidet (pCMX-Gal4-ER $\alpha$ -LBD).  $\beta$ -galaktosidase katalyserer reaksjonen der orto-nitrofenyl- $\beta$ -galaktosid (ONPG) danner galaktose og orto-nitrofenyl. Dannelsen av det lysegule produktet kan følges

spektrofotometrisk ved 420 nm. Ved å dele luminescens-verdiene av luciferaseaktiviteten på absorpsjonsverdiene av  $\beta$ -galaktosidaseaktiviteten korrigeres det dermed for ulike transfeksjonseffektiviteter mellom brønnene i celledyrkningsplaten.

### **3.17.1 Kultivering av COS-7-celler**

COS-7-celler var lagret i frysemedium DMEM-10%FBS (Tabell 7) og 5 % dimetylsulfoksid (DMSO). Cellene ble tint og tilsatt 10 mL DMEM-10%FBS (Tabell 8) og sentrifugert i 5 min ved 250g. Medium ble fjernet, og cellene ble resuspendert i 10 mL DMEM-10%FBS, sådd ut på kultiveringsplater og inkubert ved 37°C i 5 % CO<sub>2</sub>. Når celletettheten hadde nådd ca. 80 % konfluens ble cellene splittet. Medium ble fjernet, og cellene ble vasket 2 ganger i 1 X fosfatbufret salt (PBS) (pH 7,4). Cellene ble behandlet med 1,5 mL Trypsin-EDTA (0,5 % trypsin, 0,02 % EDTA) i 30 sekunder. Overskuddsløsning ble fjernet. Cellene ble inkubert ved 37 °C i 5 % CO<sub>2</sub> i 5 min, før cellene ble resuspendert i DMEM-10%FBS og fortynnet 1:10 før de videre ble inkubert ved 37 °C i 5 % CO<sub>2</sub>.

### **3.17.2 Utsåing av COS-7-celler**

Ved utsåing ble gammelt medium fjernet, cellene ble vasket 2 ganger i PBS, før de ble behandlet med trypsin-EDTA. Cellene ble resuspendert i dyrkningsmedium. Resuspenderte celler og tryptan blue ble blandet 1:1, og celletetthet ble bestemt ved hjelp av et haemocytometer (buerker) og et lysmikroskop. Cellene ble sådd ut i en 96-brønnsplate, der 5000 celler ble tilsatt hver brønn. Platen ble inkubert ved 37 °C i 5 % CO<sub>2</sub> i 24 timer.

### **3.17.3 Transfeksjon av COS-7-celler**

Ved transfeksjon ble først plasmidmiks tillaget (Tabell 40). Plasmidmiks ble tilsatt Opti-MEM og transIT-LT1. Blandingen ble inkubert ved romtemperatur i 30 min, før den ble tilsatt i vekstmedium (Tabell 41). Gammelt medium ble fjernet fra 96-brønnsplaten, og 101,3  $\mu$ L av transfeksjonsblandingen ble tilsatt hver brønn. Platen ble inkubert ved 37 °C i 5 % CO<sub>2</sub> i 24 timer.

**Tabell 40:** Mengde av de ulike plasmidene i hver brønn i en 96-brønnsplate

Plasmid	Mengde
(MH100)x4 tk luc	47,62 ng
pCMV- $\beta$ -Gal	47,62 ng
pCMX-Gal4-ER $\alpha$ -LBD	4,76 ng

**Tabell 41:** Volum av reagenser tilsatt i hver brønn i en 96-brønnsplate

Reagens	Volum
Opti-MEM	9 $\mu$ L
Plasmidmiks	0,1 $\mu$ L
TransIT-LT1	0,2 $\mu$ L
DMEM-10%FBS	92 $\mu$ L

#### 3.17.4 Eksponering

24 timer etter transfeksjon ble cellene eksponert for forbindelsene etynyløstradiol (EE2), metoksyklor (MXC), endosulfan (END) og en blanding av MXC og END (MIKS). Gammelt medium ble fjernet, og cellene ble i triplikater eksponert for de respektive konsentrasjonene av de ulike forbindelsene (Tabell 42). Eksponeringsstoffet ble tillaget sammen med DMEM 10%-FBS (uten fenolrødt) og DMSO. Konsentrasjonen av DMSO var lik i alle brønnene (0,1 %). Volum tilsatt i hver brønn var 200  $\mu$ L. Platen ble inkubert ved 37 °C i 5 % CO<sub>2</sub> i 24 timer.

**Tabell 42:** Stoff og konsentrasjoner brukt i ligandaktiveringsforsøk

Forsøk	Konsentrasjoner			
	EE2 (nM)	MXC ( $\mu$ M)	END ( $\mu$ M)	MIKS ( $\mu$ M)
<b>1</b>	100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001	100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56	100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56	100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56
<b>2</b>	25, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001	100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56	100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56	100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56
<b>3</b>	25, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001	100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56	100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56	100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56

\* konsentrasjon oppgitt for MIKS er total molaritet av MXC og END i et ekvimolart forhold

### 3.17.5 Lysering og enzymaktivitetsmåling

24 timer etter eksponering ble eksponeringsmedium fjernet fra 96-brønnsplaten. Det ble tilsatt 125  $\mu$ L lyseringsløsning (Tabell 13) til hver brønn. Platen ble inkubert ved romtemperatur under lett risting i 30 min. Fra hver brønn ble det overført 50  $\mu$ L lysat til en hvit 96-brønnsplate til måling av luminescens og 50  $\mu$ L lysat til en gjennomsiktig 96-brønnsplate til måling av absorbans. Til hver brønn i den gjennomsiktige platen ble det tilsatt 100  $\mu$ L  $\beta$ -gal-løsning (Tabell 15). Platen ble inkubert ved RT i ca. 20 min til en lysegul farge oppsto. Absorbans ble avlest ved 420 nm. Det ble tilsatt 100  $\mu$ L luciferaseløsning (Tabell 17) til hver brønn i den hvite luminescensplaten. Luminescens ved 560 nm ble øyeblikkelig avlest. Både luminescens og absorbans ble målt ved hjelp av en EnSpire 2300 plateleser (PerkinElmer).

### 3.17.6 Databehandling og statistikk

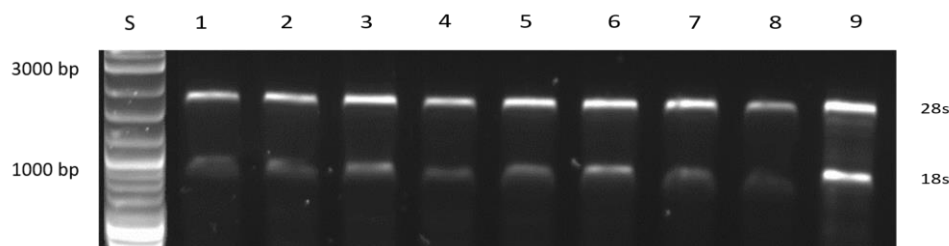
Den målte luminescensen ble normalisert mot verdiene for absorbans som beskrevet i 3.17.5. Videre ble verdiene for de ulike konsentrasjonene delt på gjennomsnittet av løsemiddelkontrollene for å beregne foldaktivering av ER $\alpha$ . Gjennomsnitt og standardavvik ble visualisert ved bruk av GraphPad Prism 7.01. Statistisk signifikans ble undersøkt ved bruk av en énveis-ANOVA med Dunnets test i GraphPad Prism 7.01.



## 4 Resultater

### 4.1 Induksjon av *esr1* i PKLS eksponert for EE2

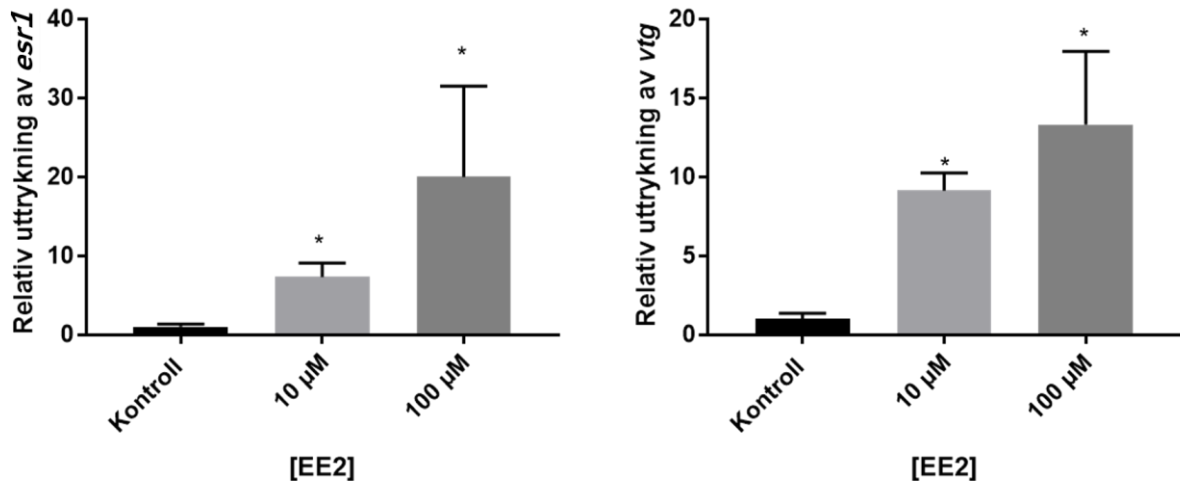
Atlantehavstorsken brukt i denne oppgaven var juvenil og uttrykker potensielt relativt lave mengder av *esr1* i gonade og lever. For å øke produksjonen *esr1*-transkript og dermed også sjansen for å amplifisere og klonere *esr1*, ble PKLS eksponert for henholdsvis 10 og 100  $\mu\text{M}$  EE2 i 48 timer for å stimulere uttrykkningen av reseptoren (metode 3.4). Det er tidligere vist at ER $\alpha$  er selv-induserende ved eksponering for agonist over en lengre periode (Danielian et al., 1992). Etter endt eksponering ble to og to parallelle leverskiver slått sammen før total-RNA ble ekstrahert (metode 3.5). RNA-kvalitet og -integritet i prøvene ble vurdert med hjelp av spektrofotometri og agarosegelelektroforese. RNA-preparatene viste  $A_{260/280}$ -verdier fra 2,05 til 2,25, og  $A_{260/230}$ -verdier som varierte fra 1,23 til 2,06 (Tabell 43). Noen av  $A_{260/230}$ -verdiene var litt lave, noe som kan være forårsaket av kontaminering av kaotropske salter og fenol. En alikvot av RNA ble deretter separert på en agarosegel for å kontrollere integriteten til RNA (Figur 19). To distinkte bånd som representerer de ribosomale 28s og 18s-subenhetene kan observeres på henholdsvis ca. 2300 og 1200 bp, og indikerer lite nedbrytning av RNA i prøvene.



**Figur 19. Integritet av RNA preparert fra leverskiver av torsk.** Integriteten av RNA isolert fra leverskiver eksponert for EE2 ble undersøkt på en 1 % agarosegel. Gelen inneholder RNA isolert fra leverskiver eksponert for DMSO (kontroll) (brønn 1-3), 10  $\mu\text{M}$  EE2 (brønn 4-6) og 100  $\mu\text{M}$  (brønn 7-9). 200 ng RNA ble applisert i hver brønn. DNA ble farget med GelRed tilsatt under støping av agarosegelen, og RNA ble visualisert med (ChemiDoc). Log2 (NEB) molekylvektstandard er merket med S. Posisjonen til 28s- og 18s-subenhetene er indikert til høyre på figuren.

cDNA ble deretter syntetisert fra RNA-preparatene som beskrevet i metode 3.7, og qPCR ble brukt for å undersøke endring i uttrykkningen av *esr1* og ER $\alpha$ -målgenet, *vtg* (metode 3.8.1) (Figur 20). Uttrykkningen ble normalisert mot uttrykkning av referansegnet *arp*, som er antatt å ikke endre transkripsjonen under eksponeringsregimet (Olsvik et al., 2008). Det ble observert en signifikant oppregulering av både *esr1* og *vtg* for begge eksponeringskonsentrasjonene. Ved eksponering for 10 og 100  $\mu\text{M}$  EE2 ble det observert en gjennomsnittlig økning i uttrykkning av *esr1* på henholdsvis 7,3 fold og 20,0 fold, og en økning i uttrykkning av *vtg* på henholdsvis 9,1

og 13,3, sammenlignet med løsemiddelkontrollen (DMSO). For et av leverskiveparene eksponert for 100  $\mu\text{M}$  EE2 ble det funnet en oppregulering av *esr1* på 42,3. RNA fra dette leverskiveparet ble brukt videre i RACE/kloningsprosessen.



**Figur 20. Transkripsjon av *esr1* og *vtg* i PKLS fra torsk eksponert for EE2.** qPCR ble benyttet for å undersøke endring i transkripsjonen av *esr1* og *vtg* i leverskiver fra torsk eksponert for 10  $\mu\text{M}$  og 100  $\mu\text{M}$  EE2. Gjennomsnittlig uttrykning (+ SEM) relativ til løsemiddelkontroll (DMSO) tre leverskiver fra én fisk for hver eksponeringskonsentrasjon er vist. Genuttrykk er normalisert mot *arp* for. Signifikante endringer i gentranskripsjon er merket med \* ( $p \leq 0,05$ ).

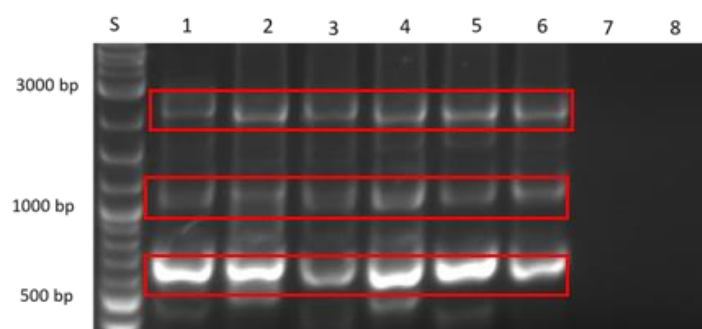
#### 4.2 Rask amplifisering av cDNA-ender (RACE)

Slutten av gensekvensen til *esr1* fra torsk er ikke tilstede i sekvensen som foreligger i GenBank-databasen (JX178935), eller annotert i genomsekvensen som er tilgjengelig via ENSEMBL. Det måtte derfor gjøres RACE-reaksjoner for å avdekke denne slik at hele ER $\alpha$ -LBD kunne klones fra atlantehavstorsk. I arbeidet for å kartlegge den ukjente 3'-enden ble en rekke mislykkede RACE-reaksjoner gjennomført (ikke vist i oppgaven). Svært mye tid gikk med på å variere ulike parametere. Det ble blant annet forsøkt ulike transkriptaser i den RACE-spesifikke cDNA-syntesen, det ble forsøkt ulike DNA-polymeraser i amplifiseringsreaksjonene, det ble forsøkt ulike variasjoner i annealingtemperatur og elongeringstid i PCR-reaksjonen, og det ble utført RACE-reaksjoner med ulike kombinasjoner av primere. Likevel viste sekvensering av de ulike RACE-produktene kun uspesifikk amplifisering av DNA-fragmenter som ikke var relatert til *esr1*. Som et siste forsøk ble det forsøkt å tilsette PCR-additiver (DMSO og betain) til RACE-reaksjonen for å denaturere eventuell sekundærstruktur tilstede i *esr1*-transkriptet i håp om å fremme amplifisering.

Resultatene fra RACE-prosedyren med DMSO og betain tilsatt til PCR-reaksjonene er beskrevet under.

#### **4.2.1 RACE-reaksjoner med PCR-additiver**

For å utføre RACE-prosedyren ble det først utført RACE-spesifikk cDNA-syntese (metode 3.7). Det ble videre utført to PCR-reaksjoner (metode 3.11), hvor den andre reaksjonen er en nestet-PCR-reaksjon, der det primære PCR-produktet blir reamplifisert ved bruk av primere som ligger innenfor primerene som ble brukt i første reaksjon. I den første PCR-reaksjonen, her omtalt som touchdown-reaksjonen, ble det RACE-spesifikke cDNA-et brukt som templat. Det ble utført touchdown-reaksjoner med seks ulike *esr1*-genspesifikke forward-primere. En revers primermiks bestående av lang universell primer (MT535) og kort universell primer (MT536) (Tabell 5) ble brukt i alle touchdown-reaksjonene. I nestet-PCR-reaksjonene ble produktet fra touchdown-reaksjonene brukt videre som templat. Den samme genspesifikke nestet-primeren ((MT537 (Tabell 5)) ble brukt i alle nestet-reaksjonene, og det ble derfor forventet like store bånd i alle prøvene dersom touchdown-reaksjonene hadde vært spesifikke mot *esr1*. Separasjon av produktene fra nestet-PCR-reaksjonene med agarosegelelektroforese viste tre like store hovedfragmenter i alle reaksjonene (Figur 20). Produktene ble separert på nytt på en preparativ agarosegel og de tre mest intense båndene (Figur 21) ble skåret ut. DNA-fragmentene ble gelrenset, ligert inn i en kloningsvektor, og transformert inn i kompetente *E. coli*-celler (metode 3.13.2). Utvalgte kolonier ble PCR-screenet dagen etter, og positive transformanter ble dyrket i LB-medium over natt før plasmid ble renset fra overnatte-kulturene (metode 3.13.4) og innskuddet i kloningsvektoren ble sekvensert (metode 3.14). Translaterte nukleotidsekvenser fra sekvenseringsreaksjonene ble sammenstilt med fragmentet fra torsk-ER $\alpha$  som tidligere har blitt klonet og sekvensert i Nagasawa et al. 2014 (ID-nummer JX178935) (Figur 22). De sekvenserte klonene viste samme nukleotidsekvens og kun én representant av disse sekvensene er vist i sekvenssammenstillingen.



**Figur 21. RACE-reaksjoner tilsatt betain og DMSO for å amplifisere 3'-enden av *esr1* fra torsk.** Figuren viser PCR-produktene fra 6 nestet-reaksjoner. Det ble brukt ulike genspesifikke primere i touchdown-reaksjonene; Brønn 1: MT1310, Brønn 2: MT1311, Brønn 3: MT1313, Brønn 4: MT1314, Brønn 5: MT1315 og Brønn 6: MT1316 (Tabell 5). Den genspesifikke primeren MT1312 (Tabell 5) ble brukt i alle nestet-reaksjonene. Produktene ble separert på en 0,7% agarosegel, og 2 µL PCR-produkt ble applisert i hver brønn. To ikke-templatkontroller (Brønn 7 og 8) er også vist på gelen. Fragmentene tilsvarende dem som ble skjært ut fra en preparativ agarosegel er merket med rødt. DNA ble farget med GelGreen tilsatt under støpning av agarosegelen. Log 2 molekylvektstandard (NEB) er merket med S.

```

JX178935      SCEGCKAFFKRSIQGHNNYMCPATNQCTIDRNRKSCQACRLRKCYEVGMMKGGMRKDRG
os73          -----

JX178935      SRVLRDKRRGVAGDRDKGPRQLENRTSPPQDGRNCGGGSRAGERTGADVGAARGSR
os73          -----

JX178935      IGIPPDQVLLVLQGAEPPISSRQKMNRPYTEVSMMTLLTSMADKELVHMIAWAKKVPGF
os73          -----

JX178935      LELSLHDQVQLLESSWLEVLMIGLIWRSIHYPGKLIFAQDLILDRTEGDCVEGMAEIFDM
os73          -----

JX178935      LLATVSRFRMLQLNPEEFVCLKAIILLNSGAFSFCSTSTMEALHDSLAVQGMLDTITDALI
os73          -----DTITDALI
                      *****

JX178935      HHISQSGCSIQQQSRRQAQLLLLLSHIRHMSNKGMEHLYSMKCKNKVPLYDILLEMLDA-
os73          HHISQSGCSIQQQSRRQAQLLLLLSHIRHMSNKGMEHLYSMKCKNKVPLYDILLEMLDAH
                      *****

JX178935      -----
os73          RLQRPVKAASHPRGGGPGDREACTSGSSSCSKLGTGHRGAGGLEGHGRAPGPGVLISSG

JX178935      -----
os73          PLHECASV *

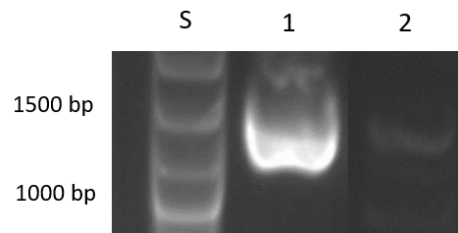
```

**Figur 22. Parvis sekvenssammenstilling av den tilgjengelige ERα-sekvensen fra torsk (ID: JX178935) og 3'-enden til ERα (sekvensert RACE-produkt).** Sammenstilling av aminosyresekvenser i Clustal Omega viste at

RACE-produkt fra PCR-reaksjon tilsatt betain og DMSO var identisk med ER $\alpha$ -sekvensen til torsk i GeneBank. RACE-produktet avslørte samtidig sekvensen til slutten av *esr1*-transkriptet. Stoppkodon er representert med \*.

#### 4.2.2 Design av primere

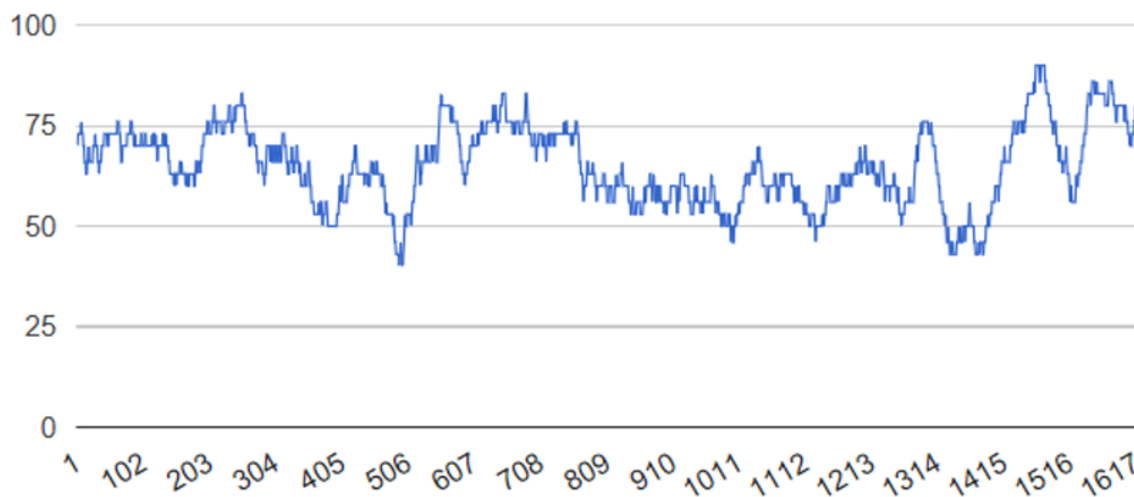
Sekvenseringen av produkter fra RACE-reaksjoner avdekket 3'-enden av *esr1*-transkriptet, og gjorde det mulig å designe primere for amplifisering av hele *esr1*-LBD fra torsk. Primerene ble designet slik at restriksjonssteder for BamHI og EcoRI ble introdusert i henholdsvis starten og slutten av PCR-fragmentet. Amplifiseringen ble forsøkt med og uten tilsetning av betain og DMSO til PCR-reaksjonsmiksen. Den positive effekten av betain og DMSO på amplifiseringseffektiviteten av *esr1*-LBD ble tydelig visualisert gjennom agarosegelelektroforese av PCR-produktene (Figur 23).



**Figur 23. Amplifisering av torsk-*esr1*-LBD-fragment med og uten betain og DMSO.** *esr1* ble amplifisert i reaksjoner med (Brønn 1) og uten (Brønn 2) betain og DMSO tilstede. Primerne MT1324 og MT1325 (Tabell 5) ble brukt. Produktene ble separert på en 0,7 % agarosegel og det ble applisert 2  $\mu$ L PCR-produkt i hver brønn. DNA ble farget med GelGreen tilsatt under støpning av agarosegelen. Log 2 molekylvektstandard (NEB) er merket med S.

#### 4.2.3 Nukleotidinnhold

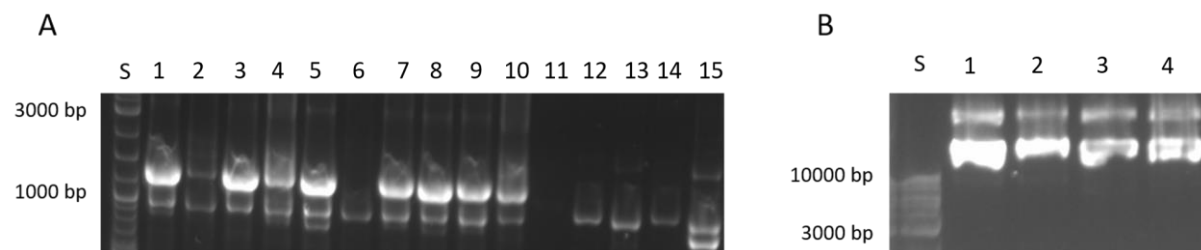
For å nærmere undersøke hvorfor det var problematisk å amplifisere slutten av *esr1*, ble det laget en oversikt over innholdet av guanin og cytosin (GC) i gensekvensen ved hjelp av programmet EndMemo. Templater med høyt GC-innhold kan være vanskelige å amplifisere da disse basene fører til høyere smeltetemperatur og mer stabile sekundærstrukturer. Sekvensdataene fra gensekvensen til *esr1* viser et relativt høyt (>60%) GC-innhold i store deler av sekvensen (Figur 24). Mot slutten av sekvensen (fra ca. nukleotid 1430) er det en drastisk økning i GC-innhold før det minker igjen rundt nt 1480. Det er en ny økning i GC-innhold rundt nt 1520 og ut slutten av sekvensen.



**Figur 24. GC-profil av torsk-*esr1*-cDNA.** Figuren viser prosentvis (%) innhold av guanin og cytosin i sekvensen til torsk-*esr1*

### 4.3 Kloning av ER $\alpha$

Amplifisering av *esr1* ble gjentatt som beskrevet i 4.2.1, og PCR-produktet ble direkte ligert inn i en kloningsvektor (pSC-A) og transformert inn i kompetente *E. coli*-celler. Utvalgte kolonier ble PCR-screenet. Det ble dyrket og rensset plasmid fra et utvalg av positive transformanter (Figur 25) før de ble sendt til sekvensering. Sekvenseringen avdekket punktmutasjoner på ulike lokaliteter i det innsatte *esr1*-fragmentet (Figur 26).



**Figur 25. PCR-screening av transformanter fra amplifisering av torsk-*esr1*-LBD (A) og kvalitetskontroll av plasmid (B).** PCR-produktet fra amplifisering av *esr1* ble ligert inn i en kloningsvektor og transformert inn i kompetente *E. coli*-celler. (A) Utvalgte kolonier ble PCR-screenet for å kontrollere for innskudd av DNA i vektoren. 2  $\mu$ L PCR-produkt ble applisert i hver brønn. (B) Plasmid rensset fra overnatte-kulturer ble undersøkt på agarosegel før sekvensering. Det ble tilsatt 200 ng plasmid til hver brønn. Både PCR-produktene (A) og plasmidene (B) ble separert på 0,7 % agarosegeler. DNA ble farget med GelGreen som ble tilsatt under støpning av gelen. Log 2 molekylvektstandard (NEB) er merket med S.

```

JX178935      SCEGCKAFFKRSIQGHNNYMCPATNQCTIDRNRKSCQACRLRKCYEVGMMKGGMRKDRG
os96+os97    -----EFMKGGMRKDRG
os100+os101  -----EFMKGGMRKDRG
os88+os89    -----EFMKGGMRKDRG
os98+os99    -----EFMKGGMRKDRG
              :*****

JX178935      SRVLRDRKRRGVAGDRDKGPRQLENRTSPPQDGRNCGGGGSRAGERTGADVGAARGSR
os96+os97    SRVLRDRKRRGVAGDRDKGPRQLENRTSPPQDGRNCGGGGSRAGERTGADVGAARGSR
os100+os101  SRVLRDRKRRGVAGDRDKGPRQLENRTSPPQDGRNCGGGGSRAGERTGADVGAARGSR
os88+os89    SRVLRDRKRRGVAGDRDKGPRQLENRTSPPQDGRNCGGGGSRAGERTGADVGAARGSR
os98+os99    SRVLRDRKRRGVAGDRDKGPRQLENRTSPPQDGRNCGGGGSRAGERTGADVGAARGSR
              ***** * *****

JX178935      IGIPPDQVLLVLQGAEPPILSSRQKMNRPYTEVSMMTLLTSMADKELVHMIAWAKKVPGF
os96+os97    IGIPPDQVLLVLQGAEPPILSSRQKMNRPYTEVSMMTLLTSMADKELVHMIAWAKKVPGF
os100+os101  IGIPPDQVLLVLQGAEPPILSSRQKMNRPYTEVSMMTLLTSMADKELVHMIAWAKKVPGF
os88+os89    IGIPPDQVLLVLQGAEPPILSSRQKMNRPYTEVSMMTLLTSMADKELVHMIAWAKKVPGF
os98+os99    IGIPPDQVLLVLQGAEPPILSSRQKMNRPYTEVSMMTLLTSMADKELVHMIAWAKKVPGF
              *****;***:*****

JX178935      LELSLHDQVQLLESSWLEVLMIGLIWRSIHYPGKLIFAQDLILDRTEGDCVEGMAEIFDM
os96+os97    LELSLHDQVQLLESSWLEVLMIGLIWRSIHYPGKLIFAQDLILDRTEGDCVEGMAEIFDM
os100+os101  LELSLHDQVQLLESSWLEVLMIGLIWRSIHYPGKLIFAQDLILDRTEGDCVEGMAEIFDM
os88+os89    LELSLHDQVQLLESSWLEVLMIGLIWRSIHYPGKLIFAQDLILDRTEGDCVEGMAEIFDM
os98+os99    LELSLHDQVQLLESSWLEVLMIGLIWRSIHYPGKLIFAQDLILDRTEGDCVEGMAEIFDM
              *****.*****

JX178935      LLATVSRFRMLQLNPEEFVCLKAIILLNSGAFSFACTSTMEALHDSLAVQGMLDITDALI
os96+os97    LLATVSRFRMLQLNPEEFVCLRPSSCSTLGPSSAPAPWRPFTTAWXVQGMMLDITDALI
os100+os101  LLATVSRFRMLQLNPEEFVCLKAIILLNSGAFSFACTSTMEALHDSLAVQGMLDITDALI
os88+os89    LLATVSRFRMLQLNPEEFVCLKAIILLNSGAFSFACTSTMEALHDSLAVQGMLDITDALI
os98+os99    LLATVSRFRMLQLNPEEFVCLKAIILLNSGAFSFACTSTMEALHDSLAVQGMLDITDALI
              *****: . * . : . : : *****

JX178935      HHISQSGCSIQQQSRRAQLLLLLSHIRHMSNKGMEHLYSMKCKNKVPLYDLLLLLEMLDA-
os96+os97    HHISQSGCSIQQQSRRAQLLLLLSHIRHMSNKGMEHLYSMKCKNKVPLYDLLLLLEMLDAH
os100+os101  HHISQSGCSIQQQSRRAQLLLLLSHIRHMSNKGMEHLYSMKCKNKVPLYDLLLLLEMLDAH
os88+os89    HHISQSGCSIQQQSRRAQLLLLLSHIRHMSNKGMEHLYSMKCKNKVPLYDLLLLLEMLDAH
os98+os99    HHISQSGCSIQQQSRRAQLLLLLSHIRHMSNKGMEHLYSMKCKNKVPLYDLLLLLEMLDAH
              *****.*****.*****

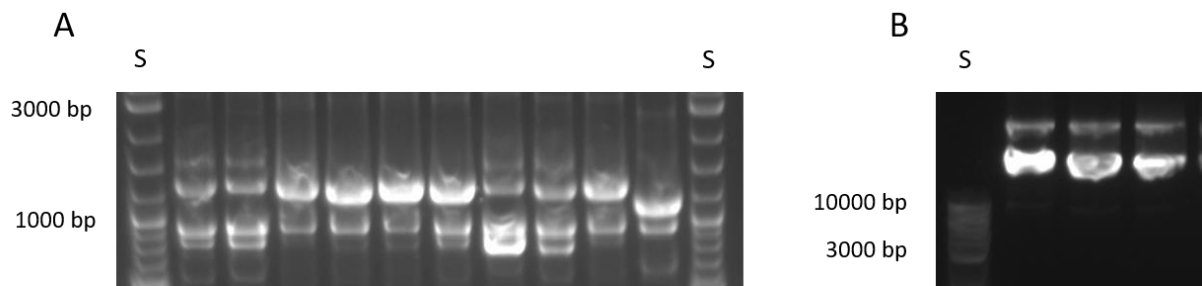
JX178935      -----
os96+os97    RLHRPVKAASHPRGGGPGDRETACTSGSSSCSELGTGHRGAGGLEHGHRAPGPGVLISGG
os100+os101  RLHRPVKAASHPRGGGPGDRETACTSGSSSCSELGTGHRGAAG-RATVGPVPGCSSAGG
os88+os89    RLQRPVKAASHPRGGGPGDRETACTSGSSSCSKLGTGHRGAGGLEHGHRAPGPEVLISGG
os98+os99    RLQRPVKAASHPRGGGPGDRETACTSGSSS-SKLTGHRGAGGLEHGHRAPGPGVLISGG

JX178935      -----
os96+os97    PLHECASV *
os100+os101  PSTSVRPSED
os88+os89    PLHECASV *
os98+os99    PLHECASV *

```

**Figur 26. Sekvenssammenstilling av den kjente sekvensen til torsk-ER $\alpha$  (JX178935) med sekvenserte produkter fra amplifisering av torsk-*esr1*-LBD. Sekvenseringsproduktene ble translaterert til protein og sammenstilt med JX178935 i Clustal Omega. Sekvenseringen viste mutasjoner på ulike posisjoner fra alle de sekvenserte innskuddene. Stoppkodon er representert med \*.**

På tross av at det ble brukt en polymerase med korrekturlesningsaktivitet ble det observert en høy andel av mutasjoner i *esr1*-transkriptet. Muligens kan PCR-additivene ha forårsaket mutasjonene ved å forstyrre korrekturlesingen til DNA-polymerasen. Det ble derfor utført setespesifikk mutagenese (metode 3.15) i en utvalgt sekvens som inneholdt bare én punktmutasjon sammenlignet den tidligere sekvenserte *esr1*-sekvensen tilstede i GeneBank. Det muterte plasmidet ble transformert i kompetente *E. coli*-celler, og utvalgte kolonier ble PCR-screenet. Det ble dyrket og rensset plasmid fra utvalgte kolonier (Figur 27). Sekvenseringen avdekket at sekvensen nå stemte overens med JX178935 og 3'-enden til *esr1* bestemt fra RACE-reaksjonene (3.2.2). Sekvenseringsproduktet ble sammenstilt med JX178935 (Figur 28).



**Figur 27. PCR-screening av transformanter fra setespesifikk mutagenese av torsk-*esr1* (A) og kvalitetskontroll av plasmid (B).** Setespesifikk mutagenese ble utført med primerne MT1347 og MT1348 (Tabell 5) og PCR-produktet ble transformert inn i kompetente *E. coli*-celler. (A) Utvalgte kolonier ble PCR-screenet. 2  $\mu$ L PCR-produkt ble applisert i hver brønn. (B) Plasmid rensset fra overnattekkulturer ble undersøkt på agarosegel før sekvensering. Både PCR-produktene (A) og plasmidene (B) ble separert på 0,7 % agarosegeler. DNA ble farget med GelGreen tilsatt under støpning av agarosegelen. Log 2 molekylvektstandard (NEB) er merket med S.



```

JX178935      SCEGCKAFFKRSIQGHNNYMC PATNQCTIDRNRKSCQACRLRKC YEVGMMKGGMRKDRG
os106+oa107  -----EFMKGGMRKDRG
                                     :*****

JX178935      SRVLRDKRRGVAGDRDKGPRQLENRTSPPQD GRRNCGGGSRAGERTGADVGG AARGSR
os106+oa107  SRVLRDKRRGVAGDRDKGPRQLENRTSPPQD GRRNCGGGSRAGERTGADVGG AARGSR
*****

JX178935      IGIPPDQVLLVLQGAEPPISSRQKMNRPYTEVSM MTLTSMADKELVHMIAWAKKVPGF
os106+oa107  IGIPPDQVLLVLQGAEPPISSRQKMNRPYTEVSM MTLTSMADKELVHMIAWAKKVPGF
*****

JX178935      LELSLHDQVQLLESSWLEVLMIGLIWRSIHYPG KLIFAQDLILDRTEGDCVEGMAEIFDM
os106+oa107  LELSLHDQVQLLESSWLEVLMIGLIWRSIHYPG KLIFAQDLILDRTEGDCVEGMAEIFDM
*****

JX178935      LLATVSRFRMLQLNPEEFVCLKAII LLNSGAFS FCTSTMEALHDSLAVQGM LDTITDALI
os106+oa107  LLATVSRFRMLQLNPEEFVCLKAII LLNSGAFS FCTSTMEALHDSLAVQGM LDTITDALI
*****

JX178935      HHISQSGCSIQQSRRQAQLLLLLSHIRHMSNKG MEHLYSMKCKNKVPLYDLLLEMLDA-
os106+oa107  HHISQSGCSIQQSRRQAQLLLLLSHIRHMSNKG MEHLYSMKCKNKVPLYDLLLEMLDAH
*****

JX178935      -----
os106+oa107  RLQRPVKAASHPRGGGPGDRE TACTSGSSSCSKLGTGHRGAGGLEGHGRAPGPEVLISGG

JX178935      -----
os106+oa107  PLHECASV

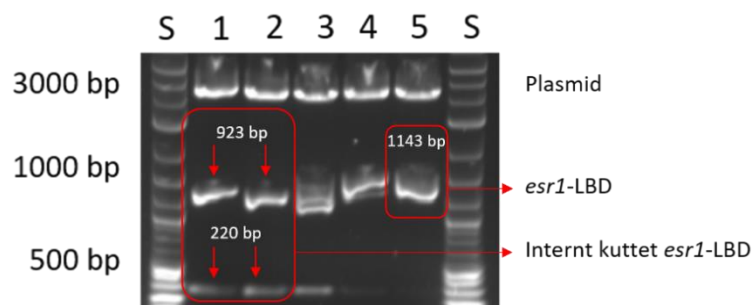
```

**Figur 28.** Sekvenssammenstilling av produkt fra setespesifikk mutagenese av torsk-*esr1*-LBD med JX178935. Sekvensert produktet etter mutagenesereaksjonen ble translaterert til protein og sammenstilt med JX178935 i Clustal Omega. Sekvenseringen viste at mutasjonen i *esr1*-transkriptet hadde blitt reversert.

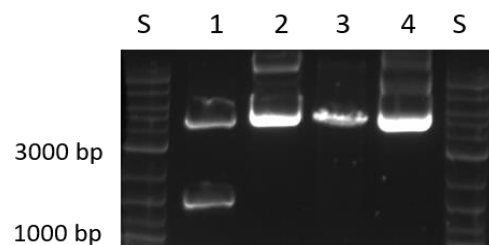
#### 4.4 Konstruksjon av reseptorplasmid

Før *esr1*-LBD kunne ligeres inn i pCMX-Gal4, måtte fragmentet kuttes ut fra den prokaryote kloningsvektoren pSC-A. I tillegg til restriksjonsenzymsetene introdusert på endene av *esr1* (BamHI og EcoRI), inneholdt samtidig *esr1* et kuttsete for BamHI internt i sekvensen. For å unngå at restriksjonsenzymet klippet DNA-fragmentet ved begge BamHI-kuttsetene samtidig, måtte optimal restriksjonsenzymkonsentrasjon bestemmes for å oppnå en partiell kutting av fragmentet (metode 3.16.2). Optimal konsentrasjon av BamHI ble funnet ved en fortykning på 1:729 som tilsvarer en endelig konsentrasjon på 0,0014 U enzym i kuttreaksjonen (Figur 29). Kuttreaksjonen ble deretter gjentatt i et større volum med større mengde plasmid og med både EcoRI og den optimale BamHI-konsentrasjonen. Det ble parallelt utført en kuttreaksjon på

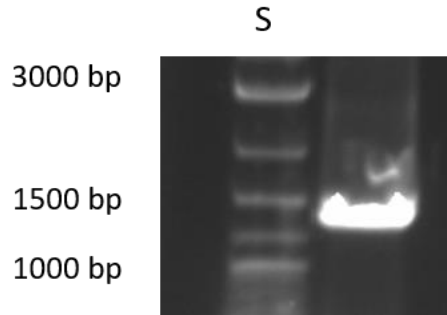
pCMX-Gal4-DBD-plasmidet med de samme to restriksjonsenzymene for å generere komplementære ender for ligering av det kuttete *esr1*-LBD inn i reseptorplasmidet (metode 3.16.3, Figur 30). Ønskede produkter fra kuttereaksjonene ble isolert fra gel, og den lineariserte pCMX-Gal4-DBD-vektoren ble defosforylert (metode 3.16.4) for å unngå religering av plasmidet. Det ble utført ligeringsreaksjon (metode 3.16.5) med restriksjonskuttet *esr1* og pCMX-Gal4-DBD, og ligeringsproduktet ble transformert inn i kompetente *E. coli*-celler. Transformasjonen resulterte i kun én koloni som deretter ble PCR-screenet for å verifisere tilstedeværelsen av innsatt fragment (Figur 31). Det ble deretter laget en overnattskultur fra kolonien, og plasmid ble rensset fra kulturen påfølgende dag. Det innsatte fragmentet ble sekvensert med primerne MT1077 og MT1078 (Tabell 5), og sekvenseringsproduktet ble sammenstilt med tidligere klonet *esr1*-sekvens for å validere at denne stemte. Ved bruk av Expsy translate tool ble sekvensen Gal4-DBD-*esr1*-LBD translaterert til protein som viste at Gal4-DBD og *esr1*-LBD var i samme leseramme i uttrykningsvektoren, pCMX-Gal4-ER $\alpha$ -LBD (Figur 32).



**Figur 29. Partiell restriksjonskutting av pSC-A-*esr1*.** For å unngå kutting ved internt BamHI-restriksjonssete ble torsk-*esr1*-LBD kuttet ut fra pSC-A-vektoren med ulike konsentrasjoner av BamHI og konstant konsentrasjon av EcoRI. I brønn 1 var konsentrasjonen fortennnet 1:9 mellom henholdsvis BamHI og EcoRI. Det ble brukt en fortenningsfaktor på 3 for hver kuttereaksjon. I brønn 5 var konsentrasjonen fortennnet 1:729. produktene ble separert på en 0,7 % agarosegel, og DNA ble farget med GelGreen som bli tilsatt gelen under støpning. Log 2 molekylvektstandard (NEB) er merket med S.



**Figur 30. Restriksjonskutting av pSC-A-*esr1*-LBD og pCMX-Gal4-DBD.** Restriksjonsenzymene BamHI og EcoRI ble brukt til å kutte torsk-*esr1*-LBD ut fra pSC-A-vektoren (1) og til å åpne pCMX-Gal4-vektoren (2). På figuren vises også ukuttet pSC-A-*esr1* (2) og pCMX-Gal4 (4). produktene ble separert på en 0,7 % agarosegel. 2 $\mu$ L produkt ble satt på hver brønn. DNA ble farget med GelGreen tilsatt under støpning av agarosegelen. Log 2 molekylvektstandard (NEB) er merket med S.



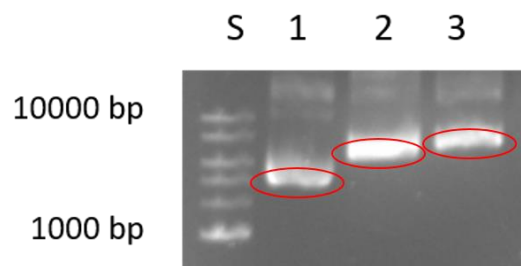
**Figur 31. PCR-screening av positiv transformant ved konstruksjon av pCMX-Gal4-ER $\alpha$ -LBD.** Kolonien transformert med ligeringsprodukt av pCMX-Gal4-*esr1*-LBD ble undersøkt med PCR og AGE og viste at det ønskede torsk-*esr1*-LBD-fragmentet innsatt (ca. 1400 bp). 2  $\mu$ L PCR-produkt ble separert på en 0,7 % agarosegel. DNA ble farget med GelGreen tilsatt under støpning av agarosegelen. Log 2 molekylvektstandard (NEB) er merket med S.

1	MKLLSSIEQA	CDICRLKKLK	CSKEKPKCAK
31	CLKNNWECRY	SPKTKRSPLT	RAHLTEVESR
61	LERLEQLFLL	IFPREDLDMI	LKMDSLQDIK
91	ALLTGLFVQD	NVNKDAVTDR	LASVETDMPL
121	TLRQHRISAT	SSSEESSNKG	QRQLTVSPEF
151	MKGGMRKDRG	SRVLRDKRR	GVAGDRDKG
181	PRQLENRTS	PPQDGR	RNCG GGGSRAGERT
211	GADVGGGAARG	SRIGIPPDQV	LLVLQGAEPP
241	ILSSRQKMN	RPYTEVSMMT	LLTSMADKEL
271	VHMIAWAKKV	PGFLELSLHD	QVQLLESSWL
301	EVLMIGLIW	RSIHYPGKLI	FAQDLILDRT
331	EGDCVEGMA	IFDMLLATVS	RFRMLQLNPE
361	EFVCLKAII	LLNSGAFSFC	TSTMEALHDS
391	LAVQGMLDTI	TDALIHHSIQ	SGCSIQQQSR
421	RQAQLLLLL	SHIRHMSNKG	MEHLYSMKCK
451	NKVPLYDLLL	EMLDAHRLQR	PVKAASHPRG
481	GGPGDRETA	CTSGSSSCSK	LGTGHRGAGG
511	LEGHGRAPGP	EVLISGGPLH	ECASV

**Figur 32 Translatert aminosyresekvens for fusjonsproteinet Gal4-DBD-ER $\alpha$ .** sekvenseringen bekreftet at Gal4-DBD og torsk-ER $\alpha$ -LBD var i samme leseramme. Her vises aminosyresekvensen til hele fusjonsproteinet. Sekvensen ble translatert ved bruk av Expasy translate tool, og sammenstilt med ER $\alpha$  fra menneske (ID: P03372) i Clustal Omega for å indikere posisjonen til hinge-regionen og LBD. Gal4-DBD er merket med rødt, ER $\alpha$ -hinge er merket med svart og ER $\alpha$ -LBD er merket med blått.

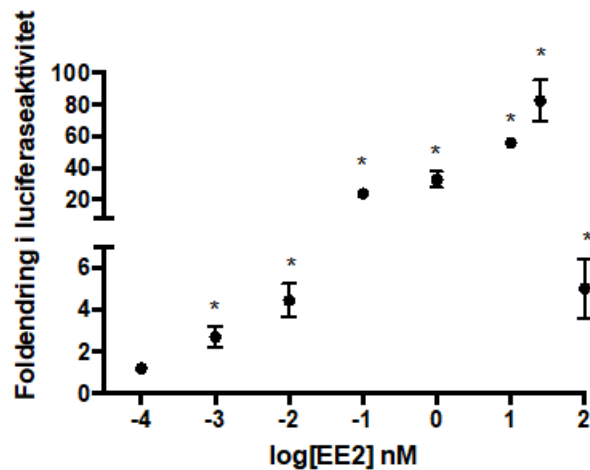
## 4.5 Luciferasebaserte genreporteranalyser

Det ble først utført midiprep (metode 3.13.4.2) av pCMX-Gal4-ER $\alpha$ -LBD. Plasmidene pCMX-Gal4-ER $\alpha$ -LBD, (mh100)x4tk luc og pCMV- $\beta$ -gal ble deretter undersøkt med agarosegelelektroforese for å undersøke konformasjonen til plasmidene (Figur 33). Migrasjonsmønsteret i agarosegelen viste at plasmidene hovedsakelig hadde en dobbelttvunnet konformasjon som er nødvendig for å sikre en effektiv transfeksjon inn i Cos-7-cellene.



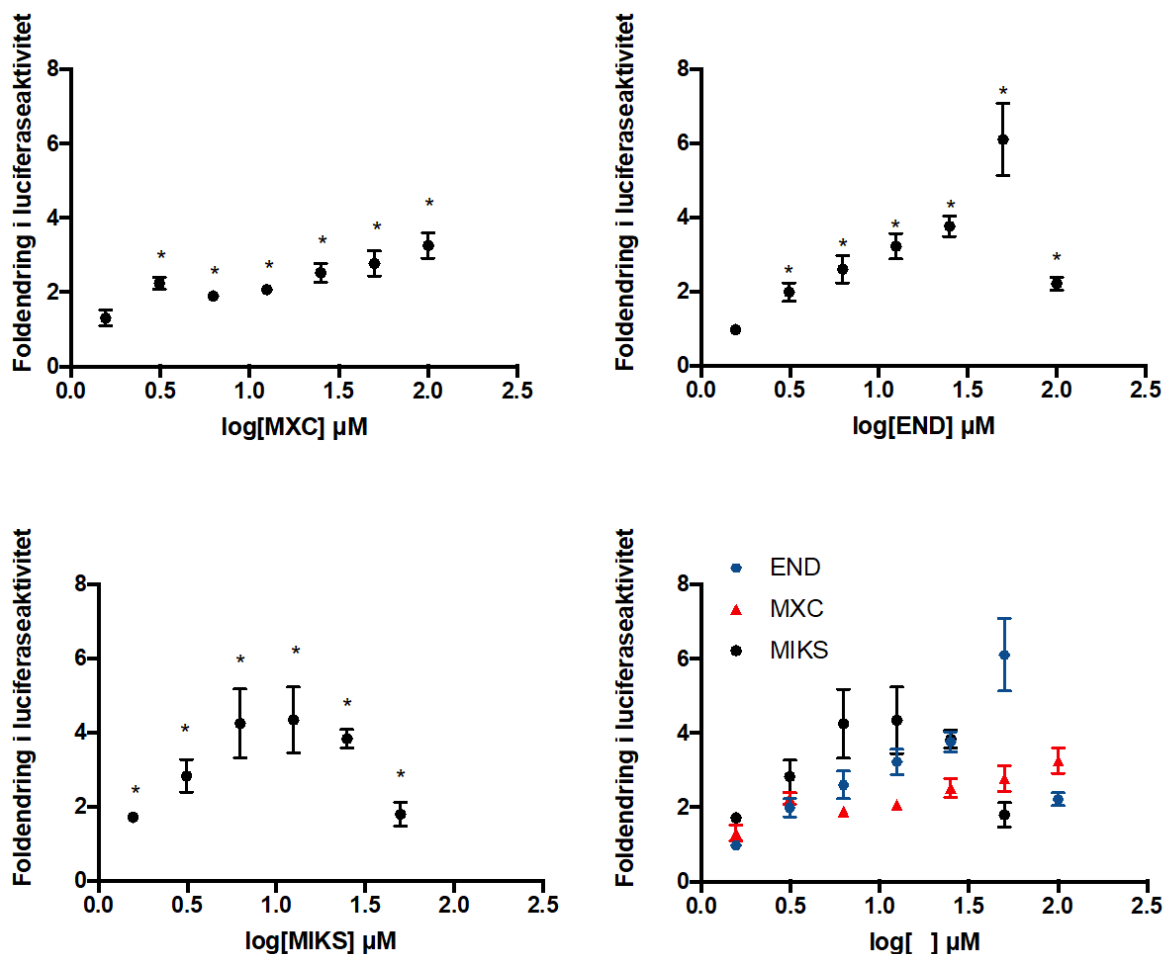
**Figur 33. Kvalitetskontroll av plasmider brukt i ligandaktiveringsforsøk.** Plasmidene pCMX-Gal4-ER $\alpha$ -LBD (1), (mh100)x4tk luc (2) og pCMV- $\beta$ -gal (3) ble separert på en 0,7 % agarosegel. 200 ng plasmid applisert i hver brønn. Gelen ble fargen med GelGreen tilsatt under støpning. Plasmid i dobbelttvunnet konformasjon er indikert med rød ring. Log 2 molekylvektstandard (NEB) er merket med S.

For å undersøke hvordan torsk-ER $\alpha$  responderte i genreportersystemet ble COS-7-celler transfektert med reseptorplasmidet pCMX-Gal4-ER $\alpha$ -LBD, reporterplasmidet (mh100)x4tk luc og kontrollplasmidet pCMV- $\beta$ -gal (metode 3.17.3). Det ble brukt et masseforhold på 1:10 mellom reporter og reseptor/kontroll-plasmid. Cellene ble deretter eksponert for EE2 i 24 timer (metode 3.17.4) og luciferaseaktivitet avlest som beskrevet i 3.17.5. EE2 er kjent for å kunne aktivere ER $\alpha$  i en rekke arter. Eksponering for EE2 ga signifikant aktivering av ER $\alpha$  for alle undersøkte konsentrasjoner unntatt for den laveste (0,1 pM), og viste dermed at fusjonsproteinet evner å aktiveres *in vitro*. Høyeste aktivering ble observert ved eksponering for 25 nM EE2 med en gjennomsnittlig aktivering på 82,3 fold i forhold til løsemiddelkontrollen (DMSO) (Figur 34).



**Figur 34. Ligandaktiveringsforsøk for Gal4-ER $\alpha$ -LBD med EE2.** COS-7-celler ble transfektert med masseforhold 1:10 mellom reseptorplasmidet pCMX-Gal4-ER $\alpha$ -LBD og reporterplasmidet (mh100)x4tk luc, og deretter eksponert for EE2 i 24 timer. Hvert punkt viser gjennomsnitt av tre replikater med SEM for hvert punkt. Aktiveringen av Gal4-ER $\alpha$  er vist som relativ foldendring i luciferaseaktivitet i forhold til i en løsemiddelkontroll (DMSO). Signifikans er indikert med \* ( $p \leq 0,05$ ).

For å undersøke aktivering av ER $\alpha$  av miljøgifter, ble det utført luciferasebaserte genreportersystem med stoffene metoksyklor (MXC), endosulfan (END) og en blanding av de to stoffene (MIKS), der konsentrasjonen oppgitt for MIKS er total molaritet av stoffene MXC og END i et ekvimolart forhold. For MXC, END og MIKS ga alle utenom den laveste konsentrasjonen en signifikant aktivering av Gal4-ER $\alpha$ -LBD. Ved eksponering for MXC ble det observert maksimal aktivering ved eksponering for 100  $\mu$ M (3,25 fold), for END ble maksimal aktivering observert ved eksponering for 50  $\mu$ M (henholdsvis 6,1) mens den for MIKS ble observert ved eksponering for 25  $\mu$ M (4,3 fold) (Figur 35).



**Figur 35. Ligandaktivering av Gal4-ER $\alpha$ -LBD ved eksponering for MXC, END og MIKS.** COS-7-celler transfektert med pCMX-Gal4-ER $\alpha$ -LBD ble eksponert for tre ulike forbindelser i 24 timer. Hvert punkt viser gjennomsnitt av tre replikater med SEM for hvert punkt. Aktivering av Gal4-DBD-ER $\alpha$  er vist som relativ foldendring i luciferaseaktivitet. Konsentrasjonene ved eksponering for MIKS er total molaritet av MXC og END i et ekvimolart forhold. Data fra alle tre forsøkene er samlet i grafen nederst til venstre. Statistisk signifikans er indikert med \* ( $p \leq 0,05$ ).

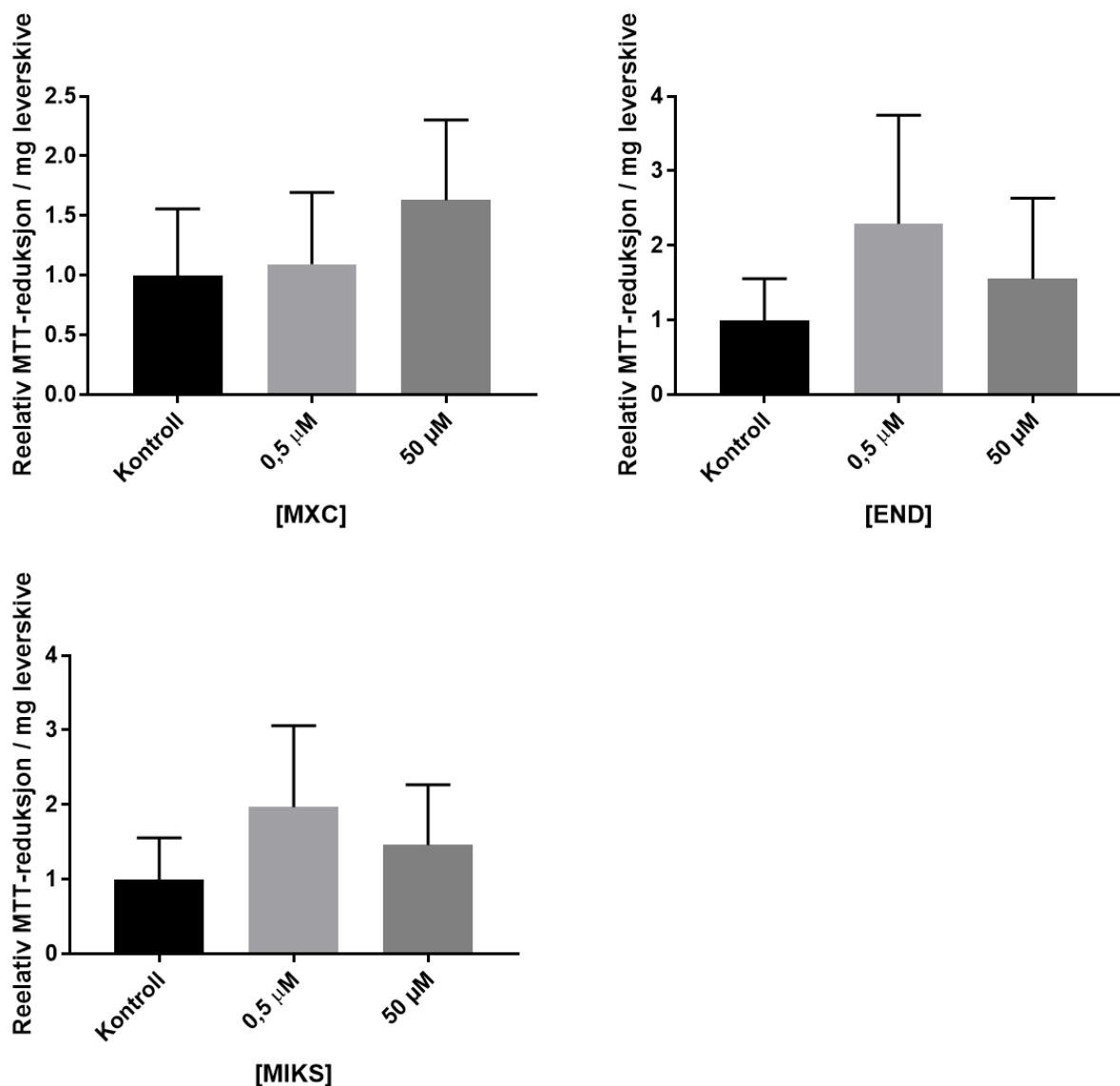
#### 4.6 *Ex vivo*-eksponering med leverskiver

For å komplementere resultatene fra det luciferasebaserte genreportersystemet, ble leverskiver fra torsk eksponert for 0,5, 5 og 50  $\mu$ M MXC, END og MIKS (der eksponeringskonsentrasjonen for MIKS er total molaritet av MXC og END i et ekvimolart forhold) i 48 timer (metode 3.4). I leverskivene beholder cellene sin normale fordeling, og eksponering av PKLS vil dermed mer ligne et *in vivo*-system enn det eksponering av COS-7-celler i det luciferasebaserte genreportersystemet vil gjøre.

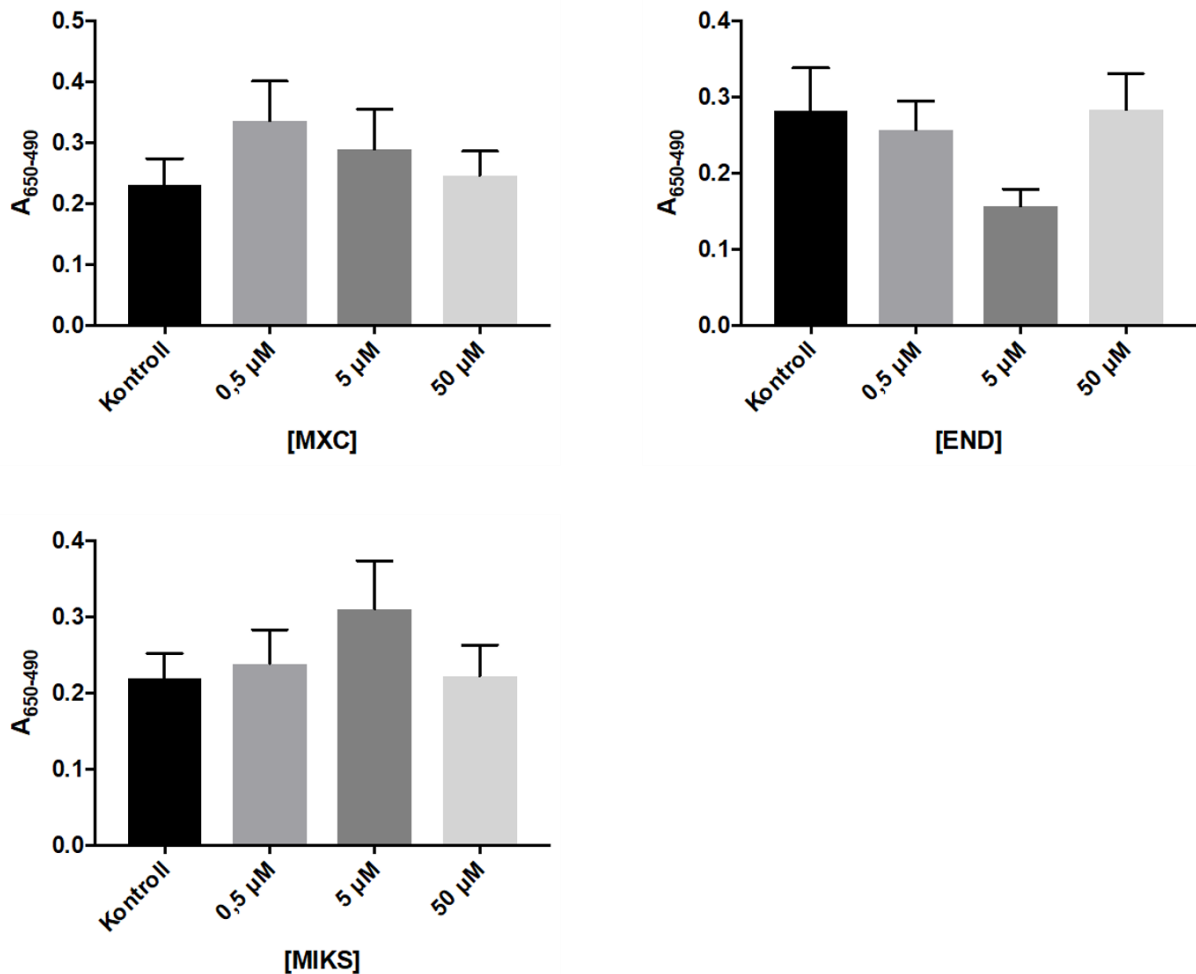
##### 4.6.1 Viabilitets- og cytotoxisitetsanalyse

For å undersøke om forbindelsene brukt i leverskiveeksponeringene påvirker viabiliteten eller har cytotoxisk effekt på cellene i leverskivene, ble det utført viabilitets- og

cytotoksisitetstester. For viabilitetsanalyse ble det utført MTT-tester for høyeste og laveste konsentrasjon av hvert stoff brukt (Figur 36, metode 3.9.1) for å se på endringer i metabolsk aktivitet. For cytotoksisitetstest ble det utført LDH-tester i vekstmediet for å undersøke effekter på membranintegritet for alle konsentrasjoner av alle stoffene som ble testet (Figur 37, metode 3.9.2).



Figur 36. Viabilitetsanalyse av leverskivecellene eksponert for MXC, END og MIKS. Figuren viser gjennomsnitt og standardavvik relativt til kontrollgruppen (DMSO) av to prøver fra tre fisk for hver konsentrasjon.

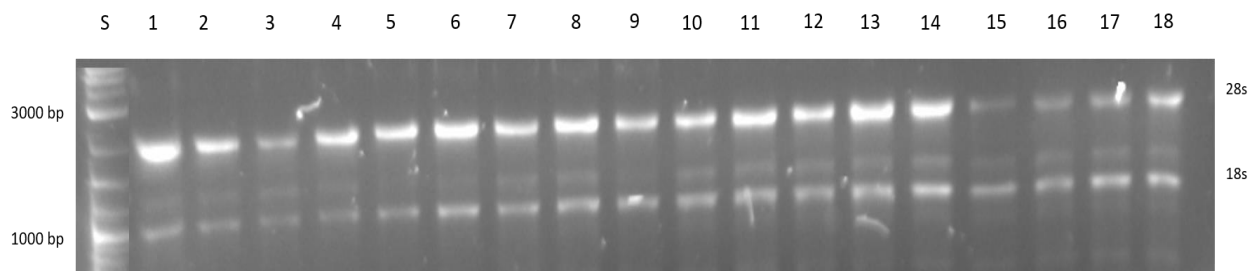


**Figur 37. Cytotoksisitetsanalyse av leverskivecellene eksponert for MXC, END og MIKS.** Figuren viser gjennomsnitt og SEM relativt til kontrollgruppen (DMSO) av seks prøver fra tre fisk for hver konsentrasjon.

#### 4.6.2 Eksposering og qPCR

RNA ble ekstrahert fra de eksponerte leverskivene (Figur 38, metode 3.5) før det ble laget cDNA (metode 3.7) Det ble deretter brukt qPCR for å undersøke endring i uttrykning av *esr1* og *vtg* (metode 3.8.1).



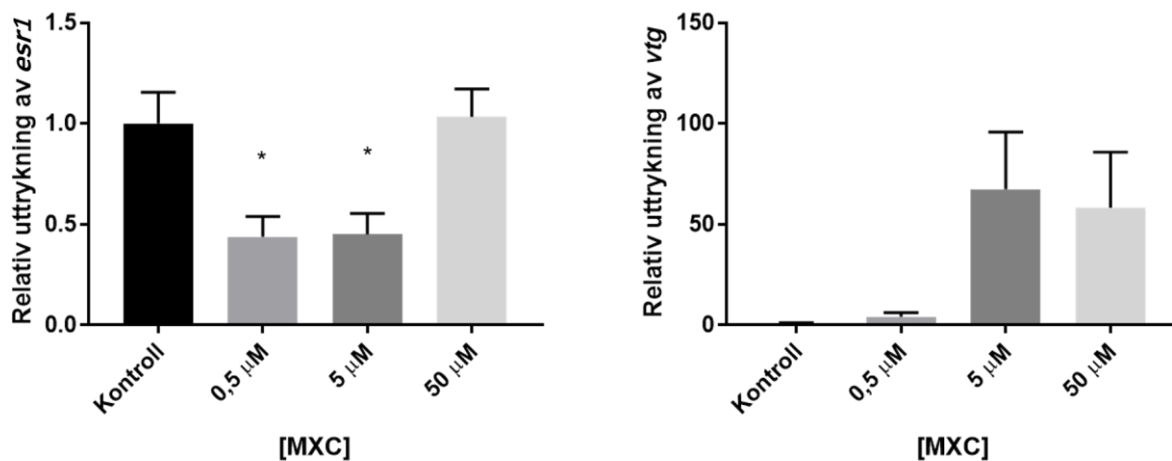


**Figur 38. RNA-integritet av RNA isolert fra PKLS.** RNA ekstrahert fra leverskiver eksponert for kontroll (DMSO) (brønn 1-3 og 13-15), 0,5  $\mu\text{M}$  MXC (brønn 4-6), 5  $\mu\text{M}$  MXC (brønn 7-9), 50  $\mu\text{M}$  MXC (brønn 10-12) og 0,5  $\mu\text{M}$  END (brønn 16-18) ble separert på en 0,7 % agarosegel. 200 ng RNA ble applisert i hver brønn. DNA ble farget med GelGreen tilsatt under støpning av agarosegelen. Molekylvektstandard er merket med S. Figuren viser RNA fra et utvalg av leverskivene.

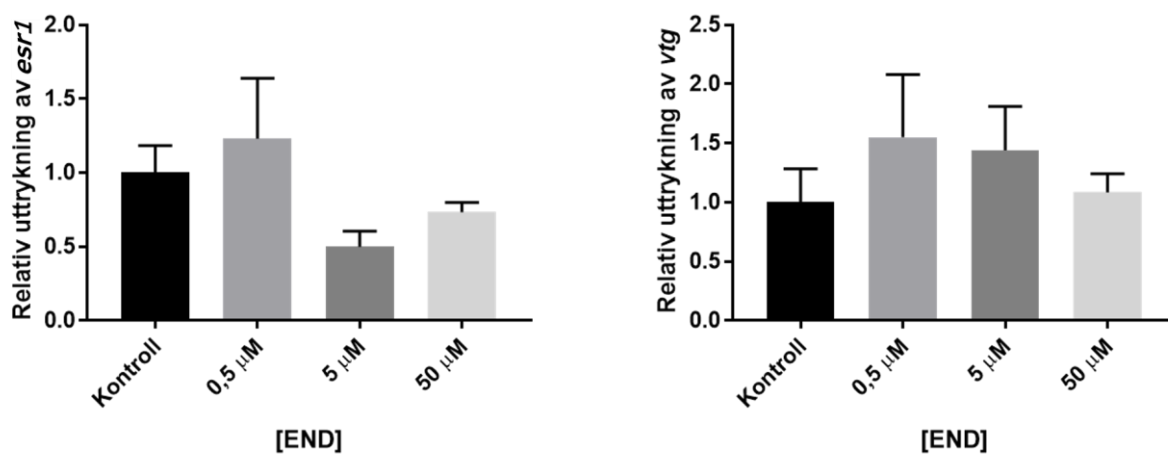
Eksponering for MXC viste en signifikant nedregulering av *esr1* ved 0,5 og 5  $\mu\text{M}$  på henholdsvis 0,4 fold og 0,5 fold i forhold til kontrollene og en uttrykning av *esr1* på 1,0 fold i forhold til løsemiddelkontrollen ved 50  $\mu\text{M}$ . For *vtg* var det en trend for oppregulering for alle konsentrasjoner av MXC på 4,2, 68 og 58 fold i forhold til kontrollene for eksponering for henholdsvis 0,5, 5 og 50  $\mu\text{M}$  (Figur 39).

Leverskiver eksponert for END ga en ikke-signifikant oppregulering av *esr1*-uttrykk ved 0,5  $\mu\text{M}$  på 1,2 fold i forhold til kontrollen, og en ikke-signifikant nedregulering ved 5 og 50  $\mu\text{M}$  på henholdsvis 0,5 og 0,7 fold i forhold til kontrollene. *Vtg* viste en trend for oppregulering ved alle konsentrasjoner av END på 1,6, 1,4 og 1,1 fold i forhold til løsemiddelkontrollene for henholdsvis 0,5, 5 og 50  $\mu\text{M}$  (Figur 40).

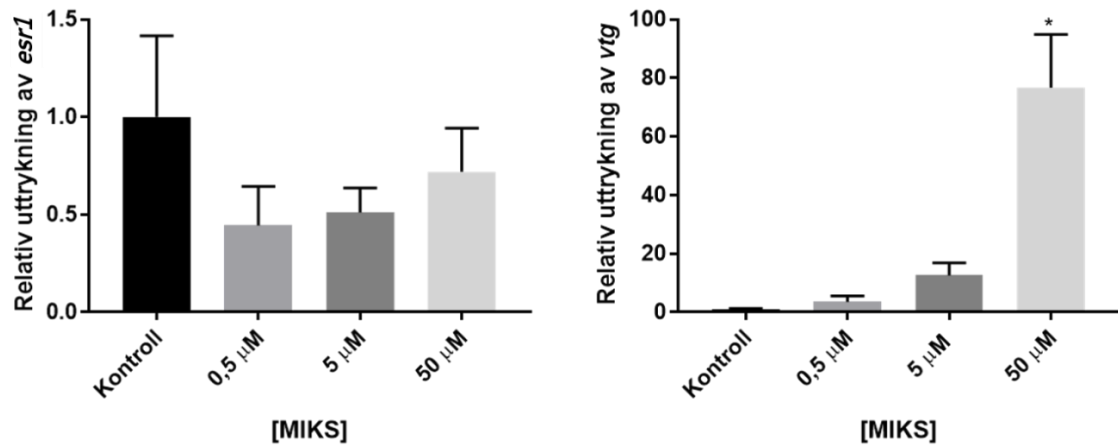
For MIKS viste *esr1* en trend for nedregulering ved alle eksponeringskonsentrasjonene på 0,4, 0,5 og 0,7 for henholdsvis 0,5, 5 og 50  $\mu\text{M}$ . *Vtg* hadde en oppregulering ved alle eksponeringskonsentrasjonene, med 3,6 og 12,5 fold i forhold til løsemiddelkontrollene for henholdsvis 0,5 og 5  $\mu\text{M}$ , der 50  $\mu\text{M}$  ga en signifikant oppregulering på 76,7 fold i forhold til løsemiddelkontrollen (Figur 41).



**Figur 39. Relativ uttrykning av *esr1* og *vtg* i PKLS eksponert for MXC.** Den relative uttrykningen av *esr1* og *vtg* i leverskiver eksponert for MXC ble målt med qPCR. Uttrykningen ble normalisert mot referansegene *arp* og *rpl22*. Signifikant endring i genuttrykk er merket med \* ( $p \leq 0,05$ ). Figuren viser gjennomsnitt og SEM av totalt 9 leverskiver fra 3 fisk.



**Figur 40. Relativ uttrykning av *esr1* og *vtg* i PKLS eksponert for END.** Den relative uttrykningen av *esr1* og *vtg* i leverskiver eksponert for END ble målt ved bruk av qPCR. Genuttrykk ble normalisert mot referansegene *arp* og *rpl22*. Figuren viser gjennomsnitt og SEM fra totalt 9 leverskiver fra 3 fisk.



**Figur 41. Relativ uttrykning av *esr1* og *vtg* i PKLS eksponert for MIKS.** Den relative uttrykning av *esr1* og *vtg* ble målt i leverskiver eksponert for MIKS ved bruk av qPCR. Konsentrasjonen oppgitt er total molaritet av MXC og END i et ekvimolart forhold. Uttrykningen av *esr1* og *vtg* ble normalisert mot referansegene *arp* og *rpl22*. En signifikant endring i genuttrykk er merket med \* ( $p \leq 0,05$ ). Figuren viser gjennomsnitt fra totalt 9 leverskiver fordelt på 3 fisk.

## 5 Diskusjon

Målet i denne oppgaven har vært å karakterisere østrogenreseptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) fra atlantehavstorsk med hensyn på aktivering av reseptoren av ulike ligander, inkludert  $17\alpha$ -etynyløstradiol (EE2), endosulfan (END) og metoksyklor (MXC). Dette arbeidet innebar å kartlegge den ukjente 3'-enden av gensekvensen til *esr1* ved bruk av RACE, for deretter å klonere og subklonere hinge-LBD-regionen av reseptoren inn i egnet plasmid, og ved hjelp av dette etablere et luciferasebasert reporter gensystem for torsk-ER $\alpha$ . Testforsøk av den luciferasebaserte genreporteranalysen med EE2 viste en kraftig aktivering av ER $\alpha$ . Reseptoren ble også aktivert ved eksponering for MXC, END og en blanding av disse (MIKS). Det ble i tillegg utført eksponering av PKLS for de samme forbindelsene etterfulgt av genekspressjonsanalyser av *esr1* og ER $\alpha$ -målgenet, *vtg*, ved hjelp av qPCR. Dette ble gjort for å sammenligne dataene fra reporter gensystemet med aktivering av østrogenreseptorsignalveien i leverskiver, og for å gi et bilde på hvordan aktivering av ER $\alpha$  kan foregå *ex vivo*, som ligner mer på en *in vivo*-situasjon. Eksponering av PKLS for EE2 ga en signifikant induksjon av både *esr1* og *vtg*. Eksponering for MXC, END og MIKS ga ingen tydelig endring i uttrykning av *esr1* for noen av stoffene. Eksponering for MXC og MIKS ga en trend for oppregulering av ER $\alpha$ -målgenet *vtg*. En signifikant oppregulering av *vtg* ble observert ved eksponering for 50  $\mu$ M MIKS.

### 5.1 Oppregulering av ER $\alpha$ i PKLS eksponert for EE2

Torskene brukt i denne oppgaven var juvenile, og har derfor naturlig lav uttrykning av *esr1* sammenlignet med kjønnsmoden fisk. For å øke transkriptmengden av *esr1*, og dermed øke sjansen for å kunne klonere reseptoren, ble leverskiver preparert fra torsk eksponert for EE2 (Shang et al., 2000). EE2 har vist seg å være en sterk agonist for ER $\alpha$  i andre arter, blant annet i mort (*Rutilus rutilus*), regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*), storhodet ørekyte (*Pimephales promelas*) og atlantehavslaks (*Salmo salar*) (Lange et al., 2008, Boyce-Derricott et al., 2009, Kidd et al., 2007, Madsen et al., 1997). I denne oppgaven viste eksponering av PKLS for EE2 en signifikant oppregulering av *esr1*, samt målgenet *vtg* (Figur 20). Dette indikerer at også ER $\alpha$  i torsk er sensitiv for EE2 og at reseptoren aktiveres og autoreguleres som tidligere vist i andre teleoster. RNA fra leverskiveparet som viste høyest uttrykning av *esr1* ble brukt som templat videre RACE/kloningsprosessen.

### 5.2 Vanskelige templat for PCR-amplifikasjon

Det ble utført en rekke RACE-reaksjoner med variasjoner i ulike parametere i forsøk på å kartlegge den ukjente 3'-enden av gensekvensen til *esr1*. Under den RACE-spesifikke cDNA-

syntesen ble det brukt ulike revers-transkriptaser. I touchdown- og nestet-PCR-reaksjoner ble det forsøkt forskjellige DNA-polymeraser, både med og uten korrekturlesningsaktivitet. En rekke primerkombinasjoner av genspesifikke primere mellom touchdown- og nestet-PCR-reaksjoner ble forsøkt. Det ble også forsøkt å forlenge elongeringstider og variere annealingtemperaturer i PCR-reaksjonene, uten at noe av dette førte frem (resultater ikke vist).

Det kan være problematisk å amplifisere templatere med høyt GC-innhold og/eller templatere som danner sterke sekundærstrukturer. Analyser av GC-innholdet i *esr1*-transkriptet avslørte områder i fragmentet med svært høyt GC-innhold (>75%) (Figur 24). Baseparing mellom guanin og cytosin i DNA foregår gjennom tre hydrogenbindinger mens baseparing mellom adenin og tymin foregår gjennom to. Det vil derfor kreve mer energi å bryte opp DNA-tråder med høyt GC-innhold. Høyt GC-innhold kan også føre til dannelse av hårnålstrukturer eller løkker i DNA-tråder. Disse sekundærstrukturene kan føre til polymerasestopp når man forsøker å amplifisere slike fragmenter med PCR. Ved å tilsette PCR-fremmede stoffer kan vanskelige fragmenter likevel la seg amplifisere. To forbindelser som ofte brukes er betain og DMSO (Mamedov et al., 2008, Nelms and Labosky, 2011).

Betain fungerer ved å gjøre stabiliteten mellom AT- og GC-baseparing mer lik ved å redusere stabiliteten til hydrogenbindingene som holder baseparene sammen (Rees et al., 1993). DMSO fungerer også ved å interferere med hydrogenbindinger, og fremmer dermed separasjon av trådene som fører til lavere DNA-smeltetemperatur ( $T_m$ ) (Jensen et al., 2010). DMSO og betain ble tilsatt til RACE-reaksjoner, noe som resulterte i mer distinkte og spesifikke fragmenter i PCR-reaksjonene. Dette fasiliterte kloningen av rett produkt og videre sekvenseringen av den ukjente slutten (3'-enden) av genet som kodet for gmER $\alpha$ .

### **5.3 Ligandaktivering av ER $\alpha$**

COS-7-celler transfektert med pCMX-Gal4-ER $\alpha$ -LBD ble eksponert for EE2 som en kontroll på at reseptoren responderte som forventet (Figur 34).

Eksponering for EE2 viste en tydelig dose-respons-trend, og maksimal aktivering ble observert ved eksponering for 25 nM EE2. Ved eksponering for 100 nM var det en kraftig nedgang i luciferaseaktivitet, som kan være følge av at EE2 muligens har cytotoxisk effekt på cellene ved denne eksponeringskonsentrasjonen (Minta et al., 2014). For å undersøke om cytotoxisk effekt var grunnen til nedgangen i aktivering kunne det vært gjennomført viabilitetstester med for eksempel 5-carboxyfluorescein-diacetate-acetoxymetyl-ester (CFDA-AM) eller Resazurin (Alamar Blue). Alamar Blue fungerer som en indikator på metabolsk aktivitet, mens CFDA-

AM indirekte måler integriteten til cellemembranen (Schreer et al., 2005). Grunnet tidspress ble det ikke gjennomført cytotoxissitetstester på cellene brukt i genreportersystemet i denne oppgaven.

Tilsvarende forsøk gjort i andre teleoster har også vist at EE2 evner å aktivere ER $\alpha$  i luciferasebaserte genreportersystemer. Full lengde-ER $\alpha$  fra afrikansk lungefisk (*Protopterus dolloi* og *Protopterus annectens*), stør (*A. schrenckii*) og pansergjedde (*A. tropicus*) viste en dose-respons-avhengig økning i luciferaseaktivitet når de ble eksponert for EE2 i HEK293-celler (Katsu et al., 2008). Maksimal aktivering av ER $\alpha$  var noe lavere i disse forsøkene sammenlignet med aktiveringen av ER $\alpha$ -LBD fra torsk observert i denne oppgaven, og kan muligens være følge av ulik sensitivitet i ulike cellelinjer (Balaguer et al., 1999) eller forskjeller i aktiveringspotensialet av ER $\alpha$  mellom disse artene.

For å studere østrogene effekter *in vivo* i fisk er de mest studerte endepunktene unormal utvikling av gonadene, og oppregulering og uttrykning av vitellogenin og zona radiata-gener (Folmar et al., 2002, Arukwe and Goksøyr, 2003). Alternativt kan østrogene effekter måles *in vitro* ved bruk av ligandaktiveringsanalyser. Det er mangelfull informasjon om østrogene effekter av metoksyklor (MXC) og endosulfan (END) i torsk, det er derfor valgt å sammenligne resultatene fra denne oppgaven med studier utført på andre arter.

### **5.3.1 Ligandaktivering ved eksponering for MXC**

MXC evnet å aktivere ER $\alpha$ . Laveste signifikante aktivering ble observert ved den nest laveste eksponeringskonsentrasjonen (3,13  $\mu$ M). Maksimal aktivering ble observert ved eksponering for 100  $\mu$ M (Figur 35).

Det er tidligere utført genreporteranalyse i form av en ER-CALUX-analyse (kjemisk aktivert luciferase-genuttrykningsanalyse) av Legler et al. (1999) der ER $\alpha$  fra menneske ble eksponert for MXC i T47D-celler (brystkreftceller fra menneske). Laveste signifikante aktivering ble observert ved eksponering for 0,6  $\mu$ M. Den høyeste aktiveringen på om lag 170 fold ble observert ved eksponering for 30  $\mu$ M. Selv om det ble observert en kraftigere aktivering av ER $\alpha$  fra menneske ved eksponering for MXC i studien beskrevet over sammenlignet med aktiveringen av ER $\alpha$  fra torsk observert i denne oppgaven, viste begge forsøkene at MXC evner å aktivere ER $\alpha$  og dermed har østrogene egenskaper både i menneske og torsk. I ER-CALUX-analysen ble maksimal induksjon av ER $\alpha$  ved eksponering for E2 (naturlig østradiol-17) oppnådd ved eksponering for 30 pM. I andre genreporteranalyser kreves konsentrasjoner fra 1 nM (Shelby et al., 1996) til 10 nM (White et al., 1994) for å oppnå maksimal aktivering av ER

ved eksponering for E2. Responen i ER-CALUX-analysen kan delvis skyldes valg av cellelinje og at full-lengde-ER (inkluderer EBD) og naturlige ERE var tilstede i ER-CALUX-systemet. Brystkreftcellelinjen T47D har samtidig høye østrogenreseptornivåer og dermed god tilgjengelighet på nødvendige kofaktorer og transkripsjonsfaktorer (Legler et al., 1999).

### **5.3.2 Ligandaktivering ved eksponering for END**

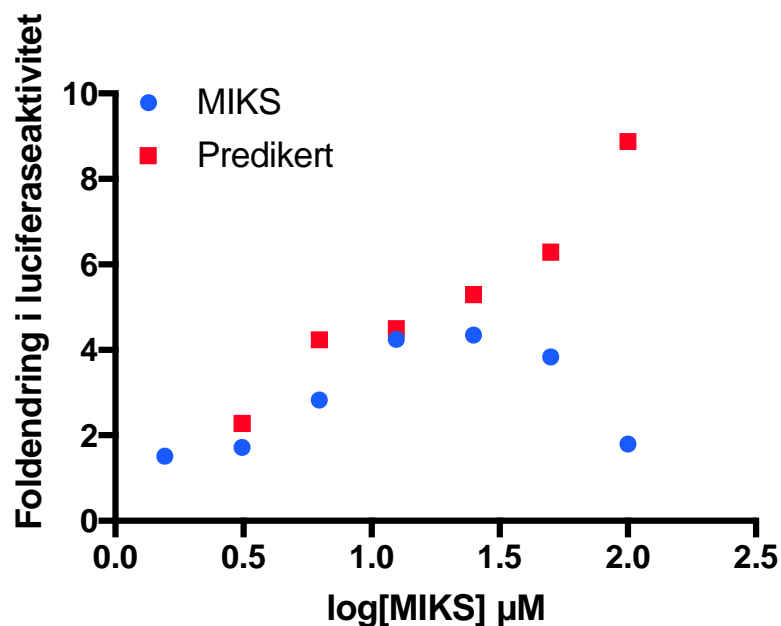
Det har tidligere også blitt utført ligandaktiveringsanalyser for å undersøke effekten av END på ER $\alpha$  fra menneske. I en ER-CALUX-analyse ble ER $\alpha$  fra menneske eksponert for END i T47D-celler. Laveste signifikante aktivering ble observert ved eksponering for 1  $\mu$ M. Maksimal aktivering på om lag 110 fold ble observert ved eksponering for 10  $\mu$ M, mens eksponeringer på over 30  $\mu$ M hadde cytotoxisk effekt på cellene (Legler et al., 1999). I en annen luciferasebasert ligandaktiveringsanalyse ble ER $\alpha$  fra menneske eksponert for END i MCF-7-celler (brystkreftceller fra menneske). Første signifikante aktivering ble observert ved eksponering for 25  $\mu$ M. Maksimal aktivering med ca. 7,5 fold ble observert ved eksponering for 75  $\mu$ M, og denne konsentrasjonen hadde ikke cytotoxisk effekt på cellene (Wu et al., 2008).

I denne oppgaven ble ER $\alpha$  fra torsk maksimalt aktivert (6,1 fold) ved eksponering for 50  $\mu$ M END, og en drastisk nedgang i aktivering ble observert ved eksponering for 100  $\mu$ M (Figur 35). Aktiveringen av ER $\alpha$  fra torsk observert i ligandaktiveringsanalysen kan minne om den observert for menneske-ER $\alpha$  av Wu et al. (2008). I denne oppgaven ble det observert en nedgang i aktivering fra eksponering for 50 til 100  $\mu$ M END, muligens som følge av cytotoxiske effekter ved høyere konsentrasjoner (Kannan et al., 2000, Andersen et al., 2002). I studien utført av Wu et al. ble det observert en økning i aktivering fra eksponering av 50 til 75  $\mu$ M END.

### **5.3.3 Ligandaktivering ved eksponering for MIKS**

I denne oppgaven ble det også utført en blandingseksponering for MXC og END for å undersøke eventuelle additive, synergistiske eller antagonistiske effekter ved aktivering av østrogenreseptor. Det ble observert en signifikant aktivering ved alle konsentrasjoner, bortsett fra ved den laveste (1,56  $\mu$ M). Det ble observert en maksimal aktivering ved 25  $\mu$ M på 4,3 fold i forhold til løsemiddelkontrollen, og en svak nedgang i aktivering fra 25 til 50  $\mu$ M til 3,8 fold. Nedgangen i aktivering var større fra 50 til 100  $\mu$ M, fra 3,8 fold til 1,8 fold i forhold til løsemiddelkontrollen (Figur 35).

Ved ligandaktiveringsanalysene utført i denne oppgaven var det mulig å observere forskjeller i aktivering av torsk-ER $\alpha$  ved eksponering for MIKS sammenlignet med predikert additiv effekt basert på data fra de separate eksponeringsforsøkene med MXC og END. For alle testede konsentrasjoner er aktiveringen som følge eksponering for MIKS lavere enn predikert effekt, og tyder dermed på antagonistiske effekter mellom MXC og END ved de undersøkte eksponeringskonsentrasjonene. Ved eksponering for 12,5  $\mu$ M MIKS er den predikerte effekten fra separate forsøkene bare 0,2 fold høyere enn ved eksponering for MIKS, det er derfor vanskelig å si om det oppstår en antagonistisk eller additiv effekt ved denne konsentrasjonen. Den høyeste forskjellen mellom predikert effekt sammenlignet med eksponering for MIKS oppstår ved eksponering for 100  $\mu$ M (Figur 42). Selv om ligandaktiveringsanalysene peker i retning av at det oppstår antagonistiske effekter ved kombinasjon av MXC og END, bør det gjennomføres flere forsøk for å kunne konkludere sikkert.



**Figur 42. Predikert og faktisk aktivering av ER $\alpha$  fra torsk ved eksponering for en ekvimolar blanding av metoksyklor og endosulfan.** Den predikerte effekten er basert på forventede additive effekter mellom MXC og END og basert på data fra de separate ligandaktiveringsanalysene.

Det er mangelfull informasjon om østrogene effekter ved kombinasjon av MXC og END fra tidligere studier. I en studie ble effekten av kombinasjonen av MXC og EE2, MXC og pentaklorfenol og effekten av END og EE2 undersøkt ved bruk av en E-screenanalyse og østrogenreseptorpositive humane MCF-7-celler (Suzuki et al., 2001). Metoden bruker



østrogenerns proliferative effekt på deres målceller som slutt punkt. For MXC kombinert med EE2 ble det observert antagonistiske effekter ved de fleste undersøkte konsentrasjonene. I motsetning ble det ved de fleste konsentrasjonene for MXC kombinert med pentaklorfenol observert mer enn additive effekter. For END kombinert med EE2 ble det ved lave konsentrasjoner av END observert additive effekter, mens det for høyere konsentrasjoner av END ble observert mer enn additive effekter (Suzuki et al., 2001). MXC viste antagonistiske tendenser både i kombinasjon med EE2 i studien utført av Suzuki et al., og muligens i ligandaktiveringsanalysen gjennomført i denne oppgaven. For å få et klarere bilde av hvilke effekter som oppstår mellom MXC og END ved aktivering av torsk-ER $\alpha$ , kan det utføres ligandaktiveringsanalyser med ER $\alpha$  fra torsk der både MXC og END kombineres med EE2.

I de ligandaktivererte genreporteranalysene utført i denne oppgaven ble det vist at de undersøkte ligandene evner å binde og aktivere ER $\alpha$  fra torsk. Endosulfan alene viste høyest aktivering. Ved 100  $\mu$ M var det en nedgang i aktivering for END, som kan indikere at END har cytotoxisk effekt på cellene ved denne konsentrasjonen (Kannan et al., 2000, Andersen et al., 2002).

#### **5.4 Miljøgifteksponering av PKLS for å undersøke effekter på *esr1* og *vtg***

Aktivering av østrogenreseptorsignalveien ble også undersøkt *ex vivo* ved å eksponere PKLS for MXC, END og MIKS. Effekten av eksponeringene ble studert ved å undersøke endringer i uttrykning av *esr1* og *vtg* med hjelp av qPCR. EE2 er en velkjent agonist for ER $\alpha$ . Forsøket der PKLS ble eksponert for EE2 for å oppregulere *esr1* førte, som forventet, til en kraftig induksjon av både *esr1* og *vtg* (Figur 20) (Hultman et al., 2015, Boyce-Derricott et al., 2009).

##### **5.4.1 Eksponering av PKLS for MXC for å undersøke effekt på *esr1* og *vtg***

*Ex vivo*-eksponering av PKLS for MXC viste ingen oppregulering av *esr1*, men derimot en signifikant nedregulering ved 0,5 og 5  $\mu$ M. Økende konsentrasjoner av MXC resulterte i en økende trend i uttrykning av *vtg* (Figur 39). Viabilitets- og cytotoxisitets tester av leverskivene viste hverken signifikant endring i metabolsk aktivitet (viabilitet) eller frigitt LDH til media (cytotoxisitet) fra de eksponerte leverskivene sammenlignet med leverskiver eksponert for løsemiddelkontroll (Figur 36 og 36).

Det er tidligere vist at injisering av 1,0 mg MXC induserer prematur uttrykning av ER $\alpha$  i livmor i 5 dager gamle BALB/c-mus, men åpenbar endring i genuttrykk ble ikke detektert når MXC ble injisert i 10-14 dager gamle mus (Eroschenko et al., 1996). En studie utført på sebrafisk (*Danio rerio*) viste en økning i VTG-konsentrasjonen i blodet hos hannfisk etter vannbåren eksponering for 5  $\mu$ g MXC/L over en periode på 14 dager. Det ble ikke observert en

xenoøstrogen effekt på juvenile individ og voksne hunnindivid for noen av de testede konsentrasjonene. Studien viste også at LC50 for MXC varierte mellom kjønnene med en LC50 etter 96 timer eksponering på 36 mg/L for hannfisk og 129 mg/kg for hunnfisk. (Versonnen et al., 2004). I denne oppgaven ble det brukt én hannfisk og to hunnfisk ved eksponering av PKLS for MXC. Det ble ikke observert tydelige forskjeller i respons mellom kjønnene, men antallet fisk er for lavt til å kunne konkludere sikkert om dette. Fra *in vitro*-forsøk er det funnet ulike verdier for lavest observerte effektkonsentrasjon (LOEC) for MXC i forskjellige arter. LOEC for *vtg*-induksjon er i sebrafisk målt til 5 µg/L (Versonnen et al., 2004) mens den i *Cyprinodon variegatus variegatus* ble målt til 2,5 µg/L (Hemmer et al., 2001). I regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) er LOEC for dødelighet målt til å være 9,8 µg/L (Thorpe et al., 2000).

MXC demetyleres i leveren til blant annet DDT-analogen 2,2-bis-(p-hydroxyphenyl)-1,1,1-trichloroethane (HPTE), som er kjent for sine østrogene egenskaper (Gaido et al., 2000, Gaido et al., 1999). Denne metabolitten er omtrent 100-fold mer aktiv på ER $\alpha$  enn metoksyklor. Forsøk gjort i humane hepatoceller (hepG2) transfektert med ER $\alpha$  fra menneske og rotter viste at HPTE er en potent ER $\alpha$ -agonist med EC50-verdier på 50 og 10 nM for henholdsvis mennesker og rotter (Gaido et al., 1999).

Selv om eksponering av PKLS for MXC ikke ga oppregulering av *esr1*, kan den tydelige trenden for oppreguleringen av *vtg* ved eksponering av leverskiver tyde på at MXC har østrogene egenskaper også *ex vivo*. Tidligere studier har vist at *vtg* induseres kraftigere enn *esr1* ved eksponering for østrogene forbindelser, dessuten følger ikke alltid oppreguleringen av genene samme dose-respons-trend (Hao et al., 2013, Kim et al., 2010). MXC, og spesielt metabolitten HPTE har i andre studier vist tydelige østrogene egenskaper (Gaido et al., 1999, Gaido et al., 2000). MXC evnet å aktivere torsk-ER $\alpha$  i den luciferasebaserte ligandaktiveringsanalysen utført i denne oppgaven. I betraktning av den tydelige trenden i økning av *vtg* fra leverskiveeksponeringene, ville det kanskje vært forventet en enda høyere aktivering av ER $\alpha$  i ligandaktiveringsanalysen. Dette kan kanskje tyde på at metabolisme av MXC til mer potente forbindelser som HPTE forårsaket den til dels sterke trenden i oppregulering av *vtg* ved eksponering av PKLS. MXC har tidligere blitt vist å kunne metaboliseres til HPTE i leverskiver fra regnbueørret. I samme studie ble det også vist at HPTE evner å inducere *vtg*-induksjon (Schmieder et al., 2004). Det er mulig at denne biotransformasjonen opptrådte i mindre grad i COS-7-cellene brukt i genreporteranalysen da nyreceller blant annet har mindre uttrykning av biotransformasjonszymer som er nødvendig for å metabolisere fremmedstoffer (Coumoul et al., 2002).

#### 5.4.2 Eksponering av PKLS for END for å undersøke effekt på *esr1* og *vtg*

Eksponering for END viste en svak oppregulering av *esr1* ved 0,5  $\mu\text{M}$ , men ved 5 og 50  $\mu\text{M}$  var det en ikke-signifikant nedregulering. For *vtg* ga END en meget svak trend for oppregulering for alle konsentrasjoner undersøkt. Oppreguleringen av *vtg* er høyest ved eksponering for 0,5  $\mu\text{M}$  end, og ser ut til å avta med økende konsentrasjon (Figur 40). Viabilitets- og cytotoxicitetstester av de eksponerte leverskivene viste hverken signifikant endring i metabolsk aktivitet eller økt frigivelse av LDH til media fra de eksponerte leverskivene i forhold til en løsemiddelkontroll (Figur 36 og 36).

Eksponering av PKLS for END ga hverken en tydelig opp- eller nedregulering av hverken *esr1* eller *vtg*. Leverskiveeksponeringene tyder på at END har ingen eller liten effekt på *esr1*- og *vtg*-uttrykning *ex vivo*. 0,5  $\mu\text{M}$  ga den høyeste oppreguleringen av både *esr1* og *vtg*, og kan tyde på at høyere dose ikke fører til økt aktivering av ER $\alpha$ . En studie utført på hannrotter har tidligere vist at END har en tofaset dose-responskurve ved at en dose på 0,5 mg END/kg/dag forstyrret utviklingen av reproduktive organer, mens en høyere dose på 1,5 mg END/kg/dag ikke hadde en effekt (Dalsenter et al., 2003). I en tidligere studie der hepatocytter fra laks ble eksponert for ulike konsentrasjoner av END viste eksponering for 10  $\mu\text{M}$  END den høyeste oppreguleringen av *vtg*. Oppreguleringen var noe lavere ved eksponering for 100  $\mu\text{M}$  END (Krøvel et al., 2010). Det ble også i den luciferasebaserte genreporteranalysen utført i denne oppgaven observert en tofaset dose-responskurve når ER $\alpha$  fra torsk ble eksponert for END. Det er imidlertid nødvendig å slå fast om nedgangen i aktiveringen av ER $\alpha$  er som følge av at høyere konsentrasjoner av END har cytotoxicisk effekt på cellene. *In vivo* er det funnet LOEC på antall egg som fører frem avkom på 1  $\mu\text{g/L}$  for Australsk regnbuefisk (*Melanotaenia fluviatilis*) etter vannbåren eksponering for END i 4 timer (Holdway et al., 2008).

Den luciferasebaserte ligandreporteranalysen med eksponering av ER $\alpha$  for END utført i denne oppgaven viste høyest aktivering ved eksponering for 50  $\mu\text{M}$ , og en kraftig reduksjon i aktivering fra eksponering for 50 til 100  $\mu\text{M}$  END. Ut fra ligandreporteranalysen kunne en kanskje forventet en høyere induksjon av *vtg* og *esr1* i leverskiveeksponeringene.

Flere forsøk har vist at END har østrogene egenskaper som avtar med økende eksponeringsdose. Ved hvilken eksponeringsdose de østrogene egenskapene til END avtar ser ut til å variere i ulike forsøk. Samtidig påvirkes typen av eksponeringsstudie som gjennomføres dosen END som kreves for å aktivere ER $\alpha$ . Ulike arter kan dessuten ha ulik sensitivitet for END som en xenoøstrogen. En av forbindelsene endosulfan metaboliseres til i leveren er

endosulfansulfat (Martínez Vidal et al., 1998), som i mennesker ikke blir videre nedbrutt (Lee et al., 2006). En tidligere studie har vist at endosulfansulfat ikke opptrer østrogen i mennesker (Rivas et al., 2001). En mulig årsak til at ulike studier viser forskjellige østrogene responser som følge av eksponering for END kan være en følge av biotransformasjon til mindre østrogene metabolitter som for eksempel endosulfansulfat.

#### **5.4.3 Eksponering av PKLS for MIKS for å undersøke effekt på *esr1* og *vtg***

Ved eksponering av PKLS for 0,5, 5 og 50  $\mu\text{M}$  MIKS ble det observert en trend for nedregulering av *esr1*. Det ble samtidig observert en trend for oppregulering av *vtg* ved eksponering for 0,5 og 5  $\mu\text{M}$  MIKS. Den eneste signifikante oppreguleringen fra eksponeringen av PKLS var oppreguleringen av *vtg* eksponert for 50  $\mu\text{M}$  MIKS (Figur 41). For MIKS ble det heller ikke observert endring i metabolsk aktivitet eller friggitt LDH til media fra de eksponerte leverskivene sammenlignet med leverskiver eksponert for en løsemiddelkontroll (Figur 36 og 36).

Oppreguleringen av *vtg* indikerer at MIKS kan ha en østrogen effekt. Fordi eksponeringskonsentrasjonene for hver av forbindelsene i MIKS (0,25, 2,5 og 25  $\mu\text{M}$  for hver av forbindelsene MXC og END) er halvparten av konsentrasjonene brukt ved eksponering for MXC (0,5, 5 og 50  $\mu\text{M}$ ) og END (0,5 5 og 50  $\mu\text{M}$ ), er ikke forsøkene direkte sammenlignbare, og det er dermed utfordrende å si noe om eventuelle kombinasjonseffekter. Ved eksponering for 0,5  $\mu\text{M}$  MIKS er effekten på *vtg*-uttrykning noe høyere enn ved den gjennomsnittlige relative uttrykningen som følge av eksponeringene for MXC og END. Ved eksponering for 5  $\mu\text{M}$  MIKS er oppreguleringen av *vtg* om lag en tredjedel av den gjennomsnittlige oppreguleringen ved eksponering for 5  $\mu\text{M}$  MXC og END. Da bidraget fra END var meget lavt (1,4 fold) kan det antas at oppreguleringen observert ved eksponering for 5  $\mu\text{M}$  MIKS hovedsakelig stammer fra MXC. Ved eksponering for 50  $\mu\text{M}$  MIKS er effekten på *vtg*-uttrykningen over 15 fold høyere enn den observert ved eksponering for 50  $\mu\text{M}$  MXC, og det kan spekuleres i om eventuelle synergistiske effekter oppstår mellom MXC og END ved denne eksponeringskonsentrasjonen. Høy oppregulering av *vtg* var observert ved eksponering for 50  $\mu\text{M}$  MIKS sammenlignet med de separate eksponeringene for 50  $\mu\text{M}$  MXC og END. Til tross for dette var uttrykningen av *esr1* ved denne konsentrasjonen høyere i leverskiver eksponert for MXC og END sammenlignet med dem eksponert for MIKS. Den høye *vtg*-uttrykning i MIKS-gruppen kommer derfor ikke av flere *esr1*-transkript i denne gruppen. Grunnet variasjon i dataene fra leverskivene, kan forskjeller mellom MXC, END og MIKS også skyldes for

eksempel ulikheter i blant annet tykkelsen til leverskivene fra prepareringen (Smith et al., 1985). Tykkelse påvirker leverskivenes evne til å ta opp næring, tilgang på oksygen og i hvilken grad cellene i leverskivene klarer å kvitte seg med avfallsstoffer, samt at tykkere leverskiver vil ha en lavere eksponeringsgrad enn tynnere leverskiver (Smith et al., 1985, Graaf et al., 2007). Tidligere studier har vist både antagonistiske, additive og synergistiske effekter når MXC og END har blitt kombinert med andre stoffer (Suzuki et al., 2001). Ved hvilke kombinasjoner de ulike effektene oppstår varierer. Det virker som at MXC har det største bidraget når leverskiver eksponeres for MIKS i PKLS, men eventuelle kombinasjonseffekter må undersøkes nærmere.

## 5.5 Vurdering av metoder

### 5.5.1 Genreportersystemet brukt i denne oppgaven

Det finnes en rekke ulike varianter av luciferasebaserte genreportersystemer, for eksempel CALUX- (kjemisk aktivert luciferase-genuttrykning) og UAS/Gal4-baserte systemer. I denne oppgaven ble det brukt en UAS/Gal4-variant. Det finnes også varianter innenfor de ulike systemene, med variasjoner i antall hormonresponselementer (HRE) eller UAS, eller ved bruk av ulike cellelinjer (Long et al., 2003, Engineer et al., 2005).

Luciferasebaserte genreporteranalyser er *in vitro*-systemer, og det er derfor vanskelig å forutsi hvordan aktiveringen ville vært om den hadde skjedd i reseptorens fysiologiske omgivelser. Ulike cellelinjer har ulike arts- og vevsforskjeller i kofaktorer, noe som kan påvirke aktiveringen av transkripsjonsfaktoren som blir undersøkt. Ulike cellelinjer har også ulik fordeling av transkripsjonsfaktorer og biotransformasjonsenzymer som bidrar i metabolisering av forbindelser. For eksempel er PXR mest uttrykt i lever- og tarmceller, og i mindre grad uttrykt i nyre- og lungeceller (Xu et al., 2005). PXR er involvert i transkripsjonen av CYP3A, som metaboliserer kolesterol, steroider og andre lipider, men også er viktig for biotransformasjonen av fremmedstoffer (Coumoul et al., 2002). Videre kan det ikke utelukkes at Gal4-DBD fusjonert med ER $\alpha$ -LBD kan påvirke foldingen til proteinet, og dermed påvirke ligandbindende egenskaper. Det må også tas i betraktning at ER $\alpha$ -LBD brukt i denne oppgaven er hentet fra atlantehavstorsk, og det kan derfor tenkes at dens optimale funksjonelle temperatur er lavere enn 37 °C som var temperaturen Cos-7-cellene ble dyrket ved i denne oppgaven.

Det finnes også andre *in vitro*-metoder for å måle ligandaktivering av ER $\alpha$ . En metode som er aktuell for å karakterisere liganders interaksjoner med ER $\alpha$  er fluorescensresonansenergioverføring (FRET). FRET er en analysemetode som baserer seg på

distanseavhengig overføring av energi fra et donormolekyl til et akseptormolekyl merket med kromoforer. For at et FRET-signal skal oppstå, må donor- og akseptormolekylene være nær hverandre (Held, 2005). For at ER $\alpha$  skal kunne regulere transkripsjon av målgener, er den avhengig av koaktivatorer. FRET kan brukes for å måle interaksjoner mellom ER $\alpha$ -LBD og en koaktivator, og forstyrrelsen av denne interaksjonen av en ligand (Moore et al., 2015). Fordelen med en slik analyse er at man også får informasjon om ligander som evner å binde reseptoren uten at nødvendige koaktivatorer rekrutteres, og dermed fører til at reseptoren blokkeres (antagonister).

### 5.5.2 Eksponering av PKLS

En av de største utfordringene ved eksponering av PKLS er at det er vanskelig å få leverskivene i nøyaktig samme størrelse. Det er tidligere vist at hvor reproducerbar tykkelsen mellom ulike vevsskiver er avhenger av vevstype (Zimmermann et al., 2009). Etter leverskiveeksponeringen i denne oppgaven ble det observert en viss grad av variasjon i uttrykkningen av *esr1* og *vtg* mellom de ulike leverskivene i samme eksponeringsgruppe. Forskjeller i tykkelsen på leverskivene kan ha bidratt til denne variasjonen. Fordi det i hovedsak er de ytre cellelagene som står for den metabolske aktiviteten antas det at tynne leverskiver generelt har en høyere metabolisme enn tykkere leverskiver. Dette kan være en følge av at det tar lenger tid før forbindelser når indre cellelag (Graaf et al., 2007).

Leverskivene brukt i oppgaven ble støpt i ultra-low melting-agarose for å stabilisere leverkjernene under utskjæringen av leverskiver. Innstøpingen skal fremme at leverskivene blir så like som mulig, og for å best mulig bevare viabiliteten til leverskivecellene. Det er også ved tidligere forsøk brukt agaroseinnstøping (Du et al., 2016).

I denne oppgaven ble bare de sentrale delene av leveren brukt under utskjæringen av leverskiver for å sikre minst mulig variasjon mellom leverskivene. Forsøk på laks har vist at beta-naftoflavon (en aryl hydrokarbonreseptor-agonist) induserte en høyere uttrykkning av *cyp1a* i de sentrale delene av leveren (Olsvik et al., 2007), og det kan ikke utelukkes at dette også gjelder for induksjonspotensialet til *esr1* og *vtg* i torskelever. Leverskivene ble tilfeldig plassert på eksponeringsplaten, og to og to leverskiver ble slått sammen før RNA-ekstraksjon. Dette kan ha bidratt til å minske bidraget fra eventuelle vevsforskjeller som kan påvirke genuttrykkningen.

En annen parameter å ta i betraktning er atlantehavstorskens fettrike lever. Det er tidligere foreslått at fettrike hepatocytter har lavere metabolsk aktivitet (Husøy et al., 1996). Det er også foreslått at lipofile forbindelser akkumulerer i lipiddråper i leveren *in vivo* (Hektoen et al.,

1994), og dermed blir utilgjengelige for aktivering av transkripsjonsfaktorer som ER $\alpha$ . Ved PKLS opprettholdes cellenes naturlige konfigurasjon. Cellekonfigurasjonen kan variere mellom leverskivene og kan være noe av årsaken til variasjoner mellom leverskivene.

## 5.6 Konklusjon

I denne oppgaven lyktes det å klonere og sekvensere den ukjente 3'-enden til *esr1* fra torsk. Videre ble et luciferasebasert genreportersystem med torsk-ER $\alpha$ -LBD etablert. Eksponering for EE2 viste at Gal4-ER $\alpha$ -LBD utgjorde et funksjonelt protein som kunne aktiveres i COS-7-celler. Eksponering for MXC, END og MIKS evnet også å aktivere reseptoren i luciferasebaserte ligandaktiveringsanalyser. Kombinasjonen av MXC og END ser ut til å ha hovedsakelig antagonistiske effekter i ligandaktiveringsanalysen, men dette må undersøkes nærmere. Det ble videre utført eksponering av PKLS for de samme forbindelsene. Eksponering av PKLS for MXC, END og MIKS viste ikke tydelige endringer i uttrykkningen av *esr1*, bortsett fra en signifikant nedregulering ved eksponering for 0,5 og 5  $\mu$ M MXC. Indusering av *vtg* og *esr1* som følge av eksponering for MXC varierer i ulike studier. Både art, kjønn og alder påvirker hvor følsomt et individ er for eksponering for MXC. På grunn av den tydelige trenden for oppregulering av *vtg* observert ved MXC-eksponering av PKLS kan det tyde på at MXC har østrogene effekter på juvenile torsk. Dette støttes av den luciferasebaserte genreporteranalysen utført i denne oppgaven. Ved eksponering for END ble det ikke observert tydelig oppregulering av *vtg* i noen av eksponeringsgruppene. Eksponering av PKLS for 0,5 og 5  $\mu$ M MIKS ga en trend for oppregulering av *vtg*. Eksponering for 50  $\mu$ M MIKS ga en signifikant oppregulering av *vtg*.

## 5.7 Forslag til fremtidig arbeid

I 2014 ble mesteparten av *esr1*-transkriptet fra atlantehavstorsk kartlagt (Nagasawa, 2014). I denne oppgaven lyktes det å avdekke 3'-enden til transkriptet. Det kan være interessant å klonere hele reseptoren og bruke den i ligandaktiveringsanalyser der det konstrueres et spesialdesignet reporterplasmid med endogene ERE oppstrøms for luciferasegenet. Fordelen med full-lengde-steroidreseptorer er at det er basert på fullt funksjonelle reseptorer som kan binde til responselementer med høy affinitet i promotoren til reporterplasmider. Problemet ved bruk av full-lengde-reseptorer er potensielt lavere toleranse av høyere uttrykningsnivåer i cellene. Celler som uttrykker høyere nivåer av en spesifikk reseptor kan være ustabile i kultur. Et annet problem med full-lengde-reseptorer er at de kan respondere på stimuli fra inne i cellen, og aktiviteten deres kan dermed moduleres indirekte av posttranslasjonelle modifikasjoner som et

resultat av aktivering av andre reksjonsveier. Disse problemene er ikke assosiert ved bruk av Gal4-DBD da aktiviteten er mediert gjennom Gal4-UAS som er fremmed for de fleste transkripsjonsfaktorer i pattedyr. Sammenligninger av Gal4-DBD-reseptor-LBD-analyser og full-lengde-reseptor-analyser viser at det er høy likhet i ligandaktivering, spesielt for ER $\alpha$ , ER $\beta$  og glukokortikoidreseptoren (GR) (Sedlák et al., 2011).

Det er interessant å utføre flere eksponeringsforsøk med PKLS fra flere individer for å undersøke om oppreguleringen av *vtg* er reell når det eksponeres for MXC og END hver for seg. Spesielt endring i genuttrykk for *vtg* som følge av leverskiveeksponering for END bør undersøkes nærmere for å kunne avgjøre om denne har en effekt, da effekten fra leverskiveeksponeringen var meget svak. For de ulike ligandene ble det observert varierende grad av aktivering av ER $\alpha$  i ligandaktiveringsanalysene sammenlignet med oppreguleringen av *vtg* fra eksponeringen av PKLS. END ga den høyeste aktiveringen av ER $\alpha$  i genreporteranalysen, mens den ga den laveste induksjonen av *vtg* i leverskiveeksponeringene. Både MXC og MIKS ga en relativt kraftig induksjon av *vtg* i leverskiveeksponeringene sammenlignet med aktiveringen av ER $\alpha$  observert i genreporteranalysene. For å få bedre forståelse av forskjeller i respons mellom metodene, kan MXC og END inkuberes med levermikrosomer fra torsk før ligandaktiveringsanalyser med ER $\alpha$  gjennomføres. På denne måten får man en indikasjon på om forskjeller i respons mellom metodene skyldes metabolsk aktivitet i leveren. Det kan være interessant å undersøke om END-metabolitten endosulfansulfat har en effekt på uttrykkningen av *esr1/vtg* i PKLS. For MXC kunne det vært en nyttig å undersøke hvordan HPTE påvirker *esr1/vtg* leverskivecellene. Det kan også utføres leverskiveeksponeringer med MXC, END og MIKS der uttrykkning av de andre østrogenreseptorvariantene undersøkes sammen med uttrykkningen av *vtg*, for å teste om *vtg* kan induseres gjennom noen av disse. Det kunne også vært en idé å utføre ligandaktiveringsforsøk med ER $\beta$ 1 og ER $\beta$ 2 fra torsk, for å undersøke om disse evner å aktiveres av MXC, END eller MIKS, da deres LBD har omtrent 59 % likhet i aminosyresekvens med DBD fra ER $\alpha$  (Harrington et al., 2003). Tidligere studier har vist at visse ligander har ulik affinitet for ER $\alpha$  og ER $\beta$  i blant annet menneske og rotte (Kuiper et al., 1998, Harrington et al., 2003).

Det er tidligere vist at MXC og END har varierende østrogene egenskaper. Det er nødvendig å gjenta ligandaktiveringen med MXC og END, da det i denne oppgaven ikke ble utført flere forsøk grunnet tidsbegrensning. Det kan også være interessant å utføre ligandaktiveringer med andre forbindelser som for eksempel bisfenol S (BPS), polyklorerte bifenyler (PCB-er) og polybromerte difenyletere (PBDE-er). Det kan også være nyttig å utføre studier med



metabolitter av MXC og END, og da spesielt med MXC-metabolitten HPTE og END-metabolitten endosulfansulfat. Det er fremdeles usikkert hva slags interaksjoner som foregår mellom MXC og END ved ulike konsentrasjoner når disse stoffene opptrer samtidig. Det kunne vært en idé å kombinere MXC og END med EE2 for å studere antagonistiske, synergistiske og additive egenskaper. Det kan også være nyttig å studere disse stoffene sammen i et *in vivo*-system ved å eksponere torsk for END, MXC og MIKS og undersøke effekter på uttrykning av *esr1* og *vtg*.

## 6 Referanser

- ANDERSEN, H. R., VINGGAARD, A. M., RASMUSSEN, T. H., GJERMANDSEN, I. M. & BONEFELD-JØRGENSEN, E. C. 2002. Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. *Toxicology and applied pharmacology*, 179, 1-12.
- ARANDA, A. & PASCUAL, A. 2001. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological reviews*, 81, 1269-1304.
- ARUKWE, A. & GOKSØYR, A. 2003. Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. *Comparative hepatology*, 2, 4.
- BALAGUER, P., FRANÇOIS, F., COMUNALE, F., FENET, H., BOUSSIOUX, A.-M., PONS, M., NICOLAS, J.-C. & CASELLAS, C. 1999. Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens. *Science of the Total Environment*, 233, 47-56.
- BERKI, T., BOLDIZÁR, F., SZABÓ, M., TALABÉR, G., VARECZA, Z. 2011. Signal Transduction (Medical Biotechnology). *University of Pécs* [online] Available: [http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop425/0011\\_1A\\_Jelatvitel\\_en\\_book/ch03.html](http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop425/0011_1A_Jelatvitel_en_book/ch03.html) [Accessed 02.07.2017].
- BERTRAND, S., THISSE, B., TAVARES, R., SACHS, L., CHAUMOT, A., BARDET, P.-L., ESCRIVÀ, H., DUFFRAISSE, M., MARCHAND, O. & SAFI, R. 2007. Unexpected novel relational links uncovered by extensive developmental profiling of nuclear receptor expression. *PLoS Genet*, 3, e188.
- BIO-RAD 2006. real-Time PCR Applications Guide.
- BIZARRO, C., EIDE, M., HITCHCOCK, D. J., GOKSØYR, A. & ORTIZ-ZARRAGOITIA, M. 2016. Single and mixture effects of aquatic micropollutants studied in precision-cut liver slices of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquatic Toxicology*, 177, 395-404.
- BLUMERG, B., SABBAGH, W., JUGUILON, H., BOLADO, J., VAN METER, C., ONG, E. & EVANS, R. 1998. SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor. *Genes Dev*, 12, 3195-3205.
- BOHNE-KJERSEM, A., SKADSHEIM, A., GOKSØYR, A. & GRØSVIK, B. E. 2009. Candidate biomarker discovery in plasma of juvenile cod (*Gadus morhua*) exposed to crude North Sea oil, alkyl phenols and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Marine Environmental Research*, 68, 268-277.
- BORSON, N. D., SALO, W. L. & DREWES, L. R. 1992. A lock-docking oligo (dT) primer for 5' and 3' RACE PCR. *Genome Research*, 2, 144-148.
- BOURGUET, W., GERMAIN, P. & GRONEMEYER, H. 2000. Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends in Pharmacological Sciences*, 21, 381-388.
- BOYCE-DERRICOTT, J., NAGLER, J. J. & CLOUD, J. G. 2009. Regulation of hepatic estrogen receptor isoform mRNA expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and comparative endocrinology*, 161, 73-78.
- BRASIER, A. R., TATE, J. E. & HABENER, J. F. 1989. Optimized use of the firefly luciferase assay as a reporter gene in mammalian cell lines. *Biotechniques*, 7, 1116-1122.
- BRZOZOWSKI, A. M., PIKE, A. C., DAUTER, Z., HUBBARD, R. E., BONN, T., ENGSTRÖM, O., ÖHMAN, L., GREENE, G. L., GUSTAFSSON, J.-Å. & CARLQUIST, M. 1997. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*, 389, 753-758.

- BUKOVSKY, A., SVETLIKOVA, M. & CAUDLE, M. R. 2005. Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3, 17.
- CAMPBELL, C. G., BORGLIN, S. E., GREEN, F. B., GRAYSON, A., WOZEI, E. & STRINGFELLOW, W. T. 2006. Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: a review. *Chemosphere*, 65, 1265-1280.
- CHEN, H., ZHANG, Y., LI, S., LIN, M., SHI, Y., SANG, Q., LIU, M., ZHANG, H., LU, D. & MENG, Z. 2011. Molecular cloning, characterization and expression profiles of three estrogen receptors in protogynous hermaphroditic orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *General and comparative endocrinology*, 172, 371-381.
- CHEN, M., HSU, I., WOLFE, A., RADOVICK, S., HUANG, K., YU, S., CHANG, C., MESSING, E. M. & YEH, S. 2008. Defects of prostate development and reproductive system in the estrogen receptor- $\alpha$  null male mice. *Endocrinology*, 150, 251-259.
- CLONTECH 2007. SMART™ RACE cDNA Amplification Kit User Manual.
- COUMOUL, X., DIRY, M. & BAROUKI, R. 2002. PXR-dependent induction of human CYP3A4 gene expression by organochlorine pesticides. *Biochemical Pharmacology*, 64, 1513-1519.
- COUSE, J. F., LINDZEY, J., GRANDIEN, K., GUSTAFSSON, J.-A. K. & KORACH, K. S. 1997. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and estrogen receptor- $\beta$  (ER $\beta$ ) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER $\alpha$ -knockout mouse. *Endocrinology*, 138, 4613-4621.
- CRISP, T. M., CLEGG, E. D., COOPER, R. L., WOOD, W. P., ANDERSON, D. G., BAETCKE, K. P., HOFFMANN, J. L., MORROW, M. S., RODIER, D. J. & SCHAEFFER, J. E. 1998. Environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. *Environmental health perspectives*, 106, 11.
- CUMMINGS, A. M. 1997. Methoxychlor as a model for environmental estrogens. *Critical reviews in toxicology*, 27, 367-379.
- DALSENTER, P. R., DEARAÚJO, S. L., DA SILVA DE ASSIS, H. C., ANDRADE, A. J. M. & DALLEGRAVE, E. 2003. Pre and postnatal exposure to endosulfan in Wistar rats. *Human & experimental toxicology*, 22, 171-175.
- DANIELIAN, P., WHITE, R., LEES, J. & PARKER, M. 1992. Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *The EMBO journal*, 11, 1025.
- DING, W., CAO, L., CAO, Z., BING, X. & ZHAO, F. 2016. Molecular characterization and expression profile of the estrogen receptor  $\alpha$  gene during different reproductive phases in *Monopterus albus*. *Scientific reports*, 6.
- DRINKWATER, K. F. 2005. The response of Atlantic cod (*Gadus morhua*) to future climate change. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*, 62, 1327-1337.
- DU, J.-L., CAO, L.-P., LIU, Y.-J., JIA, R. & YIN, G.-J. 2016. A Study of 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin Induced Liver Injury in Jian Carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) Using Precision-Cut Liver Slices. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 96, 55-61.
- EIDE, M., KARLSEN, O. A., KRYVI, H., OLSVIK, P. A. & GOKSØYR, A. 2014. Precision-cut liver slices of Atlantic cod (*Gadus morhua*): An in vitro system for studying the effects of environmental contaminants. *Aquatic Toxicology*, 153, 110-115.
- ENDRESEN, M. S. 2016. *Ligandaktivering av aryl hydrokarbon reseptor 2 (AhR2) fra Atlanterhavstorsk (Gadus morhua) ved bruk av luciferase genreportersystem*. The University of Bergen.

- ENGINEER, C. B., FITZSIMMONS, K. C., SCHMUKE, J. J., DOTSON, S. B. & KRANZ, R. G. 2005. Development and evaluation of a Gal4-mediated LUC/GFP/GUS enhancer trap system in Arabidopsis. *BMC plant biology*, 5, 9.
- EROSCHENKO, V. P., ROURKE, A. W. & SIMS, W. F. 1996. Estradiol or methoxychlor stimulates estrogen receptor (ER) expression in uteri. *Reproductive Toxicology*, 10, 265-271.
- FALLELL, S. O. & TAYLOR, L. E. 2006. *Experiments in Biochemistry A Hands-On Approach*, United States of America, David Harris.
- FAO 2017. Aquatic Species Distribution Map Viewer [online]. Available: <http://www.fao.org/figis/geoserver/factsheets/species.html> [Accessed 21.05.2017]
- FILBY, A. L., THORPE, K. L., MAACK, G. & TYLER, C. R. 2007. Gene expression profiles revealing the mechanisms of anti-androgen-and estrogen-induced feminization in fish. *Aquatic Toxicology*, 81, 219-231.
- FOLMAR, L. C., HEMMER, M. J., DENSLOW, N. D., KROLL, K., CHEN, J., CHEEK, A., RICHMAN, H., MEREDITH, H. & GRAU, E. G. 2002. A comparison of the estrogenic potencies of estradiol, ethynylestradiol, diethylstilbestrol, nonylphenol and methoxychlor in vivo and in vitro. *Aquatic Toxicology*, 60, 101-110.
- FORMAN, B. M., UMESONO, K., CHEN, J. & EVANS, R. M. 1995. Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors. *Cell*, 81, 541-550.
- FRACKMAN, S., KOBBS, G., SIMPSON, D. & STORTS, D. 1998. Betaine and DMSO: enhancing agents for PCR. *Promega notes*, 65, 27-29.
- FUJITA, H., TATSUMI, H., BAN, T. & TAMURA, S. 1986. Fine-structural characteristics of the liver of the cod (*Gadus morhua macrocephalus*), with special regard to the concept of a hepatoskeletal system formed by Ito cells. *Cell and tissue research*, 244, 63-67.
- GAIDO, K. W., LEONARD, L. S., MANESS, S. C., HALL, J. M., MCDONNELL, D. P., SAVILLE, B. & SAFE, S. 1999. Differential interaction of the methoxychlor metabolite 2, 2-bis-(p-hydroxyphenyl)-1, 1, 1-trichloroethane with estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Endocrinology*, 140, 5746-5753.
- GAIDO, K. W., MANESS, S. C., MCDONNELL, D. P., DEHAL, S. S., KUPFER, D. & SAFE, S. 2000. Interaction of methoxychlor and related compounds with estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$ , and androgen receptor: structure-activity studies. *Molecular Pharmacology*, 58, 852-858.
- GERMAIN, P., STAELS, B., DACQUET, C., SPEDDING, M. & LAUDET, V. 2006. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacological reviews*, 58, 685-704.
- GIMENO, S., KOMEN, H., GERRITSEN, A. G. M. & BOWMER, T. 1998. Feminisation of young males of the common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-tert-pentylphenol during sexual differentiation. *Aquatic toxicology*, 43, 77-92.
- GLUZMAN, Y. 1981. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*, 23, 175-182.
- GOUIN, T., MACKAY, D., JONES, K. C., HARNER, T. & MEIJER, S. N. 2004. Evidence for the "grasshopper" effect and fractionation during long-range atmospheric transport of organic contaminants. *Environmental pollution*, 128, 139-148.
- GRAAF, I. A. D., GROOTHUIS, G. M. & OLINGA, P. 2007. Precision-cut tissue slices as a tool to predict metabolism of novel drugs. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 3, 879-898.

- GROSS-SOROKIN, M. Y., ROAST, S. D. & BRIGHTY, G. C. 2006. Assessment of feminization of male fish in English rivers by the Environment Agency of England and Wales. *Environmental health perspectives*, 114, 147.
- HACHFI, L., COUVRAY, S., SIMIDE, R., TARNOWSKA, K., PIERRE, S., GAILLARD, S., RICHARD, S., COUPÉ, S., GRILLASCA, J.-P. & PRÉVOT-D'ALVISE, N. 2012. Impact of endocrine disrupting chemicals [EDCs] on hypothalamic-pituitary-gonadotrophin [HPGL] axis in fish. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 4, 14-30.
- HALSALL, C. J. 2004. Investigating the occurrence of persistent organic pollutants (POPs) in the arctic: their atmospheric behaviour and interaction with the seasonal snow pack. *Environmental Pollution*, 128, 163-175.
- HAM, J. & PARKER, M. 1989. Regulation of gene expression by nuclear hormone receptors. *Current opinion in cell biology*, 1, 503-511.
- HAO, R., BONDESSON, M., SINGH, A. V., RIU, A., MCCOLLUM, C. W., KNUDSEN, T. B., GORELICK, D. A. & GUSTAFSSON, J.-Å. 2013. Identification of Estrogen Target Genes during Zebrafish Embryonic Development through Transcriptomic Analysis. *PLOS ONE*, 8, e79020.
- HARRAD, S. 2009. *Persistent organic pollutants*, John Wiley & Sons [online]. Available: <http://eu.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-1405169303.html> [Accessed 05.04.2017].
- HARRINGTON, W. R., SHENG, S., BARNETT, D. H., PETZ, L. N., KATZENELLENBOGEN, J. A. & KATZENELLENBOGEN, B. S. 2003. Activities of estrogen receptor alpha-and beta-selective ligands at diverse estrogen responsive gene sites mediating transactivation or transrepression. *Molecular and cellular endocrinology*, 206, 13-22.
- HAWKINS, M. & THOMAS, P. 2004. The unusual binding properties of the third distinct teleost estrogen receptor subtype ER $\beta$ a are accompanied by highly conserved amino acid changes in the ligand binding domain. *Endocrinology*, 145, 2968-2977.
- HAWKINS, M. B., THORNTON, J. W., CREWS, D., SKIPPER, J. K., DOTTE, A. & THOMAS, P. 2000. Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 10751-10756.
- HEKTOEN, H., BERNHOFT, A., INGEBRIGTSEN, K., SKAARE, J. U. & GOKSØYR, A. 1994. Response of hepatic xenobiotic metabolizing enzymes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and cod (*Gadus morhua*) to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (2, 3, 7, 8-TCDD). *Aquatic toxicology*, 28, 97-106.
- HELD, P. 2005. An Introduction to Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Technology and its Application in Bioscience. *Biotek Tech Resources* [online]. Available: <https://www.biotek.com/resources/white-papers/an-introduction-to-fluorescence-resonance-energy-transfer-fret-technology-and-its-application-in-bioscience/> [Accessed 09.05.2017].
- HELDRING, N., PIKE, A., ANDERSSON, S., MATTHEWS, J., CHENG, G., HARTMAN, J., TUJAGUE, M., STRÖM, A., TREUTER, E. & WARNER, M. 2007. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiological reviews*, 87, 905-931.
- HEMMER-HANSEN, J., NIELSEN, E. E., THERKILDSEN, N. O., TAYLOR, M. I., OGDEN, R., GEFFEN, A. J., BEKKEVOLD, D., HELYAR, S., PAMPOULIE, C. & JOHANSEN, T. 2013. A genomic island linked to ecotype divergence in Atlantic cod. *Molecular Ecology*, 22, 2653-2667.
- HEMMER, M. J., HEMMER, B. L., BOWMAN, C. J., KROLL, K. J., FOLMAR, L. C., MARCOVICH, D., HOGLUND, M. D. & DENSLOW, N. D. 2001. Effects of p-

- nonylphenol, methoxychlor, and endosulfan on vitellogenin induction and expression in sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 336-343.
- HERZKE, D., KAASA, H., GRAVEM, F., GREGERSEN, H., JENSEN, H. G. B., HEDVIK, Ø. P. 2013. Perfluorinated alkylated substances, brominated flame retardants and chlorinated paraffins in the Norwegian Environment - Screening 2013. *Miljødirektoratet*, M-40.
- HEWITT, S. C. & KORACH, K. S. 2003. Oestrogen receptor knockout mice: roles for oestrogen receptors alpha and beta in reproductive tissues. *Reproduction*, 125, 143-149.
- HOEKSTRA, P. F., BURNISON, B. K., NEHELI, T. & MUIR, D. C. G. 2001. Enantiomer-specific activity of o, p'-DDT with the human estrogen receptor. *Toxicology letters*, 125, 75-81.
- HOLDWAY, D. A., HEFFERMAN, J. & SMITH, A. 2008. Multigeneration assessment of nonylphenol and endosulfan using a model Australian freshwater fish, *Melanotaenia fluviatilis*. *Environmental toxicology*, 23, 253-262.
- HUANG, P., CHANDRA, V. & RASTINEJAD, F. 2010. Structural overview of the nuclear receptor superfamily: insights into physiology and therapeutics. *Annual review of physiology*, 72, 247-272.
- HUET-HUDSON, Y. M., CHAKRABORTY, C., DE, S. K., SUZUKI, Y., ANDREWS, G. K. & DEY, S. K. 1990. Estrogen regulates the synthesis of epidermal growth factor in mouse uterine epithelial cells. *Molecular Endocrinology*, 4, 510-523.
- HULTMAN, M. T., SONG, Y. & TOLLEFSEN, K. E. 2015. 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol (EE2) effect on global gene expression in primary rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology*, 169, 90-104.
- HUSS, J. M. & KELLY, D. P. 2004. Nuclear receptor signaling and cardiac energetics. *Circulation research*, 95, 568-578.
- HUSØY, A.-M., MYERS, M. S. & GOKSØYR, A. 1996. Cellular localization of cytochrome P450 (CYP1A) induction and histology in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) and European flounder (*Platichthys flesus*) after environmental exposure to contaminants by caging in Sør fjorden, Norway. *Aquatic Toxicology*, 36, 53-74.
- HUTCHINGS, J. A., MYERS, R. A. & LILLY, G. R. 1993. Geographic variation in the spawning of Atlantic cod, *Gadus morhua*, in the Northwest Atlantic. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50, 2457-2467.
- JENSEN, M. A., FUKUSHIMA, M. & DAVIS, R. W. 2010. DMSO and betaine greatly improve amplification of GC-rich constructs in de novo synthesis. *PLoS One*, 5, e11024.
- JULSHAMN, K., DUINKER, A., BERNTSSEN, M., NILSEN, B. M., FRANTZEN, S., NEDREAAS, K. & MAAGE, A. 2013a. A baseline study on levels of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, non-ortho and mono-ortho PCBs, non-dioxin-like PCBs and polybrominated diphenyl ethers in Northeast Arctic cod (*Gadus morhua*) from different parts of the Barents Sea. *Marine pollution bulletin*, 75, 250-258.
- JULSHAMN, K., DUINKER, A., NILSEN, B. M., NEDREAAS, K. & MAAGE, A. 2013b. A baseline study of metals in cod (*Gadus morhua*) from the North Sea and coastal Norwegian waters, with focus on mercury, arsenic, cadmium and lead. *Marine pollution bulletin*, 72, 264-273.
- KANNAN, K., HOLCOMBE, R. F., JAIN, S. K., ALVAREZ-HERNANDEZ, X., CHERVENAK, R., WOLF, R. E. & GLASS, J. 2000. Evidence for the induction of

- apoptosis by endosulfan in a human T-cell leukemic line. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 205, 53-66.
- KARL, H., KAMMANN, U., AUST, M.-O., MANTHEY-KARL, M., LÜTH, A. & KANISCH, G. 2016. Large scale distribution of dioxins, PCBs, heavy metals, PAH-metabolites and radionuclides in cod (*Gadus morhua*) from the North Atlantic and its adjacent seas. *Chemosphere*, 149, 294-303.
- KARLAGANIS, G., MARIONI, R., SIEBER, I. & WEBER, A. 2001. The elaboration of the 'Stockholm convention' on persistent organic pollutants (POPs): a negotiation process fraught with obstacles and opportunities. *Environmental Science and Pollution Research*, 8, 216-221.
- KARLSEN, O. A., BJØRNEKLETT, S., BERG, K., BRATTÅS, M., BOHNE-KJERSEM, A., GRØSVIK, B. E. & GOKSØYR, A. 2011. Integrative environmental genomics of cod (*Gadus morhua*): the proteomics approach. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 74, 494-507.
- KATSU, Y., KOHNO, S., HYODO, S., IJIRI, S., ADACHI, S., HARA, A., GUILLETTE JR, L. J. & IGUCHI, T. 2008. Molecular cloning, characterization, and evolutionary analysis of estrogen receptors from phylogenetically ancient fish. *Endocrinology*, 149, 6300-6310.
- KELLY, B. C. & GOBAS, F. A. 2001. Bioaccumulation of persistent organic pollutants in lichen– caribou– wolf food chains of Canada's central and western Arctic. *Environmental science & technology*, 35, 325-334.
- KIDD, K. A., BLANCHFIELD, P. J., MILLS, K. H., PALACE, V. P., EVANS, R. E., LAZORCHAK, J. M. & FLICK, R. W. 2007. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 8897-8901.
- KIM, N. N., JIN, D.-H., LEE, J., KIL, G.-S. & CHOI, C. Y. 2010. Upregulation of estrogen receptor subtypes and vitellogenin mRNA in cinnamon clownfish *Amphiprion melanopus* during the sex change process: Profiles on effects of 17 $\beta$ -estradiol. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 157, 198-204.
- KIRUBAKARAN, T. G., GROVE, H., KENT, M. P., SANDVE, S. R., BARANSKI, M., NOME, T., DE ROSA, M. C., RIGHINO, B., JOHANSEN, T. & OTTERÅ, H. 2016. Two adjacent inversions maintain genomic differentiation between migratory and stationary ecotypes of Atlantic cod. *Molecular ecology*, 25, 2130-2143.
- KLUG, A. & RHODES, D. 1987. 'Zinc fingers': a novel protein motif for nucleic acid recognition. *Trends in Biochemical Sciences*, 12, 464-469.
- KRASOWSKI, M. D., YASUDA, K., HAGEY, L. R. & SCHUETZ, E. G. 2005. Evolutionary selection across the nuclear hormone receptor superfamily with a focus on the NR1I subfamily (vitamin D, pregnane X, and constitutive androstane receptors). *Nuclear receptor*, 3, 2 [online]. Available: <https://nuclear-receptor.biomedcentral.com/articles/10.1186/1478-1336-3-2> [Accessed 04.03.2017]
- KRISHNAN, A. V., STATHIS, P., PERMUTH, S. F., TOKES, L. & FELDMAN, D. 1993. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology*, 132, 2279-2286.
- KRØVEL, A. V., SØFTELAND, L., TORSTENSEN, B. E. & OLSVIK, P. A. 2010. Endosulfan in vitro toxicity in Atlantic salmon hepatocytes obtained from fish fed either fish oil or vegetable oil. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 151, 175-186.
- KUIPER, G. G. J. M., LEMMEN, J. G., CARLSSON, B., CORTON, J. C., SAFE, S. H., VAN DER SAAG, P. T., VAN DER BURG, B. & GUSTAFSSON, J.-A. K. 1998.

- Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor  $\beta$ . *Endocrinology*, 139, 4252-4263.
- LANGE, A., KATSU, Y., ICHIKAWA, R., PAULL, G. C., CHIDGEY, L. L., COE, T. S., IGUCHI, T. & TYLER, C. R. 2008. Altered sexual development in roach (*Rutilus rutilus*) exposed to environmental concentrations of the pharmaceutical 17 $\alpha$ -ethinylestradiol and associated expression dynamics of aromatases and estrogen receptors. *Toxicological Sciences*, 106, 113-123.
- LASSITER, C. S., KELLEY, B. & LINNEY, E. 2002. Genomic structure and embryonic expression of estrogen receptor beta a (ER $\beta$ a) in zebrafish (*Danio rerio*). *Gene*, 299, 141-151.
- LAWS, S. C., CAREY, S. A., FERRELL, J. M., BODMAN, G. J. & COOPER, R. L. 2000. Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and methoxychlor in rats. *Toxicological Sciences*, 54, 154-167.
- LEAÑOS-CASTAÑEDA, O. & VAN DER KRAAK, G. 2007. Functional characterization of estrogen receptor subtypes, ER $\alpha$  and ER $\beta$ , mediating vitellogenin production in the liver of rainbow trout. *Toxicology and applied pharmacology*, 224, 116-125.
- LEE, H.-K., MOON, J.-K., CHANG, C.-H., CHOI, H., PARK, H.-W., PARK, B.-S., LEE, H.-S., HWANG, E.-C., LEE, Y.-D., LIU, K.-H. & KIM, J.-H. 2006. stereoselective metabolism of endosulfan by human liver microsomes and human cytochrome p450 isoforms. *Drug Metabolism and Disposition*, 34, 1090-1095.
- LEGLER, J., VAN DEN BRINK, C. E., BROUWER, A., MURK, A. J., VAN DER SAAG, P. T., VETHAAK, A. D. & VAN DER BURG, B. 1999. Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 48, 55-66.
- LEGRAND, C., BOUR, J. M., JACOB, C., CAPIAUMONT, J., MARTIAL, A., MARC, A., WUDTKE, M., KRETZMER, G., DEMANGEL, C. & DUVAL, D. 1992. Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the number of dead cells in the medium of cultured eukaryotic cells as marker. *Journal of biotechnology*, 25, 231-243.
- LEHMANN, J. M., MCKEE, D. D., WATSON, M. A., WILLSON, T. M., MOORE, J. T. & KLIEWER, S. A. 1998. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *Journal of Clinical Investigation*, 102, 1016.
- LILLE-LANGØY, R., GOLDSTONE, J. V., RUSTEN, M., MILNES, M. R., MALE, R., STEGEMAN, J. J., BLUMBERG, B. & GOKSØYR, A. 2015. Environmental contaminants activate human and polar bear (*Ursus maritimus*) pregnane X receptors (PXR, NR1I2) differently. *Toxicology and applied pharmacology*, 284, 54-64.
- LINK, J. S., BOGSTAD, B., SPARHOLT, H. & LILLY, G. R. 2009. Trophic role of Atlantic cod in the ecosystem. *Fish and Fisheries*, 10, 58-87.
- LONG, M., LAIER, P., VINGGAARD, A. M., ANDERSEN, H. R., LYNGGAARD, J. & BONEFELD-JØRGENSEN, E. C. 2003. Effects of currently used pesticides in the AhR-CALUX assay: comparison between the human TV101L and the rat H4IIE cell line. *Toxicology*, 194, 77-93.
- MA, C. H., DONG, K. W. & YU, K. L. 2000. cDNA cloning and expression of a novel estrogen receptor  $\beta$ -subtype in goldfish (*Carassius auratus*). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1490, 145-152.
- MACKAY, M., RAELSON, J. & LAZIER, C. 1996. Up-regulation of estrogen receptor mRNA and estrogen receptor activity by estradiol in liver of rainbow trout and other teleostean fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 115, 201-209.



- MADSEN, A. K. 2016. *Kloning, karakterisering og ligandaktivering av aryl hydrokarbonreseptor 2 (AHR2) fra Atlanterhavstorsk (Gadus morhua)*. The University of Bergen.
- MADSEN, S. S., MATHIESEN, A. B. & KORSGAARD, B. 1997. Effects of 17 $\beta$ -estradiol and 4-nonylphenol on smoltification and vitellogenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 17, 303-312.
- MAMEDOV, T., PIENAAR, E., WHITNEY, S. E., TERMAAT, J. R., CARVILL, G., GOLIATH, R., SUBRAMANIAN, A. & VILJOEN, H. J. 2008. A fundamental study of the PCR amplification of GC-rich DNA templates. *Computational biology and chemistry*, 32, 452-457.
- MANGELSDORF, D. J., THUMMEL, C., BEATO, M., HERRLICH, P., SCHÜTZ, G., UMESONO, K., BLUMBERG, B., KASTNER, P., MARK, M. & CHAMBON, P. 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, 83, 835-839.
- MARTÍNEZ VIDAL, J. L., ARREBOLA, F. J., FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. & RAMS, M. A. 1998. Determination of endosulfan and its metabolites in human urine using gas chromatography–tandem mass spectrometry. This article is dedicated to Dr. Antonio Arrebola Ramírez of the University of Granada, in memoriam. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 719, 71-78.
- MEERTS, I., LETCHER, R. J., HOVING, S., MARSH, G., BERGMAN, A., LEMMEN, J. G., VAN DER BURG, B. & BROUWER, A. 2001. In vitro estrogenicity of polybrominated diphenyl ethers, hydroxylated PDBEs, and polybrominated bisphenol A compounds. *Environmental health perspectives*, 109, 399.
- MIENTJES, E. J., STEENWINKEL, M.-J. S. T., VAN DELFT, J. H. M., LOHMAN, P. H. M. & BAAN, R. A. 1996. Comparison of the X-gal- and P-gal-based systems for screening of mutant  $\lambda$ lacZ phages originating from the transgenic mouse strain 40.6. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 360, 101-106.
- MINTA, M., RADKO, L., STYPUŁA-TREBAS, S. & ŻMUDZKI, J. 2014. Cytotoxic effects of the synthetic oestrogens and androgens on Balb/c 3T3 and HepG2 cells. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 58, 613-620.
- MOORE, T. W., GUNTHER, J. R. & KATZENELLENBOGEN, J. A. 2015. Estrogen Receptor Alpha/Co-activator Interaction Assay: TR-FRET. *Protein-Protein Interactions: Methods and Applications*, 545-553.
- MORAS, D. & GRONEMEYER, H. 1998. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Current opinion in cell biology*, 10, 384-391.
- NAGASAWA, K., PRESSLAUER, C., KIRTIKLIS, L., BABIAK, I. & FERNANDES, J. M. 2014. Sexually dimorphic transcription of estrogen receptors in cod gonads throughout a reproductive cycle. *Journal of molecular endocrinology*, 52, 357-371.
- NELMS, B. L. & LABOSKY, P. A. 2011. A predicted hairpin cluster correlates with barriers to PCR, sequencing and possibly BAC recombineering. *Scientific reports*, 1, 106.
- NELSON, E. R. & HABIBI, H. R. 2010. Functional significance of nuclear estrogen receptor subtypes in the liver of goldfish. *Endocrinology*, 151, 1668-1676.
- NELSON, E. R. & HABIBI, H. R. 2013. Estrogen receptor function and regulation in fish and other vertebrates. *General and comparative endocrinology*, 192, 15-24.
- NELSON, J. A. 1974. Effects of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) analogs and polychlorinated biphenyl (PCB) mixtures on 17 $\beta$ -[3H] estradiol binding to rat uterine receptor. *Biochemical pharmacology*, 23, 447-451.
- NG, H. W., PERKINS, R., TONG, W. & HONG, H. 2014. Versatility or promiscuity: The estrogen receptors, control of ligand selectivity and an update on subtype selective ligands. *International journal of environmental research and public health*, 11, 8709-8742.

- OLENICK, L. 2013. The Cautionary Tale of DDT - Biomagnification, Bioaccumulation, and Research Motivation. *Sustainable nano* [online]. Available: <http://sustainable-nano.com/2013/12/17/the-cautionary-tale-of-ddt-biomagnification-bioaccumulation-and-research-motivation/> [Accessed 07.06.2017].
- OLSVIK, P. A., LIE, K. K., SÆLE, Ø. & SANDEN, M. 2007. Spatial transcription of CYP1A in fish liver. *BMC physiology*, 7, 12.
- OLSVIK, P. A., SØFTELAND, L. & LIE, K. K. 2008. Selection of reference genes for qRT-PCR examination of wild populations of Atlantic cod *Gadus morhua*. *BMC Research Notes*, 1, 47.
- OSPAR 2009. Assessment of impacts of offshore oil and gas activities in the North-East Atlantic. *London: OSPAR Commission* [online] Available: [http://qsr2010.ospar.org/media/assessments/p00453\\_OA3-BA5\\_ASSESSMENT.pdf](http://qsr2010.ospar.org/media/assessments/p00453_OA3-BA5_ASSESSMENT.pdf) [Accessed 04.07.2017].
- PANJA, S., AICH, P., JANA, B. & BASU, T. 2008. How does plasmid DNA penetrate cell membranes in artificial transformation process of *Escherichia coli*? *Molecular membrane biology*, 25, 411-422.
- REES, W. A., YAGER, T. D., KORTE, J. & VON HIPPEL, P. H. 1993. Betaine can eliminate the base pair composition dependence of DNA melting. *Biochemistry*, 32, 137-144.
- RIVAS, A., FERNANDEZ, M. F., CERRILLO, I., IBARLUZEA, J., OLEA-SERRANO, M. F., PEDRAZA, V. & OLEA, N. 2001. Human exposure to endocrine disruptors: standardisation of a marker of estrogenic exposure in adipose tissue. *Apmis*, 109.
- RUDEL, R. A., CAMANN, D. E., SPENGLER, J. D., KORN, L. R. & BRODY, J. G. 2003. Phthalates, alkylphenols, pesticides, polybrominated diphenyl ethers, and other endocrine-disrupting compounds in indoor air and dust. *Environmental science & technology*, 37, 4543-4553.
- SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J. & HIGUCHI, R. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487.
- SCHMIEDER, P. K., TAPPER, M. A., DENNY, J. S., KOLANCZYK, R. C., SHEEDY, B. R., HENRY, T. R. & VEITH, G. D. 2004. Use of trout liver slices to enhance mechanistic interpretation of estrogen receptor binding for cost-effective prioritization of chemicals within large inventories. *Environmental science & technology*, 38, 6333-6342.
- SCHREER, A., TINSON, C., SHERRY, J. P. & SCHIRMER, K. 2005. Application of Alamar blue/5-carboxyfluorescein diacetate acetoxyethyl ester as a noninvasive cell viability assay in primary hepatocytes from rainbow trout. *Analytical biochemistry*, 344, 76-85.
- SCHWABE, J. W., CHAPMAN, L., FINCH, J. T. & RHODES, D. 1993a. The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell*, 75, 567-578.
- SCHWABE, J. W., CHAPMAN, L., FINCH, J. T., RHODES, D. & NEUHAUS, D. 1993b. DNA recognition by the oestrogen receptor: from solution to the crystal. *Structure*, 1, 187-204.
- SCHWABE, J. W., CHAPMAN, L. & RHODES, D. 1995. The oestrogen receptor recognizes an imperfectly palindromic response element through an alternative side-chain conformation. *Structure*, 3, 201-213.
- SEDLÁK, D., PAGUIO, A. & BARTUNEK, P. 2011. Two panels of steroid receptor luciferase reporter cell lines for compound profiling. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 14, 248-266.

- SEEGER, B., KLAWONN, F., NGUEMA BEKALE, B. & STEINBERG, P. 2016. Mixture Effects of Estrogenic Pesticides at the Human Estrogen Receptor  $\alpha$  and  $\beta$ . *PLoS ONE*, 11, e0147490.
- SEGNER, H. 1998. Isolation and primary culture of teleost hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 120, 71-81.
- SHANG, Y., HU, X., DIRENZO, J., LAZAR, M. A. & BROWN, M. 2000. Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell*, 103, 843-852.
- SHELBY, M. D., NEWBOLD, R. R., TULLY, D. B., CHAE, K. & DAVIS, V. L. 1996. Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of in vitro and in vivo assays. *Environmental Health Perspectives*, 104, 1296-1300.
- SIGMA-ALDRICH 2016. Cytotoxicity Detection Kit<sup>PLUS</sup> (LDH).
- SMITH, P. F., GANDOLFI, A. J., KRUMDIECK, C. L., PUTNAM, C. W., ZUKOSKI, C. F., DAVIS, W. M. & BRENDEL, K. 1985. Dynamic organ culture of precision liver slices for in vitro toxicology. *Life sciences*, 36, 1367-1375.
- SOTO, A. M., CHUNG, K. L. & SONNENSCHNEIN, C. 1994. The pesticides endosulfan, toxaphene, and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells. *Environmental health perspectives*, 102, 380.
- ŠRÁM, R. J., BINKOVÁ, B., RÖSSNER, P., RUBEŠ, J., TOPINKA, J. & DEJMEK, J. 1999. Adverse reproductive outcomes from exposure to environmental mutagens. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 428, 203-215.
- STAR, B., NEDERBRAGT, A. J., JENTOFT, S., GRIMHOLT, U., MALMSTRØM, M., GREGERS, T. F., ROUNGE, T. B., PAULSEN, J., SOLBAKKEN, M. H. & SHARMA, A. 2011. The genome sequence of Atlantic cod reveals a unique immune system. *Nature*, 477, 207-210.
- SUMPTER, J. P. & JOBLING, S. 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental health perspectives*, 103, 173.
- SUZUKI, T., IDE, K. & ISHIDA, M. 2001. Response of MCF-7 human breast cancer cells to some binary mixtures of oestrogenic compounds in-vitro. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53, 1549-1554.
- TABB, M. M. & BLUMBERG, B. 2006. New modes of action for endocrine-disrupting chemicals. *Molecular Endocrinology*, 20, 475-482.
- THORPE, K. I., HUTCHINSON, T. H., HETHERIDGE, M. J., SUMPTER, J. P. & TYLER, C. R. 2000. Development of an in vivo screening assay for estrogenic chemicals using juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 2812-2820.
- TOHYAMA, S., MIYAGAWA, S., LANGE, A., OGINO, Y., MIZUTANI, T., TATARAZAKO, N., KATSU, Y., IHARA, M., TANAKA, H. & ISHIBASHI, H. 2015. Understanding the molecular basis for differences in responses of fish estrogen receptor subtypes to environmental estrogens. *Environmental science & technology*, 49, 7439-7447.
- UELAND, E. 2013. Karakterisering av vitamin D reseptor i atlantehavstorsk (*Gadus morhua*): kloning, ligandaktivering og vevsuttrykning *Universitetet i Bergen*.
- VAN MEERLOO, J., KASPERS, G. J. L. & CLOOS, J. 2011. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Cancer cell culture: methods and protocols*, 237-245.
- VERSONNEN, B. J., ROOSE, P., MONTEYNE, E. M. & JANSSEN, C. R. 2004. Estrogenic and toxic effects of methoxychlor on zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental toxicology and chemistry*, 23, 2194-2201.

- VORKAMP, K., RIGET, F., GLASIUS, M., PÉCSELI, M., LEBEUF, M. & MUIR, D. 2004. Chlorobenzenes, chlorinated pesticides, coplanar chlorobiphenyls and other organochlorine compounds in Greenland biota. *Science of the total environment*, 331, 157-175.
- WEBER, J., HALSALL, C. J., MUIR, D., TEIXEIRA, C., SMALL, J., SOLOMON, K., HERMANSON, M., HUNG, H. & BIDLEMAN, T. 2010. Endosulfan, a global pesticide: a review of its fate in the environment and occurrence in the Arctic. *Science of the Total Environment*, 408, 2966-2984.
- WEIGEL, N. L. 1996. Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochemical Journal*, 319, 657-667.
- WHITE, R., JOBLING, S., HOARE, S. A., SUMPTER, J. P. & PARKER, M. G. 1994. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology*, 135, 175-182.
- WHO 2012. World Health Day 2012: ageing and health: toolkit for event organizers [online]. Available: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/70840/1/WHO\\_DCO\\_WHD\\_2012.1\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/70840/1/WHO_DCO_WHD_2012.1_eng.pdf) [Accessed 06.07.2017].
- WILFINGER, W. W., MACKEY, K. & CHOMCZYNSKI, P. 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques*, 22, 474-6, 478-81.
- WONG, M. H., ARMOUR, M.-A., NAIDU, R. & MAN, M. 2012. Persistent toxic substances: sources, fates and effects [online]. Available: <https://www.deepdyve.com/lp/de-gruyter/persistent-toxic-substances-sources-fates-and-effects-An9dGjDDRA> [Accessed: 07.05.2017].
- WU, F., KHAN, S., WU, Q., BARHOUMI, R., BURGHARDT, R. & SAFE, S. 2008. Ligand structure-dependent activation of estrogen receptor  $\alpha$ /Sp by estrogens and xenoestrogens. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 110, 104-115.
- XU, C., LI, C. Y.-T. & KONG, A.-N. T. 2005. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Archives of Pharmacal Research*, 28, 249.
- YADETIE, F., KARLSEN, O. A., LANZÉN, A., BERG, K., OLSVIK, P., HOGSTRAND, C. & GOKSØYR, A. 2013. Global transcriptome analysis of Atlantic cod (*Gadus morhua*) liver after in vivo methylmercury exposure suggests effects on energy metabolism pathways. *Aquatic toxicology*, 126, 314-325.
- YANG, H. & WANG, H. 2014. Signaling control of the constitutive androstane receptor (CAR). *Protein & cell*, 5, 113-123.
- YING, G.-G., WILLIAMS, B. & KOOKANA, R. 2002. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates—a review. *Environment International*, 28, 215-226.
- ZIMMERMANN, M., LAMPE, J., LANGE, S., SMIRNOW, I., KÖNIGSRÄINER, A., HANN-VON-WEYHERN, C., FEND, F., GREGOR, M., BITZER, M. & LAUER, U. M. 2009. Improved reproducibility in preparing precision-cut liver tissue slices. *Cytotechnology*, 61, 145-152.

## Vedlegg A

**Tabell 43:** oversikt over  $A_{260/230}$ - og  $A_{260/280}$ -verdier fra RNA-ekstraksjoner

Individ	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$	Individ	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$	Individ	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$	Individ	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
0	2,01	1,57	1	2,11	1,78	2	2,06	1,65	3	2,09	1,02
0	2,08	2,06	1	2,01	0,55	2	2,09	1,87	3	2,06	0,95
0	2,06	1,51	1	1,80	0,60	2	2,06	1,76	3	2,02	1,20
0	2,07	1,23	1	1,71	0,74	2	2,07	1,51	3	2,01	1,26
0	2,05	1,61	1	1,73	0,47	2	2,00	1,31	3	2,04	1,22
0	2,13	1,62	1	1,86	0,58	2	1,93	1,17	3	2,06	1,15
0	2,16	1,67	1	1,83	0,17	2	2,01	1,32	3	2,00	1,30
0	2,19	1,75	1	2,07	1,09	2	2,02	0,79	3	2,09	1,49
0	2,25	1,75	1	1,95	0,26	2	2,01	0,99	3	2,09	1,52
			1	1,82	0,42	2	2,02	1,06	3	1,99	1,47
			1	1,73	0,52	2	2,06	1,20	3	2,02	1,64
			1	1,79	0,63	2	2,05	1,24	3	2,01	1,57
			1	1,94	0,96	2	2,03	1,48	3	2,01	1,10
			1	1,99	0,95	2	2,02	1,47	3	2,07	0,87
			1	2,06	1,30	2	2,03	1,34	3	2,07	1,03
			1	2,06	1,28	2	2,07	1,54	3	2,05	1,03
			1	2,05	1,26	2	2,08	1,45	3	2,04	1,27
			1	2,07	1,19	2	2,08	1,61	3	2,00	1,41
			1	2,05	0,66	2	2,04	1,04	3	1,97	1,37
			1	2,06	1,17	2	2,07	0,93	3	1,98	1,13
			1	2,02	0,84	2	2,03	0,83	3	2,01	0,88
			1	2,03	1,01	2	1,97	1,99	3	2,00	0,97
			1	1,97	0,94	2	2,00	1,01	3	1,99	0,90
			1	2,05	1,09	2	2,00	1,11	3	2,00	0,84
			1	1,99	1,23	2	2,04	1,37	3	1,96	1,00
			1	2,03	1,01	2	2,02	1,37	3	2,07	2,01
			1	1,97	0,94	2	2,04	1,14	3	2,12	2,01
			1	1,67	0,47	2	2,01	1,28	3	2,13	2,03

1	1,99	1,23	2	2,08	1,46	3	2,13	1,93
1	2,03	1,39	2	2,07	1,43	3	2,06	1,84
1	2,04	0,83	2	2,08	1,48	3	2,12	2,07
1	2,04	0,96	2	2,05	1,60	3	2,13	2,08
1	2,03	1,15	2	2,08	1,54	3	2,14	2,00
1	2,04	1,27	2	2,04	1,50	3	2,07	1,72
1	2,04	0,95	2	2,04	1,59	3	2,13	1,99
1	2,04	0,95	2	2,04	1,26	3	2,13	1,72

## Vedlegg B

Nukleotidsekvens for *gm-esrI* (ID: JX178935 + avdekket 3'-ende)

TGCAGTCCCTGGGCAGTGGGTCCACCAGCCCCCTGGTGTTTGTGCCAGCAGCCC  
CCAGCTCAGCCCCTACCTGCACCCACCGGGCAGCCCTACTACCTGGAGGCCCCC  
GCCACACCTGGGTACAGCATGGGGTCCGGCCCGCAGCACTCTCTGTCCAGGGAGG  
ACCTCTGCGACACCATCGAGGGTCTGGAGACCTACGGGGTTCATGGGCTCCCTGGC  
CGCCTCCGTGTCCGGGTCTGCTCGGCTGGTGCCGGGCCAGGGGTTCAGGGGTCTGCG  
GTGGGCACGGTGTTCGAGCTGGCCAAGGAGACGCGGTACTGCGCGGTGTGCAGC  
GACTACGCCTCGGGCTACCACTACGGCGTGTGGTCCCTGTGAAGGCTGCAAGGCCT  
TCTTCAAGAGGAGCATCCAAGGCCACAACAACACTACATGTGCCCGGCCACCAACC  
AGTGCACCATCGACCGCAACCGCAGGAAGAGCTGTCAGGCCTGTGCGCTTCGGA  
AGTGTATGAAGTGGGCATGATGAAAGGAGGTATGCGCAAGGACCGTGGGAGCC  
GGGTATTGAGGCGCGACAAGCGGCGTGGCGTGGCCGGCGACCGGGACAAGGGTC  
CCAGGCAGCTGGAGAACAGGACGTCGCCCCCGCAGGACGGGAGGAGGAACTGCG  
GCGGCGGCGGCTCCAGAGCGGGCGAGAGAACGGGGGCGGACGTTCGGAGGAGCG  
GCGAGGGGTTCTCGGATCGGGATCCCCCGGACCAGGTGCTCCTGGTCCCTCCAGG  
GGGCGGAGCCTCCCATCCTGTCTCCTCCCGGCAGAAGATGAACCGGCCGTACACCGA  
GGTCAGCATGATGACGCTGCTCACCAGCATGGCCGACAAGGAGCTTGTCCACATG  
ATCGCATGGGCCAAGAAGGTCCCAGGCTTCCTTGAGCTGTCCCTTCATGACCAGG  
TGCAGCTCCTGGAGAGTTCCTGGCTGGAAGTCCTGATGATCGGCCTCATCTGGAG  
GTCCATCCACTACCCTGGGAAACTCATCTTCGCACAAGACCTCATCCTGGACAGG  
ACTGAGGGGGACTGCGTAGAGGGCATGGCGGAGATCTTCGACATGCTGCTGGCC  
ACCGTCTCACGCTTTCGGATGCTCCAGCTGAACCCTGAGGAGTTTGTCTGTCTCAA  
GGCCATCATCCTGCTCAACTCTGGGGCCTTCTCGTTCTGCACCAGCACCATGGAG  
GCCCTTCACGACAGCCTGGCCGTTACGGGCATGCTCGACACCATCACGGACGCCC  
TCATACACCACACCAGCCAATCAGGATGCTCCATCCAGCAGCAGTCCCGGCGGCA  
GGCGCAGCTGCTGCTTCTGCTGTCCCACATCAGACACATGAGTAACAAAGGCATG  
GAGCACCTGTACAGCATGAAGTGCAAGAACAAGTGCCACTGTACGACCTGCTG  
CTGGAGATGCTGGACGCC **ACCGTCTCCAGCGGCCCGTCAAGGCGGCCTCCCACC**  
**CCCGGGGCGGGGGTCCGGGCGACCGCGAGACAGCCTGCACCAGCGGAAGCTCCA**  
**GCTGCTCCAAGTTAGGTACCGGGCACCGCGGGGCCGGCGGGCTAGAGGGCCACG**  
**GTCGGGCCCGGTCCCGGGGTGCTCATCAGCGGGGGGCCCTCCACGAGTGTGC**  
**GTCCGTCTGAG**