

Effekter av bisfenol A (BPA) og BPA analoger på
østrogenreseptorsignalveien i atlanterhavstorsk
(*Gadus morhua*)

Masteroppgave i biologi,
studieretning for miljøtoksikologi

Christine Tveiten Johansen



Institutt for biovitenskap

UNIVERSITETET I BERGEN

November 2019

Forord

Arbeidet med denne masteroppgaven ble utført i forskningsgruppen for miljøtoksikologi ved institutt for biovitenskap, UiB. Oppgaven er en del av forskningsprosjektet iCod 2.0 (prosjekt nr. 244564) som er finansiert av Norges forskningsråd og Universitetet i Bergen.

Jeg vil gjerne takke mine veiledere, Odd André Karlsen og Anders Goksøyr. Spesielt takk til Odd André for god oppfølging og stor hjelp under skriveprosessen. Takk for at jeg fikk muligheten til å dra på inspirerende konferanser (Vedlegg C og D).

Takk til Siri Goksøyr for god opplæring på luciferasebaserte reporter gensystem, og Fekadu Yadetie for opplæring av leverskivekutting, qPCR og ELISA. Jeg vil også takke Roger Lille-Langøy for gode råd både under arbeidet på laboratoriet og under skriveprosessen. Til alle dere andre i forskningsgruppen, takk for at dere alltid var behjelpelig når jeg hadde spørsmål.

Til slutt vil jeg takke June og familien min som har vært en stor støtte det siste året.

Bergen, november 2019

Christine Tveiten Johansen

Innholdsfortegnelse

Forkortelsesliste	III
Sammendrag	V
1 Introduksjon	1
1.1 Bakgrunn	1
1.2 Hormonforstyrrende stoffer	2
1.3 Østrogenreseptor	3
1.3.1 Østrogenreseptorens funksjonelle domener	6
1.3.2 Ligandbinding og aktivering av østrogenreseptoren	7
1.4 Bisfenol A og bisfenol A analoger	8
1.4.1 BPA i miljøet	9
1.4.2 Hormonforstyrrende egenskaper	9
1.4.3 Regulering av industriell anvendelse av BPA og bisfenol A analoger	10
1.5 Torsk som modellorganisme	11
1.5.1 Østrogenreseptor i torsk	13
1.6 Reportersystem for å studere aktivering av transkripsjonsfaktorer	14
1.7 Presisjonskuttete leverskiver (PKLS) som et <i>ex vivo</i> modellsystem	15
1.9 Mål for oppgaven	16
2 Materialer	17
2.1 Kjemikalieliste	17
2.2 Kommersielle Kit	20
2.3 Cellelinjer	21
2.4 Plasmider	21
2.5 Primere	21
2.6 Dyrkningsmedium	22
2.7 Løsninger	23
2.8 SDS-PAGE	26
2.9 Protein immunoblotting	27
2.10 Liste over Instrumenter	28
2.11 Programvare	29
3 Metoder	30
3.1 Oversikt over eksperimentell del	30
3.2 Luciferase reportersystem	30
3.2.1 Prinsipp	30
3.2.2 Opparbeidelse av reporter- og kontrollplasmid til bruk i reportersystemet	32
3.2.3 Transformasjon av <i>E. coli</i>	32
3.2.4 Kontroll av plasmider med agarose gelelektroforese (AGE)	33

3.2.5 Kultivering av COS-7- celler	34
3.2.6 Utsåing av COS-7 celler i 96-brønnsplate for reportergensystemet	34
3.2.7 Transfeksjon av COS-7 celler	34
3.2.8 Eksponering av COS-7 celler for løsemiddelkontroll og testforbindelser	35
3.2.9 Lysering av celler og måling av luciferase- og β -galaktosidase aktivitet	37
3.2.10 Celleviabilitet	38
3.2.11 Påvisning av fusjonsproteinet Gal4-gmER α i COS-7 celler med protein immunoblotting	38
3.3 Presisjonskuttete leverskiver (PKLS)	42
3.3.1 Preparering av PKLS	42
3.3.2 Eksperimentelt design for eksponering av leverskiver	43
3.3.3 Isolering av total RNA	44
3.3.4 RNA-elektroforese	44
3.3.5 Syntese av komplementær DNA (cDNA)	45
3.3.6 Kvantitativ sanntids polymerase kjedereaksjon (qPCR)	45
3.3.7 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	48
3.3.8 Viabilitetsanalyse av PKLS	49
4. Resultater	51
4.1 In vitro aktivering av gmERα	51
4.1.1 Kontroll av kvalitet og integritet til plasmider brukt i reportergensystemet	51
4.1.2 Ekspresjon av Gal4-gmER α fusjonsproteinet i COS-7 celler	52
4.1.3 Etynyløstradiol (EE2) aktiverte gmER α <i>in vitro</i>	53
4.1.5 Aktivering av gmER α av bisfenolforbindelser	54
4.1.6 Cytotoksiske effekter i COS-7 cellene etter ligandeksponering	58
4.2 Aktivering av østrogenreseptorsignalveien <i>ex vivo</i> etter eksponering for bisfenolforbindelser	62
4.2.1 Induksjon av <i>vtg1</i> i PKLS eksponert for bisfenoler	62
4.2.2 Økt proteinnivå av VTG i mediet fra PKLS eksponert for bisfenoler	65
4.2.3 Viabilitetsanalyse av PKLS etter 48 og 96 timers eksponering	68
5. Diskusjon	69
5.1 Strukturelle egenskaper til østrogenreseptorligander	78
5.2 Manglende regulering og restriksjoner for bruk av bisfenolforbindelser som erstatning for BPA	81
5.3 Kommentarer til modellsystemene benyttet i oppgaven	82
5.4 Konklusjon	84
5.5 Forslag til fremtidig arbeid	84
7 Litteraturliste	86
VEDLEGG A	95
VEDLEGG B	96
VEDLEGG C	97
VEDLEGG D	98

Forkortelseliste

Forkortelse	Fullt navn
A230/260/280	Absorbans ved 230/260/280 nm
AGE	Agarosegelelektroforese
cDNA	Komplimentert DNA
Coomassie Brilliant Blue	CBB
Ct	Terskelverdi
BPA	Bisfenol A
BPB	Bisfenol B
BPC	Bisfenol C
BPE	Bisfenol E
BPF	Bisfenol F
BPG	Bisfenol G
BPS	Bisfenol S
BPZ	Bisfenol Z
BPAF	Bisfenol AF
BPFL	Bisfenol FL
BPTMC	Bisfenol TMC
BADGE	Bisphenol A diglycidyl ether
DBD	DNA-bindende domene
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetyl sulfoksid
dNTP	Deoksynukleotider
DTT	Ditiotreitol
EDC	Hormonforstyrrende stoffer
E2	17 β - estradiol
EC50	Halv maksimal effektiv konsentrasjon
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
EE2	17 α -etynyl estradiol
EGTA	Etylene glykol-bis(2-aminoetyleter)-N,N,N',N'-tetraeddiksyre
E _{max}	Maksimal aktivering
ER	Østrogenreseptor
ER α	$\text{Østrogenreseptor } \alpha$
ER β	$\text{Østrogenreseptor } \beta$

ER β -I	Østrogenreseptor β 1
ER β -II	Østrogenreseptor β 2
ERE	Østrogenresponselement
<i>esr</i>	Østrogenreseptor
<i>esr</i> α	Østrogenreseptor α
<i>esr</i> β	Østrogenreseptor β
<i>esr</i> β -I	Østrogenreseptor β 1
<i>esr</i> β -II	Østrogenreseptor β 2
FBS	Fetal Bovin Serum
HSP	Varmesjokk-protein
HPG	Hypotalamus-hypofyse-gonade
HPGL	Hypotalamus-hypofyse-gonade-lever
kb	Kilobase
LBD	Ligand-bindende domene
LDH	Laktatdehydrogenase
LOEC	Lavest observerte effektkonsentrasjon
NR	Kjernereseptor
ONPG	2-Ntrofenyl β -D-galaktopyranosid
PBS	Fosfatbufret løsning
PCR	Polymerasekjedereaksjon
RPM	Rotasjoner per minutt
RT	Romtemperatur
SDS-PAGE	Natriumlaurylsulfat polyakrylamid gelelektroforese
SEM	standardfeilen til gjennomsnittet
SD	Standardavvik
TBE	Tris Borate EDTA
UAS	Oppstrøms aktiveringssekvens
VTG	Vitellogenin
Vtg1	Vitellogenin
x g	x gravitasjonskraften
actb	β -aktin
β -Gal	β -galaktosidase

I denne oppgaven er proteiner angitt med STORE bokstaver. Gener er angitt i små bokstaver i *kursiv*.

Sammendrag

Det har i de siste årene blitt innført et strengere regelverk og skjerpede restriksjoner for anvendelsen av bisfenol A (BPA) i produksjonen av termisk papir og plastprodukter. Bakgrunnen for dette er at det har blitt vist at BPA kan ha hormonforstyrrende egenskaper og forårsake uheldige effekter på organismer i miljøet, inkludert menneske. Den økte oppmerksomheten omkring BPA har ført til at industrien bruker andre bisfenolforbindelser som innehar mange av de samme fysikalsk-kjemiske egenskapene, og som i dag ikke er regulert for industrielt bruk. Det finnes imidlertid begrenset informasjon om disse BPA analogene også kan virke hormonforstyrrende. Østrogenreseptoren (ER) er en ligandaktivert transkripsjonsfaktor som regulerer gener som er essensielle for normal kjønnsutvikling og reproduksjon hos teleoster. Det er tidligere vist at BPA kan aktivere ER i en rekke organismer, blant annet atlantehavstorsk. Aktivering av ER i torsk av ligander som BPA kan potensielt forstyrre torskens normale kjønnsutvikling og reproduksjonsevne. I denne oppgaven har hovedmålet vært å få kunnskap om et sett av tolv ulike bisfenoler kan virke hormonforstyrrende gjennom å opptre som agonister eller antagonister for ER i atlantehavstorsk (gmER α). Det ble benyttet et luciferase reporter gensystem for å undersøke ligandaktivering/inhibering av gmER α etter eksponering for bisfenolene *in vitro*. For å undersøke aktivering av østrogenreseptorsignalveien *ex vivo*, ble presisjonskuttete leverskiver fra torsk eksponert for de samme forbindelsene. Induksjonen av gmER α -målgenet vitellogenin (*vtg*) i PKLS ble undersøkt, både på transkriptnivå ved hjelp av kvantitativ PCR, og på proteinnivå med bruk av enzyme-linked immunosorbent analyse (ELISA). *In vitro*-forsøkene viste at ni av bisfenolene (BPA, BPB, BPC, BPF, BPE, BPS, BPZ, BPTMC, BPAF) opptre som agonister for gmER α . Dette ble også bekreftet *ex vivo* i leverskiver der de samme bisfenolene resulterte i induksjon av *vtg*-transkripter, eller økte mengden VTG sekretert i vekstmediumet. BPG skilte seg fra de andre bisfenolene ved at den opptrådte som en antagonist for gmER α i *in vitro* studiene, men aktiverte østrogenreseptorsignalveien *ex vivo*. Dette kan indikere at metabolsk aktivering av bisfenoler i lever kan ha betydning for bisfenolenes østrogene egenskaper. Resultatene fra denne oppgaven viser at flere av bisfenolene foreslått som erstatning for BPA har tilsvarende eller lik virkeevne på gmER α , og noen av forbindelsene fremsto som mer potente agonister. Disse bisfenolene kan derfor potensielt virke hormonforstyrrende i atlantehavstorsk ved å forstyrre hypothalamus-hypofyse-gonade-leveraksen i hormonsystemet, som gmER α er en essensiell del av. Dette er i samsvar med tilsvarende studier utført på andre arter, inkludert sebrafisk, mus, og menneske, som konkluderer med at en rekke BPA analoger kan virke hormonforstyrrende gjennom å aktivere/inhibere østrogenreseptorsignalveien. Ettersom pågående forskning indikerer at bisfenoler som stoffgruppe har hormonforstyrrende egenskaper i en rekke organismer, samt at flere og flere av BPA analogene detekteres i biota, bør det etableres et nytt internasjonalt regelverk for både produksjon og anvendelse av bisfenolforbindelser som allerede benyttes og vurderes som erstatning for bruk av BPA.

1 Introduksjon

1.1 Bakgrunn

Menneskeskapt kjemiske stoffer finnes som tilsetninger i nær sagt alle forbrukerprodukter og bidrar til den levestandarden vi nyter godt av i dag. Samtidig medfører det at både mennesker og miljøet kan eksponeres for farlige stoffer der vi ikke kjenner skadevirkningene godt nok. Miljøgifter er forbindelser som innehar fysikalske og kjemiske egenskaper som potensielt gjør dem skadelig for miljøet, selv ved lave konsentrasjoner. Persistente organiske forbindelser (POPer) er en undergruppe av miljøgifter som er motstandsdyktige mot biologisk, kjemisk og fotolytisk nedbrytning. Disse forbindelsene har derfor lang oppholdstid i miljøet, kan transporteres over lange avstander, og kan tas opp av dyr og planter. Da mange av disse stoffene i tillegg er lipofile kan de avsettes og lagres i fettholdig vev i organismer, og er dermed spesielt utsatt for bioakkumulering og biomagnifisering. Andre miljøgifter er mindre persistente, men grunnet kontinuerlig utslipp til omgivelsene, fra for eksempel industrielle prosesser, kan de allikevel ha en negativ innvirkning på miljøet og biota.

Økt oppmerksomhet og kunnskap om de negative effektene av mange kjemikalier har ført til et større fokus på regulering og forbud mot bruk av enkelte forbindelser. Stockholm-konvensjonen ble i 2001 signert av en rekke land for å begrense produksjon og utslipp av en gruppe POP-er (deriblant PCB, DDT og dioxin) kjent som «the dirty dozen» (UNEP, 2001). I dag er Stockholm-konvensjonen utvidet til å gjelde flere andre forbindelser, som blant annet per- og polyfluorerte alkylstoffer (PFAS) og enkelte polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH-er). Et annet eksempel er EU-forordningen REACH (EF nr. 1907/2006) som skal sikre at produksjon, omsetning og bruk av kjemikalier ikke utgjør en fare for mennesker eller miljøet (EU, 2019). I Norge er REACH implementert i REACH-forskriften som omhandler registrering, vurdering, autorisasjon og begrensning av kjemikalier. Stoffe av stor bekymring er oppført på REACH kandidatlisten (SVHC-listen) med mål om å stanse eller redusere utslipp av disse stoffene innen 2020 (ECHA, 2016). Strengere regulering og forbud mot bruk av enkelte forbindelser har imidlertid ført til at nye kjemikalier regelmessig utvikles og produseres for å erstatte kjente giftige stoffer. De nye kjemikaliene settes i produksjon før deres toksiske

profiler er kartlagt, og det detekteres stadig «nye» miljøgifter («emerging contaminants») i miljøet, som blant annet PFASer og bisfenolforbindelser.

1.2 Hormonforstyrrende stoffer

Hormonsystemet kontrollerer mange av kroppens fysiologiske prosesser gjennom hormonmedierte signalveier (Khetan, 2014, Hiller-Sturmhofel og Bartke, 1998). Hormoner er signalmolekyler som produseres av endokrine kjertler, og lave konsentrasjoner av hormoner transporteres via blodbanen til målceller som uttrykker spesifikke reseptorer. Interaksjonen mellom hormonet og reseptoren igangsetter en rekke biokjemiske reaksjoner som modifierer målcellens funksjon eller aktivitet, som igjen modulerer fysiologiske endringer i organismen. Både persistente og ikke-persistente miljøgifter kan virke hormonforstyrrende (Flint et al., 2012). Endring i hormonproduksjon eller hormonsignal som følge av hormonforstyrrelser kan påvirke levende organismer negativt i form av blant annet redusert vekst, utvikling og nedsatt reproduksjonsevne (Khetan, 2014, Hiller-Sturmhofel og Bartke, 1998).

Hormonforstyrrende stoffer (EDC'er) kan defineres som eksogene forbindelser som potensielt kan forstyrre den normale funksjonen til hormonsystemet og forårsake uønskete helseeffekter i en organisme, dens avkom, eller (sub)populasjoner (International Programme on Chemical Safety, (WHO, u.å). EDC'er kan virke gjennom ulike mekanismer. Blant annet kan EDC'er aktivere eller deaktivere hormonreseptorer ved å virke som agonister eller antagonister, mens andre kan ha direkte innvirkning på produksjon, metabolisme eller transport av naturlige hormoner og hormonreseptorer (Giulivo et al., 2016). Flere miljøgifter er blitt identifisert som hormonforstyrrende stoffer, deriblant organoklorerte pesticider som DDT (Fry og Toone, 1981), industrielle kjemikalier som polyklorerte bifenyler (som blant annet PCB'er) (Brouwer et al., 1999), og forbindelser brukt i ulike plastmaterialer som ftalater (Kim et al., 2010) og bisfenol A (BPA) (Flint et al., 2012).

Et velfungerende hormonsystem er essensielt for vekst, utvikling, metabolisme og reproduksjon, og er nøye regulert gjennom hele livsløpet i høyerestående dyr via spesifikke signalveier og kommandolinjer (akser) (Hiller-Sturmhofel and Bartke, 1998). En av aksene er

hypotalamus-hypofyse-gonade-aksen (HPG aksen), som regulerer utvikling og reproduksjon hos vertebrater. HPG aksen er kompleks og kontrolleres av mange forskjellige hormoner, og er dermed spesielt utsatt for påvirkning av hormonforstyrrende stoffer (Hachfi et al., 2012). Hos eggleggende organismer er leveren nært knyttet HPG aksen da flere eggeplomme proteiner og eggeskallproteiner syntetiseres i leveren (Arukwe og Goksøyr, 2003). HPG aksen i disse dyrene refereres derfor ofte til som hypotalamus-hypofyse-gonade-lever-aksen (HPGL aksen). Syntesen av disse proteinene i lever er hormonregulert, deriblant transkripsjonen av eggeplomme proteinet vitellogenin (VTG) medieres av interaksjonen mellom hormonet østradiol (E2) og østrogenreseptoren (ER) (Hachfi et al., 2012).

1.3 Østrogenreseptor

Østrogenreseptoren (ER/NR3A1) er en ligandaktivert transkripsjonsfaktor som er medlem av kjernereseptor (NR) superfamilien (subfamilie 3A). Østrogenreseptoren er en del av HPG aksen og regulerer gener som er essensielle for normal kjønnsutvikling og reproduksjon hos vertebrater. Hypotalamus kontrollerer syntesen og utskillelsen av en rekke hormoner, blant annet gonadotropinfrigjørende hormon (GnRH) som stimulerer hypofysen til å skille ut gonadotropiner (GTH). Gonadotropiner virker på gonadene og stimulerer produksjon av kjønns hormoner, blant annet østrogenet 17β -østradiol (E2). HPG aksen reguleres av en negativ tilbakekobling (feed-back) der kjønns hormoner regulerer produksjonen av GnRH i hypotalamus (Arcand-Hoy og Benson, 1998, Hiller-Sturmhofel og Bartke, 1998). E2 er østrogenreseptorens mest potente endogene hormon og har en viktig rolle i utvikling av blant annet livmor hos pattedyr (Ascenzi et al., 2006, Hiller-Sturmhofel og Bartke, 1998).

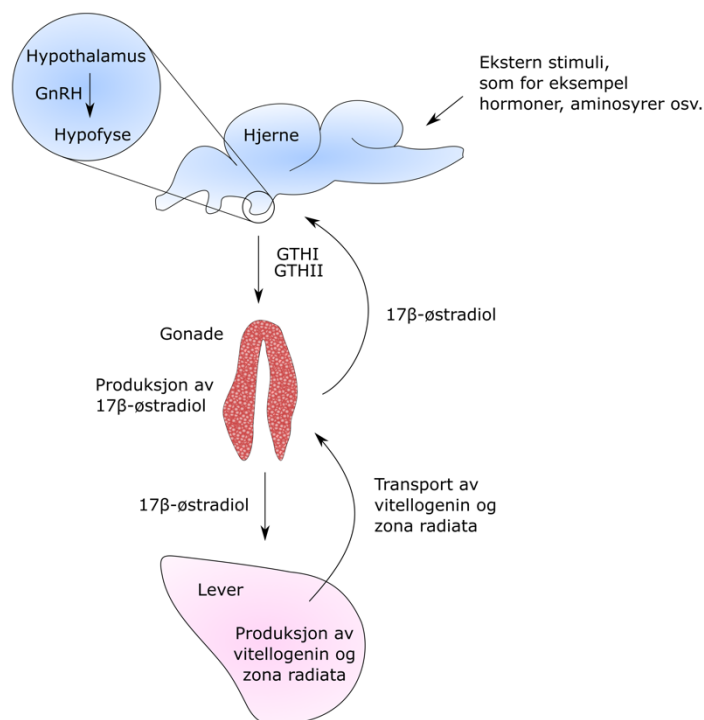
I pattedyr finnes det to varianter av ER (ER α og ER β) som er kodet fra to forskjellige gener. Aminosyresekvensene til ER α og ER β er svært like, hvor blant annet det DNA-bindende domenet (beskrevet i mer detalj nedenfor) i de to variantene viser en aminosyreidentitet på 95 % (Enmark og Gustafsson, 1999). Reseptorene skiller seg allikevel fra hverandre ved at ER β har forskjellig affinitet mot noen syntetiske ligander sammenlignet med ER α (Kuiper et al., 1997), noe som gjenspeiler at det ligandbindende domenet i de to subtypene kun har 55% aminosyreidentitet (Enmark og Gustafsson, 1999). Derimot har det endogene hormonet E2 tilnærmet lik affinitet mot begge subtypene. Vevsfordelingen av ER α og ER β viser seg også

å være noe forskjellig. I pattedyr er ER α uttrykt i nært sagt alle vev, men spesielt høyt genuttrykk finnes i testis og livmor. ER β uttrykkes fortrinnsvis i eggstokker, prostata og lunger (Couse et al., 1997). Forsøk med knockout-mus (KO-mus) har vist at østrogenreseptoren spiller en viktig rolle i utviklingen av gonader, der både hunnlige og hannlige ER α -KO-mus er fullstendig infertile (Lubahn et al., 1993). Hos ER β -KO-mus utvikler både hunnlige og hannlige individer seg normalt, men noe nedsatt fruktbarhet er observert i hunnlige individer (Krege et al., 1998).

I motsetning til pattedyr finnes det tre subtyper av østrogenreseptoren i strålefinnefisk (*Actinopterygii*); ER α , ER β -I og ER β -II (Hawkins et al., 2000, Nagler et al., 2007). ER α deler et felles opphav i alle vertebrater, og ER α fra fisk er dermed ortolog til ER α i pattedyr. ER β -II har størst sekvensidentitet med ER β i pattedyr, mens ER β -I har ingen homologe varianter blant mammalia, og har trolig oppstått som følge av en genduplisering under evolusjonen av teleoster (Hawkins et al., 2000). Hos teleoster har uttrykning av østrogenreseptor-genene (*esr*-paralogene) blitt detektert ved embryonalt stadium (Lassiter et al., 2002) og uttrykning av de ulike *esr*-paralogene har blitt vist å variere under gonadeutviklingen hos juvenil hunnfisk, men i hovedsak er *esr* α uttrykt i større grad enn *esr* β -I og *esr* β -II i ferdig utviklete gonader (Chen et al., 2011, Nagler et al., 2012). Den vevsspesifikke uttrykkingen av de ulike ER subtypene varierer mellom hunnfisk og hannfisk, og også mellom arter av teleoster. Det er forøvrig kun ER α som har blitt koblet til en eksakt biologisk funksjon i fisk i form av å regulere produksjonen av VTG og eggskallproteiner i lever (Nelson og Habibi, 2010).

Som tidligere nevnt er leveren knyttet til HPG aksene hos fisk og andre eggleggende organismer, og blir omtalt HPGL aksene. I leveren hos disse organismene vil interaksjon mellom østrogenreseptoren og E2 indusere transkripsjon av vitellogenin (VTG) og eggskallproteinet Zona radiata (ZRP) (Hachfi et al., 2012, Arcand-Hoy og Benson, 1998) (Figur 1.1). Det er blitt vist at østrogen også oppregulerer hepatisk ER α , og at oppregulering korrelerer med induksjon av VTG syntese (MacKay et al., 1996, Nelson et al., 2007). Siden vitellogenin er et av de primære målgenene til østrogenreseptoren hos fisk, brukes VTG som en biomarkør for å påvise aktivering av østrogenreseptoren (Sumpter og Jobling, 1995, Arukwe og Goksøyr, 2003). En biomarkør er en målbar indikator for en biologisk tilstand og kan brukes for å studere en eventuell respons i eksponeringsstudier (Strimbu og Tavel, 2010).

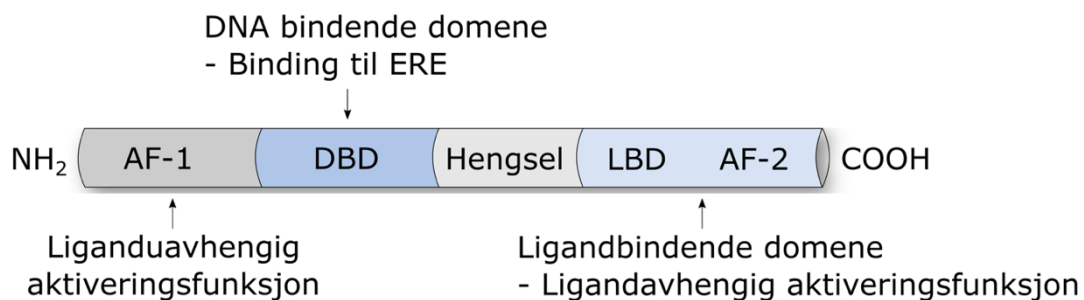
Hannfisk eksponert for forbindelser med østrogene egenskaper kan begynne å produsere VTG og egg i testikkelvevet, noe som er blitt vist i en rekke fiskearter som blant annet mort (*Rutilus rutilus*), ørret (*Salmo trutta*), medaka (*Oryzias latipes*), karpe (*Cyprinus carpio*), storhodet ørekyte (*Pimephales promelas*) og gullfisk (*Carassius auratus*) (Jobling et al., 1998, Harries et al., 1996, Harries et al., 1997). Feminisering av hannfisk kan føre til nedsatt reproduttiv suksess og infertilitet. Blant de mest kjente eksemplene på nettopp dette er et forsøk utført i ”experimental lakes” i Canada der Storhodet ørekyte over en tre års periode ble kronisk eksponert for 17-ethynylestradiol (EE2) (5-6 ng/L), et syntetisk østrogen brukt i p-piller (Kidd et al., 2007). VTG nivå hos eksponerte hannfisk var over 1000 ganger høyere enn i ueksponerte hannfisk, og 10 ganger høyere enn ueksponerte hunnfisk. Gonadeutviklingen hos både eksponerte hunnfisk og hannfisk ble også påvirket, der hunnfisk viste endret oogenese, og hannfisk viste produksjon av egg i testikkelvevet. Dette førte til nedsatt reproduttiv suksess hos arten og en dramatisk reduksjon av populasjonen som ble nær utryddet fra innsjøen (Kidd et al., 2007).



Figur 1.1 Hypotalamus-hypofyse-gonade-lever (HPGL) aksen. HPGL aksen er regulert gjennom negativ tilbakekobling av 17β-østradiol og er et potensielt mål for hormonforstyrrende stoffer. GTH= gonadotropin. GnRH= gonadotropinfrigjørende hormon. Figuren er basert på (Arukwe og Goksøyr, 2003)

1.3.1 Østrogenreseptorens funksjonelle domener

Østrogenreseptoren har fire distinkte domener som deles av nært sagt alle kjernereseptorer (Moras og Gronemeyer, 1998, Bain et al., 2007, Ng et al., 2014) (Figur 1.2). N-terminalt er det lokalisert et ligand-uavhengig domene (AF1) som er viktig for protein-protein interaksjoner og ligand-uavhengig aktivering av reseptoren. Den neste regionen inneholder det DNA-bindende domenet (DBD), som er høyt konservert hos alle medlemmene av kjernereseptorfamilien. DBD har en α -heliks struktur og består av to cysteinrike «sinkfingre» som bidrar til korrekt folding av domenet og fasiliterer bindingen til spesifikke DNA-sekvenser kalt østrogen responselementer (ERE). Det første av de to sinkfinger-modulene inneholder en serie av aminosyrer kalt P-boksen, som er essensiell for gjenkjenning av ERE. D-boksen er en serie av aminosyrer assosiert med den andre sinkfinger-modulen og er involvert i homodimerisering av reseptoren. Den neste regionen i proteinet er hengseldomenet som bidrar til strukturell fleksibilitet og binder sammen DBD med det ligandbindende domenet (LBD). Hengseldomene innehar også et kjernelokaliseringssignal for transport gjennom kjernemembranen. Det ligandbindende domenet er ansvarlig for å gjenkjenne og binde spesifikke ER ligander og er lokalisert C-terminalt sammen med en ligand-avhengig aktiveringsfunksjon (AF2) (Moras og Gronemeyer, 1998, Bain et al., 2007, Ng et al., 2014)

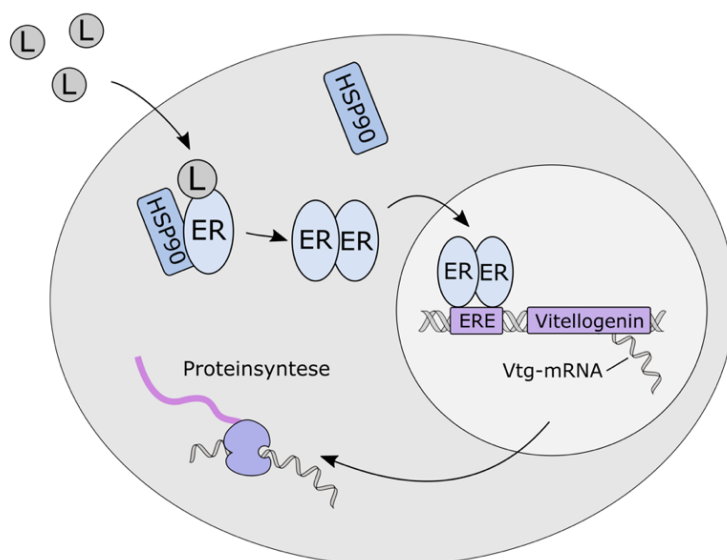


Figur 1.2 Østrogenreseptorens funksjonelle domener. De forskjellige domenenene i østrogenreseptoren er indikert på figuren. Illustrasjon: Christine Tveiten Johansen.

1.3.2 Ligandbinding og aktivering av østrogenreseptoren

Når østrogenreseptoren ikke er bundet til en ligand er reseptoren hovedsakelig lokalisert i cytoplasma i et proteinkompleks med chaperoner (HSP90). Bindingen til chaperonene fremmer riktig folding og stabiliserer reseptoren, men komplekset er ikke i stand til å binde til ERE i DNA. Når en ligand gjenkjennes og binder til LBD i østrogenreseptoren vil en konformasjonsendring gjøre at chaperonene dissosierer fra reseptoren. Reseptoren danner så enten en homodimer eller en heterodimer med andre ER-subtyper og transporteres til kjernen der den binder til ERE lokalisert i promotersekvensen til reseptorens målgener, og initierer dermed transkripsjonen av disse (Nelson og Habibi, 2013, O'Malley og Tsai, 1992) (Figur 1.3).

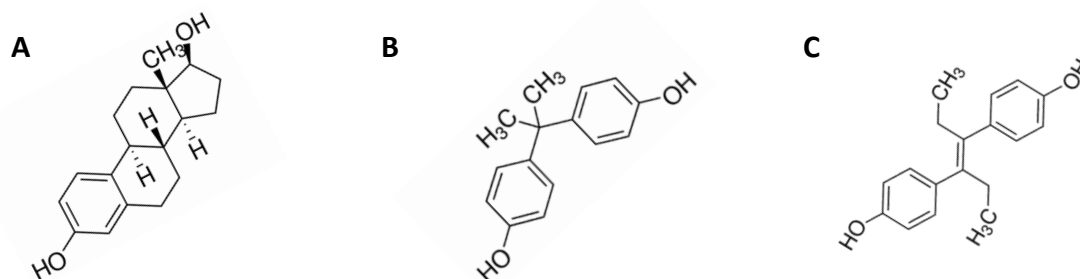
Østrogenreseptoren kan binde en rekke eksogene ligander som enten kan aktivere reseptoren eller hemme reseptorens aktivitet. Forbindelser med østrogene effekter finnes både blant persistente organiske forbindelser, deriblant pesticidene DDT, dieldrin, toksafen, og metoksyklor (Soto et al., 1994, Lemaire et al., 2006), og mindre persistente forbindelser, som BPA (Krishnan et al., 1993), og EE2 (Kidd et al., 2007).



Figur 1.3 Skjematisk oversikt over ligandaktivering av østrogenreseptoren. Uten bundet ligand finnes ER i cytoplasma i kompleks med HSP90. Når en ligand binder til reseptoren vil HSP90 dissosiere fra reseptoren. ER danner så en homodimer eller heterodimer med en annen ER subtype, og translokeres til kjernen der den binder til ERE i promotersekvensen til reseptorens målgener og initierer transkripsjonen av disse ved å rekrutere transkripsjonsmaskineriet. Figuren er basert på (Arukwe og Goksøyr, 2003)

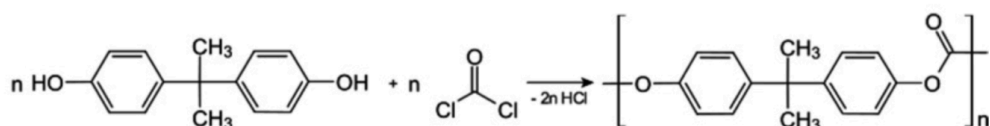
1.4 Bisfenol A og bisfenol A analoger

BPA er en kjemisk forbindelse som første gang ble syntetisert i 1891 (Geens et al., 2012, Rubin, 2011). Den kjemiske strukturen til BPA inneholder to hydroksyfenylgrupper og dannes gjennom en kondensasjonsreaksjon av aceton med to fenolmolekyler (Staples et al., 1998) (Figur 1.4). BPA har strukturlikheter med østrogene hormoner som østradiol (E2) og ble allerede på 1930 tallet undersøkt farmasøytisk for anvendelsen som et syntetisk østrogen for å forhindre spontanabort og prematur fødsel (Rubin, 2011). Selv om BPA viste østrogene effekter ble den strukturelt beslektede forbindelsen dietylstilbestrol (DES) foretrukket til bruk som et terapeutisk østrogen, siden DES viste seg å være mer potent enn BPA.



Figur 1.4 Strukturformel til østradiol (A), bisfenol A (B), og dietylstilbestrol (C).

Selv om BPA ikke hadde en fremtid i legemiddelindustrien, er BPA i dag en av verdens mest produserte kjemikalier med en årlig produksjon på omlag 8 millioner tonn i 2016, og en estimert produksjon på 10,6 millioner tonn i 2022 (Noszczyńska og Piotrowska-Seget, 2018). BPA har helt siden 1940-tallet blitt anvendt i produksjonen epoksyharpikser, og ble senere introdusert til matindustrien der det ble brukt som et beskyttende lag på innsiden av hermetiske bokser (Rubin, 2011, Usman og Ahmad, 2016). Senere på 1950-tallet ble det oppdaget at BPA kan benyttes i produksjonen av polykarbonatplast ved polymerisering av BPA molekyler (Usman og Ahmad, 2016, Vogel, 2009) (Figur 1.5). Polykarbonatplast er en type hardplast som benyttes i ulike oppbevaringsartikler for mat og drikke, deriblant emballasje, serviser og drikkeflasker (EFSA, u.å, Giulivo et al., 2016). I tillegg til at BPA brukes i matkontaktmaterialer finnes BPA også i leker, medisinsk utstyr, termisk papir, overflatebelegg og flammehemmende materialer (EFSA, u.å, Giulivo et al., 2016).



Figur 1.5 Polymeriseringsreaksjonen av BPA monomerer ved reaksjon med Cl₂O.

Figuren er hentet fra (Geens et al., 2012).

1.4.1 BPA i miljøet

Ikke før i 1993 ble det oppdaget at BPA kan lekke fra plastprodukter (Krishnan et al., 1993). Under et laboratorieforsøk ved Universitetet i Stanford ble det ved en tilfeldighet observert at en forbindelse med østrogene egenskaper ble frigitt fra polykarbonat flasker under autoklaving, og forbindelsen ble identifisert som BPA (Krishnan et al., 1993). Dette ble bekreftet av flere studier de påfølgende årene der det ble vist at BPA kan lekke fra ulike produkter laget med polykarbonatplast og epoksyharpikser (Takao et al., 2002, Mountfort et al., 1997). En økning i temperatur eller en pH-forandring kan gjøre at esterbindingene mellom BPA molekylene i polykarbonatplast og epoksyharpiks blir brutt gjennom hydrolyse og dermed frigjøres BPA til omgivelsene (Giulivo et al., 2016). Frigjøring av BPA til miljøet kan forekomme under industrielle prosesser, forbrenning av husholdningsavfall, utslipp fra avløpsvann fra rensesanlegg og nedbrytning av plast i naturen (Flint et al., 2012). Selv om BPA ikke er persistent i miljøet, vil kontinuerlig utslipp gjøre at BPA i større eller mindre grad er tilstede i atmosfæren, akvatiske miljøer, jord og sedimenter til enhver tid (Flint et al., 2012).

1.4.2 Hormonforstyrrende egenskaper

Flere studier har vist at BPA kan virke hormonforstyrrende i pattedyr, med blant annet å forstyrre HPG aksene. Både forandringer i nivå av gonadotropin og nedgang i testosteron ble observert hos rotter eksponert for 2 µg/kg BPA daglig i en periode på 14 dager (Akingbemi et al., 2004), mens avkom fra mus eksponert for 10 µg/kg BPA viste en økning i prostatastørrelse (Timms et al., 2005). Det har også blitt observert forlenget østrussyklus hos avkom fra både rotter og mus eksponert for BPA (Nikaido et al., 2004, Rubin et al., 2001). En annen studie utført på Sprague–Dawley rotter viste endringer på hypothalamus-hypofyse-tyroidea aksene hos

avkom av individer eksponert for 1, 10 og 50 mg/kg BPA daglig over 4 uker, der BPA trolig virker som en antagonist for tyroidreseptor β (TR β) (Zoeller et al., 2005). BPA har også blitt vist å kunne opptre som en agonist for PXR både i menneske og isbjørn (Lille-Langøy et al., 2015).

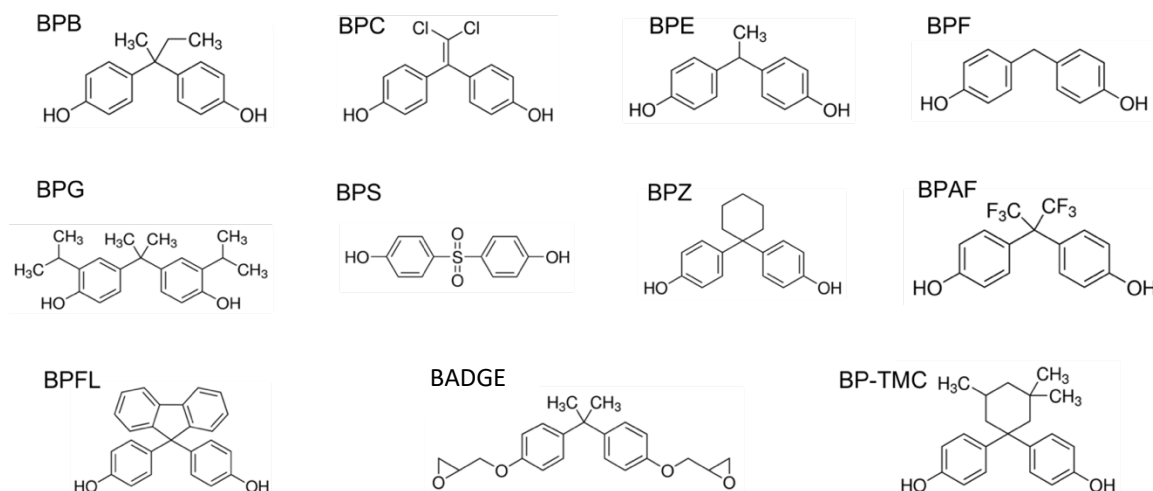
I likhet med pattedyr, kan BPA påvirke HPGL aksene hos en rekke fiskearter. Induksjon av VTG protein som følge av eksponering for BPA har blitt observert hos hannindivider av blant annet gullfisk (*Carassius auratus*) (Ishibashi et al., 2001), karpe (*Cyprinus carpio*) (Mandich et al., 2007) og storhodet ørekyte (*Pimephales promelas*) (Sohoni et al., 2001). Videre har eksponering for 1 μ g/L BPA i en periode på 14 dager vist å forårsake negative effekter på reproduksjonssystemet hos karpefisk, inkludert endret gonadestruktur hos hannfisk og deformiteter i oocytene hos hunnfisk (Mandich et al., 2007).

1.4.3 Regulering av industriell anvendelse av BPA og bisfenol A analoger

Flere studier har indikert at BPA kan ha hormonforstyrrende effekter selv ved lave konsentrasjoner (Akingbemi et al., 2004, Timms et al., 2005, Mandich et al., 2007), noe som har ført til at EU's mattrygghetsorgan, EFSA (European Food Safety Authority), i 2012 initierte en ny risikovurdering av BPA. I den nye risikovurderingen ble det konkludert med at hovedkilden for BPA-eksponering for mennesker er gjennom kosten, spesielt fra hermetisert mat, siden BPA kan lekke fra emballasje og inn i næringsmiddelprodukter (EFSA, 2015). Risikovurderingen resulterte videre i fastsetting av en ny grenseverdi for tolerabelt daglig inntak (TDI) av BPA tilsvarende 4 μ g per kg kroppsvekt per dag (EFSA, 2015). Den tidligere grenseverdien for TDI av BPA var mer en ti ganger høyere, tilsvarende 50 μ g per kg kroppsvekt per dag.

Siden BPA har vist seg å ha hormonforstyrrende egenskaper har bruken av BPA blitt forbudt i enkelte produkter. Canada ble i 2008 det første landet i verden som stanset bruken av BPA i tåteflasker, og videre i 2010 ble Canada det første landet i verden til å implementere en plan for å redusere utslipp av BPA til miljøet (Flint et al., 2012). Samme år innførte også EFSA et forbud mot bruk av BPA i tåteflasker til barn (EFSA, u.å). Selv om reguleringen av BPA har blitt strengere, har forbrukerne de siste årene uttrykt stor bekymring for bruken av BPA i andre hverdagsprodukter. Dette har resultert i at flere produsenter har valgt å fjerne BPA fra

produktene sine, og markedsfører disse som «BPA-frie». Likevel er mange av de «BPA-frie» produktene produsert med andre bisfenolforbindelser (bisfenol A analoger) (Usman og Ahmad, 2016, Chen et al., 2016). BPA analoger deler strukturlikhet med BPA, der to fenol grupper er forbundet via et karbon (eller et annet atom, som svovel), men der flere av strukturene har forgreininger og tilstedeværelse av halogener som klor (Cl) eller fluor (F). (Usman og Ahmad, 2016) (Figur 1.6). Flere av BPA analogene anvendes allerede i produksjonen av polykarbonatplast og epoksyharpikser (Chen et al., 2016). Bisfenol F (BPF, bis(4-hydroksyfenyl)metan), bisfenol AF (BPAF, 4,4'-(heksafluorisopropyliden)difenol)) og bisfenol S (BPS, 4,4'-Sulfonyldifenol) er blant BPA analogene som stadig erstatter BPA i produksjonen av emballasjeprodukter (Chen et al., 2016). Det er imidlertid ikke godt kartlagt om bisfenol A analogene som erstatter BPA også innehar hormonforstyrrende egenskaper.

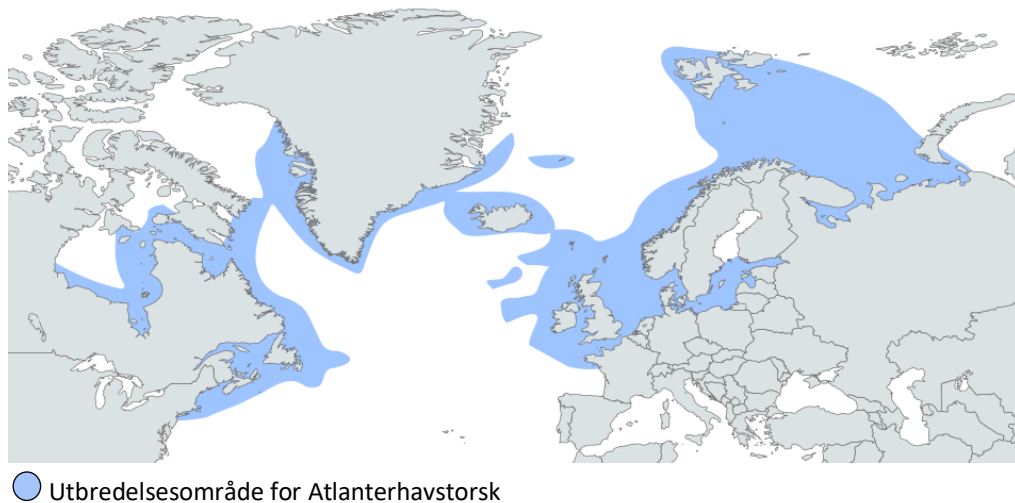


Figur 1.6 Bisfenol A analoger undersøkt i denne oppgaven. BPB=bisfenol B, BPC=bisfenolC, BPE=Bisfenol E, BPF= Bisfenol F, BPG=bisfenol G, BPS=bisfenol S, BPZ=bisfenol Z, BPAF= bisfenol AF, BPFL=bisfenol FL, BADGE= Bisphenol A diglycidyl ether, BPTMC=bisfenol TMC

1.5 Torsk som modellorganisme

Atlantehavstorsk (*Gadus morhua*) er en teleost i torskefamilien som har stor utbredelse i den nordlige delen av Atlanterhavet og Barentshavet (Figur 1.7). I norske farvann kan atlantehavstorsken deles inn i havtorsk (skrei) og kysttorsk som skiller seg fra hverandre med ulik geografisk utbredelse, livsstrategi og genetiske trekk (Jakobsen og Ozhigin, 2011). Nordøstarktisk torsk er den største torskebestanden i verden som gjør den kommersielt viktig

(Link et al., 2009). I Barentshavet er Nordøstarktisk torsk den viktigste rovfisken og kun noen få marine pattedyr, deriblant Grønlandssel (*Pagophilus groenlandicus*) og vågehval (*Balaenoptera acutorostrata*), jakter på voksne individer av Nordøstarktisk torsk (Link et al., 2009). Grunnet Nordøstarktisk torsk sin utbredelse og posisjon i næringskjeden har den en nøkkelrolle i økosystemet i Barentshavet, og blir brukt som modellorganisme i ulike økologiske studier (Link et al., 2009).



Figur 1.7 Utbredelsesområde for atlanterhavstorsk. Utbredelsen av atlanterhavstorsk er markert i blått og omfatter den nordlige delen av Atlanterhavet og Barentshavet. (AQUAMAPS, 2019)

Atlanterhavstorsken, spesielt kysttorsk, lever i områder som er utsatt for forurensing fra oljeindustri, annen kystindustri og avrenning fra urbane områder. Det er blitt funnet høye konsentrasjoner av ulike miljøgifter i lever hos atlanterhavstorsk, både klassiske miljøgifter som bly, arsenikk, dioksiner og PCB (Julshamn et al., 2013c, Julshamn et al., 2013b, Julshamn et al., 2013a), samtidig som det blir observert en økning av nye miljøgifter som polybromerte difenyletere (PBDE) (Julshamn et al., 2013a), perfluorerte alkylerte stoffer (PFAS) og bromerte flammehemmere (BFR) (Herzke et al., 2013). Norsk institutt for vannforskning (NIVA) har nylig (2016) utført kjemiske analyser av torsk fanget i Oslofjorden hvor det ble avdekket relativt høye mengder av flere ulike bisfenoler i torsklever, blant annet bisfenol A, bisfenol F og bisfenol G (BPG) (Ruus et al., 2014) (Tabell 1.1).

Atlanterhavstorsk benyttes som en indikatorart i marine miljøovervåkningsprogram, som OSPAR konvensjonen og i overvåkning av vannsøylen i forbindelse med offshore

petroleumsindustri i Norge (OSPAR, 2009). Atlanterhavstorsken har de senere årene også blitt benyttet som modellorganisme i ulike toksikologiske studier (Eide et al., 2014, Bizarro et al., 2016, Dale et al., 2019, Yadetie et al., 2018). Dette skyldes i stor grad sekvenseringen og annotasjonen av torskens genom i 2011 (Star et al., 2011). Tilgjengeligheten av et sekvensert genom har fasilitert muligheten for å kombinere proteomikk, genomikk, og metabolomikk for å kartlegge torskens respons på ulike miljøgifter over flere biologiske nivåer (Karlsen et al., 2011).

Tabell 1.1 Bisfenolforbindelser detektert i leveren til torsk fanget i oslofjorden (2016).
Tallmaterialet er hentet fra (Ruus et al., 2014). (ng/g wet weight, n = 15).

Bisfenolforbindelse	Gjennomsnitt	Laveste	Høyeste
Bisphenol A	53	12	195
Bisphenol F	71	< 5	789
Bisphenol BP	-	< 10	<10
Bisphenol S	1	< 1	10
Bisphenol B	289	< 10	1995
Bisphenol Z	264	< 2	2653
Bisphenol AP	18	< 2	117
Bisphenol E	407	< 4	1839
Bisphenol FL	1	< 10	22
Bisphenol P	34	< 5	131
Bisphenol M	19	< 3	122
Bisphenol G	4578	< 3	53448
Bisphenol TMC	828	< 3	7145

1.5.1 Østrogenreseptor i torsk

Et genfragment av hver av de tre østrogenreseptorvariantene har tidligere blitt klonet og sekvensert fra atlanterhavstorsk, og utrykning av de tre paralogene har blitt undersøkt i ulike vev (Nagasawa et al., 2014). To av *esr*-paralogene, *esr α* og *esr β -I*, har en kjønnsavhengig distribusjon i gonade og lever, hvor *esr α* og *esr β -I* er i større grad uttrykt i gonadene i hanntorsk enn gonadene i hunntorsk. Dette indikerer at begge variantene har en viktig rolle i

spermatogenese. I motsetning til hanntorsk, så er *esr α* og *esr β -I* i hunntorsk uttrykt i større grad i leveren enn i gonadene, og gjenspeiler trolig en funksjonell rolle i vitellogenese. *Esr β -II* er uttrykt i flere typer vev i hunntorsk enn i hanntorsk, men dens eksakte funksjon i de ulike vevene er fremdeles ikke kartlagt (Nagasawa et al., 2014).

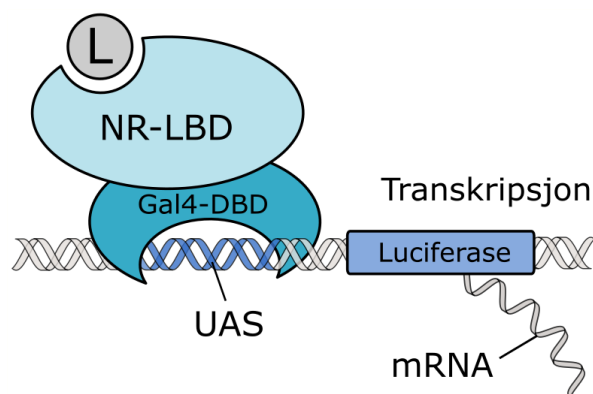
Flere forbindelser med østrogene effekter i andre arter er også vist å kunne aktivere østrogenreseptoren i torsk, også BPA. Etter en kontinuerlig eksponering for 50 $\mu\text{g/L}$ BPA over en tre ukers periode ble det observert signifikant økning i nivåer av VTG og ZRP proteiner i plasma hos juvenil atlantehavstorsk (Larsen et al., 2006). I samme studie ble torsk eksponert i tre uker for 30 $\mu\text{g/L}$ nonylfenol, som også signifikant økte nivået av VTG og ZRP. Nylig ble også vevskulturer med leverskiver fra torsk eksponert for EE2 (10 nM og 1000 nM) som førte til økt transkripsjon av gener som koder for *esr α* , *vtg* og *zrp* (Yadatie et al., 2018).

1.6 Reportersystem for å studere aktivering av transkripsjonsfaktorer

Luciferase-baserte reportersystemer er en utbredt *in vitro* metode som benyttes for å studere ligandaktivering av ulike kjernereseptorer (Brasier et al., 1989). Det finnes forskjellige typer av reportersystemer, blant annet et system basert på UAS/Gal4-DBD prinsippet (se neste avsnitt) som er benyttet i denne oppgaven (Figur 1.8). Et slikt system er tidligere blitt etablert og benyttet for å studere ligandaktivering av ulike reseptorer hos atlantehavstorsk, deriblant aryl hydrokarbonreseptor (AhR), vitamin D (VDR) reseptor og peroksisom proliferator-aktiverende reseptor (PPAR) (Madsen, 2016, Ueland, 2013, Söderström, 2017).

I UAS/Gal4 systemet blir eukaryote celler kotransfektet med et reseptorplasmid og reporterplasmid. Reseptorplasmidet uttrykker konstitutivt et gen hvor det DNA-bindende domenet fra gjærsopp-proteinet Gal4 (Gal4-DBD), er fusjonert til det ligandbindende domenet til kjernereseptoren som undersøkes (NR-LBD). Reporterplasmidet inneholder genet som koder for luciferase proteinet, kontrollert av en promoter med fire oppstrøms aktiveringsekvenser (UAS) som gjenkjennes Gal4-DBD. Ved ligandbinding til NR-LBD vil fusjonsproteinet (Gal4-DBD-NR-LBD) gjennomgå en konformasjonsendring som resulterer i binding til UAS, og uttrykking av reporter-genet luciferase initieres (se metoder 3.2.1) (Figur 1.8).

I denne oppgaven er det benyttet et nylig etablert UAS/Gal4-basert reporter-gen system med ER fra atlantehavstorsk (gmER α) (Steinkopf, 2017) for å studere bisfenol-mediert aktivering/inhibering av gmER α . Dette systemet har tidligere blitt benyttet for å studere ligandaktivering av reseptoren i COS-7 celler etter eksponering for metoksyklor og endosulfan (Steinkopf, 2017).



Figur 1.8 Reporter-gen system for å studere ligandbinding og transaktivering av kjernereseptorer. Ved ligandbinding vil fusjonsproteinet (Gal4-DBD-NR-LBD) binde til responselement (UAS) i promotoregenen og indusere utrykking av reporter-genet luciferase.

1.7 Presisjonskuttete leverskiver (PKLS) som et *ex vivo* modellsystem

Hos alle vertebrater er leveren et viktig organ for biotransformasjon av eksogene forbindelser. Både næringsstoffer og kjemiske stoffer blir tatt opp fra tarmen og fraktet til leveren via portåren (*vena porta*). De funksjonelle cellene i leveren er hepatocytter som ofte er lipidrike og uttrykker en rekke biotransformasjonsenzymmer. Presisjonskuttete leverskiver er en metode som brukes til *ex vivo* eksponeringsstudier av levervev for å studere ulike biokjemiske funksjoner som endogen metabolisme, biotransformasjon av fremmedstoffer og transport av ulike kjemiske forbindelser (de Graaf, 2010). I motsetning til primærkulturer av hepatocytter inneholder leverskivene intakte celledag som opprettholder den tre-dimensjonale strukturen i vevet og den intracellulære kommunikasjonen mellom celler i deres opprinnelige miljø (De Graaf et al., 2010, Schmieder et al., 2000). PKLS har blitt benyttet i en rekke toksikologiske studier både i pattedyr, som rotter (Laurent et al., 2000), og ulike fiskearter, som blant annet Atlanterhavslaks (*Salmo salar*) (Lemaire et al., 2011). I 2014 ble PKLS etablert for atlantehavstorsk i vårt laboratorium (Eide et al., 2014), og metoden har senere blitt benyttet

for å undersøke hvordan torsk responderer på ulike miljøgifter (Bizarro et al., 2016, Yadetie et al., 2018). I fisk kan PKLS også brukes som et verktøy for å studere effekter på HPGL aksen. ER α uttrykkes i lever og aktivering av østrogenreseptorsignalveien av potensielle østrogene stoffer kan studeres ved å måle induksjon av VTG (på transkript- eller proteinnivå) i eksponerte leverskiver (Yadetie et al., 2018).

1.9 Mål for oppgaven

De siste årene har det blitt innført et strengere regelverk og flere restriksjoner omkring produksjon og anvendelse av BPA i ulike produkter. Dette har ført til at industrien erstatter bruken av BPA med andre bisfenolforbindelser som i dag ikke er underlagt noen form for regulering. De «nye» bisfenolforbindelsene har svært lik struktur som BPA og innehar mange av de samme fysikalsk-kjemiske egenskapene. Dermed er det grunn til å tro at også disse forbindelsene kan ha de samme hormonforstyrrende egenskapene som BPA. Hovedmålet for denne oppgaven har vært å få kunnskap om et sett av tolv forskjellige bisfenoler med ulike strukturelle egenskaper kan virke hormonforstyrrende gjennom å opptre som agonister, eller antagonister, for østrogenreseptor fra atlantehavstorsk. Dette er det første omfattende studiet for å få en mekanistisk forståelse av aktivering av østrogenreseptoren fra torsk med et diverst sett av BPA analoger. Dette arbeidet har blitt gjennomført ved å utføre følgende delmål:

- Undersøke om bisfenolene evner å aktivere/inhibere gmER α *in vitro* ved bruk av et luciferase reportergensystem.
- Etablere dose-respons sammenheng for de «nye» bisfenolforbindelsene og gmER α , og sammenligne deres potensitet og virkeevne med BPA.
- Undersøke aktivering av østrogenreseptorsignalveien *ex vivo* ved å eksponere presisjonskuttete leverskiver (PKLS) fra atlantehavstorsk for bisfenolforbindelsene og måle induksjonen av gmER α -målgenet vitellogenin (*vtg1*), både på transkriptnivå (qPCR) og på proteinnivå (ELISA).

2 Materialer

2.1 Kjemikalieliste

Tabell 2.1 Liste over kjemikalier benyttet i masteroppgaven

Navn	Formel	Leverandør / produktnummer
2-Merkaptoetanol	C_2H_6OS	Aldrich / M6250
2-Nitrofenyl β -D-galaktopyranosid (ONPG)	$H_{12}C_{15}NO_8$	Sigma / N1127
2-log DNA-standard (0,1 – 10,0 kb)		New England Biolabs / N3200s
5-CFDA-AM (5-Carboxyfluorescein diacetat, acetoxymetyl ester)	$C_{28}H_{20}O_{11}$	Thermo Fisher Scientific / C1354
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 / 2A9538
Ampicillin-natrium salt	$C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$	Sigma / A9518
Ammonium persulfat (APS)	$(NH_4)_2S_2O_8$	Sigma-Aldrich/A3678
Bisfenol A	$(CH_3)_2C(C_6H_4OH)_2$	Sigma-Aldrich / 239658
Bisfenol B	$C_{16}H_{18}O_2$	Sigma-Aldrich / 50877
Bisfenol C	$Cl_2C=C(C_6H_4OH)_2$	Sigma-Aldrich / 06723
Bisfenol E	$CH_3CH(C_6H_4OH)_2$	Sigma-Aldrich / 04487
Bisfenol G	$C_{21}H_{28}O_2$	Sigma-Aldrich / 50953
Bisfenol S	$O_2S(C_6H_4OH)_2$	Sigma-Aldrich / 43034
Bisfenol Z	$C_6H_{10}(C_6H_4OH)_2$	Sigma-Aldrich / 77923
Bisfenol AF	$(CF_3)_2C(C_6H_4OH)_2$	Sigma-Aldrich / 257591
Bisfenol FL	$C_{25}H_{18}O_2$	Sigma-Aldrich / 97009
Bisfenol TMC	$C_{21}H_{26}O_2$	Sigma-Aldrich / 61923

BADGE	$C_{21}H_{24}O_4$	Sigma-Aldrich / D3415
Borsyre	H_3BO_3	Merck / A9647
Bovint serum albumin (BSA)		Sigma / A9647
CHAPS	$C_{32}H_{58}N_2O_7S$	Thermo / 28299
Coomassie Brilliant Blue R250		Bio-Rad / 1610436
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 fenolrødt)		Sigma / D5671
Dulbecco's Modified Eagle's Medium – høy glukose (uten fenolrødt)		Sigma / D1145
Eddiksyre	CH_3CO_2H	Sigma-Aldrich / 33209
Etanol	C_2H_6O	Sigma / 32221
Etylenglycol-bis(2- aminoetyleter)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
Fetal Bovin Serum		Sigma / F7524
Formamid	CH_3NO	Sigma / F9037
Fosfatbufret saltløsning (PBS) 10X		Sigma / P5493
GelRed		Biotium / 41003
Gjærekstrakt		Fluka / 92144
Glyserol	$HOCH_2CH(OH)CH_2OH$	Sigma / G5516

Isopropanol	C_3H_8O	Kemetyl / 603117000
Kaliumklorid	KCl	Sigma / P9541
Kloroform	$CHCl_3$	Sigma-Aldrich / 650498
Koenzym A trilitiumsalt	$C_{21}H_{33}Li_3N_7O_{16}P_3S$	Sigma / C3019
L-Glutamin	$C_5H_{10}N_2O_3$	Sigma / G7513
L- α -Phosfatidylcholin		Sigma / P3644
Leibovitzs 1-15-medium (uten fenolrødt)		TermoFisher / 21083-027
Magnesiumkarbonat hydroksid pentahydrat	$(MgCO_3)_4 \cdot Mg(OH)_2$	Sigma / M5671
Magnesiumklorid- heksahydrat	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	Sigma-Aldrich / M9272
Magnesiumsulfat- heptahydrat	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Sigma-Aldrich / 63140
Natriumdihydrogenfosfat monohydrat	$H_2NaO_4P \cdot H_2O$	Merck / 106346
Natriumklorid	NaCl	Merck / 106404
Natriumpyruvat	$C_3H_3NaO_3$	Sigma / S8636
N,N,N',N'- Tetramethylethane-1,2- diamine (TEMED)	$(CH_3)_2NCH_2CH_2N(CH_3)_2$	Sigma-Aldrich / 411019
Opti-MEM® I Reduced Serum Medium		Life Technologies / 31985- 062
Penicillin-Streptomycin		Sigma / P4458
Precision Plus Protein All Blue standard		Bio-rad/ 1610373
Fenylmetansulfonyl fluorid (PMSF)	$C_7H_7FO_2S$	Sigma / P7626
Qiazol		Qiagen / 79306
SOC vekstmedium		New England Biolabs / B9020S

Tamoxifen	$C_6H_5C(C_2H_5)=C(C_6H_5)C_6H_4OCH_2CH_2N(CH_3)_2$	Sigma-Aldrich / T5648
TransIT [®] -LT1		Mirus / MIR 2300
Transfeksjonsreagens		
Tricine	$H_{13}O_5C_6N$	Sigma / T0377
TriReagent		Sigma / T9424
Tris-PO ₄ (Trizma [®] fosfat dibasisk)	$(C_4H_{11}NO_3)_2 \cdot H_3PO_4$	Sigma / T4258
Triton [®] X100		Sigma / T4258
Trizma [®] base	$NH_2C(CH_2OH)_3$	Sigma / T1503
Trypan Blue løsnng	$C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$	Fluka / 93595
Trypsin-EDTA løsnng 1X (0,05% trypsin, 0,02% EDTA)		Sigma / 59417c
Trypton		Merck / 111931

2.2 Kommersielle Kit

Tabell 2.2 Kommersielle kit benyttet i oppgaven

Navn	Beskrivelse	Leverandør/produktnummer
Cod Vitellogenin ELISA kit	Deteksjon av VTG (PKLS)	BIOSENSE Laboratories/ V01006401
Cytotoxicity detection kit (LDH)	Cytotoksisitet (PKLS)	Roche / 11644793001
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

2.3 Cellelinjer

Tabell 2.3 Oversikt over cellelinjer

Cellelinje	Beskrivelse	Leverandør/produktnummer
StrataClone solopack competent cells	For transformering og dyrkning av plasmid	Agilent / 240205

Cellelinje	Beskrivelse	Referanse
COS-7 celler	Nyreceller fra afrikansk grønnape (<i>Cercopithecus aethiops</i>)	(Gluzman, 1981)

2.4 Plasmider

Tabell 2.4 Ulike plasmider brukt i luciferase reporter-gen system

Plasmid	Beskrivelse	Opprinnelse
mh(100)x4tk luc	Reporterplasmid.	(Forman et al., 1995)
pCMV- β -galaktosidase	Kontrollplasmid	(Blumberg et al., 1998)
pCMX-Gal4-DBD-ER α	Reseptorplasmid ER α torsk	(Steinkopf, 2017)

2.5 Primere

Tabell 2.5 oversikt over primere brukt i oppgaven

Primer	Retning	Nukleotidsekvens 5'-3'
<i>vtg1</i>	F	AGACTGGCCTGGTCGTCAA
	R	GCGAGGATAGAGGCAGGGAT
<i>actb</i>	F	CGACGGGCAGGTCATCACCATCG
	R	CCACGTCGCACTTCATGATGCTGT

2.6 Dyrkningsmedium

Tabell 2.6 Lysogeny Broth (LB) Dyrkningsmedium

Komponent	Konsentrasjon
Trypton	10 g/L
Gjærekstrakt	5 g/L
Natriumklorid	10 g/L
Ampicillin	100 mg/L
Deionisert H ₂ O	-

Tabell 2.7 Frysemedium for lagring av COS-7 celler

Komponent	Konsentrasjon
DMEM-10% FBS (Tabell 9)	1x
DMSO	5% (v/v)

Tabell 2.8 Dyrkningsmedium for kultivering av COS-7 celler (DMEM-10% FBS)

Komponent	Konsentrasjon
Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)	0,87 x
Fetal Bovin Serum	8,70 %
Pencillin-Streptomycin (5000U & 5mg/ml)	86 U/0,86 mg/mL
Natriumpyruvat (100mM)	0,87 mM
L-Glutamin (200mM)	3,48 mM

Ved ligandeksponering ble det brukt DMEM uten fenolrødt og superstrippet FBS

Tabell 2.9 PKLS medium

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

2.7 Løsninger

Agarose-gel elektroforese

Tabell 2.10 5 X Tris borat EDTA (TBE) buffer

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

Tabell 2.11 Tillaging av agarosegel

Komponent	Konsentrasjon
TBE-buffer (Tabell 2.10)	0,5 X
Agarose	0,7-1,2 %
Gelred	0,0002 %

Løsninger benyttet i luciferase reportergensystem

Tabell 2.12 Basebuffer lysering (1x)

Komponent	Konsentrasjon
Tris-PO ₄ , pH 7,8	25 mM
Glycerol	15 %
CHAPS	2 %
L- α -Fosfatidylcholine	1 %
BSA	1 %

Tabell 2.13 Lyseringsløsning

Komponent	Konsentrasjon
Lysisbuffer (tabell 2.12)	1x
EGTA	4 mM
MgCl ₂	8 mM
PMFS	0,4 mM
DTT	1 mM

Tabell 2.14 β -galaktosidase basebuffer (10X)

Komponent	Konsentrasjon
Na ₂ HPO ₄	60 mM
NaH ₂ PO ₄	40 mM
KCl	10 mM
MgCl ₂	1 mM

Tabell 2.15 β -galaktosidase reaksjonsløsning (10X)

Komponent	Konsentrasjon
β -galaktosidase buffer (10X) (tabel 2.14)	1x
β -merkaptoetanol	52,9 mM
ONPG	8,6 mM

Tabell 2.16 Luciferase basebuffer (4X, pH 7,8)

Komponent	Konsentrasjon
Tricine	80 mM
(MgCO ₃) ₄ • Mg(OH) ₂ • 5H ₂ O	4,28 mM
EDTA	0,4 mM
MgSO ₄	10, 68 mM

Tabell 2.17 Luciferase reaksjonsløsning

Komponent	Konsentrasjon
Luciferase buffer (4X, pH 7,8) (tabell 2.16)	1x
ATP	0,5 mM
DTT	5 mM
MilliQ	-
Koenzym A*	0,2 mM
D-luciferin*	0,5 mM

*Tilsatt rett før bruk

Tabell 2.18 Rezazurin løsning for bestemmelse av celleviabilitet til COS-7 celler

Komponent	Konsentrasjon
DMEM 10 % FBS	1x
Resazurin (0,15 mg/mL)	10 %

Løsninger benyttet til PKLS

Tabell 2.19 PKLS Buffer

Komponent	Konsentrasjon
NaCl	122 mM
KCl	4,8 mM
Na ₂ HPO ₄ • 2H ₂ O	11 mM
MgSO ₄ • 7H ₂ O	1,2 mM

Celleviabilitet

Tabell 2.20 Triton lysis buffer

Komponent	Konsentrasjon
Tris-HCl (pH 7.4)	25 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
Triton X-100	1 %
Glycerol	5 %

2.8 SDS-PAGE

Tabell 2.21 Protokoll for tillaging av 10 mL 12% seperasjonsgel

Komponent	Konsentrasjon
Tris-HCl (pH 8.8)	375 mM
Akrylamid/bisakrylamid	12 %
SDS	0,1 %
Ammonium persulfat (APS)	0,1 %
N,N,N',N'-Tetrametyletane-1,2-diamin (TEMED)	0,1 %

Tabell 2.22 Protokoll for tillaging av 5 mL 4 % konsentrasjonsgel (stackinggel)

Komponent	Konsentrasjon
Tris-HCl (pH 6.8)	125 mM
Akrylamid/bisakrylamid	4 %
SDS	0,1 %
Ammonium persulfat (APS)	0,1 %
N,N,N',N'-Tetrametyletane-1,2-diamin (TEMED)	02 %

Tabell 2.23 1X SDS-PAGE kjørebuffer

Komponent	Konsentrasjon
Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0.1 %

2.9 Protein immunoblotting

Tabell 2.24 1X Towbin buffer

Komponent	Konsentrasjon
Tris	25 Mm
Glycin	192 mM
Metanol	20 %
MilliQ	-

Tabell 2.25 5X TBS (pH 7,5)

Komponent	Konsentrasjon
Tris	24 g
NaCl	292.5 g
MilliQ	2000 mL

Tabell 2.26 0.05 % TBS-tween

Komponent	Konsentrasjon
5X TBS (Table 2.25)	1x
Tween 20	0,05%
MilliQ	-

Tabell 2.27 Protokoll for tillaging av 5 % tørrmelk (blokkeringsløsning)

Komponent	Konsentrasjon
Tørrmelk	6,25 g
TBS-Tween (tabell 2.26)	125 mL

Tabell 2.28 5X SDS-PAGE prøvebuffer (5XSB)

Komponent	Konsentrasjon
Tris-HCl (pH 6.8)	250 mM
SDS	10 %
Glycerol	30 %
β -Merkaptoetanol	5 %
Bromofenol blå	0.02 %

2.10 Liste over Instrumenter

Tabell 2.39 Oversikt over ulike instrumenter benyttet i oppgaven

Instrument	Beskrivelse	Leverandør
Avanti [®] J-26 XP Centrifuge	Sentrifuge	Beckman Coulter [®]
Bürker tellekammer	Telling av celler	Marienfeld
ChemiDoc [™] XRS+ System	Geldokumentasjon	Bio-Rad
DOPPIO Thermal Cycler	PCR Thermo Cycler	VWR
EnSpire [™] 2300 Multilabel Reader	Plateleser	PerkinElmer
G:BOX	UV-belysning	Syngene
HS 501 Digital	Risteplate	IKA-Werke
Leica vibratome	Vibratom	LEICA
NanoDrop 1000	Spektrofotometer	Thermo Scientific
New Brunswick [™] Galaxy [®] 170 R	CO ₂ -inkubator	Eppendorf
PowerPac [™] HC	Strømforsyning	Bio-Rad
Thermomixer compact	Varmeblokk	Eppendorf

2.11 Programvare

Tabell 2.30 Oversikt over ulike programvare benyttet i oppgaven

Programvare	Beskrivelse	Leverandør
Bio-Rad CFX Manager	Analyse av qPCR data	Bio-Rad
EnSpire Manager	Operasjon av plateleser	PerkinElmer
Excel 2019 (versjon 16.28)	Dataanalyse, statistikk	Microsoft®
GeneSnap Image	Visualisering av agarosegel	Syngene
GraphPad Prism 8	Statistikk, figurtillaging	GraphPad Software
NanoDrop Software	Spektrofotometri	Thermo Fisher Scientific
PowerPoint 2019 (versjon 16.28)	Tillaging av illustrasjoner	Microsoft®

3 Metoder

3.1 Oversikt over eksperimentell del

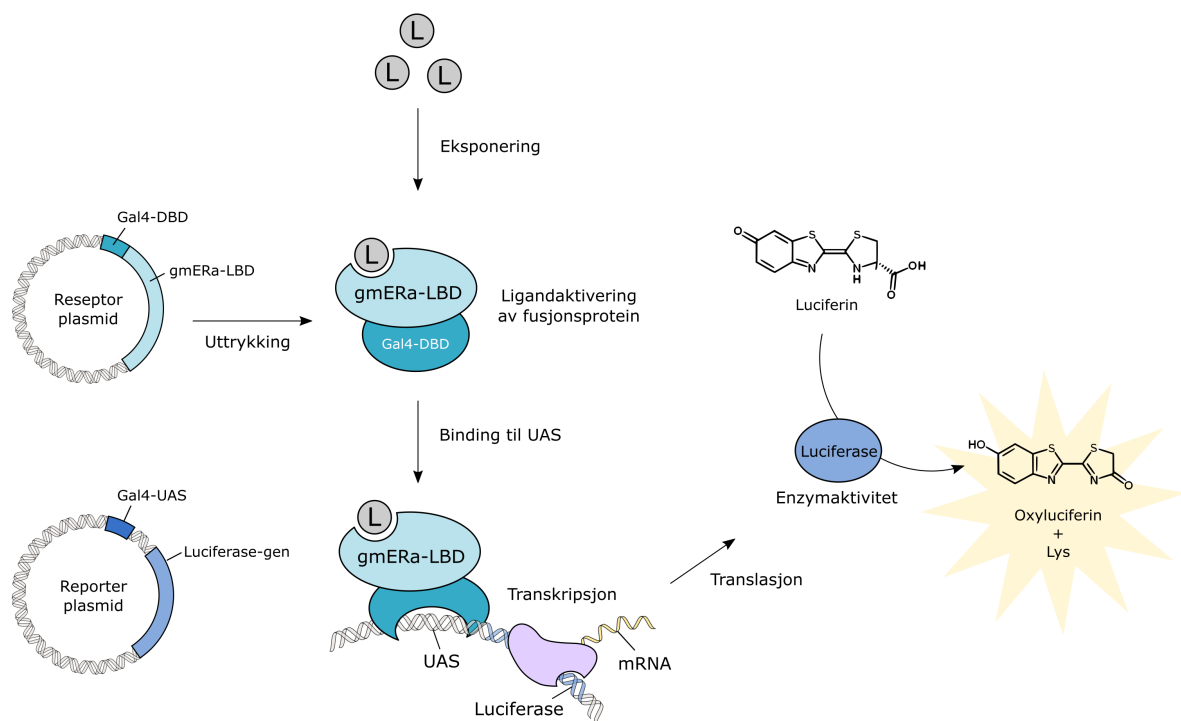
I denne oppgaven er det benyttet en rekke molekylærbiologiske metoder for å studere bisfenol-mediert aktivering/inhibering av gmER α . Det ble brukt et luciferase reportergensystem i COS-7 celler for å studere transaktivering av gmER α *in vitro*. Dette ble fulgt opp *ex vivo* ved å eksponere presisjonskuttete leverskiver (PKLS) fra torsk for de samme bisfenolene og undersøke induksjonen av gmER α -målgenet vitellogenin (*vtg*), både på transkriptnivå ved hjelp av kvantitativ PCR (qPCR) og på proteinnivå med bruk av ELISA. Ulike metoder for å måle metabolsk aktivitet og membranintegritet ble benyttet for å overvåke cytotoxicitet og viabiliteten til COS-7 celler og leverskiver under eksponeringsforsøkene.

3.2 Luciferase reportergensystem

3.2.1 Prinsipp

For å studere ligand-aktivering av gmER α *in vitro* ble det benyttet et luciferase reportergensystem basert på UAS/Gal4-DBD prinsippet (Figur 3.1). I dette systemet blir COS-7 celler kotransfektet med reporterplasmid, reseptorplasmid og et kontrollplasmid. Reporterplasmidet inneholder reportergenet som koder for luciferase som er under transkripsjonell kontroll av repeterte responselementer (Gal4-UAS) i sin promotorregion. Reseptorplasmidet inneholder det ligandbindende domenet (LBD) til gmER α reseptoren fusjonert med det DNA-bindende domenet til Gal4, en transkripsjonsfaktor fra gjærsopp. Gal4-gmER α proteinet vil uttrykkes konstitutivt i cellene fra en CMV-promoter, og ved ligandgjenkjennelse og binding av ligand til gmER α LBD oppstår det en konformasjonsendring i fusjonsproteinene som medfører at Gal4-DBD binder til Gal4-UAS aktiveringssekvensen på reporterplasmidet som initierer transkripsjonen av luciferasegenet. Luciferase-transkriptene translanteres, og ved tilsats av luciferin til COS-7 cellelysate vil det translanterte luciferaseproteinene katalysere oksidasjonen av luciferin til oxyluciferin i en reaksjon som produserer lys som biprodukt. Mengden lys som dannes kan kvantifiseres med et luminometer og brukes som et mål på luciferaseaktivitet som gjenspeiler graden av aktivering av reseptoren.

Kontrollplasmidet (pCMV β -galaktosidase) blir kotransfektet inn i COS-7 cellene for å korrigere for ulikheter i transfeksjonseffektivitet mellom brønner som er transfektet med samme transfeksjonsblanding. Kontrollplasmidet uttrykker konstitutivt genet for β -galaktosidase (β -gal) som er et bakterielt enzym som katalyserer reaksjonen som danner galaktose og orto-nitrofenyl fra orto-nitrofenyl- β -galaktosid (ONPG). Produktet som dannes har en gul farge og kan kvantifiseres spektrofotometrisk ved å måle absorbansen ved 420 nm. For å normalisere for transfeksjonseffektiviteten ble luciferaseaktiviteten dividert på β -galaktosidaseaktiviteten til COS-7 cellene.



Figur 3.1 Prinsippet bak luciferase reportergensystemet for å studere aktivering av gmER α . Reseptorplasmid og reporterplasmid blir transfektet inn i COS-7 celler. Ved eksponering av COS-7 cellene for en østrogenreseptor agonist vil binding av denne liganden (L) til det ligandbindende domenet fra gmER α aktivere fusjonsproteinet. Dette resulterer i at Gal4-DBD delen av fusjonsproteinet binder til Gal4-UAS responselementer i promotoren oppstrøms for luciferase genet i reporterplasmidet og induserer utrykking av luciferase. Ved tilsetting av substrat til cellene vil det translaterte luciferase enzymet katalysere oksidasjonen av luciferin til oxyluciferin, og det dannes i denne reaksjonen lys som kan kvantifiseres med et luminometer. Kontrollplasmidet som benyttes for å korrigere for transfeksjonseffektivitet er ikke vist i figuren. Illustrasjon er basert på Madsen (2016).

3.2.2 Opparbeidelse av reporter- og kontrollplasmid til bruk i reportergensystemet

For opparbeidelse av reporterplasmidet (mh(100)4tk luciferase) og kontrollplasmidet (pCMV β -galaktosidase), ble stamkulturer med *E. coli* celler (oppbevart i glycerol ved $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) som tidligere var transformert med enten mh(100)4tk luciferase eller pCMV β -galaktosidase inokulert i 200 mL LB-vekstmedium (Tabell 2.6) tilsatt ampicillin ($0,1\text{mg/mL}$). Bakteriekulturene ble inkubert med risting (250 RPM) ved $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ over natt.

DNA-plasmidene ble rensert fra overnattskulturen (ON) ved bruk av mellom-skala (midi-prep) plasmidrensekit (Nucleobond Midi/Maxi kit, Macherey-Nagel) (Tabell 2.2) etter protokoll fra leverandøren. *E. coli* cellene ble høstet med sentrifugering ($5000 \times g$ i 15 min ved $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) og tilsatt resuspensjonsbuffer med RNase som senere vil bryte ned RNA. Cellene ble lysert ved tilsetning av NaOH/SDS løsning som ødelegger cellemembranen og denaturerer proteiner og kromosomalt DNA. Proteiner, kromosomalt DNA og andre cellerester ble deretter presipitert ved tilsetning av nøytraliseringsbuffer, og fjernet med sentrifugering ($5000 \times g$ i 10 min). Supernatanten som inneholdt plasmid DNA ble applisert på en silikakolonne, hvor plasmid-DNA bandt til kolonnen mens andre komponenter (salter, metabolitter og cellekomponenter) ble fjernet med en vaskebuffer. DNA-plasmid ble eluert ved tilsetning av en alkalisk buffer, og rensert ytterligere med isopropanol utfelling. Presipitert DNA-plasmid ble løst i diH_2O . Konsentrasjonen og renheten til plasmidene ($A_{260/280}$ og $A_{260/230}$) ble bestemt spektrofotometrisk med NanoDrop-One (Thermo Scientific). Konformasjonen til plasmidene ble senere undersøkt ved bruk av agarose gelelektroforese som beskrevet i metode 3.2.4.

3.2.3 Transformasjon av *E. coli*

Det var ikke tilgjengelig stamkulturer med *E. coli* celler med reseptorplasmidet pCMX-Gal4-DBD-ER α . For opparbeidelse av dette plasmidet ble derfor StrataClone kompetente *E. coli* celler transformert med pCMX-Gal4-DBD-ER α plasmid (reseptorplasmid). Reseptorplasmid ble tilsatt StrataClone celler ($20\text{ }\mu\text{L}$ stock løsning) og inkubert på is i 20 minutter. Blandingen ble deretter varmebehandlet i vannbad på $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 45 sekunder og videre inkubert på is i 2 minutter. SOC-medium ($200\text{ }\mu\text{L}$) ble tilsatt og cellene ble inkubert 1 time ved $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ i en risteinkubator (250 RPM). Deretter ble cellene platet ut på LB-agar plater tilsatt ampicillin ($0,1\text{mg/ml}$) for seleksjon av positive transformanter, og inkubert over natten ved $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. For

opparbeidelse av reseptorplasmidet ble en enkelkoloni fra agarskålen plukket for videre dyrkning i LB-vekstmedium over natten (Tabell 2.6). Plasmid ble rensset fra cellene med bruk av midi-prep som beskrevet i metode 3.2.2.

3.2.4 Kontroll av plasmider med agarose gelelektroforese (AGE)

Agarose gelelektroforese (AGE) ble benyttet for å undersøke konformasjonen til plasmidene brukt i reportergensystemet. En supertvunnet konformasjon er viktig for en effektiv transfeksjon av plasmidene inn i COS-7 cellene. AGE er en metode for å separere molekyler i et elektrisk felt basert på molekylets ladning og størrelse. Små molekyler vil migrere lengre gjennom gelen enn større molekyler, og dermed vil migrasjonshastigheten til molekylene gjenspeile molekylets størrelse. Plasmider i en supertvunnet konfigurasjon er mer kompakte enn plasmider som er i åpen sirkulær form, og vil derfor migrere lengre i agarosegelen. Nukleinsyrer (DNA/RNA) er negativt ladet og vil bevege seg gjennom gelen mot den positive elektroden. Det ble tillaget en 0,7 % agarose gelløsning (Tabell 2.11) og GelRed ble tilsatt før støpning for å visualisere nukleinsyrene. Prøvene med de ulike plasmidene ble laget som angitt i tabell 3.1 og applisert i brønnene. 2-log DNA ladder ble brukt som molekylvektstandard (200 ng). Separasjonen ble utført på 110V i 35 min og Gel Doc™ EX Imager (Bio-Rad) ble brukt for å visualisere gelen.

Tabell 3.1 Tillaging av prøver for kontroll av plasmider med agarose gelelektroforese

Komponent	Mengde
Appliseringsbuffer	1 µL
200 ng DNA-plasmid	X µL
Deionisert H ₂ O	9-X µL
Total	10 µL

3.2.5 Kultivering av COS-7- celler

All håndtering av COS-7 celler ble gjennomført med bruk av sterilteknikk. COS-7 celler ble lagret i flytende N₂ i frysemedium tilsatt DMSO (Tabell 2.7). Før bruk ble cellene tint og tilsatt 10 mL dyrkingsmedium (Tabell 2.8) før DMSO ble fjernet med sentrifugering ved 500 x g i 5 min. Cellepelletten ble resuspendert i 10 mL dyrkingsmedium, sådd ut på 10 cm cellekulturskåler og inkubert ved 37°C i en normal atmosfære supplert med 5 % CO₂. Ved en konfluens på 60-80% ble cellene splittet. Ved splitting ble gammelt dyrkingsmedium fjernet og cellene vasket 2 ganger med PBS (pH 7,4). For å løsne cellene fra petriskålen og bryte intracellulære interaksjoner ble cellene behandlet med 2 mL trypsin-EDTA (0,05% trypsin, 0,02% EDTA) i 45 sekunder ved RT. Overskuddsløsning av trypsin-EDTA ble fjernet før cellene ble inkubert i 5 min ved 37°C i normal atmosfære supplert med 5% CO₂. Løsnede celler ble resuspendert i dyrkingsmediet og sådd ut i en ny petriskål med en 1:10 eller 1:20 fortykning, og videre inkubert ved 37°C i normal atmosfære supplert med 5% CO₂.

3.2.6 Utsåing av COS-7 celler i 96-brønnsplate for reportergensystemet

COS-7 celler ble vasket og trypsinert som beskrevet i metode 3.2.5. Et lite volum av resuspendert celleløsning ble blandet 1:1 med det ikke-permeable fargestoffet trypan blå før celletettheten (av levende celler) ble bestemt ved bruk av et haemocytometer (Burker) og lysmikroskop. COS-7 celler ble sådd ut i en 96-brønnsplate der 100 µL dyrkingsmedium med en celletetthet på 5000 celler ble tilsatt hver brønn før platen ble inkubert ved 37°C i normal atmosfære supplert med 5 % CO₂.

3.2.7 Transfeksjon av COS-7 celler

Transfeksjon av COS-7 celler ble gjennomført 18-24 timer etter utsåing i 96-brønnsplater. En transfeksjonsblanding (Tabell 3.2) bestående av plasmidblanding, serumfritt medium (Opti-MEM) og transfeksjonsreagens (TransIT[®]LT-1 transfection kit (Mirus Bio)) ble blandet og inkubert i 30 min ved RT før den ble tilsatt til vekstmediumet. Gammelt vekstmedium ble fjernet fra 96-brønnsplaten og cellene ble tilsatt vekstmedium med transfeksjonsblandingen (101,3 µL /brønn) og deretter inkubert ved 37°C i en normal atmosfære supplert med 5% CO₂ i 24 timer.

Tabell 3.2 Reagenser for transfeksjonblanding

Komponent	Mengde per brønn (96-brønn plate)
Opti-MEM I	9 μ L
Plasmidblanding (1 μ g/ μ L)	0,1 μ L
TransIT-LT1	0,2 μ L
DMEM-10%FBS	92 μ L
Totalt	101,4 μ

Tabell 3.3 Plasmidmengde i hver brønn i 96-brønnsplaten

Plasmid	Mengde
(MH100)x4 tk luc	47,62 ng
pCMV- β -Gal	47,62 ng
pCMX-Gal4-ER α -LBD	4,76 ng

3.2.8 Eksponering av COS-7 celler for løsemiddelkontroll og testforbindelser

Reportergenanalyse ble utført på to forskjellige måter for henholdsvis å studere agonistiske og antagonistiske effekter på gmEr α . De to ulike eksperimentelle oppsettene er beskrevet under.

Agonistiske effekter av bisfenoler

Ligandeksponering av COS-7 celler ble gjort 24 timer etter transfeksjon. Testforbindelsene ble løst i ønsket løsemiddel og fortynnet i dyrkingsmedium med en konsentrasjon to ganger (2x) av den endelige eksponeringskonsentrasjonen. For å oppnå ønsket eksponeringskonsentrasjon (1x) (Tabell 3.4), ble 100 μ L dyrkingsmedium og 100 μ L av testforbindelsen (2x) tilsatt hver brønn etter at gammelt medium ble fjernet fra 96-brønnsplaten. Cellene ble i triplikater eksponert for testforbindelsene (Tabell 3.4). Løsemiddelkonsentrasjonen var alltid <1 %, og holdt konstant gjennom fortynningsrekken til testforbindelsene. Brønner med kun vekstmedium og løsemiddel (DMSO) ble brukt som ueksponert kontroll. EE2 ble brukt som agonist for positiv kontroll av aktivering av østrogenreseptor. Cellene ble eksponert i 24 timer ved 37°C i normal atmosfære supplert med

5 % CO₂. Eksponeringsforsøket ble gjennomført tre ganger for hver konsentrasjon av de ulike testforbindelsene brukt i oppgaven.

Tabell 3.4 Testforbindelser og konsentrasjoner brukt ved undersøkelse av agonistiske effekter

Testforbindelse	Konsentrasjon (µM)
BPA	25, 12,5, 6,25, 3,12, 2, 1,5, 0,8, 0,4, 0,08
BPE, BPG, BPS, BPF, BPFL, BADGE	50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,5, 0,8
BPB og BPTMC	20, 10, 2, 0,4, 0,08, 0,16, 0,003
BPC	50, 10, 2, 0,4, 0,08, 0,02, 0,003
BPAF	10, 2, 0,4, 0,08, 0,016, 0,003, 0,001
BPZ	50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,5, 0,4
EE2 (positiv kontroll)	400, 300, 100, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,5, 0,8, 0,4, 0,2, 0,1 (nM)

Antagonistiske effekter av bisfenoler

De tre bisfenolene BPG, BPFL og BADGE viste ingen agonistisk effekt på gmER α , og ble derfor videre undersøkt for antagonistiske egenskaper. Transfekterte COS-7 celler ble i disse forsøkene koeksponert for testforbindelse (bisfenol) og 1,5 nM EE2 (tilsvarer om lag EC₂₀) for å oppnå en bakgrunnsaktivering av gmER α reseptoren. Antagonistiske effekter kan dermed observeres som en nedgang i reseptoraktivering. Tillaging av endelig eksponeringskonsentrasjon (Tabell 3.5) for ligandene, samt eksponeringsprosedyre, ble utført på samme måte som beskrevet i avsnittet over. Tamoxifen ble brukt som positiv kontroll som en kjent antagonist av østrogenreseptoren i mammalske studier (Legler et al., 1999).

Tabell 3.5 Testforbindelse og konsentrasjoner brukt ved undersøkelse av antagonistiske effekter

Testforbindelse	Konsentrasjon
BPG, BPFL og BADGE	50,0, 16,67, 5,56, 1,58, 0,62, 0,21, 0,07, 0,02, 0,01 (μM)
Tamoxifen	10000, 1000, 100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001 (nM)

3.2.9 Lysering av celler og måling av luciferase- og β -galaktosidase aktivitet

Etter ligandeksponeringen ble eksponeringsmediet fjernet og COS-7 cellene lysert før luciferase- og β -galaktosidase aktiviteten ble bestemt. Lyseringsløsningen ødelegger cellemembranen og frigjør luciferase og β -galaktosidase enzymene fra cellene. Hver brønn ble tilsatt 125 μL lyseringsløsning (Tabell 2.13) og inkubert i 30 min ved RT på risteplate.

For måling av β -galaktosidase aktivitet ble 50 μL cellelysat fra hver brønn overført til en gjennomsiktig 96-brønnsplate. Hver brønn ble deretter tilsatt 100 μL av β -galaktosidase reaksjonsløsning (Tabell 2.15) og inkubert i ca. 20 minutter til en gul farge kom til syne. Absorbansen ble målt ved 420 nm ved bruk av en EnSpire 2300 plateleser (PerkinElmer). De gjenværende 50 μL av cellelysatet ble overført til en hvit 96-brønns luminescens-plate og tilsatt 100 μL luciferase reaksjonsløsning (Tabell 2.17). Måling av luciferaseaktivitet ble gjennomført øyeblikkelig etter at luciferase reaksjonsløsning ble tilsatt ved å måle luminiscens i en EnSpire 2300 plateleser.

Data fra ligandaktiveringsforsøkene ble bearbeidet i Microsoft Excel (versjon 16.28) der luciferaseverdiene målt i lysatet fra en gitt brønn ble normalisert ved å dividere på den korresponderende β -galaktosidase verdien. For å beregne fold endring i ligand-indusert luciferaseaktivitet ble de normaliserte luciferaseverdiene fra hver brønn delt på gjennomsnittet av løsemiddelkontrollene (DMSO). En-veis ANOVA med Dunnett's test ble brukt for å beregne signifikante forskjeller mellom eksponerte og ueksponerte celler i GraphPad PRISM (Versjon 8). Ikke-lineær regresjon i GraphPad PRISM ble brukt for å visualisere dose-responskurve og bestemmelse av EC_{50} .

3.2.10 Celleviabilitet

Celleviabiliteten ble målt for å undersøke om testforbindelsene brukt i reportergensystemet hadde cytotoxisk effekt på COS-7 cellene. Grunnet tidsbegrensing ble det ikke gjort undersøkelser av celleviabiliteten til COS-7 cellene under koeksponeringen av bisfenoler med EE2, og heller ikke for eksponering for tamoxifen. Resazurin, som er cellepermeabel og ikke-fluoriserende, ble brukt som en indikator på metabolsk aktivitet i cellene. I levende celler vil resazurin omdannes til en fluorescerende metabolitt som kan detekteres og kvantiseres fluorimetrisk. COS-7 celler ble sådd ut i 96 brønnsplater og inkubert i 48 timer ved 37°C normal atmosfære supplert med 5 % CO₂. Cellene ble deretter eksponert for tre konsentrasjoner av hver ligandforbindelse i 24 timer (Tabell 3.6). 1% og 0,1% Triton X-100 ble brukt som positiv kontroll på celledød. Etter eksponering ble 100 mL resazurinløsning (Tabell 2.18) tilsatt hver brønn og inkubert i 1 time ved 37°C i 5 % CO₂. Fluorescens ble avlest (eksitasjon ved 530 nm og emisjon ved 590 nm) med en plateleser (PerkinElmer). En-veis ANOVA (Graphpad Prism (versjon 8) ble benyttet for å beregne signifikante endringer i metabolsk aktivitet i eksponerte celler i forhold til løsemiddelkontrollen.

Tabell 3.6 Konsentrasjoner av testforbindelsene brukt i undersøkelse av celleviabilitet

Forbindelse	Konsentrasjon (µM)
BPA, BPB og BPF	50, 25 og 20
BPC, BPE, BPG, BPZ, BPAF, BPFL, BPTMC og BADGE	50, 25 og 12,5
BPS	200, 50 og 25
EE2 (positiv kontroll)	10, 1 og 0,1 (nM)

3.2.11 Påvisning av fusjonsproteinet Gal4-gmERα i COS-7 celler med protein immunoblotting

Klargjøring av proteinprøver

COS-7 celler ble vasket og trypsinert som beskrevet i metode 3.2.5 og resuspendert i 10 mL vekstmedium. Et lite volum av resuspendert celledøsning ble blandet 1:1 med trypan blå før celledettheten ble bestemt ved bruk av et haemocytometer (Burker). Cellene ble sådd ut i en 6-brønnsplate i 2.5 mL vekstmedium med en celledetthet på 600000 celler per brønn. Cellene ble inkubert ved 37°C i vanlig atmosfære supplert med 5 % CO₂ i 24 timer.

Etter 24 timer ble cellene transfektert med reseptorplasmidet pCMX-Gal4-DBD-ER α ved bruk av TransIT[®]LT-1 transfection kit (Mirus Bio). Transfeksjonsblandingen (Tabell 3.7) ble tillaget og inkubert i 30 min ved RT, før den ble tilsatt til vekstmediet. Gammelt vekstmedium ble fjernet fra 6-brønnsplaten og cellene ble tilsatt transfeksjonsblandingen (2.8 μ L /brønn) og deretter inkubert ved 37°C i normal atmosfære supplert med 5 % CO₂ i 24 timer.

Tabell 3.7 Reagenser for transfeksjon av celler benyttet til protein immunoblotting

Komponent	Mengde per brønn (96-brønn plate)
Opti-MEM I	250 μ L
Plasmid-miks (1000 μ g/ μ L)	2,5 μ L
TransIT-LT1	5 μ L
DMEM-10%FBS	2,5 mL

Cellene ble høstet 24 timer etter transfeksjon som beskrevet i metode 3.2.5 ved å bruke 500 μ L trypsin-EDTA per brønn. Cellene ble resuspendert i 1 mL vekstmedium og sentrifugert (100 x g i 10 min ved 4 °C). Etter sentrifugering ble vekstmediet fjernet og pelleten vasket med 1X PBS og videre sentrifugert (100 x g i 10 min ved 4 °C). PBS ble fjernet og pelleten ble lysert i 50 μ L Triton lysis buffer (Tabell 2.20). Cellene ble holdt på is i 10 minutter før de ble sentrifugert (22000 x g for 5 minutter at 4 °C) og lagret i -80 °C fryser.

Natriumdodecylsulfat polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE)

SDS-PAGE er en metode for å separere proteiner basert på molekylvekten. Proteinprøvene ble tilsatt 5X SDS-PAGE prøvebuffer som inneholder natriumdodecylsulfat (SDS) og β -merkapttoetanol (BME). SDS er basisk og negativt ladet og denaturerer proteinene til lineære polypeptidkjeder. Et protein vil binde 1,4 ganger sin molekylvekt av SDS, og binding til SDS vil gjøre proteinet negativt ladet ved å skjule proteinets opprinnelige ladning. Samtidig vil BME bryte disulfidbroer i proteinet og sørger for en komplett denaturering av proteinene der proteinene i prøven har samme ladning-til-masse ratio. På denne måten separerer SDS-PAGE proteiner basert på molekylvekt og ikke størrelsen på den tredimensjonale strukturen til proteinet.

For SDS-PAGE ble det brukt Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad) med 0,75 mm tykke geler. Det ble laget to parallelle geler, en til immunoblotting og en til totalfarging av protein i gel (Coomassie Brilliant Blue). Hver gel besto av en 12% separasjonsgel (Tabell 2.21) med en 4 % konsentrasjonsgel (stackinggel) (Tabell 2.22) på toppen. Etter gelene var polymerisert ble brønnskammene fjernet og 1X SDS-PAGE kjørebuffer (Tabell 2.23) ble tilsatt kammeret, før proteinprøvene ble applisert på gelen. En protein standard (BioRad, Precision Plus Protein All Blue) ble også tilsatt for molekylvekt-referanse. Gelene ble kjørt med en spenning på 200 V i 50 min.

Totalfarging av proteiner i gel med Coomassie Brilliant Blue (CBB)

For deteksjon av det totale proteininnholdet i gelen ble den ene SDS-PA gelen tilsatt med Coomassie Brilliant Blue R250-fargeløsning (InstantBlue™ Coomassie Protein Stain, Expedeon) og inkubert på en ristepate over natten. Fargeløsningen ble fjernet og gelen ble skylt i deionisert H₂O og deretter dokumentert med ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad).

Protein immunoblotting

COS-7 cellelysat ble først separert med SDS-PAGE. Proteinene ble deretter overført fra akrylamidgelen til en nitrocellulosemembran ved hjelp av elektroblotting. Dette ble utført ved at membranen først ble lagt i lagt i overføringsbuffer (Towbin buffer) (Tabell 2.24) sammen med filterpapir (samme størrelse som membranen) og to filterputer i 10 minutter. Den ferdige akrylamidgelen fra SDS-PAGE ble også lagt i Towbin buffer i 10 minutter før blotte-sandwichen ble satt sammen i gelkassetten. Blotte-sandwichen bestod av en filterpute nederst, etterfulgt av to filterpapir og membranen. Gelen ble plassert på membranen, og membranen ble dekket av to nye filterpapir, før den siste filterputen ble plassert på toppen. Gelkassetten med blotte-sandwichen ble plassert i en elektrodemodul i et elektroforesekammer (Bio-Rad) og kjørt med en spenning på 100 V i en time. Når proteinene var overført til membranen ble membranen blokkert med 5% tørrmelk (Tabell 2.27) og inkubert over natten for å blokkere alle ledige bindingsområder for å unngå uspesifikk binding av antistoff.

Neste dag ble membranen vasket med 0,05% TBS-Tween (Tabell 2.26) to ganger i 5 minutter. Etter vasking ble membranen inkubert i en time på ristepate sammen med primært antistoff

(mus-anti Gal4 antistoff (Santa Cruz Biotechnology)) fortynnet 1:500 i TBS-Tween. Deretter ble membranen vasket med TBS-tween 2 ganger i 5 minutter for å fjerne ubundet antistoff, før sekundært antistoff konjugert til pepperrotperoksidase (sau anti-mus IgG (HRP), GE Healthcare) fortynnet 1:2000 i TBS-tween ble tilsatt. Membranen ble på ny inkubert i 1 time på risteplate. For å fjerne overflødig sekundært antistoff ble membranen vasket 2 ganger i 5 minutter med TBS-tween. Deretter ble membranen vasket 5 minutter i MilliQ og forsiktig tørket på filterpapir. Protein-antistoff komplekset ble visualisert med kjemiluminescens ved tilsats av 1 ml ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) til membranen og inkubering i 3 minutter på RT. ECL inneholder substrat for HRP og HRP vil oksidere substratet i en reaksjon som avgir lys. Dette lyset indikerer proteinbånd der det sekundære antistoffet har bundet og ble detektert med ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad).

For å kontrollere proteinmengden applisert for hver prøve på membranen ble et antistoff som detekterer proteinet aktin benyttet. Den samme membranen ble igjen vasket 2 ganger i 5 minutter med TBS-tween og inkubert 1 time ved RT sammen det primære antistoffet mus-anti-beta aktin (Abcam) fortynnet 1:1000 in TBS-tween. Etter inkubering ble membranen vasket 2 ganger i 5 minutter med TBS-tween for å fjerne ubundet primært antistoff. Sekundært sau anti-mus IgG antistoff bundet til pepperrotperokidase (HRP) fortynnet 1:2000 i TBS-tween ble tilsatt og membranen ble inkubert i en time på RT. Deretter ble membranen vasket 5 minutter i MilliQ og tørket på filterpapir, og protein-antistoff komplekset ble visualisert som beskrevet over.

3.3 Presisjonskuttete leverskiver (PKLS)

Bisfenol-mediert aktivering/inhibering av østrogenreseptorsignalveien ble også studert *ex vivo* ved å eksponere presisjonskuttete leverskiver (PKLS) fra torsk for BPE, BPG, BPZ BPTMC og BPFL. Aktivering av østrogenreseptoren ble undersøkt ved å kvantifisere induksjonen av gmER α -målgenet vitellogenin (*vtg1*), både på transkriptnivå ved hjelp av kvantitativ PCR (qPCR), og på proteinnivå med bruk av ELISA. Tilstedeværelse av laktat dehydrogenase aktivitet i vekstmediumet ble brukt som en indikasjon på viabiliteten til leverskivene etter eksponering for testforbindelsene.

3.3.1 Preparering av PKLS

Metoden for å tillage PKLS er en modifisert versjon av metoden presentert i (Eide et al., 2014) og er beskrevet under. For å oppnå et semi-sterilt arbeidsmiljø ble disseksjonsutstyr autoklavert og arbeidsbenken vasket med 70% etanol. PKLS-buffer (Tabell 2.19) ble sterilfiltrert (0,22 μ m) og oppbevart ved 4 °C.

Torsken ble avlivet med et slag mot hodet, vasket med 70% etanol og veid. Torsken ble deretter åpnet fra den ventrale siden fra gattåpningen mot gjellene. Leveren ble dissekert ut og overført til en petriskål med PKLS-buffer før den ble veid. Blokker fra den sentrale delen av leveren ble snittet ut og overført til PKLS-medium (Tabell 2.9). Leica VT1200 S vibrating blade vibratome (LEICA biosystem, Tyskland) ble brukt for å tillage leverskivene. Leverblokken ble montert på en plattform med superlim (Loctite Superlim Super Glue Precision), plassert i et kar med PKLS-buffer og satt på is. For å få en jevn overflate på leverblokken ble det øverste laget snittet vekk før leverskiver ble preparert. Det ble benyttet en hastighet på 0,30 mm/sek og en tykkelse på 250 μ m under kuttingen av leverskivene. Leverskivene ble overført til en petriskål med PKLS-medium for videre oppdeling til mindre leverskiver (ca. 5x5 mm). Leveren, blokkene med levervev og leverskivene ble oppbevart på is til endelig antall leverskiver var preparert (n=24 x 3 leverskiver/plate). Leverskivene ble akklimatisert i inkubator ved 10 °C og svak horisontal ristebevegelse i 2 timer i påvente av eksponering.

Tre og tre leverskiver ble overført til hver brønn i en 24-brønnsplate for eksponering av ønsket testforbindelse. Hver brønn ble tilsatt 1 ml PKLS-medium og testforbindelsene i ønsket

konsentrasjon løst i DMSO (0,1% endelig DMSO-konsentrasjon), og inkubert i 48 (for qPCR analyse) eller 96 timer (for ELISA analyse) ved 10 °C og svak horisontal ristebevegelse. Etter eksponering ble leverskivene og mediet (1000 µL) høstet og lagret ved henholdsvis -80 °C og -40 °C for videre analyse.

3.3.2 Eksperimentelt design for eksponering av leverskiver

Det ble gjennomført tre eksponeringsforsøk for både 48 og 96 timers eksponering. I hvert eksponeringsforsøk ble det brukt ett individ (samme individ for 48 og 96 timer) og tre leverskiver ble eksponert for samme testforbindelse og konsentrasjon (Tabell 3.8) De tre replikate leverskivene ble høstet og lagret sammen. For hver testforbindelse ble 0.1 % DMSO brukt som løsemiddelkontroll, og tre ulike konsentrasjoner av testforbindelsen ble benyttet. EE2 (Tabell 3.8) ble brukt som positiv kontroll på aktivering av østrogenreseptorsignalveien.

Tabell 3.8 Oversikt over testforbindelser og konsentrasjon brukt for å eksponere PKLS

Testforbindelse	Konsentrasjon (µM)	n (antall fisk)
BPA	1,10,100	3
BPB	1,10,100	3
BPC	1,10,100	3
BPE	1,10,100	3
BPF	1,10,100	3
BPG	1,10,100	3
BPS	1,10,100	3
BPZ	1,10,100	3
BPAF	1,10,100	3
BPTMC	1,10,100	3
BPFL	1,10,100	3
BADGE	1,10,100	3
EE2 (kontroll)	0,1, 1, 10 (nM)	3

3.3.3 Isolering av total RNA

RNA fra leverskivene ble ekstrahert ved bruk av trizol (TriReagent, Sigma) etter leverandørens instruksjoner. Levervevet ble holdt frossent på flytende nitrogen helt til TriReagent ble tilsatt og homogenisert ved hjelp av en mekanisk homogenisator. Kloroform ble deretter tilsatt og prøvene sentrifugert for å oppnå en faseseparasjon der det øverste laget inneholdt RNA. De to andre lagene inneholdt DNA og proteiner. 200 μ L ble forsiktig pipettert ut fra det øverste laget og tilsatt isopropanol (100%) for presipitering av RNAet. RNA ble så pelletert ved hjelp av sentrifugering og vasket 2 ganger med 75% etanol før pelleten ble lufttørket. RNA-pelleten ble videre løst i RNase-fritt deionisert vann (25 μ L). RNA-konsentrasjon (ng/ μ L) og RNA-renhet ble målt spektrofotometrisk (NanoDrop-One Thermo Scientific). RNA-integriteten ble vurdert ved bruk av agarose gelelektroforese (metode 3.3.4).

RNA-konsentrasjonen ble målt ved 260 nm som er den bølgelengden der nukleinsyrer absorberer maksimalt lys. Renheten til RNA ble vurdert ved å undersøke forholdet mellom to ulike absorbanseforhold ($A_{260/230}$ og $A_{260/280}$). For rent RNA bør $A_{260/280}$ -verdien ligge mellom 1,8 og 2. Proteiner absorberer lys ved 280 nm og en $A_{260/280}$ verdi under 1,8 kan indikere kontaminering av proteiner i prøven. Kaotriske salter og fenoler absorberer lys ved 230 nm og en $A_{260/230}$ -verdi under 1,8 kan indikere kontaminering.

3.3.4 RNA-elektroforese

Agarose gelelektroforese (AGE) ble brukt for å vurdere RNA integriteten. En agarose gelløsning på 1,2% ble tillaget (tabell 2.11) og GelRed (0,5 μ L) ble tilsatt løsningen for å visualisere nukleinsyrene etter elektroforesen. TBE-buffer (0,5X) ble brukt for tillaging av agarosegelen og som elektroforesebuffer (Tabell 2.10). RNA-prøvene (200 ng) ble så tilsatt formamid (50% v/v) for å bryte sekundærstruktur, deionisert H₂O og 10 x appliseringsbuffer. Prøvene ble varmebehandlet i 10 min på 65°C for å sikre denaturering av RNA. Prøvene ble deretter applisert på gelen og 2-log DNA ladder ble brukt som molekylvektstandard. Elektroforesen ble kjørt i 45 min på 90 V før gelen ble fotografert med Gel Doc™ EX Imager (Bio-Rad).

3.3.5 Syntese av komplementær DNA (cDNA)

Fra RNA-prøvene isolert fra PKLS ble komplementært DNA (cDNA) syntetisert ved hjelp av iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) etter leverandørens protokoll (Tabell 3.9 og Tabell 3.10) (Tabell 2.2). Det ble tillaget en løsning med revers transkriptase (RT) og en reaksjonsmiks som ble tilsatt 500 ng RNA templat. Reaksjonsmiksen består av dNTP, revers transkriptase-buffer og to typer primere; oligo (dT) som består av tyminbaser som binder poly-A halen til mRNA, og randomisert heksamere-primer som binder tilfeldige steder på mRNA-molekylene.

Tabell 3.9 komponenter for cDNA syntese ved bruk av iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad).

Komponent	Volum (μL)
5x iScript Reaction Mix	4.0
iScript Reverse Transcriptase	1.0
Nukleasefritt vann	Variabel
RNA-templat	Variabel (tilsvarende 500 ng)
Total	20

Tabell 3.10 Reaksjonsprotokoll for cDNA syntese ved bruk av iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad).

Program	Temp. (°C)	Tid (min)
Priming	25	5
Revers transkripsjon	46	20
RT-inaktivering	95	1
Hold (valgfritt)	4	Uendelig

3.3.6 Kvantitativ sanntids polymerase kjedereaksjon (qPCR)

Kvantitativ sanntids polymerasekjedereaksjon (qPCR) baserer seg på samme prinsipp som tradisjonell polymerasekjedereaksjon (PCR). PCR er en metode for å enzymatisk amplifisere spesifikke områder på DNA (gentranskript) gjennom en rekke temperatursykluser. Hver syklus består av tre trinn hvor temperaturen endres mellom hvert trinn som på denne måten gjør at temperaturavhengige reaksjoner skjer i en bestemt rekkefølge. Første trinn er denaturering

av dobbeltrådig DNA ved at temperaturen heves til 95-98 °C. Temperaturøkningen bryter hydrogenbindingene mellom basene i DNA, og DNA separeres til to enkeltråder (templat). I neste trinn vil temperaturen senkes til 55-60 °C som lar spesifikke primere hybridisere med DNA-trådene der hvor amplifikasjonen skal starte. Binding av primere er nødvendig siden DNA polymerase krever dobbeltrådig DNA for å starte replikasjonen. Primere er korte syntetiske oligoer av DNA som er komplementære til startstedet i DNA tråden som skal amplifiseres. Temperaturen økes igjen i trinn tre til 72 °C som er optimalt for at enzymet DNA polymerase skal kunne syntetisere en komplementær DNA-tråd fra templatet. Den nye DNA-tråden er avgrenset av primerene på templatet og vil fungere som nytt templat når en ny syklus starter. Dette fører til en dobling av templat etter hver syklus og resulterer i en eksponentiell økning av den amplifiserte sekvensen.

qPCR gjør det mulig å kvantifisere mengden DNA som amplifiseres i hver syklus. En forbindelse som fluoriserer når den binder til dobbeltrådet DNA tilsettes reaksjonen og en økning i lysintensitet vil være proporsjonal med mengde amplifisert DNA. Terskelverdien (C_t) er antall sykluser det tar før lysintensiteten overgår bakgrunnsignalet og forteller når det oppstår en eksponentiell økning av gentranskriptet. C_t er invers korrelert med den opprinnelige mengden av gentranskriptet i prøven ved start og korrelerer med antall amplifiseringer av gentranskriptet. En lav C_t verdi indikerer derfor større mengde av gentranskriptet sammenlignet med en høyere C_t verdi. qPCR gjør det dermed mulig å beregne relativ folds økning av genuttrykk.

qPCR reaksjonsblanding

For qPCR analyse ble det brukt LightCycler® 480 SYBR Green I Master Mix (Roche) etter produsentens anbefalinger (Tabell 2.2). cDNA prøvene ble fortynnet 1:10 dH₂O og tilsatt i triplikater (5 µL) til en 96-brønns Hard-Shell® PCR Plates (Bio-Rad). Det ble tillaget en reaksjonsmiks med 10 µL SYBR Green mastermix og 5 µL av forward og revers primermix (0,2 µM), og 15 µL av reaksjonsmiksen ble tilsatt hver brønn. Platen ble dekket med Microseal® 'B' Seal fra Bio-Rad og sentrifugert ved 500 x g i 2 min ved 4°C, før platen ble kjørt i CFX96™ Real-Time System C1000™ Thermal Cycler fra Bio-Rad med programmet beskrevet i Tabell 3.11.

Tabell 3.11 Program brukt til qPCR

Trinn	Temp. (°C)	Tid	Sykluser
Enzymaktivering	95	3 min	1
Denaturering	95	10 s	
Hybridisering	55	10 s	39
Polymerisering	72	30 s	
	95	10 s	
Smeltekurve	65	5 s	1
	95	50 s	

Standardkurve

Det ble laget en standerkurve for primerparene (Tabell 3.12) benyttet for å amplifisere genene *vtg1* og *actb* i qPCR reaksjonen. Fem tilfeldige RNA prøver isolert fra PKLS etter 48 timers eksponering for bisfenoler ble blandet, og 500 ng ble brukt til cDNA syntese. cDNA ble fortynnet 1:10 og videre seriefortynnet i en 2-folds fortynningsserie. Fortynningserien ble brukt som templat i qPCR reaksjonen for å lage standarkurven til primerparene.

Tabell 3.12 Nukleotidsekvensen til primerparene brukt i qPCR analyse

Primer	Retning	Basesekvens 5'-3'
<i>vtg1</i>	F	AGACTGGCCTGGTCGTCAA
	R	GCGAGGATAGAGGCAGGGAT
<i>actb</i>	F	CGACGGGCAGGTCATCACCATCG
	R	CCACGTCGCACTTCATGATGCTGT

Behandling av qPCR data

Relativ økning av *vtg1* uttrykk ble beregnet ut fra terskelverdien (C_t) ved bruk av komparativ C_t metode (kjent som $2^{-\Delta\Delta C_t}$) siden effektiviteten til primerene brukt i denne oppgaven tidligere har vist >90% effektivitet (Schmittgen and Livak, 2008). For å kompensere for variasjoner i mengde templat i prøvene ble *vtg1* uttrykk normalisert mot referansegene *actb*. C_t verdiene fra qPCR målingene ble behandlet i Microsoft Excel (versjon 16.28) der $2^{-\Delta\Delta C_t}$

verdier ble beregnet og fold endring i *vtg1* uttrykk ble regnet ut relativt til løsemiddelkontrollen (DMSO). For å beregne signifikante endringer i *vtg1* uttrykk mellom eksponeringskonsentrasjonene og løsemiddelkontrollen ble en en-veis ANOVA med Dunnett's test benyttet. Statistiske beregninger ble utført i Graphpad Prism (versjon 8).

Smeltekurveanalyse

Det ble gjennomført en smeltekurveanalyse for å undersøke renheten til qPCR produktene etter endt program. Produktene ble gradvis varmet opp fra 65 °C til 95 °C hvor DNA fragmentene denatureres langsomt. Reduksjon i mengde fluorescens gir et mål på DNA denaturering som plottes langs y-aksen og temperatur plottes langs x-aksen. Det forventes at prøver som har amplifisert et spesifikt produkt har samme smeltepunkt og visualiseres som en distinkt topp på smeltekurven. Om det er blitt dannet fragmenter av primerdimerer eller uspesifikk binding av primerene vil dette vises som flere topper i kurven.

3.3.7 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Proteinnivået av VTG i mediet fra eksponerte leverskiver ble bestemt med ELISA. Denne immunologiske metoden benytter den spesifikke bindingen mellom et antistoff og VTG for å kvantifisere mengden VTG i en prøve. I denne oppgaven ble det brukt «sandwich» ELISA, der antigenet (her VTG) bindes mellom to antistoffer som gjenkjenner to ulike epitoper. Bunnene til brønnene i en mikrotiterplate er dekket med et immobilisert antistoff som binder til antigenet i prøvene. Ubundet antigen og andre proteiner som er tilstede i prøven fjernes dermed gjennom ulike vaskesteg. Et sekundært antistoff tilsettes som gjenkjenner og binder til en annen epitop på antigenet, og det dannes en antistoff-antigen «sandwich» der antigenet er bundet mellom to antistoffer. Et tredje enzym-konjugert antistoff tilsettes som binder antistoff-antigen «sandwichen». Enzymaktiviteten av det konjugerte enzymet bestemmes ved å tilsette en forbindelse som enzymatisk omdannes til et farget produkt. Fargeintensiteten er direkte proporsjonal med mengde antigen og måles ved bruk av spektrofotometri.

For ELISA analyser ble det brukt Cod Vitellogenin ELISA kit (BIOSENSE Laboratories) etter leverandørens protokoll (Tabell 2.2). Prøvene ble fortynnet (1:3) med fortynningsbuffer (1% BSA i PBS, 0,05% Tween-20). Duplikater av fortynnet prøve (100 µL) og standardprøver (100

μL , inkludert i kit) ble tilsatt til en 96-brønns mikrotiterplate. På hver plate ble det i tillegg inkludert brønner til blank-prøver for å måle uspesifikk binding (NSB-brønner). Platen ble forseglet og inkubert 1 time ved $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for binding av VTG til antistoff. Etter inkubering ble brønnene vasket tre ganger med $200\text{ }\mu\text{L}$ vaskebuffer (PBS, 0,05% Tween-20). Hver brønn ble tilsatt $100\text{ }\mu\text{L}$ sekundært antistoff før platen på ny ble forseglet og inkubert i 1 time ved $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Brønnene ble på ny vasket med vaskebuffer og $100\text{ }\mu\text{L}$ enzym-konjugert antistoff ble tilsatt før platen ble forseglet og inkubert 1 time ved $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. I siste steg ble brønnene vasket fem ganger med vaskebuffer før $100\text{ }\mu\text{L}$ TMB substrat ble tilsatt til brønnene. Platen ble beskyttet mot lys og inkubert ved romtemperatur i 20 min. Reaksjonen ble stoppet ved å tilsette $100\text{ }\mu\text{L}$ $0,3\text{ M}$ H_2SO_4 . Absorbansen ble målt på 450 nm ved bruk av en EnSpire 2300 plateleser (PerkinElmer).

Bakgrunnsignalet (NSB) ble trukket fra absorbansverdiene, og gjennomsnittsverdien til prøvereplikatene ble regnet ut. VTG konsentrasjonen ble beregnet ut fra standardkurven tillaget fra de medfølgende standardprøvene. En en-veis ANOVA med Dunnetts test ble benyttet for å beregne signifikant endring i proteinnivå av VTG mellom eksponerte og ueksponerte leverskiver. Statistiske beregninger ble utført i Graphpad Prism (Versjon 8).

3.7.8 Viabilitetsanalyse av PKLS

Endringer i laktat dehydrogenase (LDH)-aktivitet i vekstmediet ble brukt som en indikasjon på viabiliteten til leverskivene etter eksponering for testforbindelsene. LDH er et cytosolisk enzym som befinner seg i alle vev og katalyserer reduksjonen av pyruvat til laktat med NADH som en kofaktor. Ved skader på cellens plasmamembran som følge av en cytotoxisk respons vil LDH frigjøres fra cellen ut til mediet. Økt LDH nivå i mediet er en indikator på redusert membranintegritet og celledød.

LDH-analyse ble utført ved hjelp av Cytotoxicity Detection kit (LDH) (Roche) etter produsentens instruksjoner (Tabell 2.2). Analysene er basert på kolorimetriske reaksjoner der tetrazolium salt (gul farge) omdannes av LDH enzym til formazan salt (rød farge), og måles ved bruk av spektrofotometri. Det ble samlet PKLS-medium ($1000\text{ }\mu\text{L}$) både ved 48 timer og 96 timer eksponering, som ble oppbevart ved $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ for videre analyse. Mediumet ble tint på is før triplikater av $50\text{ }\mu\text{L}$ fra hver mediumprøve ble tilsatt til en 96-brønnsplate. En reaksjonsmik

som inneholder tetrazolium ble tilsatt hver brønn (50 μ L). 96-brønnsplaten ble pakket inn i aluminiumsfolie for beskyttelse mot lys og inkubert i romtemperatur i 20-25 min. Absorbansen ble målt ved 490 nm ved bruk av Perkin Elmer Enspire 2300 Multilable Plate Reader. En-veis ANOVA med Dunnets test ble brukt for å beregne signifikante endringer i cytotoxicitet mellom de ulike eksponeringskonsentrasjonene og løsemiddelkontrollen. Statistiske beregninger ble utført i Graphpad Prism (versjon 8).

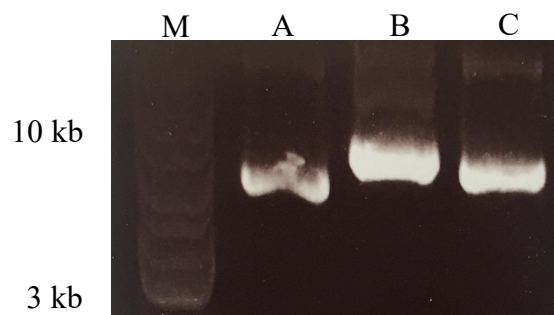
4. Resultater

4.1 *In vitro* aktivering av gmER α

For å undersøke om ulike bisfenolforbindelser kan opptre som agonister eller antagonister for gmER α *in vitro*, ble det benyttet et luciferase-basert reportergensystem. Det måtte imidlertid gjennomføres en rekke forberedende forsøk før reportergensystemet kunne tas i bruk.

4.1.1 Kontroll av kvalitet og integritet til plasmider brukt i reportergensystemet

Reseptor (pCMX-Gal4-ER α)-, reporter ((mh100)x4tk-luciferase)- og kontrollplasmidet (pCMX- β -galaktosidase) som ble benyttet i reportergensystemet ble isolert fra transformerte *E. coli* bakteriekulturer med prosedyren beskrevet i metode 3.2.2. Konsentrasjonen og renheten av plasmidene ble målt spektrofotometrisk (Tabell 4.1), og både $A_{260/280}$ og $A_{260/230}$ -ratioene indikerte lite eller ingen kontaminering av prøvene. Konformasjonen til plasmidene ble videre undersøkt med agarose gelelektroforese (Figur 4.1). Hovedvekten av plasmidene i de tre plasmidpreparatene vandret i gelen med en tilsynelatende supertvunnet konformasjon. Denne konformasjon er ønskelig for å oppnå en effektiv transfeksjon av plasmidene inn i COS-7 cellene som benyttes i reportergensystemet.



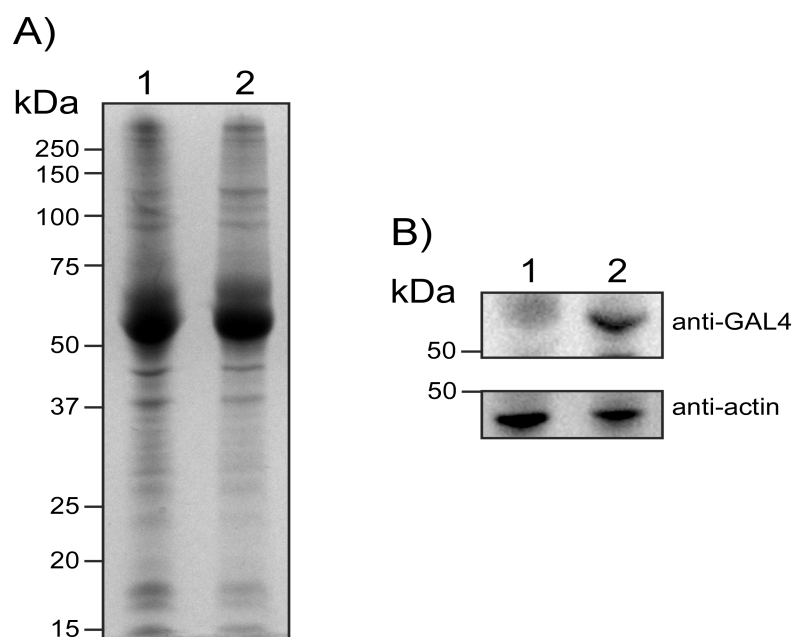
Figur 4.1. Kontroll av konformasjonen til plasmidene brukt i reportergensystemet. Reseptorplasmid pCMX-Gal4-ER α (gmER α) (A), reporterplasmid (mh100)x4tk-luciferase (B) og kontrollplasmid pCMX- β -galaktosidase (C) ble separert i en 1,6 % agarosegel. 200 ng av hvert plasmid ble applisert på gelen. M= log 2 referansemarkør (200 ng) (New England Biolabs).

Tabell 4.1 Konsentrasjon og renhet av plasmider benyttet i reportergensystemet

Plasmid	Konsentrasjon (ng/ μ L)	A _{260/280}	A _{260/230}
pCMX-Gal4-ER α	716	1,87	2,35
(mh100)x4tk luciferase	1454	1,91	2,30
pCMX- β -galaktosidase	1485	1,86	2,32

4.1.2 Ekspresjon av Gal4-gmER α fusjonsproteinet i COS-7 celler

For å bekrefte syntesen av Gal4-gmER α i transfekterte COS-7 celler ble cellelysat undersøkt med SDS-PAGE og immunoblotting med bruk av antistoff som gjenkjenner og binder til Gal4-DBD delen av fusjonsproteinet. Proteinprøvene ble separert i to parallelle SDS-PA geler, hvor den ene gelen ble farget med CBB for å fastslå totalt proteininnhold påsatt gelen, mens den andre ble benyttet til immunoblotting for en påvisning av fusjonsproteinet (Figur 4.2 A). Gelen farget med CBB viser at proteinene i COS-7 cellelysate hadde blitt separert under elektroforesen, og at om lag lik mengde protein var applisert i hver brønn i gelen (Figur 4.2 A). Membranen benyttet til immunoblotting ble probet med anti-Gal4 antistoff og anti-beta-aktin antistoff, før det sekundære antistoffet ble tilsatt for å visualisere bindingen av de primære antistoffene. Gal4-gmER α -fusjonsproteinet ble påvist som et spesifikt bånd i cellelysatprøvene fra transfekterte COS-7 celler, mens det som forventet var fraværende i de ikke-transfektete cellene (Figur 4.2 B). Beta-aktin ble påvist i både transfektete og ikke-transfektete celler (Figur 4.2 B)

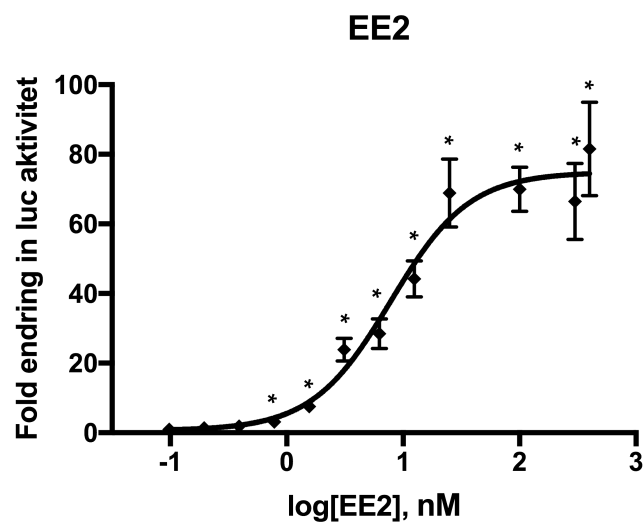


4.2 Påvisning av Gal4-ER α -fusjonsprotein i transfekterte COS-7 celler ved bruk av SDS-PAGE

og immunoblotting. A) Cellelysate fra ikke-transfekte COS-7 celler (1) og cellelysate fra COS-7 celler transfektert med pCMX-Gal4-ER α reseptorplasmid (2) ble separert i en 12% SDS-PA-gel og farget med Coomassie Brilliant Blue. B) Korresponderende PA-gel som vist i A) blottet over på en PVDF membran. Membranen ble behandlet med mus anti-Gal4 antistoff og mus anti-beta-aktin antistoff fortynnet 1:1000 i TBS-tween, før det sekundære antistoffet sau anti-mus IgG ble tilsatt (fortynnet 1:2000 i TBS-tween). Det ble applisert 10 μ g protein i hver brønn.

4.1.3 Etynyløstradiol (EE2) aktiverte gmER α *in vitro*

EE2 er kjent for å kunne aktivere ER α i en rekke ulike arter, inkludert teleoster, og ble brukt som en positiv kontroll for aktivering av gmER α i reportergensystemet. COS-7 celler ble transfektert med plasmider brukt i reportergensystemet, og luciferaseaktivitet ble avlest etter 24 timers eksponering med EE2 som beskrevet i metode 3.2.7 og 3.2.8. Dataene viste en tydelig dose-respons aktivering av gmER α (Figur 4.3), der den laveste konsentrasjonen som viste en signifikant aktivering av reseptoren var 0,8 nM EE2 med en gjennomsnittlig fold aktivering på 3,1 ($p \leq 0.0001$). Aktivering av reseptoren nådde et platå fra om lag 400 nM med en fold aktivering på omkring 80 ($p \leq 0.0001$). EC50 verdien ble beregnet til $7,82 \pm 0,002$ nM.



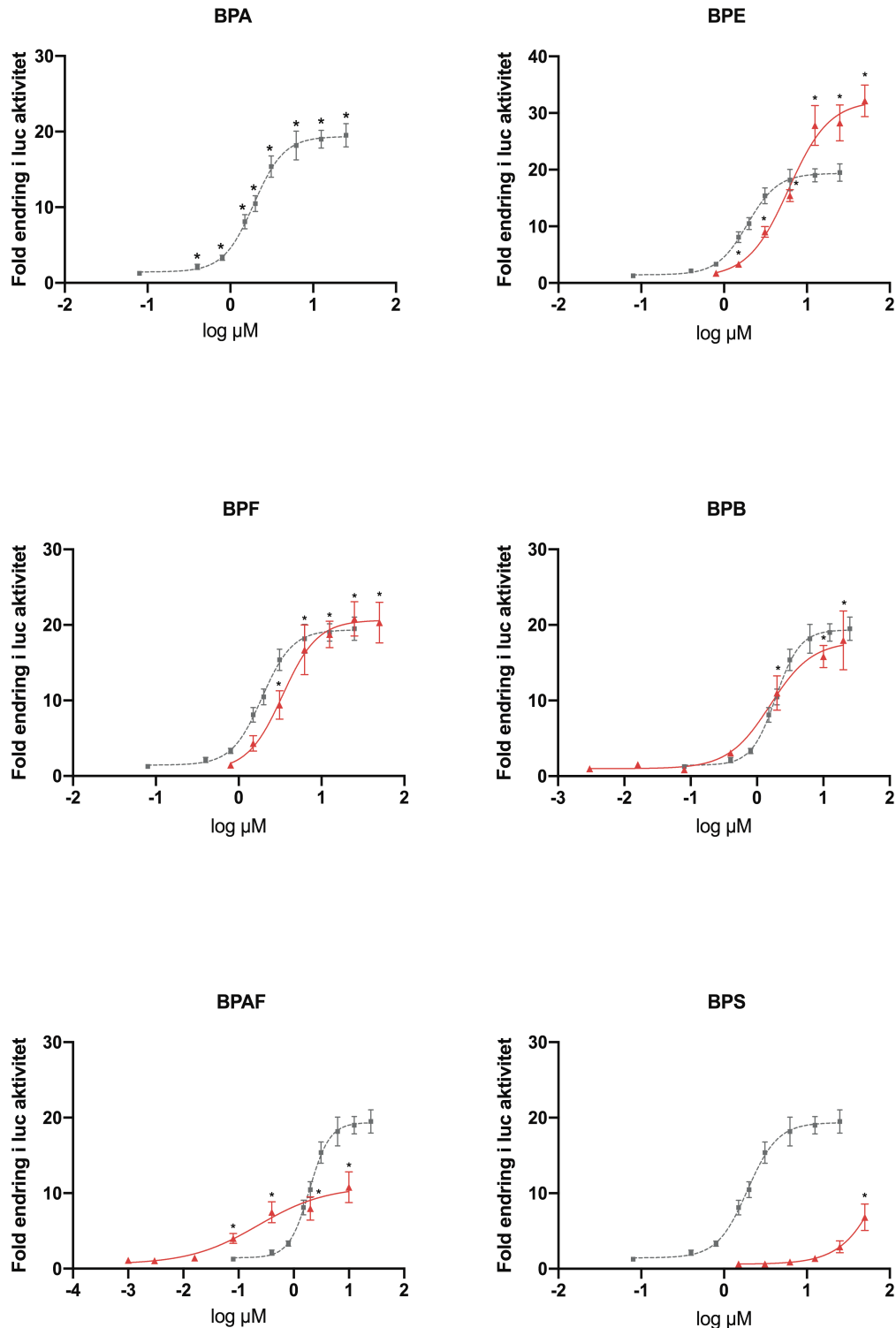
Figur 4.3 Ligandaktivering av gmER α i COS-7 celler eksponert for etynyløstradiol (EE2). COS-7 celler ble transfektert med reseptorplasmid (pCMX-Gal4-ER α -LBD), reporterplasmid (mh100)x4tk luc) og kontrollplasmid (pCMX- β -galaktosidase), og eksponert for ulike konsentrasjoner av EE2 i 24 timer. Aktivering av Gal4-gmER α er vist som relativ foldending i luciferaseaktivitet i eksponerte celler i forhold til celler eksponert for løsemiddelkontroll (0,05% DMSO). Hvert punkt indikerer gjennomsnittet av tre eksponeringsforsøk med tre replikater per konsentrasjon \pm SEM. Ikke-lineær regresjon ble brukt for å visualisere dose-responskurven. Signifikans er indikert som * = $p \leq 0.0001$.

4.1.5 Aktivering av gmER α av bisfenolforbindelser

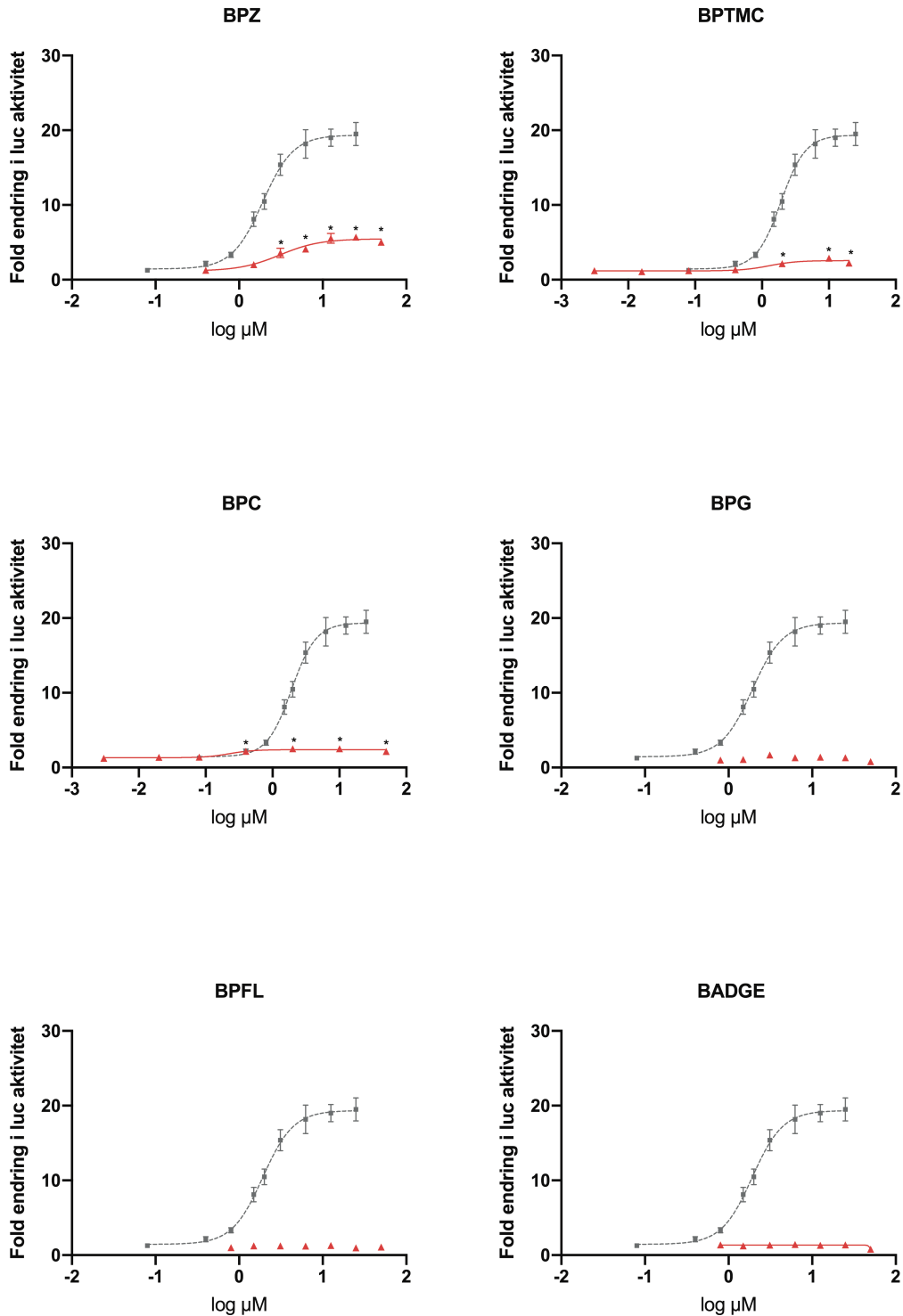
Reportersystemet ble videre benyttet for å undersøke om tolv ulike bisfenolforbindelser kunne virke som ligander og agonistisk aktivere gmER α (Figur 4.4 og 4.5). Av de tolv ligandene som ble testet var det ni bisfenoler som aktiverte reseptoren (Tabell 4.2). Eksponering for BPA medførte en laveste signifikant endring (også kjent som LOEC) i luciferaseaktivitet ved 0,4 μ M, og viste en gradvis økning i aktivering med økende konsentrasjon. Maksimal aktivering (også kjent som E_{max}) for BPA ble beregnet til $19,5 \pm 1,5$ fold ved 25 μ M (Tabell 4.2). Tilsvarende, så ble det observert en dose-respons aktivering av gmER α etter eksponering for BPB, BPE, BPF, BPS, BPZ og BPAF. Basert på virkeevne, målt som maksimal aktivering av bisfenolene som aktiverte reseptoren, var rangeringen som følgende; BPE > BPF > BPA > BPB > BPAF > BPS > BPZ > BPTMC > BPC. Høyeste virkeevne ($32,2 \pm 2,8$ fold) ble observert etter eksponering for 50 μ M BPE, som også var signifikant høyere enn den maksimale aktiveringen oppnådd av BPA ($p > 0,05$). BPC og BPTMC var blant bisfenolene som hadde signifikant lavere maksimalaktivering enn BPA ($p > 0,05$). BPAF var den bisfenolforbindelsen som gav en

signifikant aktivering ($4,0 \pm 0,2$ fold) av gmER α ved laveste eksponeringskonsentrasjon (0,08 μ M). Konsentrasjoner for maksimal- og lavest signifikante aktivering av gmER α for bisfenolforbindelsene er vist i Tabell 4.2.

For bisfenolforbindelsene som oppnådde et platå for maksimalaktivering ble det beregnet EC₅₀ verdier (Tabell 4.3). Rangering av bisfenolene etter deres potensitet var som følger; BPC = BPAF > BPTMC > BPB > BPA > BPZ > BPF > BPE. EC₅₀ verdien for BPAF og BPC ble for begge forbindelsene beregnet til $0,2 \pm 0,1$ μ M. Til sammenligning viste EC₅₀ verdien til BPA å være signifikant høyere ($p > 0,05$) og ble beregnet til $1,9 \pm 0,2$ μ M. COS-7 celler eksponert for BPG, BPFL og BADGE viste ingen dose-respons aktivering av gmER α ved de konsentrasjonene som ble benyttet i eksponeringsforsøkene.



Figur 4.4 Ligandaktivering av gmER α i COS-7 celler eksponert for BPA, BPE, BPF, BPB, BPAF og BPS. COS-7 celler ble transfektert med reseptorplasmid (pCMX-Gal4-ER α -LBD), reporterplasmid ((mh100)x4tk luc), og kontrollplasmid (pCMX- β -galaktosidase), og eksponert for økende konsentrasjoner av seks ulike bisfenoler i 24 timer. For sammenligning er dose-respons kurven for BPA (panel øverst til venstre) også plottet sammen med dose-respons kurvene for hver av de fem andre bisfenolforbindelsene vist i figuren. BPA er indikert med grå linje/firkantete indikatorer, mens de andre bisfenolforbindelsene er indikert med rød linje/trekantete indikatorer. Aktivering av Gal4-ER α er vist som relativ foldendring i luciferaseaktivitet i eksponerte celler i forhold til celler eksponert for løsemiddelkontroll (0,1%-0,05% DMSO). Hvert punkt indikerer gjennomsnittet av tre eksponeringsforsøk med tre replikater per konsentrasjon \pm SEM. Ikke-lineær regresjon ble brukt for å lage dose-responskurvene. For å betrakte gmER α som signifikant aktivert av testforbindelsene ble det satt et minimumskrav på en to-folds endring i aktivering. Statistisk signifikans er indikert som * = $p < 0.05$.



Figur 4.5 Ligandaktivering av gmER α i COS-7 celler eksponert for BPZ, BPTMC, BPC, BPG, BPFL og BADGE. COS-7 celler ble transfektert med reseptorplasmidet (pCMX-Gal4-ER α -LBD), reporterplasmidet ((mh100)x4tk luc) og kontrollplasmidet (pCMX- β -galaktosidase), og eksponert for økende konsentrasjoner av seks ulike bisfenoler i 24 timer. For sammenligning er dose-respons kurven for BPA (Fig. 4.5) også plottet sammen med dose-respons kurvene for hver av de seks andre bisfenolene vist i figuren. BPA er indikert med grå linje/firkantete indikatorer, mens de andre bisfenolforbindelsene er indikert med rød linje/trekantete indikatorer. Aktivering av Gal4-ER α er vist som relativ foldendring i luciferaseaktivitet i eksponerte celler i forhold til celler eksponert for løsemiddelkontroll (0,1%-0,05% DMSO). Hvert punkt indikerer gjennomsnittet av tre eksponeringsforsøk med tre replikater per konsentrasjon \pm SEM. Ikke-lineær regresjon ble brukt for å lage dose-responskurvene. For å betrakte gmER α som signifikant aktivert av testforbindelsene ble det satt et minimumskrav på en to-folds endring i aktivering. Statistisk signifikans er indikert som * = $p < 0,05$

Tabell 4.2 Konsentrasjoner for maksimal- og lavest signifikante aktivering av gmER α

Testforbindelse	Maksimal aktivering (E_{max})			Laveste aktivering (LOEC)		
	Kons. (μ M)	Fold \pm SEM	p-verdi (ANOVA)	Kons. (μ M)	Fold \pm SEM	p-verdi (ANOVA)
BPA	25	19,5 \pm 1,5	<0,0001	0,4	2,1 \pm 0,3	0,002
BPB	20	17,9 \pm 3,9	0,002	2,0	11 \pm 2,3	0,0024
BPC	10	2,5 \pm 0,3 *	0,0003	0,4	2,2 \pm 0,2	0,0002
BPE	50	32,2 \pm 2,8 *	<0,0001	1,5	3,3 \pm 0,5	<0,0001
BPF	25	20,8 \pm 1,7	<0,0001	3,125	9,4 \pm 1,9	0,0214
BPS	50	6,8 \pm 1,8 *	0,0073	50	6,8 \pm 1,8	0,0073
BPZ	25	5,7 \pm 0,4 *	<0,0001	3,125	3,6 \pm 0,6	0,0050
BPAF	10	10,8 \pm 2,1 *	<0,0001	0,08	4,0 \pm 0,2	0,015
BPTMC	10	2,9 \pm 0,2 *	<0,0001	2,0	2,1 \pm 0,2	<0,0001

* indikerer statistisk signifikant forskjellig maksimal aktivering av reseptoren sammenlignet med BPA. ($p > 0,05$) t-test

Tabell 4.3 EC₅₀ verdi for bisfenoler som signifikant aktiverte gmER α

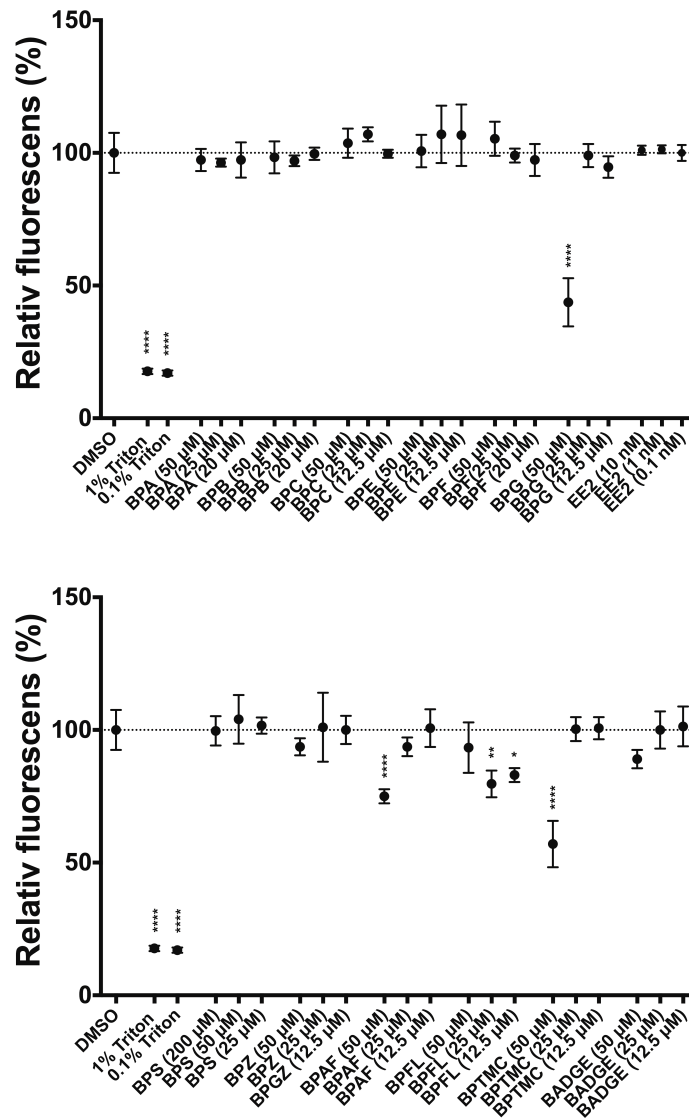
Testforbindelse	EC ₅₀ (μ M \pm SD)
BPA	1,9 \pm 0,2
BPB	1,6 \pm 0,4
BPC	0,2 \pm 0,1 *
BPE	6,0 \pm 0,9 *
BPF	3,4 \pm 0,9*
BPZ	3,1 \pm 1,9
BPAF	0,2 \pm 0,1 *
BPTMC	1,3 \pm 0,9

* indikerer statistisk signifikant forskjellig EC₅₀ verdi sammenlignet med BPA. ($p > 0,05$) t-test.

4.1.6 Cytotoksiske effekter i COS-7 cellene etter ligandeksponering

For å overvåke om ligand-konsentrasjonene som ble brukt i reporter gensystemet hadde cytotoxisk effekt på COS-7 cellene, ble bisfenolenes effekt på cellenes metabolske aktivitet analysert med et cytotoxissitetsassay (Figur 4.6). Ikke-transfektete celler ble eksponert for tre konsentrasjonene av hver testsforbindelse i 24 timer, og deretter behandlet med en resazurinløsning som beskrevet i metode 3.2.10. Det ble observert en signifikant reduksjon av fluorescenssignal hos COS-7 celler eksponert for den høyeste konsentrasjonen (50 μ M) av

BPAF, og ved eksponering for 25 μM og 12,5 μM BPFL (Tabell 4.4). COS-7 cellenes metabolske aktivitet ble også redusert etter eksponering for 50 μM BPG og BPTMC, som viste en nedgang på henholdsvis 57% og 43% (Tabell 4.4). Resten av testsforbindelsene, med de respektive eksponeringskonsentrasjonene som ble benyttet, viste ingen signifikante endringer i metabolsk aktivitet sammenlignet med løsemiddelkontrollen (Figur 4.6).



Figur 4.6 Metabolsk aktivitet i COS-7 celler etter ligandeksponering. COS-7 celler ble eksponert for tre høye konsentrasjoner av testforbindelse relevant for reporter gen eksponeringsforsøket. Eksponering for 0,1% og 1,0 % Triton X-100 ble brukt som positiv kontroll på nedgang i metabolsk aktivitet. Cytotoksisk respons i COS-7 cellene ble definert som nedgang i redusert fluorescenssignal i forholdt til løsemiddelkontrollen (0,1% DMSO). Løsemiddelkontrollen er satt til 100% (stiplet linje). Signifikans er indikert som * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, **** = $p \leq 0,0001$.

Tabell 4.4. Nedgang i metabolsk aktivitet i COS-7 celler etter ligandeksponering

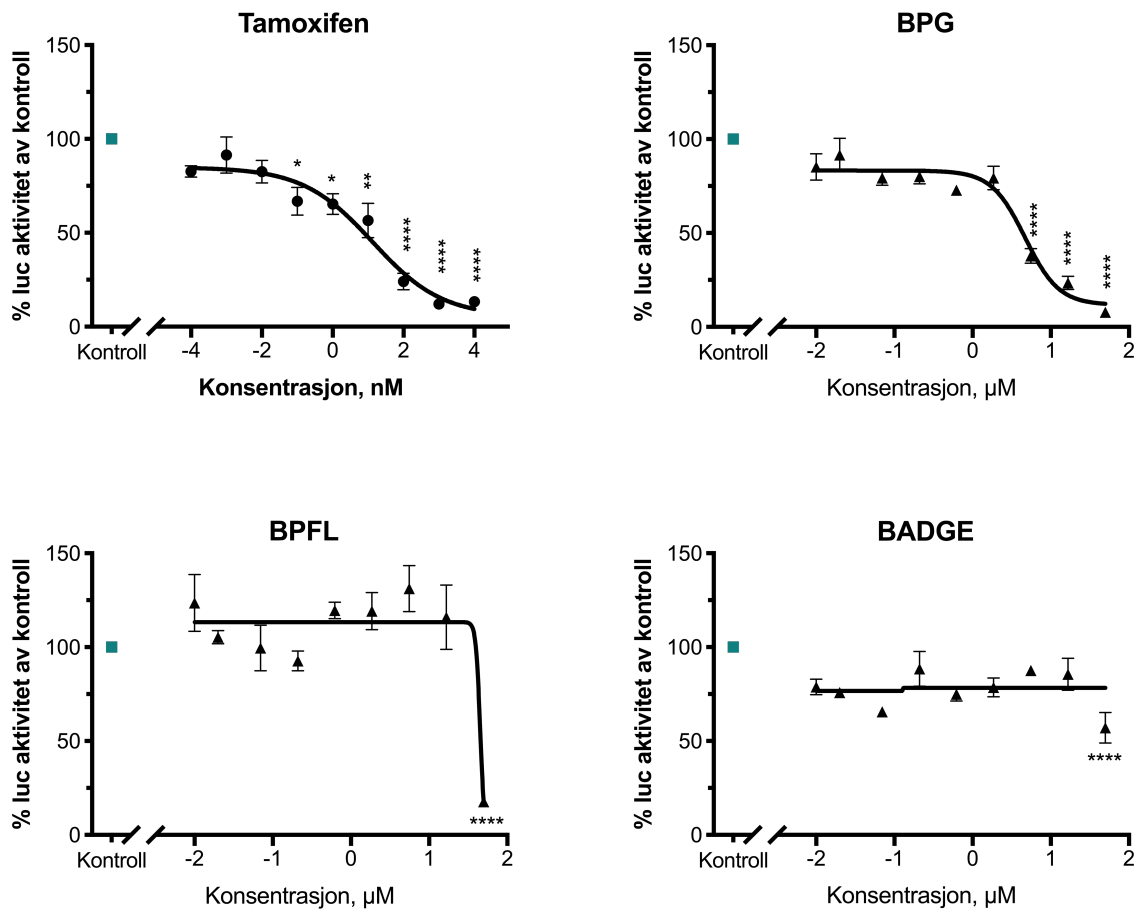
Eksponeeringsforbindelse	Konsentrasjon (μM)	% nedgang i fluorescens-signal
BPG	50	57
BPTMC	50	43
BPAF	50	25
BPFL	25	21
	12,5	17

4.1.7 Antagonistiske effekter på gmER α

De tre bisfenolforbindelsene BPG, BPFL og BADGE viste ingen aktivering av gmER α i reportergensystemet, og ble derfor videre undersøkt for å kunne opptre som antagonister for reseptoren. Reportergensystemet ble nå benyttet i et antagonistisk oppsett hvor transfekterte COS-7 celler ble koeksponert for økende konsentrasjoner av bisfenolforbindelsen sammen med en konstant konsentrasjon av EE2 (1,5 nM) som beskrevet i metode 3.2.8. Tamoxifen er en kjent antagonist for ER α i en rekke ulike arter, og ble brukt som en positiv kontroll for inhibering av gmER α aktivering.

Det ble observert en tydelig dose-respons inhibering av gmER α aktivitet etter eksponering for tamoxifen (Figur 4.7). Laveste konsentrasjon som viste en signifikant nedgang i EE2-mediert aktivering var 0,1 nM tamoxifen, som resulterte i en nedgang på 33 % ($p < 0.05$) sammenlignet med løsemiddelkontrollen. Den høyeste eksponeringskonsentrasjonen viste en reduksjon i aktivering på 87% ($p < 0,0001$), og det ble beregnet en IC₅₀ (konsentrasjon som gir 50% inhibering av reseptor aktivitet) på 13,3 nM. På tilsvarende måte, medførte eksponering for BPG en gradvis nedgang i EE2-mediert aktivering med økende konsentrasjon av BPG, og IC₅₀ ble beregnet til 4,7 μM . Laveste konsentrasjon som viste signifikant nedgang var 5,56 μM , med en reduksjon i aktivering på 63 %. Høyeste eksponeringskonsentrasjon (50 μM) viste en signifikant nedgang på 92% sammenlignet med løsemiddelkontroll.

COS-7 celler koeksponert for BPFL eller BADGE sammen med 1,5 nm EE2 viste ingen signifikant nedgang i EE2-mediert aktivitet med unntak av ved høyeste eksponeringskonsentrasjon (50 μM) som ga en nedgang på henholdsvis 83% og 43%.



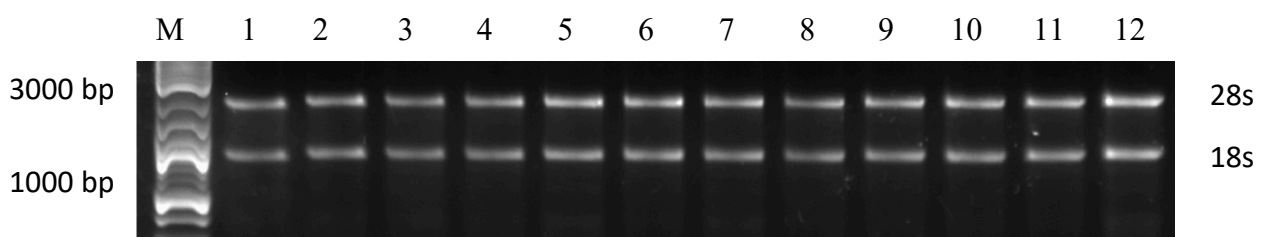
Figur 4.7 Inhibering av EE2-mediert gMER α aktivering i COS-7 celler koeksponert for EE1, BPG, BPFL, BADGE og Tamoxifen. COS-7 celler ble transfektert med reseptorplasmid (pCMX-Gal4-ER α -LBD), reporterplasmid ((mh100)x4tk luc), og kontrollplasmid (pCMX- β -galaktosidase). Cellene ble deretter koeksponert for økende konsentrasjoner av de ulike bisfenolene sammen med 1,5 nM EE2 i 24 timer. Inhibering av gMER α aktivering er vist som % nedgang i luciferaseaktivitet i eksponerte celler i forhold til celler eksponert for løsemiddelkontroll (0,1 % DMSO, og indikert som blå firkant i hver graf). Hvert punkt indikerer gjennomsnittet av to eksponeringsforsøk med tre replikater per konsentrasjon \pm SEM. Ikke-lineær regresjon ble brukt for å lage dose-responskurvene. Signifikans er indikert som * = $p \leq 0.05$, * * = $p \leq 0.01$, * * * = $p \leq 0.001$, * * * * = $p \leq 0.0001$.

4.2 Aktivering av østrogenreseptorsignalveien *ex vivo* etter eksponering for bisfenolforbindelser

Presisjonskuttete leverskiver ble videre brukt for å studere østrogene effekter av bisfenolene *ex vivo*. Leverskiver fra torsk ble eksponert for 1, 10 og 100 μM BPE, BPG, BPZ, BPTMC og BPFL i henholdsvis 48 og 96 timer. RNA ble isolert fra leverskiver eksponert i 48 timer og ble brukt i qPCR analyse for å undersøke påvirkning på uttrykning av østrogenreseptor målgenet, vitellogenin (*vtg1*) (metode 3.3.6). Nivåer av VTG-proteinet ble samtidig analysert i mediet fra leverskiver eksponert i 96 timer ved bruk av ELISA (metode 3.3.7).

4.2.1 Induksjon av *vtg1* i PKLS eksponert for bisfenoler

RNA ble isolert fra eksponerte leverskiver og brukt som templat for cDNA-syntese og videre qPCR analyser. For å sikre fullgode templat for qPCR analyser ble kvaliteten og integriteten til RNA-prøvene kontrollert spektrofotometrisk og ved bruk av agarose gelelektroforese. For alle RNA-prøvene var $A_{260/280}$ verdien over 1,8 som indikerer ingen eller lite kontaminering av proteiner i prøvene. $A_{260/230}$ verdien varierte i større grad mellom prøvene, og for noen prøver var verdien lavere enn 2. De lave $A_{260/230}$ verdiene kan indikere noe kontaminering av fenoler eller kaotropske salter. To tydelige bånd i agarosegelen ved 2300 og 1200 bp representerer henholdsvis 18S og 28S ribosomalt RNA, og indikerer lite nedbrytning av RNA (Figur 4.8). Det ble observert to distinkte bånd i alle prøvene som ble brukt til videre analyser av genuttrykk.



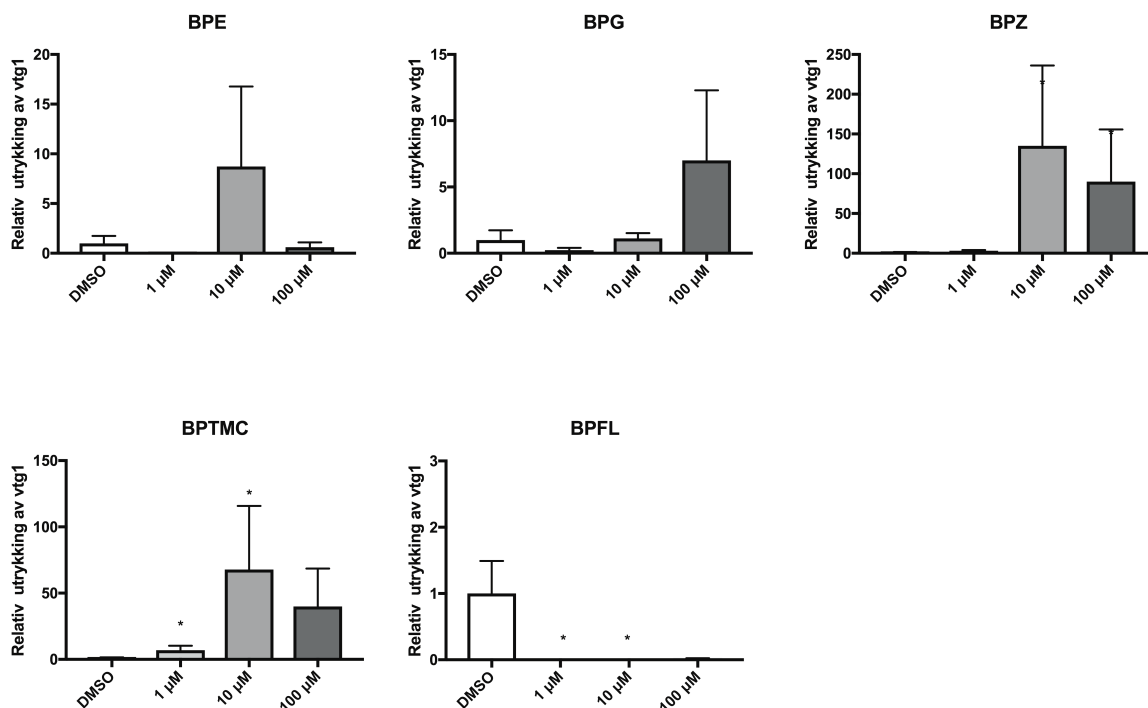
Figur 4.8 Kontroll av integritet av RNA-prøvene isolert fra PKLS. Figuren viser kun et representativt utvalg av RNA-prøver isolert fra leverskiver eksponert for løsemiddelkontroll (1% DMSO, prøve 1, 5 og 9) og 1, 10 og 100 μM av BPE (prøve 2-4), BPG (prøve 6-8) og BPZ (Prøve 10-12). 200 ng RNA ble applisert på gelen i hver brønn og prøvene er separert på en 1,2% agarosegel. M= log 2 referansemarkør (200 ng) (New England Biolabs).

qPCR ble benyttet for å studere påvirkning på transkripsjonen av $E\alpha$ -målgenet *vtg1* (Figur 4.9). For sammenligningens skyld, er det i denne oppgaven vist tilsvarende geneekspressjons data fra leverskiver eksponert for BPA, BPF, BPS, BADGE og EE2 som tidligere hadde blitt utført i forskningsgruppen (Figur 4.10). Transkriptnivå av *vtg1* ble normalisert mot referansegenet *actb*, og eksponering for EE2 ble brukt som positiv kontroll for aktivering av østrogenreseptorsignalveien (Figur 4.10). Leverskiver eksponert for 10 μ M og 100 μ M BPA viste en signifikant oppregulering av *vtg1* i leverskivene med henholdsvis 76,6 fold og 429,1 fold økning i transkriptnivå sammenlignet med løsemiddelkontroll (Tabell 4.5). En signifikant økning i *vtg1* uttrykning ble også observert i leverskiver eksponert for BPF, BPTMC og BPZ (Figur 4.10, Figur 4.11, Tabell 4.5) Eksponering for 10 μ M BPE og 100 μ M BPG gav også en økning i *vtg1* uttrykning på henholdsvis 8,7 og 7,0 fold i forhold til løsemiddelkontrollen, men denne økningen var ikke statistisk signifikant. Til forskjell fra de andre testforbindelsene ga eksponering for BPFL en nedregulering i transkripsjonen av *vtg1*. For eksponering av både 1 μ M og 10 μ M BPFL var nedreguleringen signifikant i forhold til løsemiddelkontroll. Eksponering for BADGE viste ingen økning i *vtg1* uttrykk for noen av konsentrasjonene benyttet i denne oppgaven. Eksponering av leverskiver for BPC, BPB og BPAF har også blitt utført, men endring av *vtg1* uttrykning har foreløpig ikke blitt studert.

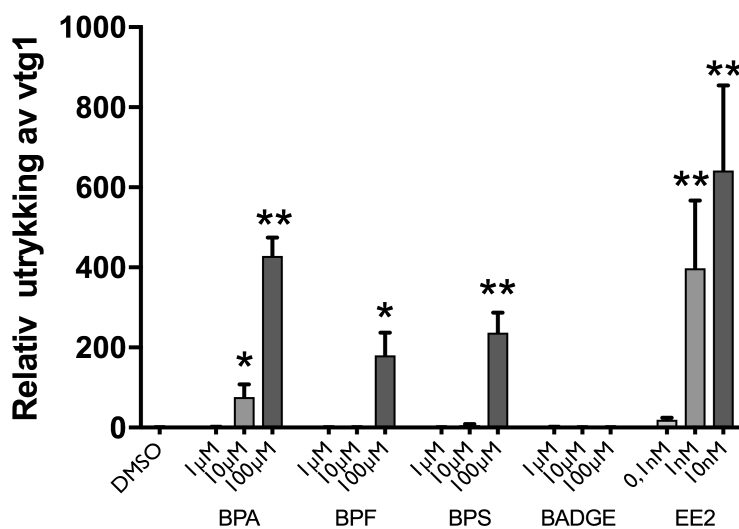
Tabell 4.5 Endring i relativ uttrykning av *vtg1* i PKLS fra torsk eksponert for ulike bisfenolforbindelser

Testforbindelse	Konsentrasjon	Relativ uttrykning av <i>vtg1</i>
BPA	10	76,6 \pm 31,3 *
	100	429,1 \pm 45,24 *
BPE	10	8,7 \pm 6,3
BPF	100	180,4 \pm 56,9 *
BPG	100	7,0 \pm 5,3
BPS	100	237,4 \pm 49,7 *
BPZ	10	135,2 \pm 100,9*
	100	90,01 \pm 66,7 *
BPTMC	1	6,9 \pm 3,2 *
	10	67,8 \pm 48,0 *
	100	39,9 \pm 39,9
BPFL	1	0,002 \pm 0,003 *
	10	0,001 \pm 0,01*
EE2 (positiv kontroll)	1 (nM)	397,9 \pm 169,5 *
	10 (nM)	641,9 \pm 212,4 *

* indikerer signifikant endring i *vtg1* transkriptnivå sammenlignet med løsemiddelkontroll



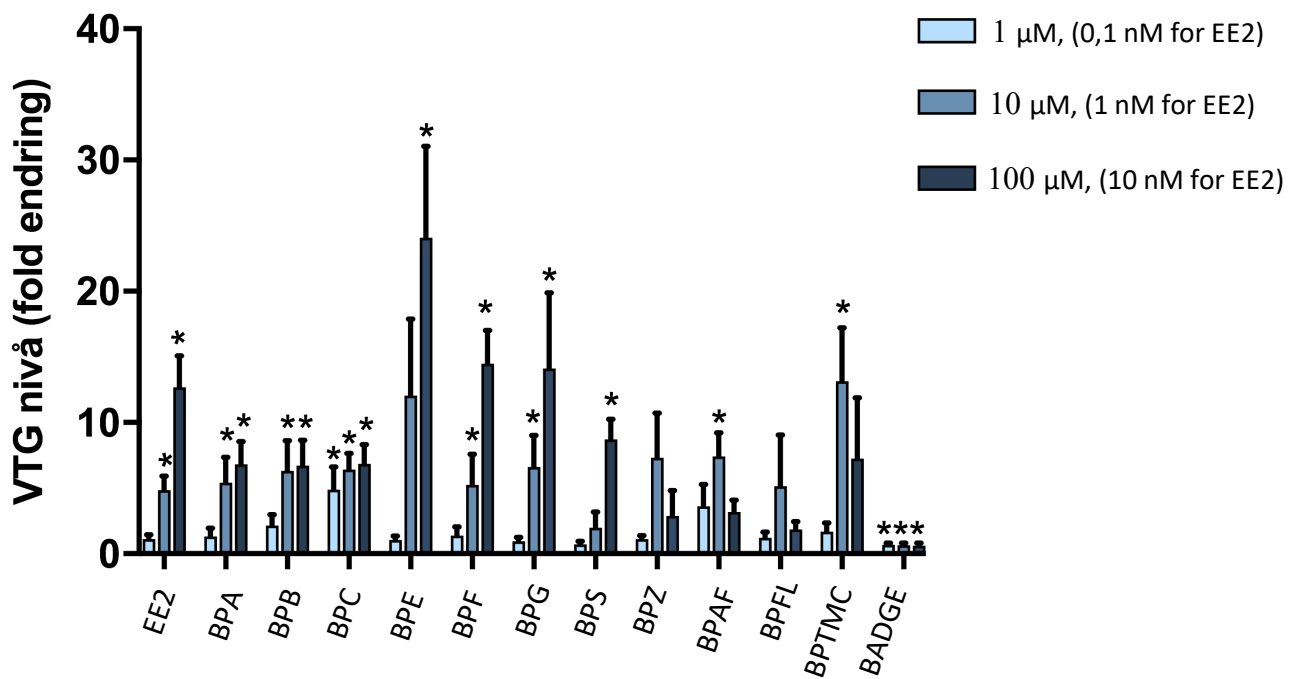
Figur 4.9. Relativ uttrykning av *vtg1* i PKLS fra torsk eksponert for BPE, BPG, BPZ, BPTMC og BPFL. PKLS fra torsk (n=3) ble eksponert for 1, 10 og 100 µM av bisfenolforbindelsene i 24 timer. Grafene viser foldendring ± SEM i transkriptnivået av *vtg1* normalisert mot referansegnetet *actb* i forhold til løsemiddelkontrollen (0,1% DMSO). Statistisk signifikans er indikert som * = p ≤ 0,05.



Figur 4.10 Relativ uttrykning av *vtg1* i PKLS fra torsk eksponert for BPA, BPF, BPS, BADGE og EE2. PKLS fra torsk (n=4) ble eksponert for 1, 10 og 100 µM av bisfenolforbindelsene i 24 timer. Eksponering for 0,1, 1 og 10 nM EE2 ble inkludert som en positiv kontroll på aktivering av østrogenreseptorsignalveien. Grafen viser foldendring ± SEM i transkriptnivået av *vtg1* normalisert mot referansegnetet *actb* i forhold til løsemiddelkontrollen (0,1% DMSO). Statistisk signifikans er indikert som * = p ≤ 0,05, ** = p ≤ 0.01. Eksperimenter og dataanalyse ble utført av forsker Fekadu Yadetie i miljøtoksikologigruppen på BIO, UiB.

4.2.2 Økt proteinnivå av VTG i mediumet fra PKLS eksponert for bisfenoler

I tillegg til å se på endring av *vtg1* på transkriptnivå i leverskiver eksponert mot bisfenoler, ble også proteinnivået av VTG i mediet undersøkt med ELISA. Disse analysene viste at eksponering for majoriteten av bisfenolforbindelsene førte til signifikant økte VTG nivåer i dyrkningsmediumet (Figur 4.11). Oversikt over fold endring av VTG ved eksponering for de ulike bisfenolforbindelsene er vist i tabell 4.6. Som forventet viste eksponering for EE2 (1 og 10 nM) signifikant økte nivåer av VTG på henholdsvis 4,8 og 12,7 fold sammenlignet med løsemiddelkontroll. BPA viste også en signifikant fold endring i VTG nivå i mediet ved en eksponeringskonsentrasjon på 10 og 100 µM. Blant de andre bisfenolforbindelsene var det kun eksponering for BPZ og BPFL som ikke resulterte i en signifikant endring i VTG nivå ved minst en av eksponeringskonsentrasjonene som ble benyttet. Til forskjell fra *in vitro* forsøkene der BPG viste antagonistiske egenskaper, viste leverskiver eksponert for 10 og 100 µM BPG signifikant økning i VTG nivå i mediumet. Leverskiver eksponert for 100 µM BPE viste høyest foldendring (24,0 fold) av alle bisfenolforbindelsene. Som eneste bisfenolforbindelsen undersøkt i denne oppgaven viste BADGE en signifikant nedgang i VTG nivå for alle eksponeringskonsentrasjonene (1, 10 og 100 µM).



Figur 4.11. VTG nivået i vekstmediet fra PKLS eksponert for ulike bisfenoler og EE2. PKLS fra frorsk ble eksponert for 1, 10 og 100 μM av BPA, BPB, BPC, BPE, BPF, BPG, BPS, BPZ, BPAF, BPFL, BPTMC og BADGE i 96 timer. Eksponering for EE2 (0,1, 1 og 10 nM) ble brukt som positiv kontroll på aktivering av østrogenreseptorsignalveien. Nivået av VTG i mediet i PKLS ble målt ved bruk av ELISA (Cod Vitellogenin ELISA kit (BIOSSENSE Laboratories)). Grafen viser VTG nivå oppgitt i fold endring sammenlignet med løsemiddelkontroll (0,1% DMSO) og hver søyle representerer gjennomsnittet (\pm SEM). $n=8$ fisk for BPE, BPG, BPZ, BPTMC og BPFL. $n=10$ fisk for EE2, BPA, BPB, BPC, BPF, BPS, BPZ, BPAF. $n=3$ for BADGE. Statistisk signifikans er indikert som $* = p \leq 0,05$. Eksperimenter og dataanalyse fra leverskiver eksponert for BPA, BPB, BPC, BPF, BPS, BPAF, BADGE og EE2 ble utført av forsker Fekadu Yadetie i miljøtoksikologigruppen på BIO, UiB.

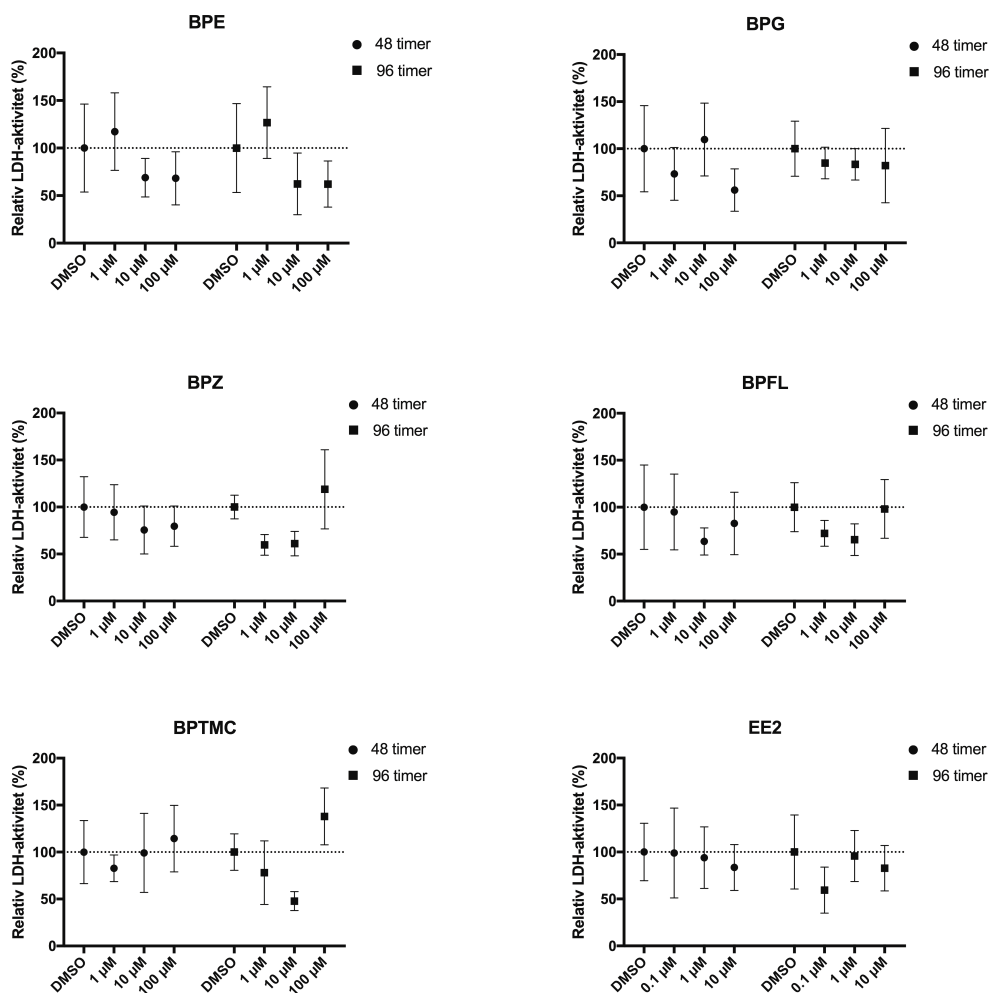
Tabell 4.6. Endring i VTG nivå i mediet fra leverskiver eksponert for bisfenolforbindelser

Testforbindelse	Konsentrasjon (μM)	VTG nivå (fold endring)
BPA	10	$5,4 \pm 1,9^*$
	100	$6,8 \pm 1,7^*$
BPB	10	$6,3 \pm 2,3^*$
	100	$6,7 \pm 1,9^*$
BPC	1	$4,8 \pm 1,7^*$
	10	$6,4 \pm 1,2^*$
	100	$6,8 \pm 1,5^*$
BPE	10	$12,1 \pm 5,8$
	100	$24,0 \pm 6,9^*$
BPF	10	$5,3 \pm 2,3^*$
	100	$14,5 \pm 2,5^*$
BPG	10	$6,6 \pm 2,4^*$
	100	$14,1 \pm 5,8^*$
BPS	100	$8,7 \pm 1,5^*$
BPZ	10	$7,3 \pm 3,4$
BPAF	1	$3,6 \pm 1,6$
	10	$7,4 \pm 1,8^*$
	100	$3,2 \pm 0,1$
BPFL	10	$5,2 \pm 3,9$
BPTMC	10	$13,3 \pm 4,1^*$
	100	$7,2 \pm 4,6$
BADGE	1	$0,7 \pm 0,1^*$
	10	$0,7 \pm 0,1^*$
	100	$0,6 \pm 0,2^*$
EE2 (positiv kontroll)	1 (nM)	$4,8 \pm 1,1^*$
	10 (nM)	$12,7 \pm 2,4^*$

* indikerer signifikant endring i VTG nivå sammenlignet med løsemiddelkontroll

4.2.3 Viabilitetsanalyse av PKLS etter 48 og 96 timers eksponering

Får å undersøke om bisfenol-eksponeringen påvirket viabiliteten til leverskivene, ble aktiviteten av LDH i vekstmediumet undersøkt som beskrevet i metode 3.7.8. Frigjøring av LDH kan indikere skader i cellenes plasmamembran og celledød. Viabiliteten til leverskivene ble uttrykt som økt LDH-aktivitet i forhold til løsemiddelkontroll (0,1% DMSO) (Figur 4.12). Ingen signifikant økning i LDH-aktivitet, hverken ved 48 eller 96 timer, ble påvist etter eksponering for BPE, BPG, BPZ, BPFL, BPTMC og EE2. LDH-aktivitet i mediumet fra leverskiver eksponert for de resterende bisfenolene (BPA, BPB, BPC, BPF, BPS, BPAF og BADGE) ble utført av Fekadu Yadetie, og viste ingen signifikant økning i LDH aktivitet for disse forbindelsene (Vedlegg A).



Figur 4.12 LDH-aktivitet i medium fra PKLS etter 48 og 96 timer eksponering for BPE, BPG, BPZ, BPFL, BPTMC og EE2. Relativ-LDH aktivitet i vekstmedium til PKLS eksponert for fem ulike bisfenoler og EE2 i henholdsvis 48 og 96 timer. Cytotoksisitet indikeres av økt LDH-aktivitet i forhold til løsemiddelkontroll som er justert til 100% (0,1% DMSO, indikert som stiplet linje). Hvert punkt representerer gjennomsnittet av tre eksponeringsforsøk \pm SEM.

5. Diskusjon

Den omfattende bruken av bisfenoler i industrien, og tilstedeværelsen av disse forbindelsene i ulike forbruksvarer, har i den senere tid fått økt oppmerksomhet grunnet potensielt hormonforstyrrende egenskaper (EFSA, u.å). Spesielt har forskning knyttet til effekter av BPA-eksponering på mennesker vært en pådriver for dette (Ehrlich et al., 2012, Kandaraki et al., 2011, Meeker et al., 2009). Industriens tilsvarende på den økte oppmerksomheten omkring BPA har vært å erstatte BPA med bisfenolforbindelser som har svært lik struktur og innehar mange av de samme fysikalsk-kjemiske egenskapene. Det er imidlertid ikke godt kartlagt om disse bisfenolene også kan virke hormonforstyrrende, hverken i mennesker eller andre organismer. I denne oppgaven har målet vært å få kunnskap om et sett av tolv ulike bisfenoler kan virke hormonforstyrrende gjennom å aktivere/inhibere østrogenreseptorsignalveien i atlantehavstorsk. Dette har blitt undersøkt både *in vitro* og *ex vivo* ved å henholdsvis benytte et luciferase-basert reporter-gen system og presisjonskuttete leverskiver. De østrogene egenskapene til bisfenolene har samtidig blitt vurdert opp mot BPA ved å sammenligne deres potensitet og virkeevne (oppsummert i Tabell 5.1).

I *in vitro* forsøkene ble det vist at ni bisfenoler (BPA, BPB, BPC, BPF, BPE, BPS, BPZ, BPTMC, BPAF) evnet å aktivere reseptoren og virke som gmER α agonister. Dette ble bekreftet i *ex vivo* studier med leverskiver, der eksponering for de samme bisfenolene resulterte i induksjon av gmER α målgenet *vtg1*, enten på transkriptnivå eller proteinnivå.

Tabell 5.1 Oversikt over resultater fra *in vitro* og *ex vivo* forsøkene

Testforbindelse	<i>In vitro</i>			<i>Ex vivo</i>	
	EC ₅₀	E _{max}	LOEC	Vtg1	VTG
	µM	Fold / µM	µM / fold	µM / fold	µM / fold
BPA	1,9	19,5 / 25,0	0,4 / 2,1	10 / 76,6‡ 100 / 429,1‡	10 / 5,4‡ 100 / 6,8‡
BPB	1,6	17,9 / 20,0	2,0 / 11	I.A	10 / 6,3‡ 100 / 6,7‡
BPC	0,2 *	2,5 * / 10,0	0,4 / 2,2	I.A	1 / 4,8‡ 10 / 6,4‡ 100 / 6,8‡
BPE	6,0 *	32,2 * / 50,0	1,5 / 3,3	10 / 8,7	10 / 12,1 100 / 24,0‡
BPF	3,4	20,8 / 25,0	3,125 / 9,4	100 / 180,4‡	10 / 5,3‡ 100 / 14,5‡
BPG	4,7 (IC ₅₀)	-/-	-/-	100 / 7,0	10 / 6,6‡ 100 / 14,1‡
BPS	I.B.	6,8* / 50,0	50,0 / 6,8	100 / 237,4‡	100 / 8,7‡
BPZ	3,1	5,7 * / 25,0	3,125 / 3,6	10 / 135,2‡ 100 / 90,01‡	10 / 7,3
BPAF	0,2 *	10,8 * / 10,0	0,08 / 4,0	I.A	1 / 3,6 10 / 7,4‡ 100 / 3,2
BPTMC	1,3	2,9 * / 10,0	2,0 / 2,1	1 / 6,9‡ 10 / 67,8‡ 100 / 39,9	10 / 13,3‡ 100 / 7,2
BPFL	I.B.	-/-	-/-	1 / 0,002‡ 10 / 0,001‡	10 / 5,2
BADGE	I.B.	-/-	-/-	-/-	1 / 0,7‡ 10 / 0,7‡ 100 / 0,6‡

fold= foldendring sammenlignet med løsemiddelkontroll (DMSO), *= EC₅₀ signifikant forskjellig fra BPA (p<0,05, TTEST), ‡=signifikant fold endring (p<0,05, ANOVA), I.A= Ikke analysert, I.B.= EC₅₀ kunne ikke (I) bestemmes (B) p.g.a ingen aktivering, eller ved at et aktiveringsplata ikke ble oppnådd. -/- = ingen signifikant fold endring.

Bisfenol A

BPA er historisk den mest benyttede bisfenolforbindelsen, og grunnet dens egnete egenskaper har den vært omfattende brukt som et tilsetningsstoff i produksjonen av termisk papir og plastartikler, som drikkeflasker og emballasje (EFSA, u.å, Giulivo et al., 2016). Som nevnt tidligere har en rekke studier indikert at BPA har hormonforstyrrende egenskaper, både i menneske og andre vertebrater som fisk, mus og rotte (Mandich et al., 2007, Sohoni et al., 2001, Akingbemi et al., 2004, Timms et al., 2005, Nikaido et al., 2004, Rubin et al., 2001, Zoeller et al., 2005). Det er samtidig vist at BPA kan binde til flere ulike hormonreseptorer, inkludert østrogenreseptor, androgenreseptor (AR), glukokortikoidreseptor (GR) og tyroidreseptor (TR), hvor ER ser ut til å være et av de mest foretrukne mål-molekylene (Grimaldi et al., 2019, Pelch et al., 2019, Kojima et al., 2019). I 2017 ble BPA oppført på REACH kandidatlisten over stoffer av stor bekymring (SVHC-listen) grunnet potensielt skadelige effekter på reproduksjonsevne og hormonforstyrrende egenskaper (ECHA, 2017a). Likevel er det ikke bare human eksponering som er relevant siden BPA, og andre bisfenoler, ender opp i miljøet. BPA og BPA analoger er detektert i avløpsvann, overflatevann og sedimenter, og samtlige av bisfenolforbindelsene undersøkt i denne oppgaven var blant bisfenolene påvist i leveren til atlantehavstorsk fanget i Oslofjorden i 2015 (Liao et al., 2012a, Yang et al., 2014, Song et al., 2014, Song et al., 2012, Thomas et al., 2014, Liao et al., 2012c, Fromme et al., 2002, Ruus et al., 2014). I januar 2018 ble BPA oppføringen i REACH kandidatlisten oppdatert for å gjenspeile at BPA også forårsaker uheldige effekter på miljøet grunnet dens hormonforstyrrende egenskaper (ECHA, 2017b).

Med bruk av *in vitro* reportergensystemet viste eksponering for BPA en tydelig dose-respons aktivering av gmER α , og en EC₅₀ verdi på 1,9 μ M ble beregnet. Laveste signifikante aktivering (2,1 fold) ble nådd med en eksponeringskonsentrasjon på 0,4 μ M, og maksimal aktivering (19,5 fold) av reseptoren ble observert ved eksponering for 25 μ M BPA. Dette er i samsvar med studier av andre teleoster som har blitt studert med tilsvarende eller lignende reportergensystemer, inkludert stingsild (*Gasterosteus aculeatus*), medaka (*Oryzias latipes*) og sebrafisk (*Danio rerio*) (Tohyama et al., 2015). EC₅₀ verdiene ble beregnet til å være 0,3 μ M for gaER α , og 0,8 μ M for både olER α og drER α . Disse EC₅₀ verdiene er noe lavere enn EC₅₀ verdien beregnet for gmER α , men i samme størrelsesorden. Det er i den videre diskusjonen

valgt å ikke legge for stor vekt på å direkte sammenligne EC₅₀ verdier for spesifikke bisfenoler mellom torsk og andre organismer, da det er knyttet usikkerhet til hvordan ulike varianter av reportergensystemer som benyttes i de forskjellige studiene påvirker bestemmelsen av EC₅₀. Dette diskuteres i et eget avsnitt mot slutten av diskusjonen.

Aktivering av gmER α *in vitro* stemte godt overens med funnene gjort *ex vivo* i leverskiver. Leverskiver eksponert for 10 og 100 μ M BPA viste signifikant oppregulering av *vtg1* transkript, og videre en signifikant økning av mengden VTG protein i kulturmediet til leverskivene. Dette er også i overensstemmelse med et tidligere *in vivo* studie med BPA og Atlanterhavstorsk, hvor det ble observert en signifikant økning av VTG i plasma etter kontinuerlig eksponering for 50 μ g/L BPA over en tre ukers periode (Larsen et al., 2006). Aktivering av østrogenreseptorsignalveien og økning i VTG nivåer etter *in vivo* BPA eksponering har også blitt observert i en rekke andre teleoster, inkludert medaka, karpe, storhodet ørekyte og gullfisk (Ishibashi et al., 2005, Mandich et al., 2007, Sohoni et al., 2001, Hatf et al., 2012), som videre underbygger at BPA opptrer som en østrogenhermer på tvers av ulike ordner og familier av teleoster.

Bisfenol S og bisfenol F

BPS og BPF er to av bisfenolforbindelsene som i de siste årene har erstattet BPA i produksjonen av blant annet polykarbonatplast og epoksyharpikser (Usman og Ahmad, 2016). BPS har også i lengre tid vært brukt i ulike papirprodukter (Liao et al., 2012b). Den økte bruken av BPS og BPF har ført til økende tilstedeværelse av forbindelsene i miljøet, hvor begge stoffene er påvist i sedimenter, avløpsvann og overflatevann (Thomas et al., 2014, Liao et al., 2012c, Fromme et al., 2002). BPS er lite nedbrytbar i naturen og vil trolig akkumulere i akvatiske miljøer i større grad enn BPA og BPF (Ike et al., 2006, Danzl et al., 2009). BPS og BPF ble også påvist i leveren til atlanterhavstorsk der mengdene ble bestemt til henholdsvis 1 ng/g våtvekt og 71 ng/g våtvekt (Ruus et al., 2014). Nylig er det vist med bruk av forskjellige varianter av luciferase reportergensystemer at både BPS og BPF kan aktivere human ER α (Molina-Molina et al., 2013, Kojima et al., 2019, Pelch et al., 2019, Grimaldi et al., 2019). I disse studiene ble EC₅₀ verdien til BPS funnet å være fra 0,44-4,47 μ M, og EC₅₀ verdien til BPF ble

beregnet til å være 0,07-0,20 μM (Molina-Molina et al., 2013, Kojima et al., 2019, Pelch et al., 2019, Grimaldi et al., 2019).

I denne oppgaven ble det vist at både BPS og BPF også evner å aktivere østrogenreseptoren fra atlantehavstorsk *in vitro*. Imidlertid viste eksponering for BPS kun signifikant aktivering (6,8 fold) av $\text{gmER}\alpha$ ved den høyeste eksponeringskonsentrasjonen (50 μM). Fordi det ikke ble funnet et platå for maksimal aktivering kunne det heller ikke beregnes en EC_{50} verdi for BPS. I motsetning til BPS, ble det nådd et platå for maksimal aktivering (20,3 fold) etter eksponering mot BPF, og EC_{50} ble beregnet til 3,4 μM . *In vitro* aktivering av $\text{ER}\alpha$ som følge av BPS og BPF eksponering er også tidligere blitt undersøkt i sebrafisk (Le Fol et al., 2017). Ved bruk av et luciferasebasert reportergensystem i ZELH celler (hepatiske sebrafiskceller) ble det observert en aktivering av $\text{drER}\alpha$ av begge bisfenolforbindelsene, og EC_{50} ble beregnet til 4,1 μM for BPS, og 5,8 μM for BPF (Le Fol et al., 2017). *In vitro* aktivering av $\text{gmER}\alpha$ er i samsvar med *ex vivo* eksponering av leverskiver, der leverskiver eksponert for BPS og BPF viste signifikant økning av vtg både på transkriptnivå og proteinnivå. Økning i ER-mediert vitellogenin syntese er også vist hos sebrafisk eksponert for BPS og BPF *in vivo* (Naderi et al., 2014, Le Fol et al., 2017). I disse studiene ble det observert signifikant økning i plasma VTG hos sebrafisk eksponert for $\geq 10 \mu\text{g/l}$ BPS og 0,1 og 1 μM BPF (Naderi et al., 2014, Le Fol et al., 2017).

Bisfenol AF

BPAF har lenge vært anvendt i produksjonen av fluorpolymerer (fluorplast som benyttes i elektroniske apparater på grunn av liten elektrisk ledeevne) og syntetisk gummi (fluorelastomer) (Usman og Ahmad, 2016). De siste årene har BPAF også erstattet BPA i matkontaktmaterialer som plastemballasje (Usman og Ahmad, 2016). BPAF er samtidig påvist i husstøv, overflatevann og sedimenter (Liao et al., 2012a, Yang et al., 2014, Song et al., 2014, Song et al., 2012). Selv om bruken av BPAF øker er det sammenlignet med BPS og BPF færre studier som har undersøkt om BPAF har østrogene egenskaper, men i likhet med BPS og BPF er det vist *in vitro* at også BPAF kan virke hormonforstyrrende i menneske (Grimaldi et al., 2019, Pelch et al., 2019, Kojima et al., 2019).

In vitro eksponering for BPAF viste en dose-avhengig aktivering av gmER α , og EC₅₀ ble beregnet til 0,2 μ M. Laveste signifikante aktivering av gmER α ble nådd ved eksponering for 0,08 μ M, og aktiverer med dette gmER α ved den laveste konsentrasjonen av bisfenolene undersøkt i denne oppgaven. I studier med human ER α , er EC₅₀ verdien funnet å være fra 3 nM til 130 nM (Grimaldi et al., 2019, Pelch et al., 2019, Kojima et al., 2019). I leverskiver eksponert for BPAF ble det observert en økning av mengden VTG protein i kulturmediet. Dette er også i samsvar med studier av andre teleoster, hvor blant annet signifikant induksjon av hepatisk VTG hos hannfisk av medaka ble påvist etter *in vivo* eksponering for 0,05, 0,5 og 5 μ M BPAF (Yamaguchi et al., 2015). Signifikant oppregulering av *vtg* på transkriptnivå er også funnet i zebrafisk eksponert for BPAF *in vivo* (Shi et al., 2015, Yang et al., 2016).

Bisfenol B og bisfenol C

BPB anvendes i produksjonen av harpikser (Grumetto et al., 2008) og kan trolig erstatte BPA i produksjonen av epoksyharpikser og polykarbonatplast (Thomas et al., 2014). Det er mindre kunnskap om bruk og utslipp av BPC, men BPC er foreslått som et alternativ for BPA i produksjonen av termisk papir (EPA, 2014). BPB er påvist i innendørs støv (Liao et al., 2012a) og hermetisert mat (Thomas et al., 2014), men også i miljøet i blant annet sedimenter (Liao et al., 2012c). BPB ble også detektert i leveren til torsk fra Oslofjorden (289 ng/g våtvekt) (Ruus et al., 2014). Dette er i samsvar med at BPB er relativt persistent i miljøet, og er mer motstandsdyktig mot aerob og anaerob biodegradering enn BPA (Ike et al., 2006).

Ved bruk av et luciferase-basert reportergensystemer er det nylig blitt vist at BPB og BPC kan aktivere human ER α (Grimaldi et al., 2019, Pelch et al., 2019, Kojima et al., 2019). I denne oppgaven ble det også funnet en dose-avhengig aktivering av gmER α etter eksponering for både BPB og BPC. Sammenlignet med de andre bisfenolene som ble undersøkt, viste BPC den laveste maksimalaktivering (2,5 fold) av gmER α , samtidig som den viste seg å være blant de to mest potente forbindelsene (EC₅₀=0,2 μ M). Aktivering av gmER α ble også påvist *ex vivo* i leverskiver, hvor eksponering for BPB og BPC resulterte i en signifikant økning i mengde VTG i kulturmediet til leverskivene. Aktivering av østrogenreseptoren av BPB og BPC er også vist i et *in vivo* studie med medaka (Yamaguchi et al., 2015). Her det ble observert en signifikant

oppregulering av *vtg* på transkriptnivå hos individer etter eksponering for 5 og 50 μM BPB og 0,5 og 5 μM BPC.

Bisfenol E, bisfenol Z, bisfenol FL og BADGE

Mindre er kjent angående omfang av anvendelse av BPE, BPZ, BPFL og BADGE, men både BPFL og BADGE kan anvendes i produksjonen av polykarbonatplast og epoksyharbikser (Satoh et al., 2004, Dai et al., 2009). Samtidig finnes det begrenset informasjon om østrogene effekter av disse bisfenolforbindelsene i teleoster, og det har derfor vært nødvendig å sammenligne resultatene i denne oppgaven med tilsvarende *in vitro* studier utført med human ER α . Ved bruk av et luciferasebasert reporter gensystem i HeLa celler, ble det nylig vist at BPE og BPZ kan aktivere ER α (Grimaldi et al., 2019). I samme studie ble det også vist at BPFL er en mulig antagonist, og at BADGE trolig opptrer hverken som en agonist eller antagonist for ER α i menneske (Grimaldi et al., 2019). *In vitro* aktivering av human ER α etter eksponering mot BPE og BPZ er også nylig blitt vist i studiet til Kojima et al. (2019) og Pelch et al. (2019).

Eksponering for BPE og BPZ viste en dose-respons aktivering av gmER α i reporter gensystemet. BPE var også den bisfenolforbindelsen som gav høyest aktivering (32,1 folds), samtidig som den viste seg å være den minst potente agonisten blant bisfenolene som ble undersøkt. I studier med human ER α ble EC₅₀ verdien vist å være fra 0,28-1,4 μM for BPE og 0,09-0,12 μM for BPZ, som er noe lavere enn de respektive EC₅₀ verdiene beregnet for gmER α (Grimaldi et al., 2019, Pelch et al., 2019, Kojima et al., 2019). Både for BPE og BPZ ble aktiveringen av gmER α bekreftet *ex vivo* i leverskiver, der eksponering for BPE resulterte i signifikant økning av mengde VTG i kulturmediet fra leverskivene og eksponering for BPZ viste en signifikant oppregulering av *vtg* på transkripsjonsnivå.

Det ble ikke observert aktivering av gmER α *in vitro* etter eksponering for BPFL. Det har tidligere blitt vist at BPFL virker som en antagonist for human ER α med en IC₅₀ verdi beregnet til $5.91 \pm 1.92 \mu\text{M}$ (Grimaldi et al. 2019). I denne oppgaven ble det også funnet en nedgang i EE2-mediert luciferase-aktivitet, men kun ved den høyeste eksponeringskonsentrasjonen av BPFL (50 μM). Dette kan indikere at BPFL virker som en østrogenreseptor-antagonist i atlantehavstorsk, men nedgangen kan også skyldes cytotoksiske effekter som inntreffer ved

så høye konsentrasjoner. At reduksjonen i gmER α -aktivering skyldes cytotoxicitet underbygges av at eksponering for både 12,5, 25 og 50 μ M BPFL viste en reduksjon i metabolsk aktivitet i COS-7 cellene (statistisk signifikant ved 12,5 og 25 μ M). Eksponering av leverskiver for BPFL viste en signifikant nedregulering av *vtg1* transkripter, men ingen signifikante endringer av VTG nivået i vekstmediumet ble funnet. Som nevnt ovenfor, kan nedgangen i *vtg1* transkripter skyldes at BPFL innehar antagonistiske egenskaper, men det kan imidlertid ikke utelukkes at nedgangen skyldes redusert viabilitet av leverskivene som følge av eksponeringsregimet. Til tross for at LDH-assayet som ble benyttet for å overvåke viabilitet ikke viste økt LDH-aktivitet med høye konsentrasjoner av BPFL, er det viktig å påpeke at dette assayet kun gir en indikasjon på opprettholdelse av cellers membranintegritet i vevet. Eventuelt andre cytotoxicke endepunkter som kan påvirkes av eksponeringen og endre viabiliteten til leverskivene blir ikke avdekket med dette assayet alene. Andre metoder for å overvåke tilstanden til levervevet (som MTT-assay) bør derfor benyttes for å slå fast om BPFL er cytotoxic i det konsentrasjonsområdet som ble benyttet i eksponeringen, før man eventuelt kan slå fast om forbindelsen virker antagonistisk på gmER α .

BADGE viste ingen aktivering av gmER α , hverken *in vitro* i reportersystemet, eller *ex vivo* i leverskiver. Det ble heller ikke funnet noen signifikant reduksjon i EE2-mediert luciferaseaktivitet etter eksponering for BADGE. Dette er i samsvar med data presentert i Grimaldi et al. (2019), der det ble vist at BADGE hverken var en agonist eller antagonist for human ER α . I leverskiver eksponert for BADGE ble det derimot observert en signifikant nedgang i VTG nivå i mediet til leverskivene fra alle eksponeringskonsentrasjonene. Det må imidlertid undersøkes nærmere om nedgangen i VTG er et resultat av BADGE-mediert cytotoxicitet i levervevet.

Bisfenol G og bisfenol TMC

Både BPG og BPTMC er lite beskrevet i forskningslitteraturen. BPG og BPTMC er likevel blant bisfenolene som ble påvist i høye mengder (henholdsvis 4578 og 828 ng/g våtvekt) i leveren til atlantehavstorsk fra Oslofjorden, som indikerer at begge bisfenolforbindelsene kan være relativt persistente i miljøet (Ruus et al., 2014). Eksponering for BPG viste ingen ligandaktivering av gmER α i reportersystemet. Derimot reduserte BPG EE2-mediert

luciferase aktivitet med økende konsentrasjoner (dose-respons), og en IC_{50} ble beregnet til 4,7 μM . Basert på funnene i denne oppgaven kan BPG være en mulig antagonist for $gmER\alpha$. Den høyeste eksponeringskonsentrasjonen (50 μM) viste 57 % nedgang i metabolsk aktivitet, noe som kan indikere at høye BPG konsentrasjoner har en cytotoxisk effekt på COS-7 cellene. Siden det ikke ble gjort tilsvarende bestemmelse av metabolsk aktivitet i celler koeksponert med EE2, kan det foreløpig ikke utelukkes at nedgangen i EE2-mediert luciferaseaktivitet skyldes en nedgang i viabiliteten til cellene også ved de lavere eksponeringskonsentrasjonene av BPG. Observasjonene gjort i ligandaktiveringsforsøket samsvarte ikke med funnene gjort *ex vivo* i leverskiver. I leverskiver eksponert for BPG ble det påvist en signifikant økning av VTG i dyrkningsmediumet. Dette kan indikere at en metabolsk aktivering av BPG forekommer i leveren til Atlanterhavstorsk, og at det er nødvendig med kjemisk modifisering for at BPG (BPG-metabolitt) skal fungere som en østrogenreseptor agonist. Hvis dette er tilfelle, opptrer tilsynelatende BPG som en antagonist for $gmER\alpha$ *in vitro*, og som en $gmER\alpha$ agonist ved *ex vivo* eksponering. Dette kan være veldig relevant med tanke på risikovurdering av bisfenolforbindelser.

In vitro eksponering for BPTMC viste en signifikant ligandaktivering av $gmER\alpha$, og EC_{50} verdien ble beregnet til 1,3 μM . Aktivering av $gmER\alpha$ ble også bekreftet i leverskiver eksponert for 1 og 10 μM BPTMC, hvor det ble funnet en signifikant oppregulering av *vtg* på transkriptnivå. Eksponering for 100 μM BPTMC viste noe lavere uttrykning av *vtg1* transkripter sammenlignet med eksponering for 10 μM BPTMC. Dette kan ha sammenheng med den noe økte LDH-aktiviteten som ble observert i leverskiver eksponert for høyeste konsentrasjonen etter 48 timer, som kan indikere en cytotoxisk respons i leverskivene og redusert viabilitet. Det samme mønsteret ble observert for nivået av VTG protein i mediet til leverskivene, som også samsvarer med noe økt LDH aktivitet i leverskivene eksponert for 100 μM BPTMC i 96 timer.

5.1 Strukturelle egenskaper til østrogenreseptorligander

Det er vist at begge hydroksylgruppene til E2 (østradiol) er avgjørende for binding i ligandbindingslommen til østrogenreseptoren (Brzozowski et al., 1997). Den ene hydroksylgruppen binder til aminosyrene Glu353 og Arg394 gjennom hydrogenbindinger, og den andre hydroksylgruppen danner hydrogenbinding til His524. Videre er de hydrofobe aromatiske ringene i østradiolmolekylet viktig for interaksjon med de hydrofobe aminosyrene i liganbindingslommen, bestående av blant annet Ala350, Leu346, Phe404, Leu428 (Brzozowski et al., 1997). De to hydroksylgruppene plassert i paraposisjon på aryl-ringene hos BPA gjør at denne forbindelsen har strukturelle likheter til østradiol og binder på en lignende måte i det ligandbindende domenet til ER α , selv om BPA ikke er en like potent agonist (Kitamura et al., 2005). I likhet med E2 har BPA hydrofobe ringer og propanstrukturer som også fasiliterer binding av BPA til det hydrofobe bindingssetet i ligandbindingslommen. Felles for alle bisfenolforbindelsene som aktiverte gmER α i denne oppgaven er at de nettopp har to tilgjengelige hydroksylgrupper i paraposisjon. Samtidig er alle aminosyrene som er vist å være involvert i koordineringen av BPA i hER α (som nevnt ovenfor) også konserverte i proteinsekvensen til gmER α (VEDLEGG B). Dette underbygger at de aktive bisfenolforbindelsene trolig binder og koordineres i det ligandbindende doment til gmER α på en tilsvarende måte som har blitt observert for den humane reseptoren. Likevel er det flere forskjeller i aminosyresekvensen i LBD mellom hER α og gmER α , som kan være med på å gi opphav til ulikheter i ligand-gjenkjennelse og bindingsaffinitet, og dermed arts-spesifikke ulikheter i reseptor-aktivering. Det kan derfor være interessant å undersøke nærmere hvilke aminosyrer som er involvert i binding av bisfenoler til gmER α hjelp av homologimodellering og *in silico* ligand-docking. Blant annet er det tidligere vist med *in silico* analyser at det er forskjeller i hvilke aminosyrer som er involvert i binding av BPA, BPC og BPAF til ER α i medaka og karpe, men at aminosyren Glu353 er felles og viktig for bindingen av bisfenolforbindelsene både blant disse teleostene og human ER α (Brzozowski et al., 1997, Yamaguchi et al., 2015)

BADGE har ikke hydroksylgrupper i paraposisjon, noe som kan være noe av årsaken til at den viste hverken agonistisk eller antagonistisk aktivitet for gmER α i luciferase reporter-gen forsøkene. I tillegg skiller BADGE seg fra de andre bisfenol-forbindelsene med tanke på

størrelse og øvrig struktur, som kan gjøre at den ikke er kompatibel med binding i ligandbindingslommen til gmER α .

Også blant bisfenolforbindelsene som har to hydroksylgrupper i paraposisjon ble det observert en forskjell i aktivering av gmER α . Det er derfor gjort en mer detaljert sammenligning mellom potensitet (EC₅₀) og virkeevne (maksimalaktivering) til BPA analogene og BPA. Rangering over virkeevne av bisfenolene som aktiverte gmER α var som følger; BPE > BPF > BPA > BPB > BPAF > BPS > BPZ > BPTMC > BPC. BPB, BPF og BPE er de bisfenolforbindelsene som har størst strukturlikhet med BPA, som også kan være årsaken til at det observeres høy virkeevne av disse forbindelsene. Dette er også i samsvar med flere nylige studier der BPE, BPF og BPB ser ut til å aktivere human ER α med om lag samme virkeevne som BPA (Molina-Molina et al., 2013, Grimaldi et al., 2019, Pelch et al., 2019, Kojima et al., 2019). Når det gjelder potensiteten til bisfenolene sammenlignet med BPA, er det tilsynelatene større forskjeller mellom arter. I torsk fremstår BPF som en mindre potent agonist for gmER α sammenlignet med BPA p.g.a. signifikant høyere EC₅₀ verdi (p<0,05). Dette samsvarer med at BPF er en mindre potent agonist enn BPA for ER α i sebrafisk (Le Fol et al., 2017). Tilsvarende er imidlertid ikke beskrevet for human ER α . Derimot er BPB vist å være en mer potent ER α agonist enn BPA i menneske (Grimaldi et al., 2019, Pelch et al., 2019, Kojima et al., 2019). BPE hadde høyere virkeevne enn BPA (p<0,05) for gmER α , men opptrer som en mindre potent agonist (p<0,05). Dette samsvarer heller ikke med *in vitro* studier med human ER α der BPE ser ut til å ha samme virkeevne og potensitet som BPA (Grimaldi et al., 2019, Pelch et al., 2019, Kojima et al., 2019).

Den signifikant lavere aktiveringen av gmER α observert ved eksponering for BPZ og BPS indikerer at de to bisfenolene ikke har like høy virkeevne som BPA på reseptoren (p<0,05 for begge). BPZ fremstår i tillegg som en noe mindre potent agonist enn BPA (men ikke signifikant forskjellig EC₅₀). Både BPS og BPZ har noe lavere strukturlikhet med BPA. Hos BPS er det sentrale karbonatomet som binder de to arylringene byttet ut med svovel, og BPZ har en større funksjonell gruppe bundet til det sentrale karbonatomet. Disse strukturulighetene kan være noe av årsaken til at BPZ og BPS gir lavere aktivering av gmER α sammenlignet med BPA. I andre studier med human ER α ble det for BPS og BPZ ikke observert store forskjeller i ER α aktivering i forhold til BPA, og BPZ fremstår også som en mer potent agonist for human ER α

(Grimaldi et al., 2019, Pelch et al., 2019, Kojima et al., 2019, Molina-Molina et al., 2013). Forskjellene som observeres mellom human ER α og gmER α kan gjenspeile forskjellene i LBD utover de konserverte aminosyrene som potensielt kan ha konsekvenser for binding og ligandkoordinering til gmER α .

BPAF ser ut til å være en mer potent gmER α agonist enn BPA ($p < 0.05$), men ga opphav til en lavere maksimalaktivering av reseptoren ($p < 0.05$). I aktiveringsstudier med human ER α er det også vist at BPAF er en mer potent forbindelse, samtidig som den gir en tilsvarende virkeevne som BPA (Grimaldi et al., 2019, Pelch et al., 2019, Kojima et al., 2019). Som for BPAF, ser det også ut til at BPC er mer potent enn BPA ($p < 0.05$), men gir en signifikant lavere aktiveringsgrad av reseptoren. Dette er i samsvar med studiet til (Grimaldi et al., 2019) hvor det også ble vist at BPC er mer potent enn BPA, samtidig som den viste lavere virkeevne. I motsetning til BPA, har både BPC og BPAF tilstedeværelse av halogener i strukturen. BPAF har to trifluormetyl grupper bundet til det sentrale karbonet og den funksjonelle gruppen til BPC inneholder klor. Dette antyder at større grupper bundet til det sentrale karbonatomet i bisfenolen er med på å gjøre forbindelsene til mindre attraktive gmER α agonister (Grimaldi et al., 2019,). Dette ser ut til å være tilfellet også for BPTMC, som sammenlignet med BPA har en større funksjonell gruppe bundet til det sentrale karbonatomet og viste lavere virkeevne på reseptoren enn BPA ($p < 0,05$).

I motsetning til mange av de andre bisfenolene ble det for BPFL og BPG ikke observert en aktivering av gmER α , til tross for at begge forbindelsene har hydroksylgrupper i paraposisjon. Basert på antagonisme-forsøket kan det derimot se ut som BPG er en mulig antagonist for gmER α . Strukturforskjellen mellom BPG og BPA er at BPG har en funksjonell gruppe (1-metyletyl) i metaposisjon på begge arylringene. Dette kan resultere i en ikke-optimal binding av BPG i ligandbindingslommen hvor liganden ikke stabiliserer en aktivert konformasjon av reseptoren, og kan dermed være årsaken til at BPG opptrer forskjellig fra BPA. Hvilken struktur som er avgjørende for at en forbindelse skal virke som en antagonist for østrogenreseptoren bør likevel undersøkes nærmere. Selv om BPFL har hydroksylgrupper i paraposisjon ble det ikke funnet en aktivering eller inhibering av gmER α . Dette kan skyldes den øvrige strukturen til BPFL, der større grupper bundet til det sentrale karbonatomet, er med på å gjøre forbindelsen mindre egnet som en østrogenreseptor agonist (Grimaldi et al., 2019).

Den ulike aktiveringen av gmER α som observeres mellom bisfenolene undersøkt i denne oppgaven har tilsynelatende en sammenheng med at ulike funksjonelle grupper i bisfenolmolekylene regulerer aktiviteten til reseptoren forskjellig. Dette er også i tråd med tidligere observasjoner som har vist at den funksjonelle gruppen bundet til det sentrale karbonet i bisfenolforbindelsene er regulerende for østrogenaktivitet (Kitamura et al., 2005).

5.2 Manglende regulering og restriksjoner for bruk av bisfenolforbindelser som erstatning for BPA

De siste årene har det blitt innført strengere regulering og flere restriksjoner rundt produksjon og anvendelse av BPA. Som nevnt innledningsvis, ble Canada i 2010 første landet i verden til å implementere en plan for å redusere utslipp av BPA til miljøet, og allerede i 2008 ble bruken av BPA i tåteflasker stanset. Også Norge og EU innførte forbud mot å bruke BPA i tåteflasker i 2011 (Miljødirektoratet, 2019). I EU/EØS-landene er det også innført en migrasjonsgrense på 0,05 μg BPA per kilo mat som er tillatt å lekke fra matkontaktmaterialer (Miljødirektoratet, 2019). Belgia, Danmark og Sverige har i tillegg innført forbud mot å bruke BPA i alle matkontaktmaterialer som er beregnet til barn under tre år, og i Frankrike er det totalforbud mot BPA i alle matkontaktmaterialer, som blant annet emballasjer og beholdere (ECHA, u.å). I desember 2016 besluttet EU kommisjonen å begrense bruken av BPA i termisk papir, og la ned et forbud mot dette som trer i kraft januar 2020 (Reach vedlegg XVII, post 66) (EU, 2016). BPS er blant bisfenolene som er foreslått som et alternativ til BPA i produksjonen av termisk papir, og bruken av BPS har allerede økt i EU (ECHA, 2019). Fra 2014 til 2018 har bruken av BPS i termisk papir økt med 6% på det totale markedet i EU (papir produsert i EU og import) og 1476 tonn BPS ble brukt til termisk papir i 2018 (ECHA 2019). I samme periode ble BPA-basert termisk papir redusert med 10%. BPA er likevel den dominerende forbindelsen som brukes i termisk papir og BPA-basert termisk papir utgjør 48% (3304 tonn BPA) av alt termisk papir produsert og importert i EU (ECHA 2019).

Av de tolv bisfenolene undersøkt i denne oppgaven er det bare BPA som i dag er regulert og underlagt restriksjoner for anvendelse. Etterhvert som BPA fases ut er BPAF, BPF, BPB og BPC noen av de foreslåtte bisfenolene som kan tas i bruk som erstatning for BPA i varer som

inneholder epoksyharpiks, polykarbonatprodukter og termisk papir (Miljødirektoratet, 2019, (EPA, 2014, ECHA, u.å). Siden produsenter og importører ikke er pålagt å gi detaljer om den kjemiske sammensetningen til sine produkter, finnes det ikke tilstrekkelig med informasjon om hvilke bisfenoler (eller andre forbindelser) som benyttes. Derfor er det lite kunnskap om bruk og utslipp av bisfenolene som stadig erstatter BPA (Miljødirektoratet, 2019). Samtidig indikerer nyere forskning, inkludert resultatene i denne oppgaven, at flere av bisfenolforbindelsene ser ut til å ha samme østrogene egenskaper, og noen viser seg å være mer potente og kraftigere agonister enn BPA. Siden pågående forskning indikerer sterkt at flere av bisfenolforbindelsene ikke ser ut til være fullgode alternativer for BPA, bør det implementeres et nytt og strengere regelverk når det gjelder produksjon og anvendelse av bisfenoler som allerede benyttes og vurderes som erstatningsforbindelser. Dette er i tråd med "føre-var-prinsippet" siden vi i dag har svært liten kunnskap om den samlede effekten disse miljøgiftene kan ha på både mennesker og natur.

5.3 Kommentarer til modellsystemene benyttet i oppgaven

Luciferase reporter system er en utbredt *in vitro* metode for å studere aktivering av ulike kjernereseptorer av potensielle ligander. Metoden benyttes til å sammenligne ligander sin potensitet og virkeevne, og man kan også gjøre komparative studier for å undersøke om ulike reseptorer aktiveres av de samme ligandene. I denne oppgaven ble det benyttet en versjon av assayet der reseptorens LBD er fusjonert til det DNA-bindende domenet til proteinet Gal4. Fordelene med et UAS/Gal4-DBD system er at det er uavhengig av reseptorens naturlige dimeriseringspartnere og endogene responselementer for å initiere transkripsjonen av luciferase. Det er derfor ikke nødvendig å klonere reseptorspesifikke responselementer eller lage reseptorspesifikke reporterplasmid for å undersøke aktiviteten til ulike kjernereseptorer. Det er allikevel viktig å ta høyde for at reporter systemer som har Gal4-DBD fusjonert med reseptorens LBD kan påvirke konformasjonen til reseptoren og dermed ha innvirkning på de ligandbindende egenskapene. For å unngå helt en potensiell effekt av Gal4-DBD må det i assayet benyttes en full-lengde variant av reseptoren (inkluderer det det DBD-bindende domenet), og et reporter gen som kontrolleres av endogene responselementer som gjenkjennes spesifikt av reseptoren som studeres.

Forskjellige varianter av luciferase reporter-gen systemet har også blitt benyttet til å studere aktivering av ER α (Tohyama et al., 2015, Grimaldi et al., 2019, Pelch et al., 2019, Kojima et al., 2019,). Det inkluderer variasjon i responselementer (UAS eller ERE) avhengig om full-lengde reseptoren eller et Gal4-LBD fusjonsprotein er benyttet, men også ulike cellelinjer for uttrykning av reseptoren har blitt brukt. Forskjellige cellelinjer kan ha forskjeller i tilstedeværelsen av kofaktorer (som koaktivatorer) som også kan være med å påvirke aktivering av reseptoren. Metodiske forskjeller gjør at det er knyttet usikkerhet til hvordan de ulike systemene som benyttes påvirker bestemmelse av potensitet og virkeevne til ligandene. Studier med human ER α har vist forskjeller i både EC₅₀ verdier og maksimalaktivering av reseptoren for de samme bisfenolene (Grimaldi et al., 2019, Pelch et al., 2019, Kojima et al., 2019, Molina-Molina et al., 2013). Sammenligning på tvers av studier, og direkte sammenligning av potensitet og virkeevne for spesifikke bisfenoler mellom Atlanterhavstorsk og andre arter, kan derfor bare gjøres med et forbehold om at ulike varianter av reporter-gen systemer kan gi opphav til forskjellige beregninger av EC₅₀ verdier og maksimal aktivering.

Det er også viktig å ta i betraktning at reporter-gen systemer er en forenklet modell sammenlignet med *in vivo* eller *ex vivo* systemer, og at dette systemet ikke kan forutsi om det hadde oppstått en aktivering av reseptoren i dens fysiologiske omgivelser. Det er derfor nødvendig å følge opp slike *in vitro* studier med forsøk på levende dyr eller vev. I denne oppgaven ble leverskiver fra torsk eksponert for de samme bisfenolene for å undersøke om gmER α også kan aktiveres *ex vivo*. Leverskiver inneholder intakte cellelag og opprettholder den intracellulære kommunikasjonen mellom cellene i deres opprinnelige miljø, og representerer derfor bedre en *in vivo* situasjon sammenlignet med for eksempel primære hepatocytter. For å bekrefte *ex vivo* aktivering av reseptoren ble induksjon av gmER α målgenet *vtg* undersøkt både på transkripsjonsnivå og proteinnivå. I oppgaven ble det funnet at BPG ikke aktiverte gmER α *in vitro*, men BGP var samtidig en av bisfenolene som ved *ex vivo* eksponering av leverskiver gav signifikant økning av VTG i vekstmediumet. Dette er med på å illustrere begrensingene til rene *in vitro* systemer som ikke tar høyde for metabolsk aktivering i blant annet risikovurdering av nye fremmedstoffer.

5.4 Konklusjon

I denne oppgaven har ligandaktivering/inhibering av ER α fra torsk blitt studert *in vitro* og *ex vivo* etter eksponering for tolv ulike bisfenolforbindelser. *In vitro* studier viste at ni av bisfenolene (BPA, BPB, BPC, BPF, BPE, BPS, BPZ, BPTMC, BPAF) kan opptre som agonister for gmER α . Dette ble bekreftet *ex vivo* i leverskiver der de samme bisfenolene resulterte i induksjon av gmER α målgenet *vtg1*, enten på transkripsjonsnivå eller proteinnivå. Samtidig indikerte forsøkene at BPG kan opptre både som en agonist og antagonist for østrogenreseptorsignalveien. Østrogenreseptoren er en del av HPGL aksene som regulerer essensielle gener for normal kjønnsutvikling og reproduksjon hos vertebrater. Basert på funnene i denne oppgaven kan en rekke bisfenoler interagere med østrogenreseptor fra torsk, og dermed virke hormonforstyrrende ved å modulere den naturlige hormon signaliseringen. Eksponering for bisfenoler kan derfor potensielt forstyrre HPGL aksene i torsk og påvirke fysiologiske funksjoner som vekst, utvikling og reproduksjonsevne.

Samtlige av bisfenolene (BPAF, BPF, BPB og BPC) som i dag er foreslått som erstatning for BPA viste seg å være potente gmER α agonister, eller å ha samme virkeevne. Disse forbindelsene ser dermed ikke ut til å være fullgode alternativer for å erstatte BPA. Siden pågående forskning går i retning av at bisfenoler som stoffgruppe har hormonforstyrrende egenskaper i en rekke arter, samt at flere og flere av BPA analogene detekteres i biota, bør det etableres et nytt og strengere internasjonalt regelverk for både produksjon og anvendelse av bisfenolforbindelser som allerede benyttes og vurderes som erstatning for BPA.

5.5 Forslag til fremtidig arbeid

Basert på forskningslitteraturen er det trolig artsforskjeller i hvor sensitiv østrogenreseptoren er for bisfenoler. For å studere årsaken til denne forskjellen er det interessant å undersøke nærmere hvilke spesifikke aminosyrer i det ligandbindende domenet som er viktig for binding av de ulike bisfenolforbindelsene. Ligand-reseptor interaksjoner kan studeres *in silico* ved hjelp av homologimodellering basert på proteinstrukturen av ER løst fra andre arter, etterfulgt av ligand docking analyser. Dette kan videre følges opp med *in vitro* mutagenese studier av utvalgte aminosyrer i LBD for å eksperimentelt verifisere (med for eksempel reporter gen assay) og karakterisere deres rolle i binding og koordinering av bisfenolforbindelsene.

In vitro og *ex vivo* forsøk er essensielle verktøy for å få en mekanistisk forståelse av miljøgifters virkemåte, men har sine begrensninger i forhold til å gjenskape et realistisk eksponeringsscenario for miljøgifter. Det er derfor naturlig å følge opp funnene i denne oppgaven med å gjennomføre *in vivo*-eksponeringstudier med levende torsk. Som nevnt innledningsvis, regulerer østrogenreseptoren gener som er essensielle for normal kjønnsutvikling og reproduksjon. Eksponering av torsk i ulike livsstadier (befruktede egg, yngel og reproduktive individer), med ulike doser, eksponeringstidspunkter, og med realistiske blandinger av bisfenoler, er noen av mulighetene for å undersøke hvilke fenotypiske effekter bisfenolene har på organismen og dens avkom.

Det eksisterer ulike subtyper av østrogenreseptoren, og den eksakte funksjonen av Er β og Er β -II i teleoster er ikke godt kartlagt. I likhet med Er α , har Er β trolig en funksjonell rolle i vitellogenese hos hunntorsk og spermatogenese i hanntorsk (Nagasawa et al., 2014). Å undersøke om de andre ER-subtypene også binder og aktiveres av bisfenolforbindelser er nødvendig for å videre kartlegge effekter på HPGL-aksen. Flere nylige studier har også undersøkt om bisfenolforbindelser kan aktivere andre kjerne reseptorer, blant annet androgen reseptor (AR) og glukokortikoid reseptor (GR) (Grimaldi et al., 2019, Pelch et al., 2019, Kojima et al., 2019). I disse studiene ble det funnet at BPA, BPC og BPE modulerer aktiviteten til flere av kjerne reseptorene, og at mange av bisfenolene blant annet virker som antagonister for AR og GR (Grimaldi et al., 2019, Pelch et al., 2019, Kojima et al., 2019). Det hadde vært interessant å følge opp dette med å undersøke om dette var tilfellet for tilsvarende kjerne reseptorer og andre hormonreseptorer i atlantehavstorsk.

7 Litteraturliste

- AKINGBEMI, B. T., SOTTAS, C. M., KOULOVA, A. I., KLINEFELTER, G. R. & HARDY, M. P. 2004. Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. *Endocrinology*, 145, 592-603.
- AQUAMAPS. 2019. *Reviewed distribution maps for Gadus morhua (Atlantic cod), with modeled year 2100 native range map based on IPCC A2 emissions scenario* [Internett]. www.aquamaps.org: [Lest 14.10.19].
- ARCAND-HOY, L. D. & BENSON, W. H. 1998. Fish reproduction: an ecologically relevant indicator of endocrine disruption. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 17, 49-57.
- 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.
- ASCENZI, P., BOCEDI, A. & MARINO, M. 2006. Structure–function relationship of estrogen receptor α and β : Impact on human health. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 299-402.
- BAIN, D. L., HENEGHAN, A. F., CONNAGHAN-JONES, K. D. & MIURA, M. T. 2007. Nuclear receptor structure: implications for function. *Annu. Rev. Physiol.*, 69, 201-220.
- 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.
- BLUMBERG, B., SABBAGH, W., JUGUILON, H., BOLADO, J., VAN METER, C. M., ONG, E. S. & EVANS, R. M. 1998. SXR, a novel steroid and xenobioticsensing nuclear receptor. *Genes & development*, 12, 3195-3205.
- BRASIER, A., TATE, J. & HABENER, J. 1989. Optimized use of the firefly luciferase assay as a reporter gene in mammalian cell lines. *Biotechniques*, 7, 1116-1122.
- BROUWER, A., LONGNECKER, M. P., BIRNBAUM, L. S., COGLIANO, J., KOSTYNIK, P., MOORE, J., SCHANTZ, S. & WINNEKE, G. 1999. Characterization of potential endocrine-related health effects at low-dose levels of exposure to PCBs. *Environmental health perspectives*, 107, 639-649.
- BRZOWSKI, 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.
- CHEN, D., KANNAN, K., TAN, H., ZHENG, Z., FENG, Y.-L., WU, Y. & WIDELKA, M. 2016. Bisphenol Analogues Other Than BPA: Environmental Occurrence, Human Exposure, and Toxicity—A Review. *Environmental Science & Technology*, 50, 5438-5453.
- 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.
- COUSE, J. F., LINDZEY, J., GRANDIEN, K., GUSTAFSSON, J.-A. K. & KORACH, K. S. 1997. Tissue Distribution and Quantitative Analysis of Estrogen Receptor- α (ER α) and Estrogen Receptor- β (ER β) Messenger Ribonucleic Acid in the Wild-Type and ER α -Knockout Mouse. *Endocrinology*, 138, 4613-4621.

- DAI, Z., LI, Y., YANG, S., ZHAO, N., ZHANG, X. & XU, J. 2009. Kinetics and thermal properties of epoxy resins based on bisphenol fluorene structure. *European Polymer Journal*, 45, 1941-1948.
- DALE, K., MÜLLER, M. B., TAIROVA, Z., KHAN, E. A., HATLEN, K., GRUNG, M., YADETIE, F., LILLE-LANGØY, R., BLASER, N., SKAUG, H. J., LYCHE, J. L., ARUKWE, A., HYLLAND, K., KARLSEN, O. A. & GOKSØYR, A. 2019. Contaminant accumulation and biological responses in Atlantic cod (*Gadus morhua*) caged at a capped waste disposal site in Kollevåg, Western Norway. *Marine Environmental Research*, 145, 39-51.
- DE GRAAF, I. A., OLINGA, P., DE JAGER, M. H., MEREMA, M. T., DE KANTER, R., VAN DE KERKHOF, E. G. & GROOTHUIS, G. M. 2010. Preparation and incubation of precision-cut liver and intestinal slices for application in drug metabolism and toxicity studies. *Nature protocols*, 5, 1540.
- ECHA 2016. Candidate List of substances of very high concern for Authorisation. European Chemicals Agency.
- ECHA Member State Committee 2017a. *Support Document for the identification of BPA as an endocrine disruptor for human health* [Internett]. <https://echa.europa.eu/documents/10162/908badc9-e65d3bae-933a-3512a9262e59> [Lest 18.10.2019].
- ECHA Member State Committee 2017b. *Support Document for the identification of BPA as an endocrine disruptor for the environment* [Internett]. <https://echa.europa.eu/documents/10162/908badc9-e65d3bae-933a-3512a9262e59> [Lest 18.10.2019].
- ECHA 2019. Use of bisphenol A and its alternatives in thermal paper in the EU – 2018 update. *European Chemicals Agency*.
- ECHA u.å. European Chemicals agency. *Bisphenol A* [Internett]. <https://echa.europa.eu/hot-topics/bisphenol-a/> [Lest 08.10.19].
- EFSA 2015. Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. *EFSA Journal*, 13, 3978.
- EFSA u.å. European Food Safety Authority. *Bisphenol A* [Internett]. Tilgjengelig fra: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/bisphenol> [Lest 15.02.2019].
- EHRlich, S., WILLIAMS, P. L., MISSMER, S. A., FLAWS, J. A., YE, X., CALAFAT, A. M., PETROZZA, J. C., WRIGHT, D. & HAUSER, R. 2012. Urinary bisphenol A concentrations and early reproductive health outcomes among women undergoing IVF. *Human Reproduction*, 27, 3583-3592.
- 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.
- ENMARK, E. & GUSTAFSSON, J. Å. 1999. Oestrogen receptors—an overview. *Journal of internal medicine*, 246, 133-138.
- EPA 2014. Bisphenol A alternatives in thermal paper. *United States Environmental Protection Agency. Final report*.
- EU 2016. *Reach vedlegg XVII, post 66. Commission Directive (EU) 2016/2235 of 12 December 2016 amending Annex XVII to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) as regards bisphenol A*. [Internett]. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32016R2235>: [Lest 08.11.19].
- EU 2019. European Commission. *REACH (EC 1907/2006)* [Internett]. https://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/reach_en.htm: [Lest 05.11.2019].

- FLINT, S., MARKLE, T., THOMPSON, S. & WALLACE, E. 2012. Bisphenol A exposure, effects, and policy: A wildlife perspective. *Journal of Environmental Management*, 104, 19-34.
- 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.
- FROMME, H., KÜCHLER, T., OTTO, T., PILZ, K., MÜLLER, J. & WENZEL, A. 2002. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Research*, 36, 1429-1438.
- FRY, D. M. & TOONE, C. K. 1981. DDT-induced feminization of gull embryos. *Science*, 213, 922-924.
- GEENS, T., AERTS, D., BERTHOT, C., BOURGUIGNON, J.-P., GOEYENS, L., LECOMTE, P., MAGHUIN-ROGISTER, G., PIRONNET, A.-M., PUSSEMIER, L., SCIPPO, M.-L., VAN LOCO, J. & COVACI, A. 2012. A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 3725-3740.
- GIULIVO, M., LOPEZ DE ALDA, M., CAPRI, E. & BARCELÓ, D. 2016. Human exposure to endocrine disrupting compounds: Their role in reproductive systems, metabolic syndrome and breast cancer. A review. *Environmental Research*, 151, 251-264.
- GLUZMAN, Y. 1981. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*, 23, 175-182.
- GRIMALDI, M., BOULAHTOUF, A., TOPOROVA, L. & BALAGUER, P. 2019. Functional profiling of bisphenols for nuclear receptors. *Toxicology*, 420, 39-45.
- GRUMETTO, L., MONTESANO, D., SECCIA, S., ALBRIZIO, S. & BARBATO, F. 2008. Determination of bisphenol A and bisphenol B residues in canned peeled tomatoes by reversed-phase liquid chromatography. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56, 10633-10637.
- 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-gonad-liver [HPGL] axis in fish. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 4, 14-30.
- HARRIES, J. E., SHEAHAN, D. A., JOBLING, S., MATTHIESSEN, P., NEALL, P., SUMPTER, J. P., TYLOR, T. & ZAMAN, N. 1997. Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 16, 534-542.
- HARRIES, J. E., SHEAHAN, D. A., MATTHIESSEN, P., NEALL, P., RYCROFT, R., TYLOR, T., JOBLING, S., ROUTLEDGE, E. J. & SUMPTER, J. P. 1996. A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland waters. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 15, 1993-2002.
- HATEF, A., ALAVI, S. M. H., ABDULFATAH, A., FONTAINE, P., RODINA, M. & LINHART, O. 2012. Adverse effects of bisphenol A on reproductive physiology in male goldfish at environmentally relevant concentrations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 76, 56-62.
- 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.
- HERZKE, D., KAASA, H., GRAVEM, F., GREGERSEN, H., JENSEN, J., HORN, J., HARJU, M., BORGÉN, A., ENGE, E. & WARNER, N. 2013. Perfluorinated alkylated substances,

- brominated flame retardants and chlorinated paraffins in the Norwegian Environment-screening 2013. *Norwegian Environment Agency. NILU–Norsk Institutt for Luftforskning. SWECO, Tromsø, Norway.*
- HILLER-STURMHOFEL, S. & BARTKE, A. 1998. The endocrine system: an overview. *Alcohol Research*, 22, 153.
- IKE, M., CHEN, M., DANZL, E., SEI, K. & FUJITA, M. 2006. Biodegradation of a variety of bisphenols under aerobic and anaerobic conditions. *Water science and technology*, 53, 153-159.
- ISHIBASHI, H., TACHIBANA, K., TSUCHIMOTO, M., SOYANO, K., ISHIBASHI, Y., NAGAE, M., KOHRA, S., TAKAO, Y., TOMINAGA, N. & ARIZONO, K. 2001. In vivo testing system for determining the estrogenic activity of endocrine-disrupting chemicals (EDCs) in goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Health Science*, 47, 213-218.
- ISHIBASHI, H., WATANABE, N., MATSUMURA, N., HIRANO, M., NAGAO, Y., SHIRATSUCHI, H., KOHRA, S., YOSHIHARA, S.-I. & ARIZONO, K. 2005. Toxicity to early life stages and an estrogenic effect of a bisphenol A metabolite, 4-methyl-2, 4-bis (4-hydroxyphenyl) pent-1-ene on the medaka (*Oryzias latipes*). *Life sciences*, 77, 2643-2655.
- JAKOBSEN, T. & OZHIGIN, V. K. 2011. *The Barents Sea-ecosystem, resources, management. Half a century of Russian-Norwegian cooperation*, Tapir Akademisk Forlag.
- JOBLING, S., NOLAN, M., TYLER, C. R., BRIGHTY, G. & SUMPTER, J. P. 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental science & technology*, 32, 2498-2506.
- 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., FRANTZEN, S., MAAGE, A., VALDERSNES, S. & NEDREAAS, K. 2013b. A baseline study of levels of mercury, arsenic, cadmium and lead in Northeast Arctic cod (*Gadus morhua*) from different parts of the Barents Sea. *Marine pollution bulletin*, 67, 187-195.
- JULSHAMN, K., DUINKER, A., NILSEN, B. M., NEDREAAS, K. & MAAGE, A. 2013c. 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.
- KANDARAKI, E., CHATZIGEORGIOU, A., LIVADAS, S., PALIOURA, E., ECONOMOU, F., KOUTSILIERIS, M., PALIMERI, S., PANIDIS, D. & DIAMANTI-KANDARAKIS, E. 2011. Endocrine Disruptors and Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): Elevated Serum Levels of Bisphenol A in Women with PCOS. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96, E480-E484.
- 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.
- KHETAN, S. K. 2014. *Endocrine disruptors in the environment*, John Wiley & Sons.
- 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, T. S., JUNG, K. K., KIM, S. S., KANG, I. H., BAEK, J. H., NAM, H.-S., HONG, S.-K., LEE, B. M., HONG, J. T. & OH, K. W. 2010. Effects of in utero exposure to DI (n-Butyl) phthalate on development of male reproductive tracts in Sprague-Dawley rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 73, 1544-1559.
- KITAMURA, S., SUZUKI, T., SANOH, S., KOHTA, R., JINNO, N., SUGIHARA, K., YOSHIHARA, S. I., FUJIMOTO, N., WATANABE, H. & OHTA, S. 2005. Comparative Study of the Endocrine-Disrupting Activity of Bisphenol A and 19 Related Compounds. *Toxicological Sciences*, 84, 249-259.
- KOJIMA, H., TAKEUCHI, S., SANOH, S., OKUDA, K., KITAMURA, S., URAMARU, N., SUGIHARA, K. & YOSHINARI, K. 2019. Profiling of bisphenol A and eight of its analogues on transcriptional activity via human nuclear receptors. *Toxicology*, 413, 48-55.
- KREGE, J. H., HODGIN, J. B., COUSE, J. F., ENMARK, E., WARNER, M., MAHLER, J. F., SAR, M., KORACH, K. S., GUSTAFSSON, J.-Å. & SMITHIES, O. 1998. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor β . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 15677-15682.
- 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.
- KUIPER, G. G., CARLSSON, B., GRANDIEN, K., ENMARK, E., HÄGGBLAD, J., NILSSON, S. & GUSTAFSSON, J.-A. K. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology*, 138, 863-870.
- LARSEN, B. K., BJØRNSTAD, A., SUNDT, R. C., TABAN, I. C., PAMPANIN, D. M. & ANDERSEN, O. K. 2006. Comparison of protein expression in plasma from nonylphenol and bisphenol A-exposed Atlantic cod (*Gadus morhua*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) by use of SELDI-TOF. *Aquatic Toxicology*, 78, S25-S33.
- LASSITER, C. S., KELLEY, B. & LINNEY, E. 2002. Genomic structure and embryonic expression of estrogen receptor beta a (ER β a) in zebrafish (*Danio rerio*). *Gene*, 299, 141-151.
- LAURENT, A., PERDU-DURAND, E., ALARY, J., DEBRAUWER, L. & CRAVEDI, J. 2000. Metabolism of 4-hydroxynonenal, a cytotoxic product of lipid peroxidation, in rat precision-cut liver slices. *Toxicology letters*, 114, 203-214.
- LE FOL, V., AÏT-AÏSSA, S., SONAVANE, M., PORCHER, J.-M., BALAGUER, P., CRAVEDI, J.-P., ZALCO, D. & BRION, F. 2017. In vitro and in vivo estrogenic activity of BPA, BPF and BPS in zebrafish-specific assays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 142, 150-156.
- 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.
- LEMAIRE, B., BECK, M., JASPART, M., DEBIER, C., CALDERON, P. B., THOMÉ, J.-P. & REES, J.-F. 2011. Precision-Cut Liver Slices of *Salmo salar* as a tool to investigate the oxidative impact of CYP1A-mediated PCB 126 and 3-methylcholanthrene metabolism. *Toxicology in Vitro*, 25, 335-342.
- LEMAIRE, G., MNIF, W., MAUVAIS, P., BALAGUER, P. & RAHMANI, R. 2006. Activation of α - and β -estrogen receptors by persistent pesticides in reporter cell lines. *Life Sciences*, 79, 1160-1169.

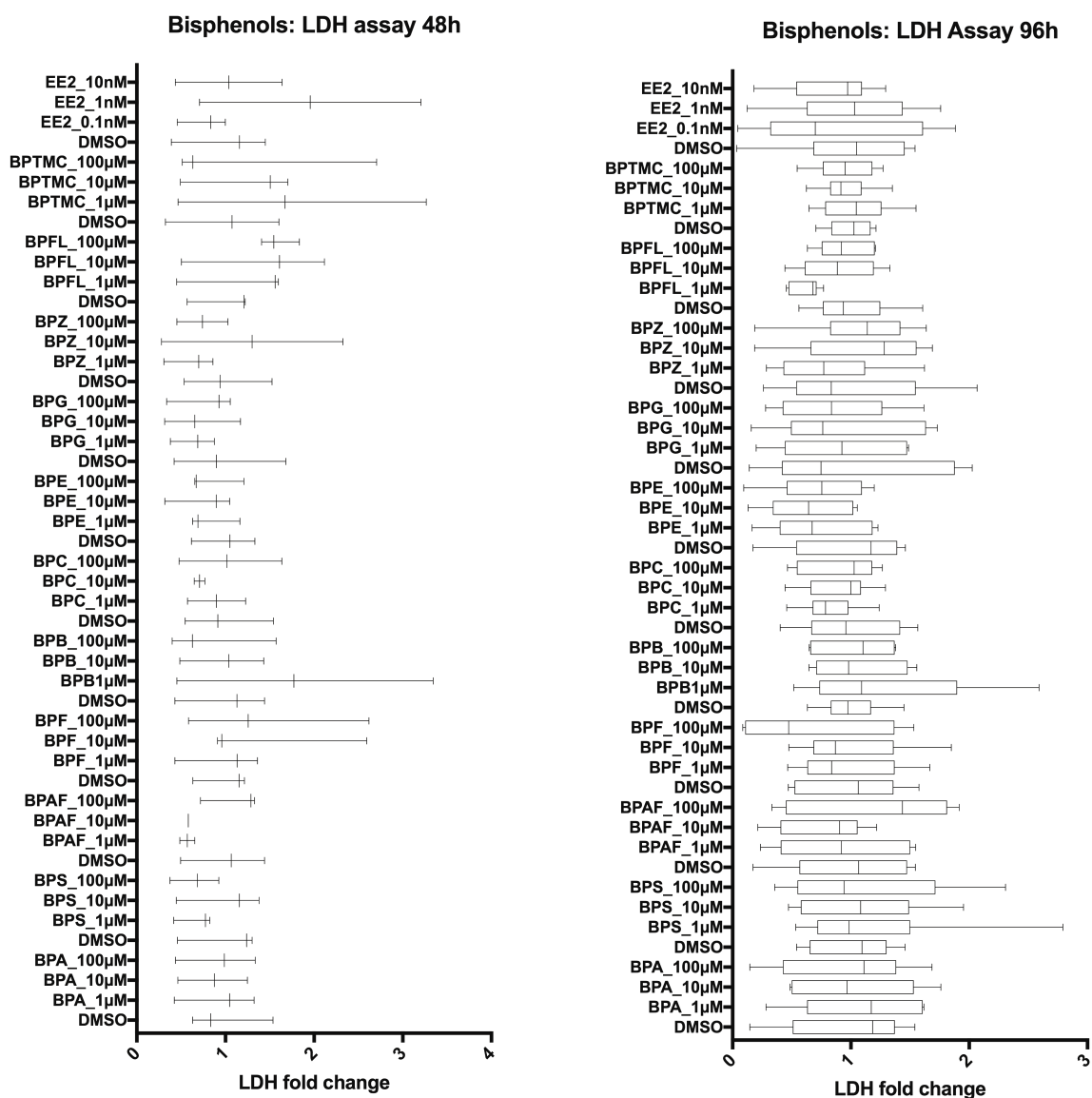
- LIAO, C., LIU, F., GUO, Y., MOON, H.-B., NAKATA, H., WU, Q. & KANNAN, K. 2012a. Occurrence of eight bisphenol analogues in indoor dust from the United States and several Asian countries: implications for human exposure. *Environmental science & technology*, 46, 9138-9145.
- LIAO, C., LIU, F. & KANNAN, K. 2012b. Bisphenol S, a new bisphenol analogue, in paper products and currency bills and its association with bisphenol A residues. *Environmental science & technology*, 46, 6515-6522.
- LIAO, C., LIU, F., MOON, H.-B., YAMASHITA, N., YUN, S. & KANNAN, K. 2012c. Bisphenol analogues in sediments from industrialized areas in the United States, Japan, and Korea: spatial and temporal distributions. *Environmental science & technology*, 46, 11558-11565.
- 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.
- LUBAHN, D. B., MOYER, J. S., GOLDING, T. S., COUSE, J. F., KORACH, K. S. & SMITHIES, O. 1993. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, 11162-11166.
- 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.
- MANDICH, A., BOTTERO, S., BENFENATI, E., CEVASCO, A., ERRATICO, C., MAGGIONI, S., MASSARI, A., PEDEMONTE, F. & VIGANO, L. 2007. In vivo exposure of carp to graded concentrations of bisphenol A. *General and comparative endocrinology*, 153, 15-24.
- MEEKER, J. D., CALAFAT, A. M. & HAUSER, R. 2009. Urinary bisphenol A concentrations in relation to serum thyroid and reproductive hormone levels in men from an infertility clinic. *Environmental science & technology*, 44, 1458-1463.
- Miljødirektoratet. 2019. *Bisfenoler (bisfenol A)* [Internett]. <https://miljostatus.miljodirektoratet.no/tema/miljogifter/prioriterte-miljogifter/bisfenoler-bisfenol-a/>: [Lest 08.10.2019].
- MOLINA-MOLINA, J.-M., AMAYA, E., GRIMALDI, M., SÁENZ, J.-M., REAL, M., FERNÁNDEZ, M. F., BALAGUER, P. & OLEA, N. 2013. In vitro study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 272, 127-136.
- MORAS, D. & GRONEMEYER, H. 1998. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Current Opinion in Cell Biology*, 10, 384-391.
- MOUNTFORT, K. A., KELLY, J., JICKELLS, S. M. & CASTLE, L. 1997. Investigations into the potential degradation of polycarbonate baby bottles during sterilization with consequent release of bisphenol A. *Food Additives & Contaminants*, 14, 737-740.

- NADERI, M., WONG, M. Y. L. & GHOLAMI, F. 2014. Developmental exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to bisphenol-S impairs subsequent reproduction potential and hormonal balance in adults. *Aquatic Toxicology*, 148, 195-203.
- 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.
- NAGLER, J. J., CAVILEER, T., SULLIVAN, J., CYR, D. G. & REXROAD III, C. 2007. The complete nuclear estrogen receptor family in the rainbow trout: discovery of the novel ER α 2 and both ER β isoforms. *Gene*, 392, 164-173.
- NAGLER, J. J., CAVILEER, T. D., VERDUCCI, J. S., SCHULTZ, I. R., HOOK, S. E. & HAYTON, W. L. 2012. Estrogen receptor mRNA expression patterns in the liver and ovary of female rainbow trout over a complete reproductive cycle. *General and comparative endocrinology*, 178, 556-561.
- NELSON, E., WIEHLER, W., COLE, W. & HABIBI, H. 2007. Homologous regulation of estrogen receptor subtypes in goldfish (*Carassius auratus*). *Molecular reproduction and development*, 74, 1105-1112.
- 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.
- NG, H., 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.
- NIKAIDO, Y., YOSHIZAWA, K., DANBARA, N., TSUJITA-KYUTOKU, M., YURI, T., UEHARA, N. & TSUBURA, A. 2004. Effects of maternal xenoestrogen exposure on development of the reproductive tract and mammary gland in female CD-1 mouse offspring. *Reproductive Toxicology*, 18, 803-811.
- NOSZCZYŃSKA, M. & PIOTROWSKA-SEGET, Z. 2018. Bisphenols: Application, occurrence, safety, and biodegradation mediated by bacterial communities in wastewater treatment plants and rivers. *Chemosphere*, 201, 214-223.
- O'MALLEY, B. W. & TSAI, M.-J. 1992. Molecular pathways of steroid receptor action. *Biology of reproduction*, 46, 163-167.
- OSPAR 2009. Assessment of impacts of offshore oil and gas activities in the North-East Atlantic. *OSPAR Commission, London*, 1-40.
- PELCH, K. E., LI, Y., PERERA, L., THAYER, K. A. & KORACH, K. S. 2019. Characterization of Estrogenic and Androgenic Activities for Bisphenol A-like Chemicals (BPs): In Vitro Estrogen and Androgen Receptors Transcriptional Activation, Gene Regulation, and Binding Profiles. *Toxicological Sciences*.
- RUBIN, B. S. 2011. Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127, 27-34.
- RUBIN, B. S., MURRAY, M. K., DAMASSA, D. A., KING, J. C. & SOTO, A. M. 2001. Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environmental health perspectives*, 109, 675-680.
- RUUS, A., ALLAN, I., BEYLICH, B., BÆK, K., SCHLABACH, M. & HELBERG, M. 2014. Environmental contaminants in an urban fjord.

- SATO, K., OHYAMA, K., AOKI, N., IIDA, M. & NAGAI, F. 2004. Study on anti-androgenic effects of bisphenol a diglycidyl ether (BADGE), bisphenol F diglycidyl ether (BFDGE) and their derivatives using cells stably transfected with human androgen receptor, AR-EcoScreen. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 983-993.
- SCHMIEDER, P., TAPPER, M., LINNUM, A., DENNY, J., KOLANCZYK, R. & JOHNSON, R. 2000. Optimization of a precision-cut trout liver tissue slice assay as a screen for vitellogenin induction: comparison of slice incubation techniques. *Aquatic toxicology*, 49, 251-268.
- SCHMITTGEN, T. D. & LIVAK, K. J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3, 1101.
- SHI, J., JIAO, Z., ZHENG, S., LI, M., ZHANG, J., FENG, Y., YIN, J. & SHAO, B. 2015. Long-term effects of Bisphenol AF (BPAF) on hormonal balance and genes of hypothalamus-pituitary-gonad axis and liver of zebrafish (*Danio rerio*), and the impact on offspring. *Chemosphere*, 128, 252-257.
- SOHONI, P., TYLER, C., HURD, K., CAUNTER, J., HETHERIDGE, M., WILLIAMS, T., WOODS, C., EVANS, M., TOY, R. & GARGAS, M. 2001. Reproductive effects of long-term exposure to bisphenol A in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental science & technology*, 35, 2917-2925.
- SONG, S., RUAN, T., WANG, T., LIU, R. & JIANG, G. 2012. Distribution and preliminary exposure assessment of bisphenol AF (BPAF) in various environmental matrices around a manufacturing plant in China. *Environmental science & technology*, 46, 13136-13143.
- SONG, S., SONG, M., ZENG, L., WANG, T., LIU, R., RUAN, T. & JIANG, G. 2014. Occurrence and profiles of bisphenol analogues in municipal sewage sludge in China. *Environmental pollution*, 186, 14-19.
- 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, 380-383.
- STAPLES, C. A., DOME, P. B., KLECKA, G. M., OBLOCK, S. T. & HARRIS, L. R. 1998. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere*, 36, 2149-2173.
- 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.
- STEINKOPF, O. M. 2017. *Funksjonell karakterisering av østrogenreseptor α fra atlantehavstorsk (*Gadus morhua*); kloning, ligandaktivering og induksjon av østrogenreseptorsignalveien i presisjonskuttete leverskiver*. The University of Bergen.
- STRIMBU, K. & TAVEL, J. A. 2010. What are biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS*, 5, 463.
- SUMPTER, J. P. & JOBLING, S. 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental health perspectives*, 103, 173-178.
- SÖDERSTRÖM, K. S. 2017. *Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) as tools for studying effects of contaminants on the lipid metabolism in Atlantic cod (*Gadus morhua*)*. The University of Bergen.
- TAKAO, Y., LEE, H. C., KOHRA, S. & ARIZONO, K. 2002. Release of bisphenol A from food can lining upon heating. *Journal of Health Science*, 48, 331-334.

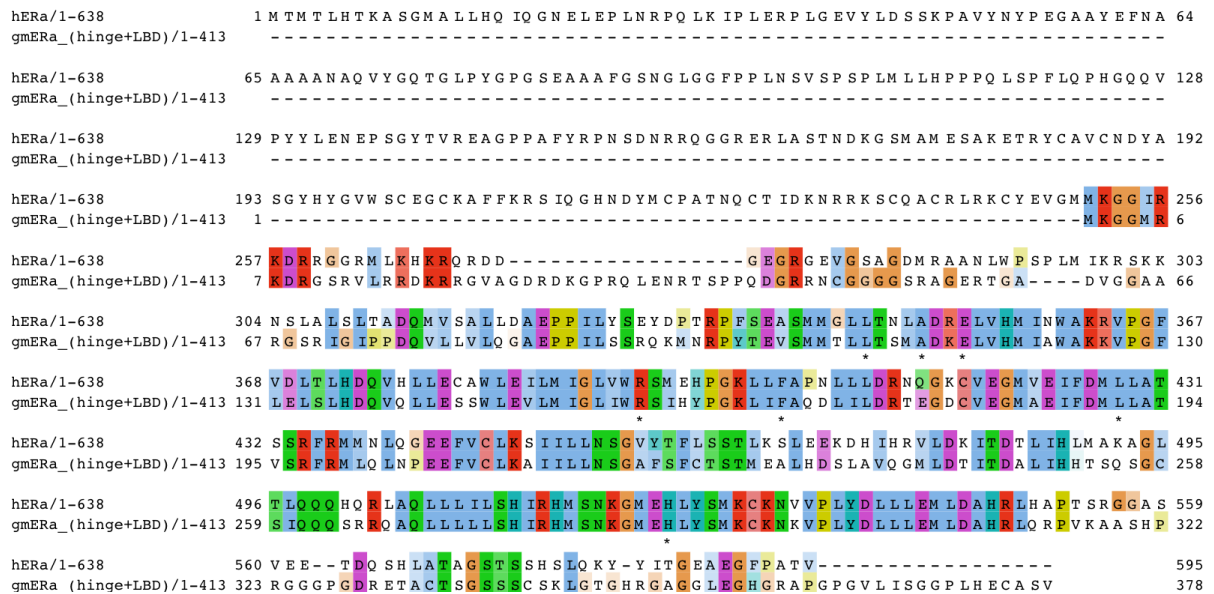
- THOMAS, K. V., SCHLABACH, M., LANGFORD, K., FJELD, E., ØXNEVAD, S., RUNDBERGET, T., BÆK, K., ROSTKOWSKI, P. M. & HARJU, M. 2014. Screening program 2013. New bisphenols, organic peroxides, fluorinated siloxanes, organic UV filters and selected PBT substances.
- TIMMS, B. G., HOWDESHELL, K. L., BARTON, L., BRADLEY, S., RICHTER, C. A. & VOM SAAL, F. S. 2005. Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 7014-7019.
- 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 reseptorer i atlantehavstorsk (*Gadus morhua*): kloning, ligandaktivering og vevsuttrykning. Universitetet i Bergen.
- UNEP 2001. Stockholm convention on persistent organic pollutants. United Nations Environment Programme, Chemicals division Geneva, Switzerland.
- USMAN, A. & AHMAD, M. 2016. From BPA to its analogues: Is it a safe journey? *Chemosphere*, 158, 131-142.
- VOGEL, S. A. 2009. The politics of plastics: the making and unmaking of bisphenol a "safety". *American journal of public health*, 99, S559-S566.
- WHO u.å. *International Programme on Chemical Safety* [Internett].
https://www.who.int/health-topics/chemical-safety#tab=tab_1: [Lest 17.11.2019].
- YADETIE, F., ZHANG, X., HANNA, E. M., ARANGUREN-ABADÍA, L., EIDE, M., BLASER, N., BRUN, M., JONASSEN, I., GOKSØYR, A. & KARLSEN, O. A. 2018. RNA-Seq analysis of transcriptome responses in Atlantic cod (*Gadus morhua*) precision-cut liver slices exposed to benzo[a]pyrene and 17 α -ethynylestradiol. *Aquatic Toxicology*, 201, 174-186.
- YAMAGUCHI, A., ISHIBASHI, H., ARIZONO, K. & TOMINAGA, N. 2015. In vivo and in silico analyses of estrogenic potential of bisphenol analogs in medaka (*Oryzias latipes*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 120, 198-205.
- YANG, X., LIU, Y., LI, J., CHEN, M., PENG, D., LIANG, Y., SONG, M., ZHANG, J. & JIANG, G. 2016. Exposure to Bisphenol AF disrupts sex hormone levels and vitellogenin expression in zebrafish. *Environmental toxicology*, 31, 285-294.
- YANG, Y., LU, L., ZHANG, J., YANG, Y., WU, Y. & SHAO, B. 2014. Simultaneous determination of seven bisphenols in environmental water and solid samples by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1328, 26-34.
- ZOELLER, R. T., BANSAL, R. & PARRIS, C. 2005. Bisphenol-A, an Environmental Contaminant that Acts as a Thyroid Hormone Receptor Antagonist in Vitro, Increases Serum Thyroxine, and Alters RC3/Neurogranin Expression in the Developing Rat Brain. *Endocrinology*, 146, 607-612.

VEDLEGG A



Figur V1. LDH-aktivitet i medium fra PKLS etter 48 og 96 timer eksponering for EE2, BPA, BPB, BPC, BPE, BPF, BPG, BPS, BPZ, BPTMC, BPAF, BPFL og BADGE. Relativ-LDH aktivitet i vekstmedium til PKLS eksponert for fem ulike bisfenoler og EE2 i henholdsvis 48 og 96 timer. Cytotoksisitet indikeres av økt LDH-aktivitet i forhold til løsemiddelkontroll (0,1% DMSO). Hvert punkt inikerer gjennomsnittet av fire eksponeringsforsøk ± SD. Eksperimenter og dataanalyse ble utført av forsker Fekadu Yadetie i miljøtoksikologigruppen på BIO, UiB.

VEDLEGG B



Figur V2. Parvis sammenstilling av aminosyresekvensen til human ERα (Ac no. P03372) og aminosyresekvensen som korresponderer til hinge-regionen og LBD i gmERα. Sammenstillingen ble gjort med Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Konserverte aminosyrer involvert i bindingen av E2 i human ERα (Leu346, Ala350, Glu353, Arg394, Phe404, Leu428, His524) er indikert med * under alignmentet.

In vitro assessment of estrogenic effects of bisphenols on Atlantic cod (*Gadus morhua*)

Christine T. Johansen¹, Siri Ø. Goksøy¹, Fekadu Yadetie¹, Anders Goksøy¹, Odd André Karlsen¹
¹Department of Biological Sciences, University of Bergen

Christine T. Johansen
 University of Bergen
 Christine.Johansen@student.uib.no

Many "BPA-free" products contain BPA analogues. May they cause xenoestrogenic effects?

INTRODUCTION

The estrogen receptor (ER) is a steroid hormone receptor involved in growth, development and reproduction. ER belongs to the nuclear receptor superfamily, which are ligand activated-transcription factors that can be activated by both endogenous and exogenous compounds, including industrial chemicals. Bisphenol A (BPA) is a chemical produced in large quantities, and it is used in the manufacture of polycarbonate plastics and epoxy resins. Polycarbonate plastics are commonly used as food and drink packaging. Since BPA has been reported to act as an endocrine disruptor in vertebrate animals, public concern has been raised about the safety of BPA in consumer products. As a result, many manufacturers have now stopped using BPA in their productions. However, several of these "BPA-free" products are manufactured with bisphenol analogues (1). In this study, BPA and 11 BPA analogues were tested for their ability to activate the Atlantic cod (*Gadus morhua*) Er α . Atlantic cod is an important teleost in North-Atlantic fisheries, and has in recent years emerged as a model species in environmental toxicology studies.

RESULTS

Luciferase reporter gene assay

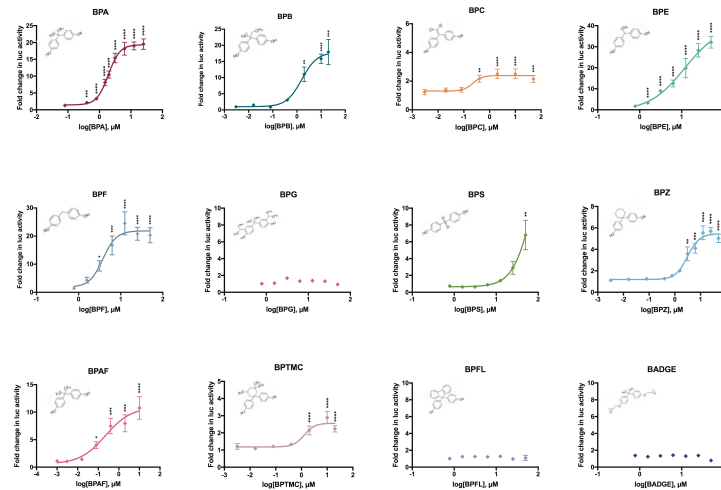


Figure 3. Ligand activation of Atlantic cod Er α exposed to twelve different bisphenols for 24 hours. Ligand activation of Er α was measured as increased luciferase activity in bisphenol-exposed COS-7 cells compared to solvent (DMSO) exposed cells. Significance is denoted as * = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$, *** = $p \leq 0.001$, **** = $p \leq 0.0001$

Table 1. EC₅₀ and maximum response (E_{max})

Ligand	BPA	BPE	BPC	BPF	BPG	BPS	BPZ	BPAF	BPFL	BPTMC	BADGE
EC ₅₀ (µM)	1.9	1.2	-	3.1	3.7	-	3.1	3.1	0.2	-	1.3
E _{max}	19.4	15.5	-	32.2	21.6	-	5.4	5.5	10.9	-	2.5

Among the 12 bisphenols tested in LRA (Figure 3), eight bisphenols were able to activate the Atlantic cod Er α (BPA, BPE, BPF, BPG, BPS, BPZ, BPAF and BPTMC). Highest activation of Atlantic cod Er α was found in COS-7 cells exposed to BPE, followed by BPA, BPF, BPG and BPAF. Furthermore, BPAF, BPTMC, BPG, and BPA appear to be the most potent Er α agonists tested (Table 1).

Similar activations by bisphenols were observed in ex vivo PCLS (Figure 4). ELISA analyses of PCLS showed high induction of Vtg production by BPE. Interestingly, while BPG did not induce the transcription of the luciferase reporter in LRA assay, it showed induced Vtg production in PCLS. In accordance with the LRA assay, there was also induced production of Vtg in liver slices exposed to BPTMC and BPZ.

CONCLUSION

BPA and many of the BPA analogues tested were able to activate cod Er α . Importantly, this indicates that these compounds may act as xenoestrogens in Atlantic cod and can potentially affect processes related to development, maturation and reproduction. Follow up analysis with ex vivo liver slices with a selected set of the bisphenols, confirmed the observations made with the LRA assay. Interestingly, BPG did not activate the Er α in the LRA assay, while it induced vitellogenin production in PCLS. This may suggest a biotransformation of BPG in liver necessary for it to act as an Er α agonist.

Many BPA analogues are able to activate Er α from Atlantic cod. Varying xenoestrogenic potencies were observed.

METHODS

Luciferase reporter gene assay

Ligand activation of Atlantic cod Er α was studied with a GAL4/UAS-based luciferase reporter gene assay (LRA) in COS-7 cells (Figure 1). COS-7 cells were exposed to twelve different bisphenols for 24 h. Ligand activation of Er α was measured as induced luciferase activity in bisphenol-exposed cells.

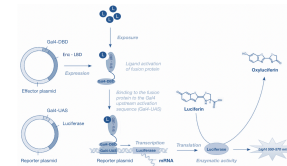


Figure 1. Illustration of the luciferase reporter gene assay. Modified version from Soile Söderström 2017

Precision-cut liver slices - ELISA

Activation of Er α was also assessed ex vivo with precision cut liver slices (PCLS) (2) from juvenile male cod (n=3). PCLS (250µm) were produced with a Leica VT1200 S vibrating blade microtome. PCLS were exposed to five different bisphenols for 96 hours. Activation of Er α was determined by measuring induction of vitellogenin production by measuring vitellogenin levels in the culture medium using ELISA (Cod Vitellogenin ELISA kit, BIOSENSE Laboratories). Ethynylestradiol (EE2) was used as a positive control for Er α activation.



Figure 2. Preparation of PCLS

Precision-cut liver slices - ELISA

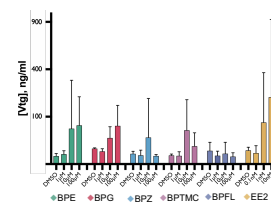


Figure 4. ELISA measurements of vitellogenin in culture medium of PCLS exposed to bisphenols and EE2. PCLS were exposed to a selected set of bisphenols and EE2 (positive control) for 96 hours.

ACKNOWLEDGEMENT: The work is part of the iCod 2.0 (244564) and dCod 1.0 project (), funded by the Research Council of Norway248840

REFERENCES
 1. Eladak et al. (2015). Fertil. Steril. 103, 11–21
 2. Eide et al. (2014). Aquatic Toxicology

UNIVERSITY OF BERGEN





Fra 18-22. mai deltok jeg på det 20. PRIMO-møte som fant sted i Charleston, Sør-Carolina. PRIMO har blitt arrangert hvert andre år siden 1981 der temaet er kunnskapsfronten av forskning som omhandler effekter av miljøgifter og andre menneskeskapte stressfaktorer (som f.eks. havforsuring) på marine og akvatiske organismer. PRIMO er blant de viktigste konferansene innenfor dette fagfeltet, og renommerte forskere fra de ledende forskningsinstitusjonene er alltid representert.



FORFATTER:
**CHRISTINE
JOHANSEN**
INSTITUTT FOR BIVITENSKAP
UNIVERSITETET I BERGEN
E-post: Christine.Johansen@
student.uib.no.

Pollutant Responses in Marine Organisms

På årets PRIMO-møte var det over 190 deltagere fra 22 forskjellige land. Konferansen ble åpnet av Marquetta Goodwin, aka Queen Quet, lederen av Gullah/Geechee nasjonen, som snakket om hvordan Gullah/Geechee arbeider for å bevare det marine miljøet.

Det faglige programmet varte hver dag fra kl. 08:40 om morgenen til 18:30 om kvelden. Det var fire forskjellige vitenskapelige sesjoner, blant annet "Endocrine Disruptors" og "Receptors and Receptor-Mediated Signaling" og "Ocean Acidification and Climate Change", og to poster-sesjoner med tilsammen 90 forskjellige poster. Det vitenskapelige tilbudet var dermed svært variert og holdt et høyt faglig nivå med mange store navn innen miljøøkosykologi.

Dette var min første internasjonale konferanse og dag tre hadde jeg en poster-presensasjon der jeg presenterte resultatene fra min masteroppgave. I masteroppgaven har jeg undersøkt hvordan bisfenol A (BPA)

og 11 andre BPA analoger kan virke hormonstyrrende ved å binde til og aktivere østrogenreseptor (gmERα) i Atlantierhavstorsk (Gadus morhua).

Østrogenreseptoren (ER) er en steroid hormonreseptor som er involvert i vekst, utvikling og reproduksjon. ER tilhører kjernereseptor-familien som er ligandaktiverende transkripsjonsfaktorer som kan aktiviseres av både endogene og eksogene forbindelser, som for eksempel industrielle kjemikalier. BPA er en kjemisk forbindelse som produseres i store mengder til bruk i blant annet plastprodukter som drikkeflasker og leketøy til barn.

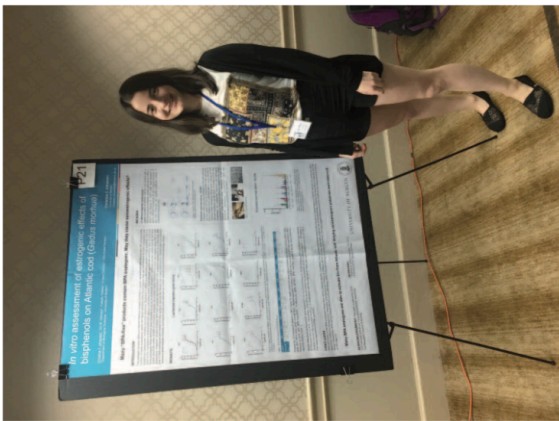
Siden BPA har vist seg å kunne ha hormonstyrrende egenskaper har flere produsenter fjernet BPA fra sine produkter. Likevel er mange av de «BPA-frie» produktene produsert med andre bisfenoler, som bisfenol S og bisfenol F. Om Disse BPA substituttene også medhar hormonstyrrende egenskaper er foreløpig ikke like godt kartlagt.

For å studere bisfenol-medierte aktivering av gmERα har jeg benyttet en rekke molekylærbiologiske metoder. Blant annet har jeg brukt et luciferase-basert genreporter system (LRA) i COS7 celler for å studere transaktivering av reseptoren in vitro. Dette ble fulgt opp ex vivo ved å disponere presisjonsutvete lever-skiver (PCLS) fra torsk for de samme bisfenolene og hvor induksjonen av gmERα-malgenet vitellogenin (vtg) ble undersøkt ved hjelp av kvantitativ PCR, samt på proteinnivå med bruk av ELISA.

Som forventet øvnet BPA å aktivere gmERα. I tillegg ble det observert en aktivering av gmERα i celler eksponert for 8 andre bisfenoler. Av de 12 bisfenolene som ble testet, viste bisfenol E høyest aktivitet, mens bisfenol AF viste seg å være den mest potente varianten. Tilsvarende aktivering av østrogenreseptoren ble påvist i PCLS der det ble observert økt induksjon av vtg i leverskivene. Et interessant funn var at BPG viste ingen aktivering av reseptoren i LRA assayet, men eks-



dCod delegasjonen som deltok på PRIMO20 konferansen.



Like for poster-sesjonen starter.

Selv om jeg var veldig nervøs ble posterpresensasjonen en svært positiv og lærerik opplevelse der jeg fikk muligheten til å diskutere mine resultater med dyktige forskere.

Atmosfæren gjennom hele konferansen var uhyevidelig og avslappet, og man fikk gode muligheter til å bli kjent med de andre deltagerne under lunsjen og kaffe-pausene inntil mellom programmet. Det ble også arrangert en bankettmiddag på akvariet i Charlston. Den ene ettermiddagen var en liten gruppe på en guidet kjøkk-tur ved Bowers Island der vi fikk sett både pelikaner og skilpadder, før turen gikk videre til stranden der det ble bading i bølgene.

Tilslutt vil jeg takke NRS for reisepensjon som gjorde det mulig for meg å delta på PRIMO20 konferansen. Det var en veldig kjekk konferanse som jeg har hatt stort utbytte av både faglig og sosialt. Tusen takk!

Min masteroppgave er del av prosjektene i Cod 2.0 (prosjekt no. 244564) og dCod 1.0 (prosjekt no. 248840) finansiert av Norges Forskningsråd.

