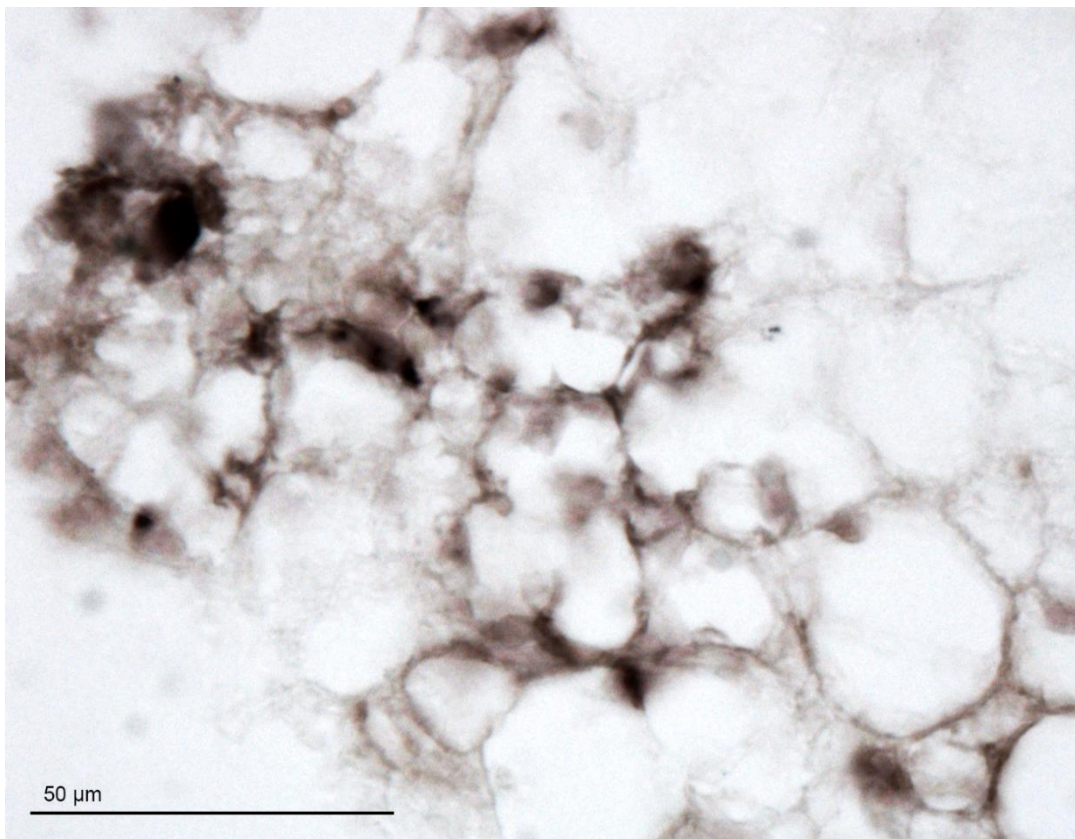


In situ hybridisering for deteksjon av cytokrom
P450 1A i presisjonskuttete leverskiver (PCLS) fra
atlanterhavstorsk (*Gadus morhua*)

Masteroppgave i biologi

Marie Nohre

Universitetet i Bergen



Institutt for biologi
Miljøtoksikologigruppen

Juni 2016

30 studiepoeng

Forsidebilde er *in situ* hybridisering av målgenet *cyp1a* på en presisjonskuttet leverskive (PCLS) som er eksponert for 1 μ M BNF. Snittet er fotografert ved hjelp av mikroskopet DM6000B (Leica) og mikroskopkameraet DFC320R2 (Leica) med 20X forstørrelse. Bar = 50 μ m

Forord

Denne masteroppgaven er skrevet ved forskningsgruppen Miljøtoksikologi ved Institutt for biologi, Universitetet i Bergen. Denne oppgaven er et bidrag til forskningsprosjektet ‘iCod 2.0: Integrative environmental genomics of Atlantic cod (*Gadus morhua*)’, som er finansiert av Norges forskningsråd og Universitetet i Bergen, prosjektnummer 244564/E40.

Jeg vil først takke mine veiledere Odd André Karlsen, Tom Ole Nilsen og Anders Goksøyr for deres gode hjelp, veiledning og støtte gjennom prosjektet. Jeg vil og rette en stor takk til Valentina Tronci ved Uni Research Miljø for god opplæring og diskusjoner rundt probelaging og *in situ* hybridisering.

Til slutt ønsker jeg å takke de andre studentene og ansatte i Miljøtoksikologi-gruppen og medstudenter for bidrag til hyggelig studiemiljø, spennende diskusjoner, liv og latter. Prosessen med oppgaven hadde ikke blitt så god hvis det ikke hadde vært for god familie, venner og Magnus som har gitt meg gode avbrekk og støtte i jobbingen med masteren, så takk til alle som har bidratt til mange fine lyspunkt denne våren.

Bergen, juni 2016

Marie Nohre



INNHOILDSFORTEGNEISE

1	Innledning.....	1
1.1	Bakgrunn	1
1.2	Atlanterhavstorsk (<i>Gadus morhua</i>)	2
1.3	Biotransformasjon	5
1.3.1	Faser i biotransformasjonen	5
1.3.2	Cytokrom P450	6
1.3.3	Aryl hydrokarbon reseptoren (AhR)	7
1.3.4	Ligander for AhR	9
1.3.5	CYP1A som biomarkør	11
1.4	<i>In vitro</i> toksikologi	11
1.4.1	Studier på torskelever	12
1.4.2	Primære hepatocyttkulturer	13
1.4.3	Presisjonskuttete leverskiver fra atlanterhavstorsk	13
1.5	<i>In situ</i> hybridisering (ISH).....	14
1.6	Mål for oppgaven.....	16
2	Material og metode.....	19
2.1	Oversikt over metoder	19
2.2	Fisk	20
2.3	Uttak av vev for pilotforsøk med <i>in situ</i> hybridisering	20
2.4	PCLS og eksponeringsforsøk	21
2.4.1	Uttak av kjerner for kutting av PCLS.....	21
2.4.2	Cytotoksitet-målinger	22
2.5	Preservering, innstøpning og forberedelse av vev for ISH.....	22
2.5.1	Prosessering, innstøpning og snitting med OCT	23
2.5.2	Prosessering for parafin-innstøpning, snitting og farging	23
2.6	RNA isolering.....	24
2.6.2	Kontroll av nukleinsyreintegritet	25
2.7	cDNA syntese	26
2.8	Polymerase kjedereaksjon (Polymerase chain reaction, PCR).....	27

2.8.1	Rensing av PCR produkt med gelekstraksjon	28
2.8.2	Kontroll av DNA med agarosegelelektroforese	28
2.9	Kloning av gener i <i>E. coli</i> celler	28
2.9.1	Transformering av <i>E. coli</i>	29
2.9.2	Identifikasjon av ønskede kloner (<i>Screening</i>).....	29
2.9.3	Plasmid-rensing.....	30
2.10	Sekvensering.....	31
2.11	Syntese av prober til ISH	32
2.11.1	Probesyntese og Dig-merking	32
2.11.2	Rensing av probene	35
2.12	<i>In situ</i> hybridisering	35
2.12.1	ISH med vev opparbeidet fra OCT og parafinsnitting	35
2.13	Kvantitativ polymerase kjedereaksjon (qPCR).....	40
2.13.1	Prøvetillaging	40
2.13.2	Standardkurve.....	40
2.13.3	Analyse av qPCR resultat.....	41
2.13.4	Smeltekurveanalyse.....	41
3	Resultater.....	43
3.1	Konstruksjon av probe til ISH	44
3.1.1	RNA isolering	44
3.1.2	cDNA syntese og PCR av <i>cyp1a</i> og β -aktin	45
3.1.3	Kloning av <i>cyp1a</i> og β -aktin gensekvenser.....	46
3.1.4	Syntese av probe til ISH.....	47
3.2	Sense og anti-sense bestemmelse av probene.....	48
3.2.1	ISH på hjertevev	48
3.2.2	ISH på levervev	49
3.3	Histologi og ISH på levervev innstøpt i parafin	50
3.4	ISH på PCLS eksponert for BNF	54
3.4.1	Eksponering av PCLS for BNF	54
3.4.2	ISH av <i>cyp1a</i> på parafininnstøpte PCLS.....	55
3.5	Induksjon av <i>cyp1a</i> i PCLS	58
3.5.1	Syntese av cDNA til qPCR	58

3.5.2	Måling av induksjon av <i>cyp1a</i> med qPCR.....	59
4	Diskusjon.....	61
4.1	Etablering av ISH på PCLS	61
4.1.1	In situ hybridisering (ISH)	62
4.1.2	Forberedelse av vev til ISH analyser.....	63
4.1.3	Morfologien til levervevet.....	66
4.1.4	Utfordringer med overeksponering	67
4.2	Tilstedeværelse av <i>cyp1a</i> i PCLS	68
4.2.1	Tilstedeværelse av <i>cyp1a</i> i fettfylte hepatocytter.....	68
4.2.2	Lokalisering av <i>cyp1a</i> ved eksponering av PCLS for BNF	68
4.2.3	qPCR for verifisering av <i>cyp1a</i> induksjon	69
4.2.4	Ulike soner	70
4.2.5	<i>Cyp1a</i> lokalisering i PCLS ved eksponering for BNF	71
4.3	Forskjeller i uttrykning av <i>cyp1a</i> mellom laks og torsk	71
4.4	Oppgavens relevans for videre forskning.....	73
4.4.1	En nordligere kystindustri	73
4.4.2	Bruk av PCLS.....	74
4.5	Videreutvikling av ISH på torskelever	75
4.5.1	Få forsøksdyr.....	75
4.5.2	Cytotoksisitet.....	75
4.5.3	Ulik <i>cyp1a</i> uttrykning i ulike regioner av leveren.....	76
4.5.4	Optimalisering av parafininnstøpning	76
4.5.5	Ulik vekt på PCLS til qPCR.....	76
4.6	Forslag til videre studier	77
4.6.1	Studie av andre målgener	77
4.6.2	Andre vev	77
4.6.3	Sammenligne fettinnhold, alder og respons til giftstoffer.....	77
4.6.4	Studie av hele PCLS.....	78
5	Konklusjon	79
6	Vedlegg	81
6.1	Oppbygging av vektor	81
6.2	Utvikling av ISH på vev fra torsk.....	82

6.2.1	Cellulær lokalisasjon av <i>cyp1a</i> i hjertet	82
6.2.2	Cellulær lokalisasjon av β -aktin i hjertet.....	83
6.2.3	Cellulær lokalisasjon av β -aktin og <i>cyp1a</i> i lever	84
6.2.4	Cellulær lokalisasjon av <i>cyp1a</i> i PCLS eksponert for 10 μ M BNF	85
6.2.5	Forberedelse for «whole mount».....	86
6.3	Cellulær lokalisering av <i>cyp1a</i> hos atlantehavslaks	87
6.4	Materialliste	88
6.4.1	Torsk.....	88
6.4.2	Løsninger og buffere	88
6.4.3	Eksponeringsstoffer.....	93
6.4.4	Produsenter.....	93
6.4.5	«Kit».....	95
6.4.6	Primere	95
6.4.7	Utstyr og programvarer	96
6.5	Fragmenter.....	99
6.5.1	Primerpar og fragment til <i>cyp1a</i> probe.....	99
6.5.2	Primerpar og fragment til β -aktin probe.....	100
6.6	Kilder	101

Sammendrag

Marine arter og økosystemer blir utsatt for menneskeskapt stoffer fra en rekke ulike kilder. Siden de biologiske effektene for mange av disse stoffene ikke er godt karakterisert er det derfor behov for gode og effektive metoder for å studere effektene av nye, kjente og også blandinger av disse forbindelsene. Atlanterhavstorsken (*Gadus morhua*) er en økonomisk og økologisk svært viktig art i Nord-Atlanteren. Torskegenomet ble i 2011 sekvensert og annotert (Star et al., 2011) og atlanterhavstorsken er slik en viktig modellorganisme for økotoksikologiske studier.

I tråd med 3R-prinsippet (Russell og Burch, 1959) ble det nylig utviklet en metode for å tillage presisjonskuttete leverskiver (PCLS) på torsk (Eide et al., 2014). Dette er ett *in vitro* system som muliggjør eksponeringsforsøk for ulike miljøgifter og også blandinger av slike. Målet for denne oppgaven har vært å utvikle en prosedyre for *in situ* hybridisering (ISH) på PCLS og studere den cellulære lokalisasjonen av cytokrom P450 1A (CYP1A) ved eksponering for β -naftoflavon (BNF).

Oppgaven viser at det på grunn av torskens høye fettinnhold er nødvendig å støpe leveren inn i et hydrofobisk materiale, slik som parafin, ved kutting av snitt til histologi eller ISH analyser. ISH av *cyp1a* i PCLS antyder en homogen bakgrunnsuttrykning av transkriptet i ueksponert lever og en induksjon og mer heterogen uttrykning av CYP1A etter eksponering for BNF. CYP1A er en av de viktigste biomarkørene for oljerelaterte forbindelser, men denne metoden kan også benyttes til å studere tilstedeværelsen av andre transkripter og biomarkører.

ISH på PCLS muliggjør deteksjon og cellulær lokalisering av RNA og DNA og er slik en god støtte til immunohistokjemi (IHC), da det ofte ikke er tilgjengelig et egnet antistoff til proteinet man vil studere. Ved hjelp av det sekvenserte og annoterte torskegenomet (Star et al., 2011) og grunnleggende molekylærbiologiske metoder kan man produsere ønskede prober og gjennomføre ISH analyser på torskelever som beskrevet i denne oppgaven.

Forkortelsesliste

Forkortelser	Forklaring
<i>a.</i>	Arterie (<i>arteria</i>)
AGE	Agarosegelelektroforese
AhR	Aryl hydrokarbon reseptor
ALDH3A1	Aldehyd dehydrogenase
ARNT	Aryl hydrokarbon reseptor kjernetranslokator
ARP	Aktin relatert protein
bHLH	Basisk heliks-loop-heliks
BNF	β -naftoflavone
bp	basepar
cDNA	Komplementært DNA
CYP	Cytokrom P450
CYP1A	Cytokrom P450 1A
CYP1B	Cytokrom P450 1B
dATP	Deoksyadenosin trifosfat
dCTP	Deoksytytidin-trifosfat
ddNTP	Dideoksynukleosid trifosfat
DDT	Diklorodifenyltrokloroetan
dGTP	Deoksyguanosin trifosfat
dH ₂ O	MilliQ destillert vann
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetyl sulfoksid
DNA	deoksyribonukleinsyre
dNTP	deoksynukleotid trifosfat
DTT	Dithiotreitol
dTTP	Deoksytymidine trifosfat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylene Diamine-Tetra-acetic Acid
FBS	Fetal bovin serum
GST	glutation-S-transferase
IHC	Immunohistokjemi
ISH	<i>In situ</i> hybridisering
kb	Kilobasepar (nukleotid)
L-15	Leibowitz-15 vekstmedium
LBD	Lidangbindendedomene
LDH	Laktatdehydrogenase
MIC	Molecular Imaging Center
mRNA	messenger RNA

NQ01	NAD(P)H avhengig dehydrogenase quinone 1
nukH ₂ O	Nukleasefritt vann
PAS	Per-Arnt-Sim
PCLS	Pressisjonskuttete leverskiver
PCR	Polymerase kjedereaksjon
PF	Paraformaldehyd
qPCR	Kvantitativ polymerase kjedereaksjon
qRT-PCR	kvalitativ sanntids polymerase kjedereaksjon
RPL22	Ribosomalt protein
Rpm	Runder per minutt
rRNA	ribosomalt RNA
RT	romtemperatur
RT	Sanntid (Real time)
TAE	Tris base, eddiksyre og EDTA
TBE	Tris-Borisk syre-EDTA
TEA	trietanolamin
T _m	Smeltetemperatur
UGT1A1	UDP-glukoronosyltransferase 1A1
UGT1A6	UDP-glukoronosyltransferase 1A6
v.	vene (<i>vena</i>)
x g	Ganger gravitasjon

I denne oppgaven vil proteiner skrives med STORE bokstaver, mens gen skrives i *kursiv*.

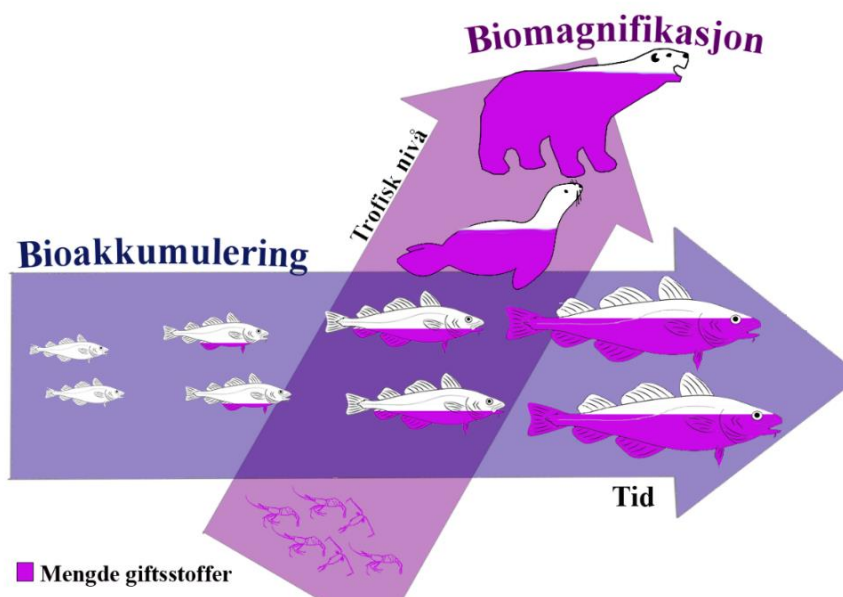
1

INNLEDNING

1.1 Bakgrunn

Marine økosystemer utsettes for utslipp av kjemikalier fra petroleums- og kystnær industri, jordbruk, kloakk, luftforurensning, dumping, landfyllinger, gruvedrift, legemiddelindustrien, matavfall og tilsetningsstoffer i akvakulturen.

Mange av disse stoffene har en negativ påvirkning på organismer og økosystemer, og karakteriseres derfor som miljøgifter. Flere av miljøgiftene har en lang halveringstid og er persistente i naturen, noe som muliggjør opptak til organismer over lengre perioder. Blant disse er miljøgiftene som klassifiseres som persistente organiske miljøgifter (persistent organic pollutants, POP). Typisk for POPs er at de er lipofile forbindelser og vil derfor akkumulere i organismer ved at de lagres i fettrike vev som lever og underhuds fett. Dersom inntak av miljøgifter er større enn utskillingen av disse vil giftene bioakkumulere ved at organismen over tid få en økt konsentrasjon av miljøgiftene (). Konsentrasjonen av miljøgifter kan også øke mellom ulike ledd i næringskjeden, hvor man i høyere trofiske nivåer vil se en økt mengde miljøgifter. Dette kalles biomagnifikasjon ().



Figur 1.1: **Oppkonsentrering i ulike organismer.** Grunnet miljøgifters persistens i naturen og akkumulering i fettrike vev vil giftstoffer oppkonsentreres i organismer over tid (bioakkumulering) og samtidig øke i nivå oppover de trofiske nivåene i næringskjeden (biomagnifisering). Mengden giftstoff i de ulike artene (indikert i lilla) er kun en illustrasjon på hvordan konsentrasjonen øker og er ikke et reelt bilde på mengde giftstoffer. Illustrasjon laget av Marie Nohre, med inspirasjon fra:

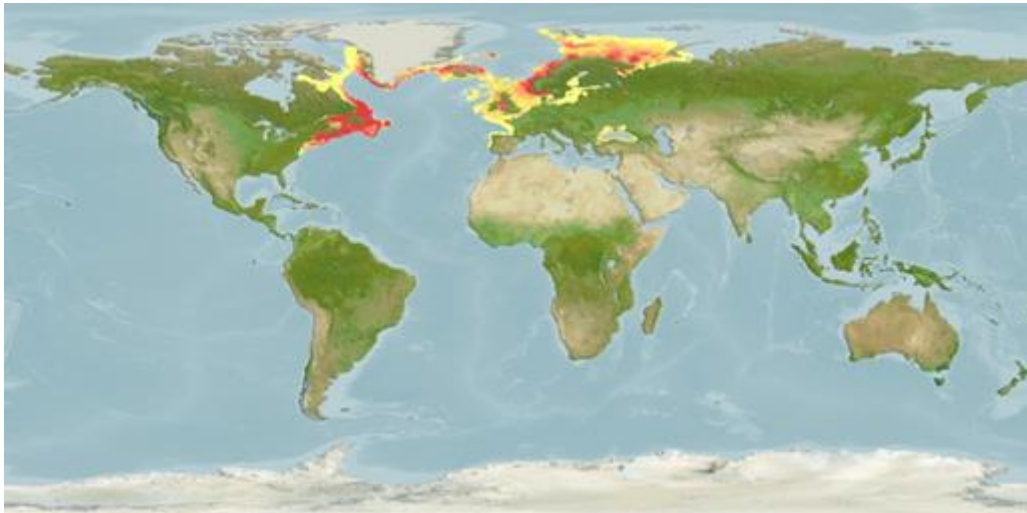
<https://sustainablenano.files.wordpress.com/2013/12/3-bioaccumulation-vs-biomagnification.png>, Aleksander K. Madsen og <http://www.drawingtutorials101.com/how-to-draw-an-atlantic-cod>

Effekter av miljøgifter på organismer kan ha svært ulik karakter. Flere giftstoffer er vist å kunne gi DNA skader og føre til utvikling av kreft, gi oksidativt stress og skader på makromolekyler, påvirke utviklingen i tidlige livsstadier, forårsake endringer i immunsystemet og påvirke reproduktive prosesser (Harris et al., 2001; Incardona et al., 2006; Meier et al., 2007; Myers et al., 2003b; Reynaud og Deschaux, 2006; Sturve et al., 2006)

Kunnskapen om miljøgifters påvirkning på organismer økes gjennom forskning og det har nylig blitt et økt fokus omkring såkalte blandingseffekter eller «cocktaileffekter». Med dette menes at ulike stoffer kan virke samlet og gi additive, antagonistiske, synergistiske eller potensierteffekter, noe som vil si at effektene kan summeres, hemmes, økes eller ved at et kjemikalie som ikke medierer en effekt alene øker effekten til ett annet stoff (Casarett et al., 2010). Stoffer som dermed tilsynelatende ikke har noen effekt ved eksponering enkeltvis, kan derimot gi effekt ved eksponering sammen med andre forbindelser. Til sammen kan derfor mangfoldet av stoffer utgjøre en trussel for marine økosystemer og det er derfor viktig å kartlegge hvordan disse avfallsstoffene kan påvirke ulike organismer.

1.2 Atlanterhavstorsk (*Gadus morhua*)

Atlanterhavstorsken (*Gadus morhua*) tilhører rekken Chordata, klassen Actinopterygii, orden Gadiformes og familien Gadidae. Ordenen består for det meste av saltvannsfisker og familien Gadidae er utbredt i kalde områder på den nordvestlige halvkule. Arten kan tolerere store temperaturforskjeller, fra sommertemperaturer over 20 °C, til temperaturer rundt 0 °C, men foretrekker temperaturer mellom 4 og 7 °C. Atlanterhavstorsken er utbredt på begge sider av Nord-Atlanterhavet fra Cape Hatteras til Nova Scotia, Biscaya til Nord-Norge, i Nordsjøen og Østersjøen (se Figur 1.2). Torsken kan leve i ulik salinitet, hvor den rundt Bottenvika lever med et saltinnhold på under 10 ‰, mens de fleste populasjonene oppholder seg i habitater med en salinitet på 28-35 ‰ (FAO, 2004).



Figur 1.2: **Utbredelse av atlantehavstorsken.** Kartet viser en gradering av torskens leveområde utfra tetthet av torskebestanden. Gult indikerer lav tilstedeværelse, mens rødt indikerer høy tilstedeværelse av arten. Kilde: http://www.incofish.org/Workpackages/WP3/images/Aquamap_Gadus_morhua.jpg

Torsken gjenkjennes ved at overkjeven er lengre enn underkjeven og særlig dens karakteristiske, lange skjeggtråd. Den laterale linjen er tydelig lys og sterkt kurvet under den andre dorsale finnen og strekker seg så rett bak til halefinnen. Alle finnene er runde og med kort avstand seg i mellom. I tillegg til tre dorsale finner har torsken to anale finner, en bukfinne, to brystfinner og en separat, firkantet kuttet halefinne, som vist i Figur 1.3.



Figur 1.3: **Morfologiske trekk ved atlantehavstorsken**
Kilde: http://ec.europa.eu/fisheries/marine_species/wild_species/cod/index_en.htm

Hos torsken finner man i hovedsak to typer adferd; de stasjonære kystnære torskene som i hovedsak er bentiske, og de vandrende, oseaniske torskene (skrei) som er pelagiske. Fargen på torsken varierer avhengig av dens bentopelagiske karakter. De individene som lever i nærheten av tang og steinbunn kan ha en gylden eller dyp rød farge og blir sjelden større enn 80 cm. De pelagiske individene har ofte en grønn-grå farge med brune eller grå prikker på den dorsale

siden og kan bli opp til 1,8 m og 56 kilo (FAO, 2004). Den laterale siden er ofte grå-hvit. Noen individer er svært stasjonære gjennom hele livet, mens pelagiske individer kan migrere mellom havet og langs kysten (FAO, 2004). Berg et al. (2016) har sett at den ulike adferden til skrei og kysttorsken mest sannsynlig er divergert gjennom kromosomale rearrangeringer. De eldre individene kan finnes helt ned til 500-600 m, men bestanden finnes på alle dybder og er i hovedsak bunneterere. Protein/fett/karbohydrat-ratioen ligger vanligvis på 50/15/10 og torsken livnærer seg på ormer, crustacea, mollusker og småfisk, som sild og lodde (Pethon og Nyström, 1994).

Fettinnholdet i leveren er høyere hos torsk enn hos andre arter, hvor levercellene, hepatocytene, har et økt cellulært volum da de inneholder fettdråper (Fujita et al., 1986). Fettprosenten og størrelsen på leveren er avhengig av fettinnholdet i kosten (Kjær et al., 2009), hvor mer enn 80 % av lipidinnholdet i fisken kan lagres i leveren (Hansen et al., 2008). Den høye bestanddelen av fett (40-70 %) i lever, kombinert med eksponering for lipofile POPs, kan føre til en bioakkumulering av giftstoffer i dette organet hos torskefisker (Husøy et al., 1996). Da arten kan gjennomgå sultperioder, er det høye fettinnholdet i leveren mest sannsynlig utviklet for å ha et energilager til tider hvor det er mindre tilgang på føde (Kjær et al., 2009). I perioder med sult vil torsken måtte benytte seg av fettreservoarene i leveren og de opphopede, lipofile miljøgiftene vil da kunne frigjøres ut i blodomløpet og medføre toksiske effekter på individet. Torsken er derfor slik ekstra sårbar for eventuelle eksponeringer for miljøgifter og sultperioder.

Flere arter innen torskefamilien er noen av våre viktigste, økonomiske fiskearter (Langeland, 1992). Atlanterhavstorsken har vært og er en kommersielt viktig fisk for pelagiske- og kystfiskeriene i Nord-Amerika og Nord-Europa. Som matfisk blir den benyttet som en kilde i ulike produkter, alt fra leverolje til torskefileter, både i Norge og som eksportprodukt (Lythgoe og Lythgoe, 1991). Rundt 80 % av fangsten i Norge blir eksportert, hvor hovedmarkedene er Danmark, Sverige, Frankrike, Tyskland, Spania og Nederland (FAO, 2004). Atlanterhavstorsken er også økologisk svært viktig ved at den både er en predator og et byttedyr, og slik en verdifull bidragsyter i marine økosystemer. Siden torsk er både en økologisk og økonomisk viktig art, er det nødvendig å gi denne arten oppmerksomhet slik at man kan opprettholde levedyktige torskepopulasjoner. Torsk blir i tillegg benyttet som en indikatorart i miljøovervåkningsstudier, blant annet i overvåkning av vannsøylen (OSPAR, 2009).

Torskegenomet ble i 2011 sekvensert og annotert (Star et al., 2011). Tilgjengeligheten av et sekvensert genom har gjort atlantehavstorsken til en attraktiv modellorganisme for å studere effekter av miljøgifter. Ved hjelp av torskegenomet kan man nå gjennomføre omfattende toksikogenomiske analyser og studere hvordan ulike miljøgifter påvirker torsken på et molekylært nivå, ved hjelp av transkriptomikk og proteomikk (Karlsen, Odd André et al., 2011; Karlsen, O. A. et al., 2014; Yadetie et al., 2014; Yadetie et al., 2013).

1.3 Biotransformasjon

Biotransformasjon er betegnelsen på prosessen der fremmedstoffer gjennomgår ulike kjemiske modifiseringer slik at de lettere kan skilles ut fra cellene. Biotransformasjon skjer katalytisk ved at enkelte enzymer med bred substratspesifisitet metabolsk omdanner xenobiotiske kjemikalier til mer vannløselige forbindelser. Denne detoksifiseringsprosessen endrer de fysiske egenskapene til fremmedstoffer fra de som favoriserer absorpsjon (lipofilisitet) til egenskaper som fremmer ekskresjon (hydrofilisitet). Biotransformasjon fører vanligvis til at stoffer blir mindre toksiske, men den kjemiske endringen kan også resultere i skadelige effekter ved at fremmedstoffer blir omdannet til mer reaktive metabolitter. Syntesen av enzymene som er involvert i biotransformasjonen kan bli induert av xenobiotiske stoffer (enzym induksjon) eller uttrykkes konstitutivt.

1.3.1 Faser i biotransformasjonen

For å detoksifisere fremmedstoffer gjennomgår kjemikaliene vanligvis tre ulike biotransformasjonsfaser. Under fase I-reaksjoner blir kjemikaliene mer reaktive og vannløselige. Disse reaksjonene katalyseres av ulike enzymer gjennom ulike hydrolyse-, reduksjons- eller oksideringsreaksjoner, hvor cytokrom P450 systemet er det mest beskrevne og blant de viktigste. Neste trinn i biotransformasjonen består av fase II reaksjoner hvor forbindelsen gjøres ytterligere mer vannløselig ved konjugering med endogene molekyler gjennom for eksempel acetylering, glukoronidering, sulfonering, metylering, glutation- eller aminosyre konjugering. I den tredje og siste fasen blir konjugatene transportert over cellemembranene av spesifikke transportproteiner. Videre kan fremmedstoffet bli skilt ut fra organismen gjennom urin, avføring, svette, melkeproduksjon eller spytt (Casarett et al., 2010).

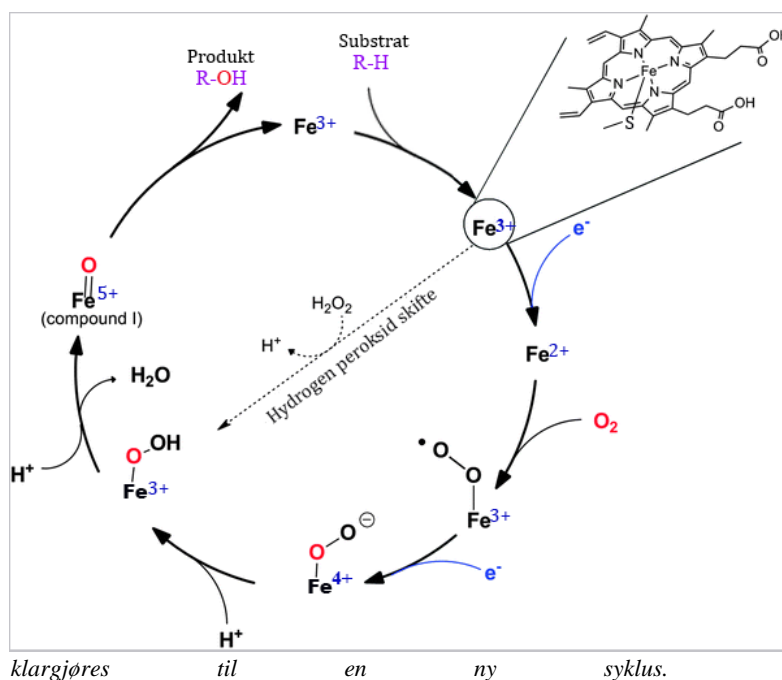
1.3.2 Cytokrom P450

En viktig enzymfamilie i fase I av biotransformasjonen er cytokrom P450 (CYP) enzymene (Nebert og Gonzalez, 1987; Nelson et al., 1996). Superfamilien består (pr. 2011) av 12,456 P450er som er navngitt, som fordeler seg på 1000 CYP familier og 2500 subfamilier, i tillegg til rundt 6000 flere som ikke enda var navngitt (Nelson, 2011). CYP finnes i ulike livsformer, både blant sopp, mikroorganismer og i plante og dyreriket (Coon et al., 1992). Mennesket har 57 ulike gener og 59 pseudogener som koder for CYP proteiner, men antallet CYP kodende gener i dyr kan variere (Nelson et al., 2013). For torsk er det identifisert 29 ulike CYP enzymer fra 9 forskjellige CYP familier og 15 subfamilier (Karlsen, Odd André et al., 2012). Man trodde lenge at CYP enzymer hovedsakelig ble benyttet i metabolismen av fremmedstoffer i leveren, men det er vist at den også bidrar i viktige biosynteser og fysiologiske prosesser (Gonzalez og Nebert, 1990; Guengerich, 2015; Nebert og Gonzalez, 1987; Nebert og Russell, 2002; Schuster et al., 2003; Zanger og Schwab, 2013).

CYP-enzymene er i hovedsak hemproteiner og monooksygenaser med en stor katalytisk- og substratdiversitet (Ortiz de Montellano, 2005). Enzymene benytter jernatomets ulike oksidasjonstilstander katalytisk for å gjøre substratene mer elektrophile, polare og vannløselige (Denison, M.S. og Whitlock, 1995; Ortiz de Montellano, 2005). Et oksygenatom fra molekylært oksygen blir ved hjelp av CYP-enzymet overført til substratet og det resterende oksygenet blir redusert til vann (H_2O) (Ortiz de Montellano, 2005), som forklart i Figur 1.4.

Figur 1.4: **Katalytisk syklus for cytokrom P450**

Syklusen viser de ulike intermediatstegene som fører til at substratet ($R-H$) blir hydroksilert ($R-OH$). Hydroksileringsreaksjonen er ett koblet elektrontransportsystem med flere tilleggsenzym som befinner seg i endoplasmatisk retikulum. Jernatomets ulike oksidasjonstilstander bidrar katalytisk i prosessen som vist her. I det første steget vil en elektronoverføring skje fra kofaktoren NADPH, via flavoproteiner, noe som medfører et økt positivt potensial for jernet i hemgruppen. Binding til oksygenmolekylet og tilførsel av elektron fra NADPH reduktase eller cytokrom b5 fører til en økt positiv ladning av komplekset. Protonering danner et treverdig jernatom og videre protonering medfører en utskilling av vann. Substratet bindes så til oksygenet, hydroksileres og enzymet klargjøres til en ny syklus.



Illustrasjon av Marie Nohre, med inspirasjon fra: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2014/cc/c3cc49747j>

De viktigste familiene som er involvert i metabolismen av fremmedstoff er CYP1, CYP2, CYP3 og CYP4. CYP4 har også en nødvendig endogen rolle i metabolismen av fettsyrer og endogene stoffer, slik som omega (ω)-oksideringen av fettsyrer og eikosanoider (Edson og Rettie, 2013). Eikosanoider er essensielle signalmolekyler som bidrar til sammentrekning av glattmuskulatur, stimulering og hemming av blodplatekoagulering og har påvirkning på blodtrykket.

Noen CYP-enzymmer blir uttrykt konstitutivt, mens andre kun blir induisert ved stimuli, som for eksempel av hormoner eller fremmedstoffer (Ortiz de Montellano, 2005). Denne responsen gjør cellene tilpasningsdyktige til kjemiske endringer i miljøet. Reguleringen skjer hovedsakelig på transkripsjonsnivå ved at CYP-genene blir regulert av transkripsjonsfaktorer. Aryl hydrokarbon reseptor (AhR), pregnane X reseptor (PXR) og konstitutiv androstan reseptor (CAR) er eksempler på transkripsjonsfaktorer som er involvert i regulering av ulike CYP gener (Guengerich, 1999; Waxman, 1999).

CYP1A er en velkjent og godt karakterisert monooksygenase som metaboliserer fremmedstoffer, slik som dioksiner, furaner, polyaromatiske hydrokarboner (PAH) og polyklorinerte bifenyler (PCB) (Stegeman og Hahn, 1994). CYP1A enzymet er i fisk hovedsakelig uttrykt i lever, men finnes også i flere ekstrahepatiske vev, slik som nyre, hjerte, tarm, gjeller, luktesystemet, gonader, hjerne og endokrine vev (Husøy et al., 1994). I ekstrahepatiske vev er CYP1A uttrykt i vaskulært endotelium, som er de første cellene i vevene som blir eksponert for blodbårne giftstoffer. I leveren ser man derimot den største uttrykningen av CYP1A i hepatocytene, da hovedvekten av biotransformasjonen foregår her, men også i de vaskulære endotele cellene. Oppreguleringen av CYP1A ved eksponering for blant annet dioksiner, PAH'er og dioksinlignende PCB'er mediert av transkripsjonsfaktoren aryl hydrokarbon reseptor (AhR)

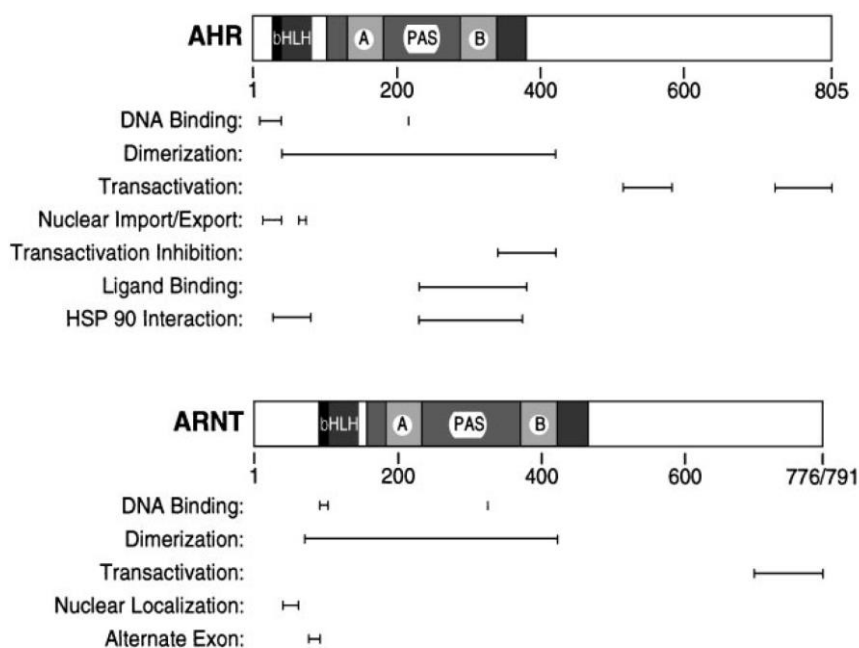
1.3.3 Aryl hydrokarbon reseptoren (AhR)

AhR er en ligandaktivert transkripsjonsfaktor som er involvert i reguleringen av en rekke enzymer i biotransformasjonen av fremmedstoffer, hvor *cyp1a* er blant de mest beskrevne målgenene. Reseptoren er medlem av en familie transkripsjonsfaktorer som inneholder en basic helix-loop-helix (bHLH) konfigurasjon og et Per-Arnt-Sim (PAS) domene (Whitlock, 1999). bHLH/PAS proteiner er viktige regulatorer i fundamentale biologiske prosesser, slik som opprettholdelse av homeostase, sirkadiske rytmer og regulering av prosesser som er viktig for normal utvikling (Hahn et al., 1997). bHLH domenet er lokalisert nær N-terminalen på proteinet

(Figur 1.5) og bidrar til bindingen til DNA (Whitlock, 1999). bHLH domenet er også viktig for transport over kjernemembranen siden kjernelokaliseringssignalet (NLS), som bidrar til transport av proteinet fra cytoplasma, er lokalisert i dette domenet (Ikuta et al., 2000). PAS domenet er utbredt blant eukaryoter, arker og bakterier og inneholder to subdomener, PAS A og B (Whitlock, 1999).

I fravær av et ligand finnes AhR som et kompleks i cytoplasma hvor bHLH og PAS B er bundet til to heatsjokk 90 (HSP90) proteiner som bidrar til å holde AhR i en inaktiv konfigurasjon (Kazlauskas et al., 2001). I tillegg kan to andre proteiner bindes til komplekset; hepatitt B virus X assosiert protein (XAP2) og p23 som begge bidrar til å stabilisere proteinkomplekset (Kazlauskas et al., 2001). XAP2 bindes til PAS domenet, mens p23 binder til både bHLH og PAS domenet og medfører en inhibering av kjernetransport (Kazlauskas et al., 2001). Det er vist at AhR ligander bindes uavhengig av XAP2 og p23 binding, og at p23 er ikke avgjørende for responsen til reseptoren. Derimot kan fraværet av XAP2 og p23 føre til en destabilisering av AhR (Fukunaga et al., 1995; Kazlauskas et al., 2001). Ved binding av en ligand til AhR, vil proteinkomplekset transporteres til cellekjernen og HSP90, XAP2 og p23 frigjøres fra komplekset (Figur 1.5). AhR heterodimeriserer så med arylhydrokarbon kjernetranslokator (ARNT) ved bHLH-PAS domenet, som er avgjørende for bindingen av responselementer i DNA (Fukunaga et al., 1995; Ikuta et al., 2000). Dette medfører en oppregulering av blant annet CYP1A, men også blant annet glutation-S-transferase (GST), UDP-glukoronosyltransferase (UGT1A1 og UGT1A6), diaforaser, NAD(P)H avhengig dehydrogenase quinone 1 (NQO1) og aldehyddehydrogenase (ALDH3A1) (Nebert et al., 1990; Pretti et al., 2001).

Tidligere trodde man at ARNT var nødvendig for translokasjonen av AhR til kjernen, derav navnet, men det viste seg at det kun er en viktig dimeriseringspartner i bindingen til DNA-sekvensen (Fukunaga et al., 1995; Hoffman et al., 1991; Holmes og Pollenz, 1997; Johnson, 1991; Lindebro et al., 1995; Pollenz et al., 1994). Den strukturelle organiseringen til ARNT er lik den som finnes i AhR, inkludert et N-terminalt bHLH domene, en PAS kjernelokaliseringsskvens og PAS A og B subdomenene (Figur 1.5) (Hoffman et al., 1991; Whitlock, 1999).

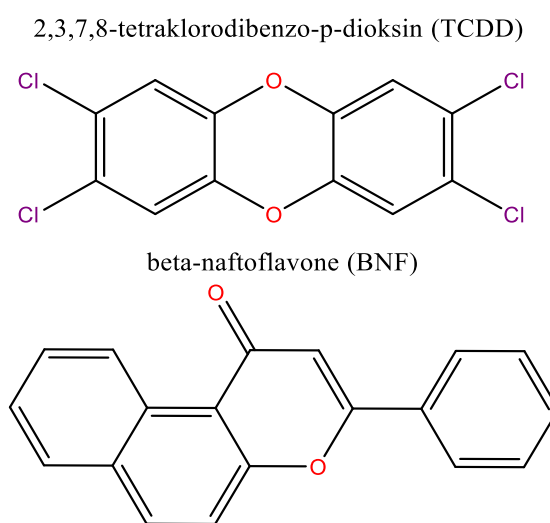


Figur 1.5: Strukturell oppbygging av arylhydrokarbonreseptoren (AhR) og arylhydrokarbon kjernetranslokator (ARNT). Figuren viser den strukturelle oppbyggingen og regionene for DNA binding, dimerisering, transaktivering, kjerne import og eksport, inhibering av transaktivering, ligandbinding og HSP90 interaksjon for AhR og ARNT. Kilde: (Whitlock, 1999)

1.3.4 Ligander for AhR

Det er ulike grupper kjemikalier som med ulik affinitet kan binde til denne reseptoren; blant annet polyaromatiske hydrokarboner (PAH) og halogenerte aromatiske hydrokarboner (HAH), dioksiner og dioksin-like polyklorinerte bifenyler (PCB) (Denison, M. S. og Nagy, 2003; Denison, M.S et al., 2002; Poland og Knutson, 1982). Det som kjennetegner disse ligandene er deres stabile, planare aromatiske struktur. Flere av de miljøskadelige kjemikalieutslippene fra oljenæringen er PAHer eller PAH-lignende kjemikalier som er potensielt skadelige for ulike organismer og miljøet. De inneholder flere aromatiske ringer, er ofte planare og vil derfor kunne være AhR agonister (Denison, M. S. og Nagy, 2003).

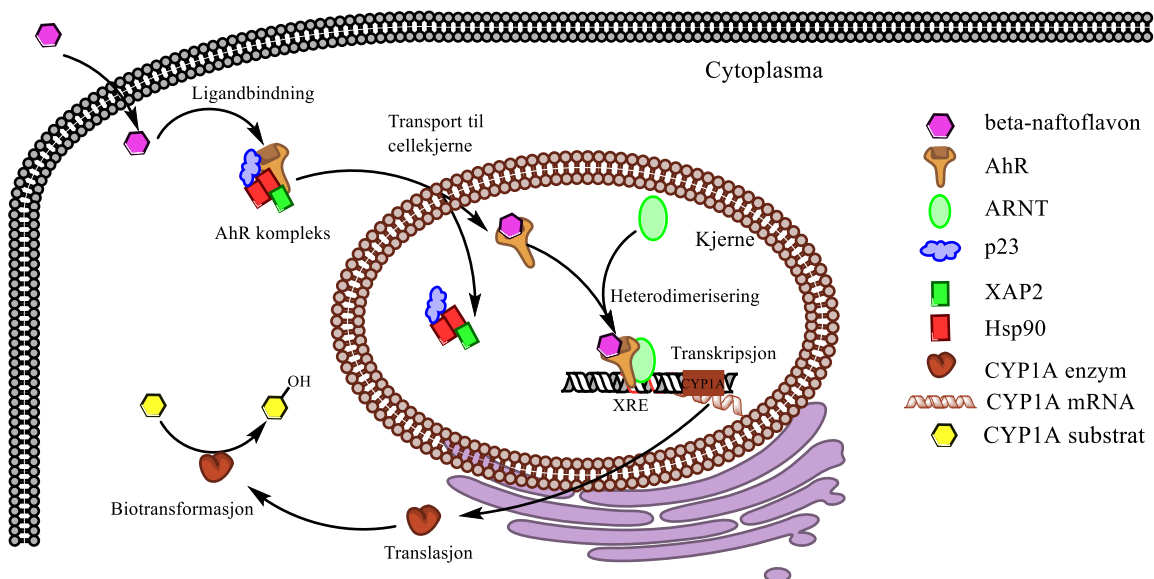
To kjente AhR agonister er den potente 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD) (Denison, M.S. og Whitlock, 1995) og flavonoiden β -naftoflavon (BNF) (Figur 1.6). TCDD og BNF blir ofte benyttet ved studier av AhR og induksjon av målgenet *cyp1a*.



Figur 1.6: Kjemisk struktur til 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD) og beta-naftoflavon (BNF)

BNF blir i denne masteroppgaven benyttet som en AhR agonist, og dette er et kjemikalie som ligner på PAH i struktur og oppbygning ved at det inneholder flere aromatiske ringer i en planær konfigurasjon (Denison, M. S. og Nagy, 2003). BNF har har en høy indusibilitet av CYP1A, men en lavere toksisitet enn TCDD og kjemikaliet er derfor gjerne en mer gunstig modellforbindelse for å studere AhR interaksjoner (Denison, M. S. og Nagy, 2003).

Kunnskapen om BNF er veldokumentert, og dose-respons effekter BNF har på AhR og CYP1A induksjon er blitt omfattende studert (Chung-Davidson et al., 2004; Goksøy et al., 1991b; Grøsvik et al., 1997; Kloepper-Sams og Stegeman, 1989; Olsvik et al., 2007; Pretti et al., 2001; Wilson et al., 1998). BNF binder til AhR reseptoren som vist i Figur 1.7 og medfører en induksjon av CYP1A og andre biotransformasjonsenzymmer. Et økt antall biotransformasjonsenzymmer medfører en økt metabolisering og detoksifisering av både BNF og andre giftstoffer.



Figur 1.7: **Aktivering av AhR og induksjon av cyp1a.** β -naftoflavon (BNF) bindes til den intracellulære arylhydro karbon-reseptoren (AhR) som videre heterodimeriserer med Aryl hydrokarbon reseptor kjernetraslokator (ARNT). Det dimeriserte komplekset binder til det spesifikke xenobiotisk-responsivt dlementet (XRE) oppstrøms for cyp1a genet på DNA sekvensen (Zhu, 2010) og starter transkripsjonen av cyp1a mRNA. En vil slik få en oppregulering av genets mRNA og videre CYP1A enzymet (Denison, M.S. og Whitlock, 1995). AhR-ARNT-BNF komplekset kan også binde til andre XRE og gi en oppregulering av andre gener og proteiner.

1.3.5 CYP1A som biomarkør

En biomarkør kan være strukturer, stoffer eller prosesser som gir målbare biologiske responser ved eksponering for fremmedstoffer og som reflekterer eksponering for eller effekter av miljøgifter (Goksøyr, 1994; Peakall, 1994). Induserbare proteiner er attraktive kandidater som biomarkør ved at endringer i proteinnivået kan benyttes i overvåkningsøyemed og dermed gi et tidlig varsel om at populasjoner, samfunn og økosystem blir eksponert for fremmedstoff.

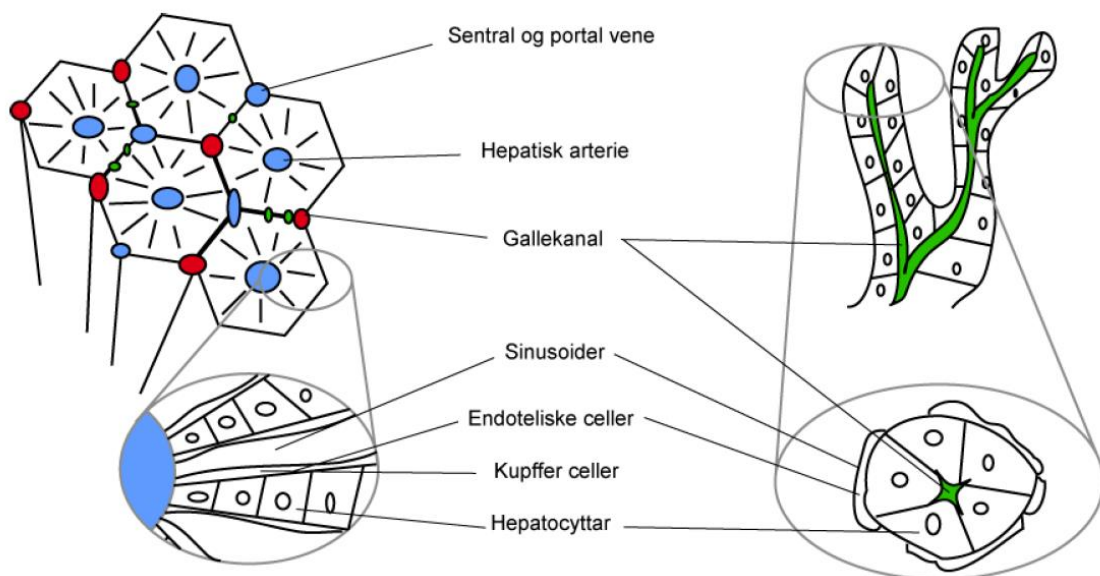
Da uttrykkningen av CYP1A blir aktivert av ulike planare polyaromatiske hydrokarboner er måling av CYP1A et verktøy som kan benyttes til å detektere eksponeringen for og effektene av PAH miljøforurensinger (Goksøyr og Förlin, 1992; Pretti et al., 2001). CYP1A har en lang historie som en biomarkør for eksponering av HAH, PAH, dioksiner og lignende aromatiske kjemikalier. CYP1A har en lav konstitutiv (bakgrunn) uttrykkning i blant annet leverceller og høy induserbarhet. Induksjon av CYP1A kan måles på ulike nivåer, både gjennom aktiviteten til enzymet, proteinmengden eller endringer i gentranskripsjon. CYP1A enzymaktivitet kan måles gjennom 7-etoksyresourfin-O-deetylase (EROD) –assays (Goksøyr, 1995). Nivåer av CYP1A proteinet kan måles med antistoff, som Western blotting, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) og immunohistokjemi. Dessuten kan genekspressjon av *cyp1a* mRNA måles med Northern blotting, kvantitativ sanntids polymerase kjedereaksjon (real time-polymerase chain reaction, qRT-PCR, i denne oppgaven kalt qPCR) og *in situ* hybridisering (Goksøyr, 1995).

1.4 *In vitro* toksikologi

For å studere kjemikaliers effekt på ulike arter er det lenge blitt benyttet levende fisk i *in vivo* forsøk. Dette kan medføre lidelse for fisken og ofte et behov for mange forsøksdyr (Casarett et al., 2010). I et forsøk på å redusere antall forsøksdyr i grunnforskningen er det utviklet ulike *in vitro* metoder. Dette gjøres for å erstatte forsøk som kan medføre lidelse på forsøksdyrene, redusere antall dyreforsøk på levende organismer og forbedre studiene slik at forsøkene blir mer effektive og samtidig frembringer troverdige data, i tråd med 3R-prinsippet (Replace, reduce, refinement) (Russell og Burch, 1959). Dette kan blant annet gjøres ved å bruke egnede cellelinjer, ved å benytte primære cellekulturer, slik som primære hepatocytter, eller gjennom å benytte vevskulturer.

1.4.1 Studier på torskelerver

Flere vitale biokjemiske og metabolske funksjoner, som aminosyre-, karbohydrat- og fettstoffsiftet, lagring av fett og vitaminer, glykogensyntese og glukoneogenesen foregår i leveren (Hinton et al., 1992; Oppen-Berntsen et al., 1992; Pelissero et al. 1993). En annen viktig funksjon for leveren er detoksifisering av metabolske avfallsprodukter og deaminering av aminosyrer for produksjon av urea (Young et al., 2000). Leveren bidrar og til destruksjon av brukte røde blodceller, syntese og sekresjon av galle, ekskretoriske produkter og eksokrin sekresjon (Akiyoshi og Inoue, 2004; Miller et al., 1951; Young et al., 2000).



Figur 1.8: **Organisering av celler i levervev hos mennesker (t.v) og fisk (t.h.).** Der man hos fisk finner tubulære gallekanaler omgitt av hepatocytter og sinusoider finner man hos mennesket rader med hepatocytter og sinusoider som er dekt med Kupffer celler som omringer gallekanalene. Illustrasjon er laget av (Eide, 2010)

Leveren har stor blodgjennomstrømning gjennom *vena portae hepatis* som frakter aminosyrer, enkle sukkermolekyler og andre produkter fra nedbrytningsprosesser i tarmen. Det venøse blodet har et lavt oksygennivå, så oksygenbehovet blir dekt gjennom tilførsel av arterielt blod fra *arteria (a.) hepatica*, som er en gren fra *a. coeliacae*. I motsetning til mammalielever finner man ikke triader, som er grupper av arterie, vene og gallegang i fiskelever, men i stedet finnes det grupper av gallegang og noen arterier kalt diader. Blodet blir videre fjernet gjennom den hepatiske venen og tilbakeført til hjertet (Kryvi og Totland, 1995).

Leveren er en av portalene til vevene i kroppen og blodgjennomstrømningen blir derfor høy. Da den metabolske aktivitet også er høy er leveren spesielt sårbar sammenlignet med mindre metabolsk aktive vev, slik som huden. Leveren kan derfor bli eksponert for mange potensielt toksiske stoffer før fortykning skjer gjennom systemisk sirkulasjon (Lautt, 2009).

I et toksikologisk perspektiv er leveren spesielt interessant, da svært mange detoksifiseringsreaksjoner av ulike fremmedstoffer foregår nettopp her. Å få kunnskap om de ulike biotransformasjonsprosessene og responsene i torsk leveren på ulike miljøgifter har vært studert lenge, men fremdeles er det mye som gjenstår å forstå (Eide et al., 2014; Goksøyr, 1985; Goksøyr et al., 1987b; Goksøyr et al., 1988; Goksøyr et al., 1986; Goksøyr og Solberg, 1987; Karlsen, Odd André et al., 2012).

1.4.2 Primære hepatocyttkulturer

Et *in vitro*-system som er blitt mye benyttet for å studere fysiologiske og toksikologiske responser i leveren er primære hepatocyttkulturer (Ellesat et al., 2011; Segner, 1998; Sjøfteland et al., 2010). Hepatocytter kan isoleres fra andre celletyper i leveren ved dissosiering av vev og tetthetsentrifugering (Ellesat et al., 2011; Sjøfteland et al., 2010). Det er derimot vist at dette er en mindre effektiv metode for torsk enn hos andre arter, da torsk har en unik hepatocyttemorfologi, hvor størrelsen på torskens hepatocytter varierer avhengig av ernæringsstatus og mengden lipider lagret intracellulært i hepatocytterne (Ellesat et al., 2011; Kjær et al., 2009).

1.4.3 Presisjonskuttete leverskiver fra atlantehavstorsk

I motsetning til primære hepatocyttkulturer vil man gjennom presisjonskuttete leverskiver (PCLS) bevare den opprinnelige tredimensjonale strukturen og vevsintegriteten. Levercellene vil heller ikke bli eksponert for de enzymatiske stressorene som blir benyttet under preparering av primære hepatocyttkulturene. PCLS er primært blitt brukt i mammaliestudier, men er utført på regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) og atlantehavslaks (*Salmo salar*) (Cravedi et al., 1998; Lemaire et al., 2011). Etableringen av PCLS på atlantehavstorsk er blitt gjort nylig, hvor Eide et al. (2014) så at PCLS også fungerer på atlantehavstorsk og at atlantehavstorsken reagerer godt ved eksponering av den velkjente AhR agonisten BNF.

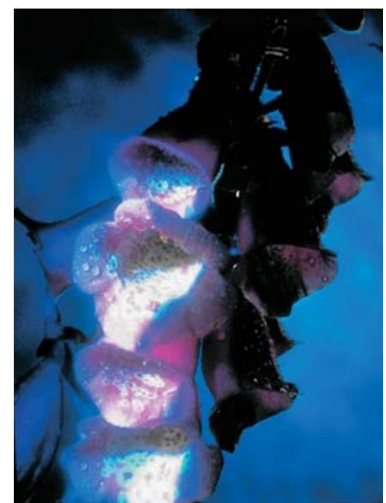
Siden PCLS er svært tynne, 250 µm, vil vekstmediumet tilføre cellene tilstrekkelig næring og oksygen i en gitt periode. Eide et al. (2014) så at nesten alle cellene fra vevsnitt fra torsk leveren var inntakte 24 timer etter eksponering. Etter 48 timer hadde noen hepatocytter begynt å brytes ned og kollapse, men majoriteten av hepatocytterne var fortsatt levedyktige og morfometrisk intakte etter 72 timer (Eide et al., 2014). Ved å benytte PCLS vil man beholde den romlige strukturen og PCLS vil kunne fungere som normale cellesystemer. Dette samspillet vil man i likhet med *in vivo* forsøk kunne se i PCLS (Eide et al., 2014) og PCLS kan dermed gi et mer riktig bilde av leverens respons på giftstoffene enn andre *in vitro* systemer, slik som primære

hepatocyttkulturer (Boess et al., 2003; Elferink et al., 2008). Hepatocytene gir den største responsen ved eksponering for giftstoffer, men endotele celler, som danner grunnlaget til blodårer, perisinusoidale itoceller og erytrocytter er direkte eller indirekte involvert ved eksponering (Eide et al., 2014).

1.5 *In situ* hybridisering (ISH)

In situ hybridisering (ISH) er en teknikk som muliggjør deteksjon av DNA eller RNA sekvenser i vevseksjoner med bruk av komplementære RNA prober som kan detekteres (Nakamura, 1990). Teknikken ble uavhengig utviklet og introdusert av forskningsgruppen til John, Birnstiel og Jones og forskningsgruppen til Pardue og Gall i 1969. ISH er en nyttig teknikk for å avgjøre romlige mønstre av mRNA uttrykning i vev. Teknikken muliggjør en cytologisk lokalisering og visualisering av spesifikke nukleinsyresekvenser på enkeltcellenivå i morfologisk bevarte celler og vevseksjoner. Sensitiviteten og effektiviteten er avhengig av forskjellige variabler, slik som probe konstruksjon og hybridiseringsforhold, vevskonservering og fiksering, samt metoden som benyttes for å detektere probesignalet. Kunnskapen gir en god tilleggsinformasjon til teknikker som kvantitativ genekspressjon ved kvantitativ sanntids polymerase kjedereaksjon (qRT-PCR, i denne oppgaven kalt qPCR) og gjennom ISH metoden kan en få både topologisk informasjon og bestemme hvilke celletyper som uttrykker genet (Coghlan et al., 1985). En eller flere nukleinsyresekvenser kan merkes med en eller flere markører. Merkingen kan enten skje direkte med kortere nukleinsyresekvenser, haptener, slik som biotin eller 2,4-dinitrofenol, med plantesteroidet digoksygenin (DIG) eller indirekte med fluoriserende molekyler (Dettmeyer, 2011).

Radioaktive prober har en høy sensitivitet, men medfører visse risikoer. I denne oppgaven ble det derfor benyttet digoksygenin (DIG)-merking for å detektere mRNA i lever- og hjertevev. Digoksygenin (DIG) systemet ble utviklet og er under utvikling av Roche Applied Science, hvor det første kittet ble introdusert i 1987 (Roche, 2008). Dette er en indirekte metode hvor proben inneholder reportermolekylet som enten er introdusert kjemisk eller enzymatisk og som detekteres ved hjelp av antistoff-binding til den spesifikke nukleotidsekvensen. De kjemiske stoffene er basert på steroider fra blomsten og bladene til plantene *Digitalis purpurea* og *Digitalis lanata*, som er naturlige kilder til digoksygenin (Figur 1.9). DIG

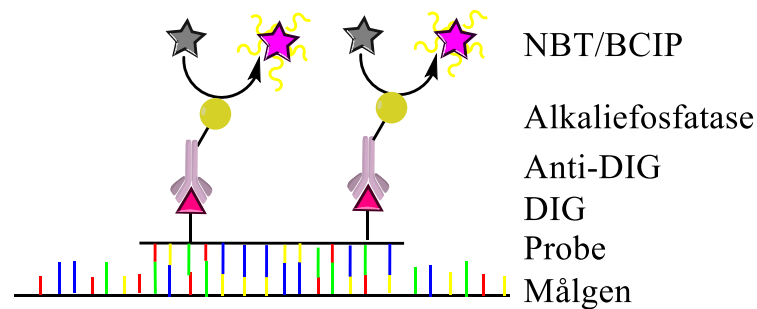


Figur 1.9: *Digitalis purpurea*

finnes kun i disse blomstene og det sekundære antistoffet, anti-DIG, vil derfor ikke bindes til andre biologiske materialer. Anti-DIG antistoffet lages ved immunisering av DIG molekylet i blant annet sau, som stoffet som er benyttet i denne oppgaven stammer fra.

Visualiseringen av antistoff-konjugatet kan enten skje fluoriserende med stoffet 2-hydrokxy-3-naftosyre-2 fenylanilid fosfat (HNPP) eller kolometrisk med nitro-blå tetrasolium (NBT) og 5-bromo-4-kloro-3'-indolyfosfat (BCIP). De hybridiserte DIG-merkede probene detekteres med høy affinitet ved at NBT-BCIP konjugerer med anti-DIG antistoffet gjennom alkalisk fosfatase (Figur 1.10).

BCIP-NBT reaksjoner er relativt trege og intermedietet indoksyd kan diffunderer inn i mediumet og bidra til bakgrunnsfarging, noe som vanskeliggjør lokaliseringen av hybridiseringslokaliteten og reduserer hybridiseringssignalet (Cremer et al., 1990; Owens et al., 2004; Van Noorden og Jonges, 1987). ISH kan benyttes på fiksert materialet som enten er støpt inn i OCT embedding matrix (OCT), parafin eller vev som lagres på $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i metanol for «whole mount». Dette er en metode som ofte benyttes i studier av arters utvikling og endring av genuttrykk gjennom utviklingssteg. Det kan også benyttes i diagnostikk ved å se etter økte mengder genuttrykk i cellekjernen, noe som kan være et signal på enkelte sykdommer, slik som brystkreft, eller oppdagelse av translokalisasjon av kromosomer for pasienter med kronisk myeloid leukemi eller for å detektere trisomy 21 (Pinkel et al., 1988).



Figur 1.10: **Cellulær lokalisering ved hjelp av digoksygeninmerking.** Proben festes komplementært til mRNAet i cellen hvor digoksygenin (DIG) er festet til tymin i probesekvensen. Antistoffet til digoksygenin (Anti-DIG) bindes til digoksygeninmerkingen og enzymet alkalisk fosfatase bidrar til visualisering av proben kolorimetrisk ved å fosforylere nitro-blå tetrasolium (NBT) og 5-bromo-4-kloro-3'-indolyfosfat (BCIP) som avgir en lilla farge.

1.6 Mål for oppgaven

Mange menneskeskapte stoffer som frigjøres til miljøet transporteres over lange avstander med værssystemer og havstrømmer. Et økende antall «nye» kjemikalier er da også identifisert i biotaen i arktiske og polare områder. Flere av disse stoffene deler egenskaper med POPs og det eksisterer liten kunnskap om de biologiske effektene for mange av disse stoffene. Enda mindre vites om blandings effekter av ulike miljøgifter og hvordan ulike stresseffekter, som klimaendringer, kan påvirke responser i ulike organismer.

Ved Universitetet i Bergen forskes det på dette blant annet gjennom prosjektet iCod 2.0, som denne masteroppgaven er et bidrag til. iCod 2.0 prosjektet ønsker å utvide kunnskapen om effekter av nye miljøgifter og blandings effekter ved å integrere data fra ulike cellulære nivåer gjennom analyser av genomet, transkriptomet, proteomet og metabolomet. iCod 2.0 benytter Atlanterhavstorsken som modellorganisme og et overordnet mål i prosjektet er å få en økt økotoksikologisk forståelse for betydningen av eksponering av torsk for miljøgifter.

En sentral metode som benyttes i prosjektet er presisjonskuttete leverskiver (PCLS) som skal eksponeres for ulike stoffer og blandinger av disse, både kjente og nye forbindelser. Siden PCLS på lever fra atlanterhavstorsk er en relativt ny *in vitro* metode (Eide et al., 2014) ønsket vi å utvide deres bruksområde med å kunne studere den cellulære uttrykkningen av transkripter i PCLS ved hjelp av *in situ* hybridisering.

Denne oppgavens hovedmål er derfor å utvikle en metode for å studere den cellulære lokaliseringen av transkripter ved å benytte *in situ* hybridisering på PCLS. *In situ* hybridisering kombinert med andre histologiske analyser er et viktig verktøy for å studere cellulære strukturer, mekanismer ved eksponering og distribusjonen av biomarkør-transkripter som blir benyttet i studier av ulike giftstoffer. På grunn av viktigheten av CYP1A i biotransformasjonen i lever, og at ekspresjonen av *cyp1a* lar seg induser ved eksponering for AhR-agonisten BNF, ble det valgt å benytte en probe mot dette gentranskriptet i arbeidet med etableringen av *in situ* hybridiseringen på PCLS.

På grunn av leverens høye fettinnhold ble det antatt at det kunne oppstå vanskeligheter med å snitte levervev innstøpt i OCT embedding matrix. Det er derfor blitt tatt ut ulike vev for ISH analyser og det er blitt eksperimentert med ulike innstøpnings- og presserveringsmetoder for å optimalisere morfologien til vevene. Så langt jeg vet, har ikke *in situ* hybridisering på PCLS fra atlanterhavstorsk tidligere blitt gjort og etableringen av metoden vil slik forenkle fremtidige studier av lokaliseringen av transkripter i PCLS.

Eksponering for BNF vil medføre en induksjon av CYP1A og oppgaven vil derfor belyse den cellulære lokalisasjonen og forskjeller mellom bakgrunnsuttrykkningen ved ueksponert levervev sammenlignet med PCLS som er eksponert for 1 μ M og 10 μ M BNF. Induksjonen kan måles semikvantitativt med ISH, men for å bekrefte induksjonen er det også gjennomført qPCR for å verifisere denne økningen i transkriptmengde.

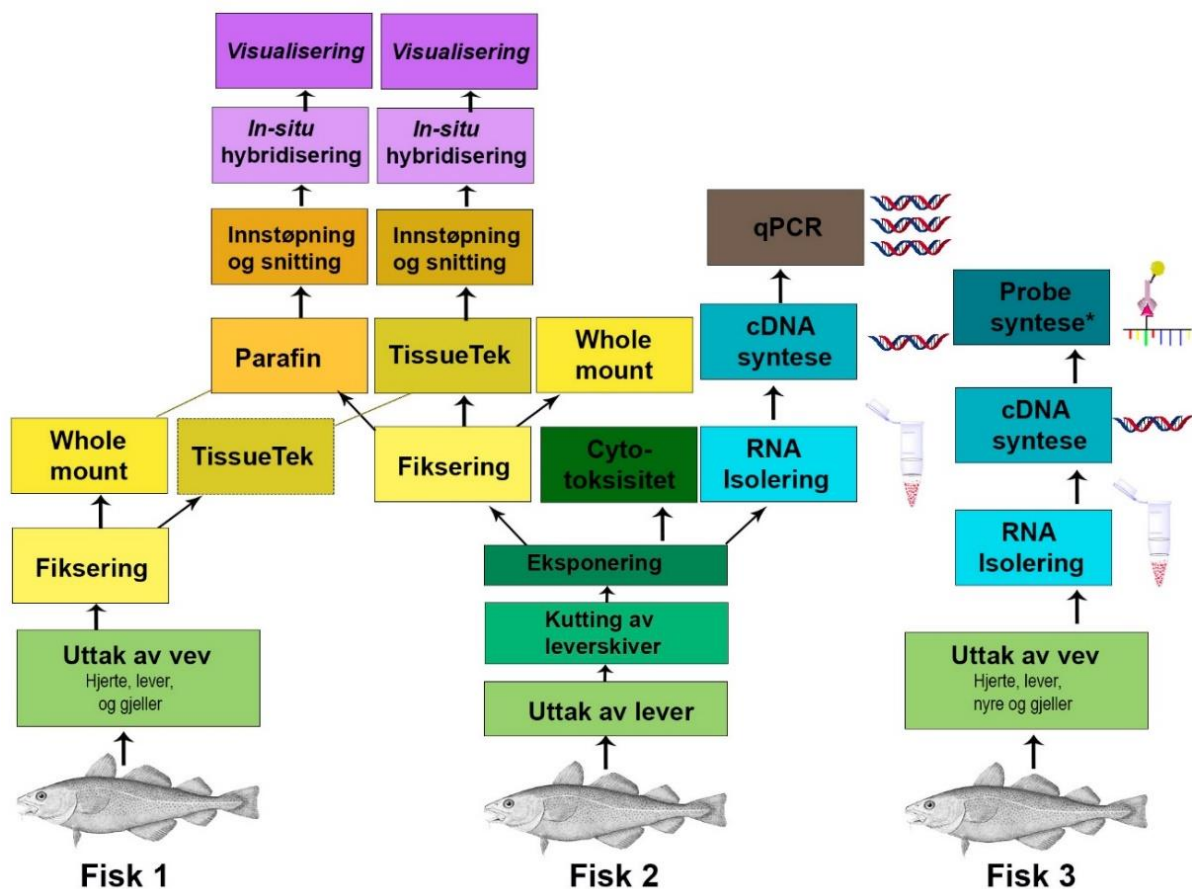
In situ hybridisering av *cyp1a* ved eksponering for BNF er tidligere blitt gjort på lakselever (Olsvik et al., 2007). Torskens økte fettinnhold og artsforskjeller mellom atlantehavstorsk og atlantehavslaks gjør det interessant å studere om det finnes forskjeller på uttrykkningen av *cyp1a* ved eksponering for BNF.

2

MATERIAL OG METODE

2.1 Oversikt over metoder

En oversikt over de ulike metodene som ble benyttet i oppgaven og bruk av de ulike fiskene er vist i Figur 2.1.



Figur 2.1: Oversikt over ulike metoder og fremgangsmåter som er benyttet og flytdiagram over rekkefølgen metodene vil bli beskrevet. For probedannelse, se Figur 2.3.

Jeg vil først gå igjennom uttak av vev, eksponering og cytotoxicitetsmålinger (grønt), som illustrert i Figur 2.1. Videre vil jeg beskrive hvordan vevene er fiksert, preservert og snittet for de ulike innstøpningsmetodene (gult) før jeg går nærmere inn på RNA isolering, cDNA syntese og produksjon av proben (blått). Til slutt ønsker jeg å gjennomgå prosedyren rundt *in situ* hybridisering (ISH) (lilla) og qPCR (brunt) (Figur 2.1). Fullstendig materialliste med oversikt

over løsninger, kjemikalier, «kitt», primere, produsenter og utsyr som er benyttet i denne oppgaven finnes i Vedlegg 1.1 og denne vil bli referert til i dette kapitlet.

2.2 Fisk

Atlantehavstorsk (*Gadus morhua*) ble kjøpt fra Austevoll Havbruksstasjon (Havforskningsinstituttet) og røktet ved Industrielaboratoriet (ILAB, Bergen, Norge). Fiskene oppholdt seg i 500 L tanker supplert med naturlig sjøvann på 9 °C. Vanngjennomstrømning, oksygeninnhold og fôringsregime ble gjennomført i henhold til standard protokoll hos ILAB. Et 12:12 timers lyssyklusregime ble benyttet og fiskene ble matet med økologisk fôr fra EWOS Scotland. Tre individer med forskjellig størrelse og med ulik grad av seksuell modenhet ble brukt i eksperimentene (Tabell 6.1). Fordeling av kjønn var tilfeldig og leversomatisk indeks (LSI) ble regnet ut etter ligningen:

$$LSI = \frac{\text{levervekt (g)}}{\text{totalvekt (g)}} * 100.$$

2.3 Uttak av vev for pilotforsøk med *in situ* hybridisering

En liten hannfisk, 50 g og 17 cm lang, ble overført til en bøtte fylt med 2 liter sjøvann og 100 mg/L av bedøvelsesmiddelet Tricaine metan sulfat (MS222) (Scan Aqua) og fraktet opp på disseksjonslaboratoriet (3. etg., UiB). Fisken ble fiksert ved kardiovakulær perfusering med 4% paraformaldehyd (PF, Tabell 6.6) (utført av Tom Ole Nilsen, Uni Research miljø). Denne metoden tillater fikseringsvæsken å benytte blodårene til å nå perifere vev og på en slik måte ytterligere skylle blodet ut fra de ulike vevene.

Ved å fikserer vev blir morfologien bevart, noe som er ett kritisk steg for å prosessere vevsbiter til eksaminering og ved arkivering (Ostrander, 2000). Dette er for å opprettholde den cellulære arkitekturen og komposisjonen til cellene i vevet, slik at vevet kan motstå degradering under de ulike prosesseringsstegene. Proteiner, karbohydrater og andre bioaktive enheter blir preservert i forhold til det spatielle forholdet i cellen, slik at denne kan studeres nøyere (Fox et al., 1985; Thavarajah et al., 2012). Aldehyder, slik som formaldehyd, danner kryssbindinger i og mellom proteiner, ved at formaldehydet reagerer med aminene i proteinene og danner reaktive iminium ione intermediater (Thavarajah et al., 2012). Disse vil videre reagere med fenolgruppen til tyrosin og danne kovalente kryss-bindinger mellom ulike aminosyrer i polypeptidkjeden. Det er viktig at formalinen har en riktig pH da maksimal kryssbinding skjer ved nøytralt bufret pH, hvor aminosyrene vil være utladet og kun reagere med formaldehyd. pH på fikseringsvæsken ble derfor justert til 7.2.

Det ble tatt ut tre ulike typer vev; lever, hjerte og gjeller. Fra leveren ble det tatt ut en del i den distale delen av leveren og en bit i nærheten av den hepatiske portåren. Det ble tatt ut fire gjellebuer og hele hjertet. Fra hvert vev ble det tatt ut to vevsprøver, med unntak av hjertet som ble delt i to i medialplanet. Dette ble gjort slik at det ene vevet kunne preserveres for kryopreservering (2.5.1, s. 23) og det andre kunne preserveres til organ-«whole mount» (6.2.5, s. 86).

2.4 PCLS og eksponeringsforsøk

PCLS og eksponeringsforsøket ble gjort som beskrevet i (Eide et al., 2014). En torsk ble valgt ut tilfeldig og overført med en håv til en bøtte med 1,2 liter sjøvann tilsatt 1,2 g Tricaine metan sulfat (MS222) (Scan Aqua) (1 g/L) for å bedøve fisken. Fisken ble tatt med opp til laboratoriet, hvor vekten ble målt til 714 g og pulsåren ble kuttet og blodet fikk renne ut. Buken ble så åpnet med en saks fra anus mot gjellene og leveren ble forsiktig dissekert ut, mens overflødig blod ble vasket vekk ved å spyle med kald buffer (Tabell 6.9, s. 90) på området. Leveren ble målt til 54 g og LSI beregnet til 7,6. Kjønn ble fastslått til å være hannkjønn. Ved hjelp av 23G nål (BD Microlance™) og BD Plastipak™ sprøyte ble leveren perforert ved at kald buffer (Tabell 6.9, s. 90) ble sprøytet inn i portåren og ut gjennom den hepatiske levervenen.

2.4.1 Uttak av kjerner for kutting av PCLS

Vevsbiter på 8 mm i diameter ble skjært ut ved hjelp av et kjerneverktøy og overført til kaldt Leibowitz-15 (L-15) cellemedium (Tabell 6.22, s. 93). Kjernene ble hovedsakelig tatt fra området rundt portåren og den midtre lobulen. Kjernene ble videre limt til platen på Vibratome Line VT1200 (Leica) ved hjelp av Super Glue Precision (Loctite) og dekt med kald buffer. Toppen ble skåret vekk og 250 µm tykke PCLS ble så kuttet med lav fremoverhastighet og høy kuttefrekvens, som anbefalt av produsentens innstillinger. PCLS ($10,4 \pm 3,4$ mg våtvekt, $n = 57$) ble kuttet og overført til kaldt vekstmedium (4 °C) ved hjelp av en pinsett. Skivene ble inkubert i 2 timer ved 10 °C før de ble overført til 24 brønns vevskulturplater (Sarstedt) tilsatt 1000 µL eksponeringsmedium (Tabell 6.22, s. 93) med ulike konsentrasjoner av β-naftoflavon eller kun løsemiddel (Tabell 6.24, s. 93). Vekstmedium tilsatt 1% Triton X-100 ble inkludert som en positiv kontroll på celledød (Tabell 6.24, s. 93). Etter 48 timer eksponering ved 10 °C ble det tatt ut 5 PCLS til parafinsnitting, 3 skiver til kryosnitting, 3 skiver til organ-«whole mount» og 6 skiver til qPCR for både 10 µM BNF-, 1 µM BNF- og kontrollgruppen. (totalt 57 PCLS).

2.4.2 Cytotoksisitet-målinger

Etter 24 timer ble 200 µL tatt ut fra eksponeringsmediet for cytotoksisitetstesting med LDH cytotoxicity detection Kit (Roche) for måling av mengden laktatdehydrogenase (LDH) i mediumet. Cytotoksisitetstesten ble utført i triplikater etter 24 og 48 timer i samsvar med produsentens protokoll.

Cytotoksisitet ble beregnet fra følgende ligning

$$\text{Cytotoksisitet (\%)} = \frac{\text{Triplikat absorbanse} - \text{lav kontroll}}{\text{Høy kontroll} - \text{lav kontroll}} * 100$$

Her blir prosentvis cytotoksisitet til triplikatene beregnet ved å sammenligne absorbansen til triplikatene med mengde LDH som blir frigjort av ubehandlede PCLS (lav kontroll) og maksimal LDH frigjøring ved behandling av PCLS med detergenten Triton X-100 (Sigma) (høy kontroll). Konsentrasjonen av LDH ble målt spektrofotometrisk ved å måle absorbansen ved 490 nm og 650 nm. Absorbansen ved 490 nm måler mengde LDH tilstede i mediumet, mens absorbansen ved 650 nm er referansemåling over bakgrunnssignal

2.5 Preservering, innstøpning og forberedelse av vev for ISH

For å preservere morfologien og cellestrukturen i vevene, ble vevsbitene og PCLS fiksert i 4% paraformaldehyd (PF) i 0,2 M Sørensen-buffer (Tabell 6.6, s. 89) over natten. Paraformaldehyd er ifølge BRAISSANT og WAHLI (1998) ett av de beste fikseringsmidlene for å preservere vevskvaliteten, hindre nedbrytning av RNA i vevet og optimalisere gjenkjennelsen av RNA ved hjelp av probene.

De ulike *in situ* hybridiseringsmetodene krever ulik prosessering for klargjøring til innstøpningsprosessen. Alle vevene ble først vasket i 0,1 M Sørensen (Tabell 6.2, s. 88) i 30 minutter for å fjerne rester av PF. Vevsprøven fra hjertet ble etter vaskesteget kuttet i medialplanet, hvor den ene delen ble preservert for innstøpning i OCT (Metode 2.5.1, s. 23) og den andre delen ble preservert for organ-«whole mount» (Metode 6.2.5, s. 86).

2.5.1 Prosessering, innstøpning og snitting med OCT

Etter vaskesteget med 0,1 M Sørensen ble vevsbitene fra pilot-forsøket videre behandlet med 0,1 M Sørensen med 25 % sukrose (Tabell 6.3, s. 88) over natt i kjøleskap, mens PCLS ble tilsvarende behandlet med 0,1 M Sørensen med 25 % sukrose og 10 % OCT embedding matrix (CellPath) (Tabell 6.4, s. 88). Små bokser av stiv aluminiumsfolie som passet til størrelsen på vevsbitene ble laget og fylt med et lite lag OCT Embedding matrix (Cell Path) og videre overført til en kuldeblokk av metall på tørris. Vesken gikk da fra å være gjennomsiktig til å få en hvitfarge i det materialet ble fryst. Vevsbiten ble overført til boksen, plassert tilbake på tørris og fylt opp med innstøpningsmiddelet. Det ble hele veien påsett at det ikke ble dannet noen luftbobler i innstøpningsmiddelet, da dette vil påvirke snittene. Boksene ble merket med vevstype og orientering, pakket inn i klar parafilm for å hindre uttørking og lagret ved -80 °C.

Snitting av vev ble gjort med kryostaten CM3050 S (Leica) med temperaturer på -22 °C for snitting av hjerte og temperaturer mellom -17 °C til -28 °C for levervev. Den innstøpte vevsbiten ble festet til kutteplaten ved hjelp av OCT embedding matrix. Overflødig OCT (CellPath) ble fjernet ved bruk av skalpell og vevet ble kuttet i snitt på 12 µm og 10-20 µm for henholdsvis hjerte og lever. De kuttete snittene ble overført til Menzel-Gläser Superfrost[®] plus objektglass (Thermo Science). For å feste vevene tilstrekkelig til objektglassene ble glassene med vevsprøvene varmet på 65 °C i 10 minutter, før snittene ble lagret ved -80 °C.

2.5.2 Prosessering for parafin-innstøpning, snitting og farging

Etter vaskesteget ble PCLS dehydrert i 50 % og 70 % etanol i 30 minutter for hvert steg. Vevsbitene ble så lagret i 70 % etanol i fryseren, før de ble støpt inn i parafin og snittet på en RM2155 (Leica) av Anne Nyhaug på Molecular Imaging Center (MIC) ved Bygg for biologiske basalfag (UiB).

Noen av snittene ble farget med hematoxylin og eosin (HE) hvor hematoxylin bindes til basofile substanser, slik som DNA/RNA som er syrer og negativt ladet. Fosfatryggraden i nukleinsyrene i DNA/RNA i kjerner og RNA i ribosomer i endoplasmatisk retikulum er negativt ladet og binding til hematoxylin vil gi en mørk blå farge. Eosin binder til syreholdige enheter, slik som positivt ladde aminosyresidekjeder (som lysin og arginin). De fleste proteiner i cytoplasma er basiske på grunn av innhold av lysin og arginin og vil derfor bindes til det negativt ladde eosin-fargestoffet og avgi en rødlig farge. Eosin vil derfor bindes til cytoplasmatiske filamenter i muskulatur, intracellulære membraner og ekstracellulære fibre.

2.6 RNA isolering

For RNA isolering ble det benyttet to ulike metoder. For isolering av RNA som ble brukt til syntesen av proben ble det benyttet TriReagent (Sigma), og for isolering av RNA til bruk i qPCR ble det benyttet RNeasy® Mini Kit (Qiagen) etter leverandørens anbefalinger.

For syntesen av proben ble en 1,056 kg moden hunntorsk tilfeldig valgt og overført til en bønne med naturlig sjøvann. Torsken ble så fraktet opp til laboratoriet og lammet med ett slag mot hodet før aortaen ble kuttet og blodet fikk renne ut. Leveren ble målt til 78 g og LSI ble beregnet til 7,4. Vevsprøver fra hjerte, nyre, gjeller og lever ble tatt ut og 75-100 mg av hvert vev ble veid ut og overført til 2,5 mL eppendorfrør.

Total-RNA ble ekstrahert ved bruk av TriReagent (Sigma) etter leverandørens anbefalinger som er en forbedret metode av Chomczynskis opprinnelige metode for RNA-ekstrahering (Chomczynski & Sacchi 1987). 500 μ L TriReagent ble tilsatt de ulike vevene og prøvene ble homogenisert ved hjelp av Pellet Pestle Motor (Kontes). Ytterligere 500 μ L TriReagent ble tilført prøvene før de ble blandet med vortexer og sentrifugert ved 12.000 x g ved 4 °C i 15 minutter. Prøvene ble stående i romtemperatur (RT) i 5 minutter før 0,2 mL kloroform ble tilsatt hvert rør. Prøvene ble blandet, inkubert i 9 minutter ved RT og videre sentrifugert 12.000 x g ved 4 °C i 15 minutter med en Himac CT15RC (VWR). Sentrifugeringen resulterte i en faseseparasjon, som vist i Figur 2.2, hvor den øverste, blanke fasen



Figur 2.2: **Faseseparasjon**, hvor den øverste blanke fasen inneholder RNA, den hvite interfasen og den røde organiske fasen inneholder DNA og proteiner

inneholder RNA. Denne fasen ble pipettert over i ett nytt eppendorfrør og tilsatt 0,5 mL 2-propanol for å vaske prøven. RNA-fasen ble så mikset, inkubert i 8 minutter i RT og videre sentrifugert ved 12.000 x g i 10 minutter ved 4 °C. Supernatanten ble fjernet og pelleten ble vasket med 1 mL 75 % etanol. Løsningen ble blandet og sentrifugert ved 7.500 x g i 5 minutter ved 4 °C. Etanolen ble fjernet fra røret og pelleten tørket i romtemperatur i 8 minutter. For å løse opp pelleten ble det tilsatt 100 μ L nukleasefritt vann og inkubert på varmeblokk i 12 minutter ved 60 °C.

To og to PCLS fra den samme eksponeringsgruppen ble slått sammen og overført til samme eppendorfrør og homogenisert ved hjelp av Pellet Pestle Motor (Kontes). Det ble kjørt tre paralleller fra de tre ulike eksponeringene. Da det er avgjørende med god RNA kvalitet ved qPCR ble RNA rensert og isolert ved RNeasy® Mini Kit (Qiagen) etter produsentens protokoll.

2.6.1.1 Beregning av RNA konsentrasjon og renhet

RNA konsentrasjonen og renheten til prøvene ble målt ved hjelp av en Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). Nukleotider, RNA, enkelttrådet DNA (ssDNA) og dobbeltrådet DNA (dsDNA), vil alle absorbere lys med bølgelengde på 260 nm, mens proteiner, fenoler eller andre forurensninger vil absorbere lys med en bølgelengde på 280 nm. Ratioen mellom absorbansen på 260 og 280 nm vil derfor gi et estimat på renheten til prøven. En ratio på ~1,8 for DNA og ~2,0 for RNA blir vanligvis regnet som rene prøver (Thermo-Fischer, 2008). Kvaliteten på RNAet ble også målt med en Agilent RNA 6000 Nano Kit etter produsentens retningslinjer og prøvene ble gitt en RNA integritetsnummer (RIN)-verdi ¹.

2.6.2 Kontroll av nukleinsyreintegritet

For å kontrollere kvaliteten på de ulike nukleinsyrene ble det benyttet agarosegelelektroforese (AGE). Elektroforesen separerer de ulike nukleinsyrene i forhold til lengden og en kan slik både visualisere og kvantifisere RNA og DNA. Agarosegelen består av et nettverk av agarose som danner porer. Størrelsen på disse porene vil være avhengig av konsentrasjonen på agarosen. I dette forsøket er det blitt benyttet 0,7 % (Tabell 6.18, s. 92) og 1 % agarosegel (Tabell 6.9, s. 92). Nukleinsyrer har en negativ ladning og prosessen blir drevet av et elektrisk felt som separerer de ladde molekylene ut ifra størrelse. På grunn av den negative ladningen vil nukleinsyrene migrere fra negativ til positiv pol ved hjelp av den tilkoblede strømkretsen PowerPac™ HC (BioRad). Det ble tilsatt en 10X lastebuffer (TaKaRa), hvor glycerol og glukose gjør prøvene tyngre, slik at de legger seg i bunnen av agarosegelbrønnene. SmartLadder (Eurogentec) ble benyttet for å sammenligne størrelse og intensiteten til de ulike båndene. Prøvene ble kjørt ved 100-110 V i 30-60 minutter. For å visualisere RNA/DNA er gelene tilsatt GelRed (Biotum) som interkalerer med basene i nukleinsyrene. Ved UV eksponering av gelen vil GelRed fluoresere og gi fra seg gult lys, som kan sees ved hjelp av en G:Box (Syngene).

2.6.2.1 Kontroll av RNA integritet

Integriteten på det rensede RNAet ble målt ved 1 % agarosegel i 1X TAE buffer (Tabell 6.19, s. 92). Sekundærstrukturene i RNAet ble ødelagt kjemisk med tilsatt av 5 µL formamid og termisk ved at prøvene ble inkubert ved 65 °C i 10 minutter på VWR varmeblokk før elektroforesen. Prøveløsningen og molekylvektstandard (Tabell 2.1, s. 26) ble videre overført

¹ En RNA integritetsnummer (RIN)-verdi beskriver renheten til RNAet. De ulike prøvene blir gitt en verdi fra 1-10, basert på ratioen av ribosomale bånd og tilstedeværelsen eller fraværet av degradert RNA prøver. En RIN verdi på 10 forteller at det ikke er noe degradering av RNAet og desto lavere RIN-verdi jo høyere kontaminering og degradering av prøvene er det.

til brønnene på gelen og separert ved 100 V i 30 minutter ved hjelp av PowerPac HC (BioRad). Tilstedeværelse av intakt RNA vises med to distinkte bånd som representerer de to hovedkomponentene i ribosomalt RNA (rRNA), 18S og 28S. Ved å bedømme forholdet mellom disse og tilstedeværelsen eller fraværet av andre bånd kan en vurdere kvaliteten med tanke på nedbrytning av det totale RNAet i prøven.

Tabell 2.1: Mengder til agarosegelelektroforese for RNA

Komponenter	Mengde
Formamid	5 µl
10 X loadingbuffer	1 µl
RNA	200 ng
nukH ₂ O	< 4 µl
Totalt	10 µl

2.7 cDNA syntese

SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) ble benyttet for å danne komplementært DNA (cDNA) med utgangspunkt i 500 ng rensset RNA fra de ulike vevene og PCLS som beskrevet i produsentens veiledning (se Tabell 2.2). Prøvene ble inkubert som beskrevet i Tabell 2.2 på VWR Digital varmeblokk.

Tabell 2.2: Reaksjonsoppsett (a) for cDNA syntese med SuperScript™ III RT og inkubasjonsoppsett

Reaksjon 1		Reaksjon 2	
oligo (dT) (50 µM)	1 µL	5X First-strand buffer	4 µL
dNTP miks (10 mM)	1 µL	0,1 M DTT	1 µL
RNA (50 ng/µL)	10 µL	RNaseOut (40 U/µL)	1 µL
Nukleasefritt vann	1 µL	SuperScript™ III RT	1 µL
Til volum	13 µL	Totalt volum	20 µL
Inkubasjon 1		Inkubasjon 2	
65 °C	5 min	25 °C	5 min
Is	1 min	50 °C	60 min
		70 °C	15 min

2.8 Polymerase kjedereaksjon (Polymerase chain reaction, PCR)

For å amplifisere de ønskede gensekvensene av *cyp1a* og β -*aktin* til probesyntesen ble 4 μ L av cDNAet benyttet som templat for PCR. PCR ble i 1986 utviklet av Kary Mullis og er en reaksjon hvor en benytter primere (fremover og bakover), nukleotider og polymeraser for å amplifisere spesifikke gensekvenser. Reaksjonen gjennomgår flere temperatursykluser hvor hver syklus har tre ulike faser; en denaturering, hybridisering (annealing) og til slutt elongeringsfase. I den første fasen blir de to DNA trådene separert ved temperaturer mellom 93-98 °C, slik at sekvensen som skal repliseres blir tilgjengelig. I hybridiseringsfasen vil spesifikke primere bindes til den ønskede DNA sekvensen. Temperaturen dette skjer ved er primerspesifikke og må derfor optimaliseres for hver enkelt primer og er avhengig av lengden og hvilke baser primersekvensen består av. I disse forsøkene er det blitt benyttet primere for *cyp1a* og β -*aktin* (Tabell 6.27) i produksjonen av probene og primere for *cyp1a*, *arp* og *rlp22* (Tabell 6.28) ved sanntids PCR (qPCR)

Den termostabile Taq DNA polymerasen (Invitrogen) ble benyttet til å forlenge og replikere DNA sekvensen, etter produsentens anbefalinger (Tabell 2.3a). PCR reaksjonen ble gjort i GeneAmp PCR system 2700 (Applied Biosystems) med temperatursykluser som vist i Tabell 2.3b.

Tabell 2.3: (a) Reaksjonsmiks og (b) temperaturforhold ved PCR

a PCR reaksjonsmiks		b Temperatursykluser ved PCR		
Komponenter	Mengde	Temperatur	Tid	Sykluser
MgCl (50mM)	1 μ l	94 °C	60 s	X 35
10X PCR buffer	5 μ l	94 °C	30 s	
dNTP miks (10 μ M)	5 μ l	58 °C	30 s	
Sense primer (10 μ M)	1 μ l	72 °C	45 s	
Antisense primer (10 μ M)	1 μ l	72 °C	7 min	
cDNA fra cDNA syntesen	4 μ l	4 °C	∞	
Taq DNA polymerase (5 U/ μ l)	0,4 μ l			
Nukleasefritt vann	32,6 μ l			
Totalt	50 μ l			

2.8.1 Rensing av PCR produkt med gelekstraksjon

For å rense PCR produktet for rester av reaksjonsmiksen og uønskede DNA fragmeneter ble 20 µL av PCR produktet separert med agarosegelelektroforese (Metode 2.8.2) i en 1 % agarosegel (Tabell 6.19) i 1X TAE ved 100 V i 35 minutter. Gelen ble visualisert under UV-lys og PCR-produkter med ønsket størrelse ble kuttet ut i en High Performance Ultraviolet Transilluminator (UVP) og renses ved hjelp av QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) etter produsentens retningslinjer.

2.8.2 Kontroll av DNA med agarosegelelektroforese

I likhet med RNA kan også DNA bli separert med agarosegelelektroforese. Da det ikke blir dannet like sterke sekundær struktur i DNA, er det ikke nødvendig med kjemiske eller termisk ødeleggelse av sekundærstrukturer. For å analysere PCR produktet, det lineariserte plasmidet og de syntetiserte probene ble 1-2 µL av DNA produktet blandet med lastebuffer og vann, slik at den totale mengden ble 10 µL, som vist i Tabell 2.4. Disse ble kjørt på en 1 % agarosegel (Tabell 6.19) med 1X TAE kjørebuffer i 30 minutter på 100 V.

Tabell 2.4: Prøveløsning ved agarosegelelektroforese av DNA-produkter

Komponent	Mengde
10X Loading buffer	1 µL
DNA-produkt	1-2 µL
dH ₂ O	7-8 µL
Totalt	10 µL

2.9 Kloning av gener i *E. coli* celler

De ekstraherte PCR-produktene ble satt inn i en pCR[®]4Blunt-TOPO vektor (Invitrogen, se Vedlegg 6.1, s. 81) ved å benytte TOPO[®] TA kloningskit (Invitrogen) og produsentens protokoll. 2 og 4 µL av det rensede PCR produktet av henholdsvis *β-aktin* og *cyp1a* ble tilsatt som vist i Tabell 2.5.

Tabell 2.5: Reaksjonsoppsett for TOPO[®] kloningsreaksjon

Reagent	Volum: <i>cyp1a</i>	Volum: <i>β-aktin</i>
Renset PCR produkt	4 µL	2 µL
Saltløsning	1 µL	1 µL
Vann	0 µL	2 µL
Topo [®] vektor	1 µL	1 µL
Totalt	6 µL	6 µL

2.9.1 Transformering av *E. coli*

3 μL av TOPO® kloningsreaksjonen ble overført til One Shot® kjemiske kompetente *E. coli* bakterieceller (Invitrogen), blandet med forsiktig pipetering på is og deretter overført til agarplater (Tabell 6.20). Platene ble varmet i inkuberingsskapet Heraeus Function Line (Kendro) ved 37 °C i 3 timer før prøvene ble spredt ut. Disse platene var tilsatt ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), for seleksjon av bakterier med plasmidet. En Blue-White screening (Sigma-Aldrich) bidro til å detektere hvilke kolonier som inneholdt plasmidet hvor PCR-produktet hadde blitt ligert inn².

200 μL og 50 μL ble sådd ut over to plater og agarplatene ble inkubert ved 37 °C i Heraeus Function Line (Kendro) over natten.

2.9.2 Identifikasjon av ønskede kloner (*Screening*)

Ved hjelp av Blue-White screening ble enkelte kolonier valgt ut. For å verifisere at de selekterte koloniene inneholdt plasmid med det ønskede PCR-produktet ble det kjørt en koloni-PCR. Det ble benyttet vektorspesifikke primere M13 (Invitrogen) og Taq DNA polymerase (Qiagen) for å amplifisere det innsatte DNA-fragmentet etter produsentens anbefalinger (Tabell 2.6). Ved hjelp av en ren pipettespiss ble *E. coli* celler fra de utvalgte koloniene overført til reaksjonsblandingen og PCR ble kjørt med temperatursykluser som vist i Tabell 2.6b. GeneAmp PCR system 2700 (Applied Biosystems) ble benyttet for PCR-reaksjonen. PCR-produktene ble kontrollert på en 1 % agarosegelelektroforese som forklart i metode 2.8.2

² Denne screeningen fungerer ved at β -galaktosidase, et enzym i *E. coli* spalter laktose til glukose og galaktose. *LacZ* operonet i *E. coli* blir trigget ved tilstedeværelse av laktose og starter metaboliseringen av laktose. Dersom plasmidvektoren inneholder fremmed DNA vil α -komplementeringen ikke skje og det funksjonelle β -galaktosidase enzymet vil ikke produseres. Dette vil danne hvite kolonier. Dersom det fremmede DNAet er utenfor *LacZ* operonet eller dersom en ikke har fått satt inn PCR produktet i plasmidet vil en få dannet en blå ring rundt koloniene (Sigma-Aldrich, 2016).

Tabell 2.6: Reaksjonsblanding og temperatursykluser for PCR med Taq DNA polymerase

Komponenter	PCR produkt		Temperaturforhold ved PCR		
	Mengde	Temperatur	Tid	Sykluser	
MgCl (50mM)	1 μ L	94 °C	10 min	X 25	
10X PCR buffer	5 μ L	94 °C	30 s		
dNTP miks (10 μ M)	5 μ L	58 °C	30 s		
Fremover primer (10 μ M)	1 μ L	72 °C	1,10 min		
Revers primer (10 μ M)	1 μ L	72 °C	10 min		
E.coli	Litt	4 °C	∞		
Taq DNA polymerase (5 U/ μ L)	0,4 μ L				
Nukleasefritt vann	36,6 μ L				
Totalt	50 μL				

De koloniene som inneholdt plasmid med ønsket PCR-produkt (positive transformanter) ble overført til falkonrør som inneholdt 6 mL av vekstmediumet Luria-Bertani (Tabell 6.21) og inkubert i Multitrom Standard (Infors HT) ved 37 °C og med 250 rpm resting over natten.

2.9.3 Plasmid-rensing

1,5 mL av overnattskulturen med *E.coli* ble overført til et eppendorfrør og sentrifugert i 3 minutter ved 13.000 x g ved romtemperatur. Supernatanten ble fjernet og nye 1,5 mL ble overført fra overnattskulturen. Dette ble gjort tre ganger, slik at en totalt fikk overført 4,5 mL av den opprinnelige overnattskulturen. Det resterende volumet ble overført til nytt eppendorfrør og tilsatt 1:1 med 50 % glyserol og lagret ved -80 °C. For å ekstrahere plasmidet fra bakteriene ble det benyttet QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) etter produsentens veiledning.³ Plasmidkonsentrasjonen og renhetsgraden ble målt med en Nanodrop 1000 (Thermo Science).

³ Dette er en enkel og rask metode for rensing av plasmider hvor DNA binder seg til en silikonmembran. Gjennom ulike vaskesteg fjernes salter, metabolitter og andre uønskede komponenter fra bakteriekulturen. Plasmidene vil ved lave ioniske betingelser elueres fra membranen og kan slik benyttes videre.

2.10 Sekvensering

For å kontrollere sekvensen til PCR-produktene som ble ligert inn i plasmidene, ble 200-400 ng av plasmidet benyttet som templat i en Sanger-sekvensering (Sanger et al., 1977). Sekvenseringen utføres ved at DNA templatet blir blandet med plasmidspesifikke primere, Big Dye versjon 3.1, DNA polymerase og en sekvenseringsbuffer⁴, som vist i Tabell 2.7a. De ulike sekvensene blir først amplifisert ved en polymerasekjedereaksjon (Metode 2.8) med temperatursykluser som vist i Tabell 2.7b ved GeneAmp PCR system 2700 (Applied Biosystems). Selve sekvenseringen ble så utført på den automatiserte Sanger DNA sekvenseringsmaskinen 3730XL Analyzer (Applied Biosystem) ved sekvenseringslaben på Molekylærbiologisk institutt, UiB.

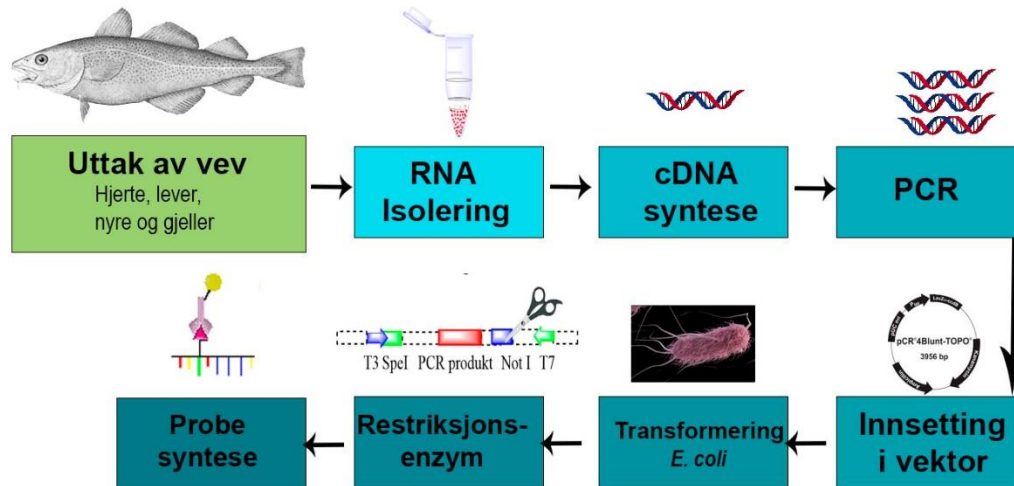
Tabell 2.7: a) PCR produkt og b) forhold for sekvensering

a) PCR produkt		b) Temperaturforhold ved PCR		
Komponenter	Mengde	Temperatur	Tid	Sykluser
Nukleasefritt vann	6,5 µl	90 °C	5 min	X 25
Sekvenseringsbuffer	1 µl	96 °C	10 sek	
Big dye v.3.1	1 µl	50 °C	5 sek	
Plasmid (200-400 ng)	1 µl	60 °C	4 min	
Primer M13 F/R	0,5 µl	4 °C	∞	
Totalt	10 µl			

⁴ Sekvenseringsbufferen inneholder de fire deoksynukleotidene (dNTPene), dATP, dTTP, dCTP og dGTP og fluoriserende dideoksyNTP (ddNTP). I ddNTP er en 3'-OH gruppe fjernet, noe som umuliggjør forlengelse gjennom fosfodiesterbinding. Dideoksynukleotidene plasseres tilfeldig på ulike steder i sekvensen og bryter slik elongeringsprosessen. Ved å kjøre en elektroforese vil en få dannet en sekvensstige. Ved hjelp av fluoriserende komponenter kan en avlese de ulike basene og en vil slik få tilgangen til den genetiske koden.

2.11 Syntese av prober til ISH

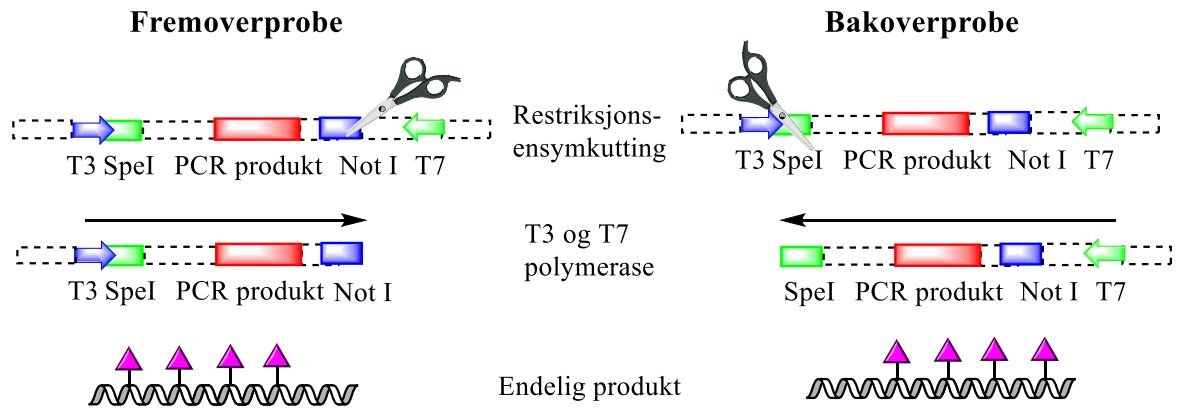
For å detektere mRNA i individuelle celler ved hjelp av *in situ* hybridisering ble det syntetisert en probe merket med digoksygenin (DIG), som beskrevet i Figur 2.3. Vektorplasmidet ble benyttet til å syntetisere proben.



Figur 2.3: **Ulike trinn i en syntese av probe:** Det er ulike steg i produksjonen av en probe. RNA må isoleres, komplementært DNA (cDNA) syntetiseres gjennom revers transkriptase og det spesifikke genet må amplifiseres med polymerase kjedereaksjon (PCR). PCR produktet blir videre renset og klonet i *Escherichia coli* (*E.coli*). Kloningsvektoren vil siden renses og kuttet ved hjelp av restriksjonsensymene *NotI* og *SpeI* og proben syntetiseres og merkes med digoksygenin ved hjelp av RNA polymerasene T3 og T7.

2.11.1 Probesyntese og Dig-merking

For å syntetisere proben og merke den med digoksygenin (DIG) ble det sirkulære vektorplasmidet kuttet og slik lineærisert ved hjelp av to ulike restriksjonsenzymmer parallelt. Da det ble benyttet en pCR[®]4Blunt-TOPO[®]-vektor (Invitrogen) (Vedlegg 6.1) ble *Not I* (Invitrogen) og *Spe I* (Invitrogen) benyttet som restriksjonsenzymmer i to parallelle reaksjoner (Figur 2.4). Ved å benytte *Spe I* og T7 sammen og *Not I* og T3 vil en få et RNA som vil fungere som sense og det andre som antisense. Det ble gjennomført to parallelle prosesser, en med *Not I* og det andre med *Spe I* som vist i Tabell 2.8. Reaksjonen skjedde på VWR digitale varmeblokk ved 37 °C over natten.



Figur 2.4. **Probe syntese.** Ut fra oppbyggingen av vektoren (Vedlegg 6.1) ble polymerasen T3 tilført prøven med NotI, slik at en fikk en fremover probe. Polymerasen T7 ble tilsatt prøven som var kuttet med restriksjonsenzymet Spe I, slik at en fikk en bakover probe. Da en ikke, med sikkerhet, vet hvilken vei gensekvensen sitter i kloningsvektoren må proben testes gjennom ISH for å bestemme hvilken probe som er antisense, og da binde seg til målsekvensen, og hvilken som er sense, og dermed være den negative kontrollproben.

Tabell 2.8: **Restriksjonsenzym kutting**

Komponenter	Mengde
Plasmid cDNA templat	2,5 µg
10X restriksjonsenzymbuffer	5 µL
100 X BSA (10 µg/µL)	5 µL
Restriksjonsenzym (Spe I / Not I)	2,5 µL
Nukleasefritt vann	< 37,5 µL
Totalt	50 µL

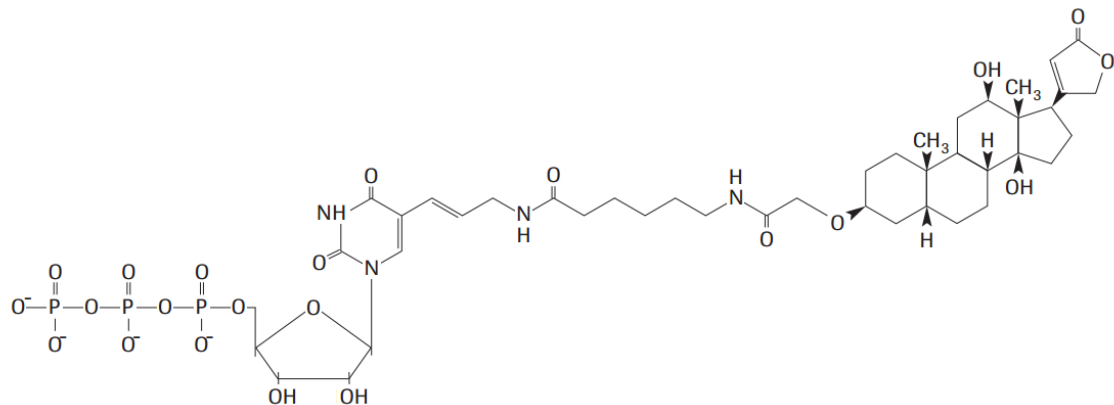
Det kuttete plasmidet ble testet med 1 % AGE (Metode 2.8.2) for å kontrollere lineariseringen av plasmidet. Videre ble plasmidet rensset gjennom fenol ekstrahering, etanol utfelling og vasket.

Merkingsmiksen (Tabell 2.9) inneholder en DIG-merket uridin til dTTP ratio som gir en optimal sensitiv hybridiseringsprobe, hvor det DIG-merkede nukleotid (Figur 2.5) inkorporeres i hvert 20ende til 25. nukleotid ved hjelp av enten DNA polymerase, RNA polymerase eller terminal transferase (Roche, 2008). Tettheten tillater optimal sterisk interaksjoner mellom haptenet og anti-DIG antistoff konjugatet, da antistoff konjugatet er stort nok til å dekke rundt 20 nukleotider (Roche, 2008).

For å både produsere en fremover og bakoverprøve ble polymerasen T3 tilført prøven med restriksjonsenzymet NotI og polymerasen T7 tilsatt prøven med SpeI (Tabell 2.9). Dette vil slik

MATERIAL OG METODE

danne en probe som vil hybridiseres komplementært med transkriptet (antisense) og et som ikke vil binde seg til transkriptet og slik fungere som en kontroll (sene).



Figur 2.5: *Oppbyggingen av alkalistabile digoksigenin-UTP. Digoksigenin er bundet til C-5 posisjonen på uridin nukleotider ved hjelp av en spacer arm med elleve karbonatomer.*

Løsningene ble så satt på VWR digitale varmeblokk i 2 timer ved 37 °C.

Tabell 2.9: *RNA syntese*

Komponenter	Mengde
Renset og linearisert plasmid	14 µL
10X Dig merkingsmiks	2 µL
10X transkripsjonsbuffer	2 µL
RNA polymerase (T7/T3)	2 µL
Nukleasefritt vann	< 14 µL
Totalt	20 µL

Syntesen ble stoppet ved å tilsette EDTA, glycogen, litiumklorid og etanol som vist i Tabell 2.10 over natten ved -80 °C.

Tabell 2.10: *Stoppreaksjonløsning ved probesyntese*

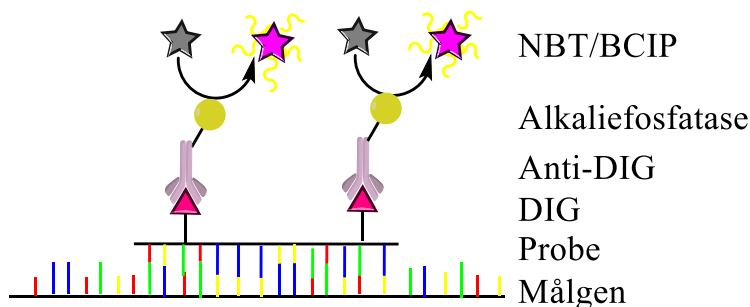
Komponent	Mengde
EDTA (0,2 M)	2 µL
Glycogen	1 µL
Litiumklorid (4 M)	2 µL
Etanol (100 %)	66 µL

2.11.2 Rensing av probene

Probene ble så sentrifugert i 30 minutter ved 4 °C. Supernatanten (alkoholen) ble fjernet og pelleten vasket med 50 µL kald 70 % etanol. Løsningen ble sentrifugert på nytt i 20 minutter og etanolen fjernet. Pelleten ble lufttørket i 5 minutter ved romtemperatur før 20 µL nukleasefritt vann ble tilsatt. For å løse opp pelleten ble løsningen varmet på 65 °C i 10 minutter. Proben ble kvalitetsjekkert på en 1 % agarosegel med 1X TAE konsentrasjonen og renheten ble målt med en Nanodrop® 1000 (Thermo Scientific).

2.12 *In situ* hybridisering

In situ hybridisering er en metode som muliggjør studier av cellulær lokalisering av genuttrykk i organismer eller vev. I denne oppgaven har den cellulære lokaliseringen av *cyp1a* og referansegenet β -aktin i hjerte og lever blitt studert. Prosedyren inneholder flere steg som inkluderer rehydrering, permeabilisering, eddiksyrebehandling, prehybridisering, hybridisering, RNase behandling, antistoff inkubering og fremkalling av proben med alkalisk fosfatase. For visualisering av proben ble det benyttet et digoksygenin (DIG) system (Figur 2.6) som er utviklet av Roche Applied Science (Roche, 2008).



Figur 2.6: *Cellulær lokalisering ved hjelp av digoksygeninmerking*. Proben festes komplementært til mRNAet i cellen hvor digoksygenin (DIG) er festet til tymin i probesekvensen. Antistoffet mot digoksygenin (Anti-DIG) bindes til digoksygeninmerkingen og enzymet alkaliefosfatase bidrar til visualisering av proben kolorimetrisk ved å fosforylere substratene nitro-blå tetrasolium (NBT) og 5-bromo-4-kloro-3'-indolyfosfat (BCIP) som avgir en lilla farge.

2.12.1 ISH med vev opparbeidet fra OCT og parafinsnitning

Forbehandlingen av prøvene i OCT og parafin er litt ulike. Objektglassene med vevssnittene som var støpt i OCT embedding matrix (CellPath) ble lufttørket i 1 time ved romtemperatur og deretter 10 min ved 65 °C. Vevene ble videre stegvis rehydrert i etanol, ved 95 %, 70 % og 50 % i 1 minutt for hvert rehydreringssteg. Vevsprøvene ble så vasket i 1 minutt med 2x SSC (Tabell 6.14). Vevsbitene som var innstøpt i parafin ble rehydrert to ganger i xylene á 10 minutter og videre i 100 %, 70 % og 50 % etanol i 2 minutter for hvert steg. Prøvene ble videre

MATERIAL OG METODE

vasket i 1 x KPBS (Tabell 6.15) i 2 minutter. Videre behandling er lik for OCT og parafininnstøpte prøver.

For å permeabilisere vevene og slik øke penetreringen av RNA-proben, ble prøvene Proteinase K behandlet (Tabell 2.11) i 3,5 minutter (Roche, 2008).

Tabell 2.11: *Proteinase K-behandling*

Komponent	Mengde
1 M Tris-HCl (pH = 8)	5 mL
Autoklavert vann	40 mL
0.5 M EDTA	5 mL
ProtK 2 mg/mL	250 µL
Totalt:	50,25 mL

4% paraformaldehyd (PF) (Tabell 6.6) ble tilsatt for å post-fiksere vevene i 5 minutter for å motvirke bakgrunnsfarging fra endogen fosfatase aktivitet. Vevene ble så vasket i 1X KPBS á 2, minutter to ganger.

Vevene ble så eddiksyrebehandlet ved å inkubere snittene i 0.1 M trietanolamine (TEA) buffer (pH 8.0, Tabell 2.12b) i 3 minutter. Vevene ble videre behandlet med 0,25 % eddiksyreanhydrid (Tabell 2.12a) i 10 minutter for å ytterligere redusere bakgrunnsfarging fra endogen fosfatase aktivitet.

Tabell 2.12: (a) 0,25 % eddiksyreanhydridbehandling (*acetic anhydrid*) og (b) trietanolamin (TEA) buffer, pH 8.0

a. 0,25 % eddiksyreanhydridbehandling		b. Trietanolamin buffer	
Komponent	Mengde	Komponent	Mengde
Acetic anhydride	125 µL	Trietanolamine	1,33 mL
TEA buffer	50 mL	Autoklavert vann	100 mL
Totalt	50 mL	Totalt	100 mL

Vevene ble vasket med 2x SSC i 1 minutt og dehydrert med 50 %, 70 %, 90 % og 100 % etanol i 1 minutt for hvert dehydreringssteg. Snittene ble vasket to ganger i 100 % etanol og satt til å tørke ved romtemperatur i to timer, hvor det underveis ble laget en hydrofob ramme ved hjelp av DakoCytomation PAP-pen (Agilent).

Ved hjelp av resultatet fra sekvenseringen kan man se hvilken vei PCR produktet er plassert i vektoren og dermed vite hvilken probe som vil hybridiseres komplementært med transkriptet (antisense) og hvilket som ikke vil det og slik fungere som en kontroll (sense) for hybridiseringsreaksjonen. For at RNA proben skal hybridisere med mRNA i vevet ble 12,6 µL av RNA probene (100 ng) for hvert objektglass varmet til 80 °C i 5 minutter før den ble plassert direkte på is (Tabell 2.13b). Hybridiseringsbufferen (Tabell 6.17) ble blandet med 10,0 µL blokkeringsløsning (Tabell 6.11) og varmet til 65 °C i vannbad. 87,4 µL av hybridiseringsbufferen, blokkeringsløsningen og 12,6 µL av proben ble så mikset og spunnet ned. Dette ble gjort med både fremover og bakoverproben.

Tabell 2.13: *Hybridisering med RNA probe, mengde er per objektglass med spesifikk probe.*

Hybridiseringsbuffer		Probe	
Komponent	Mengde	Komponent	Mengde
Ferdiglaget hybridiseringsbuffer	77,4 µL	Probe	50-200 ng
Blokkeringsløsning (10 %)	10,0 µL	Nukleasefritt vann	<12,6 µL
Totalt	87,4 µl	Totalt	12,6 µL

100 µL av løsningen (Tabell 2.13) ble overført til hvert objektglass og dekt med HybriSlip™ Hybridization Cover (Grace Bio-Labs) og inkubert i 12-36 timer/ O/N ved 65 °C i ett GasPak™ EZ *in situ* kammer (BD) med filterpapir med 2x SSC for å hindre uttørking (Tabell 6.14).

Gjenværende RNA probe og hybridslips ble skyltd bort med 2X SSC. Prøvene ble videre vasket med 2X SSC to ganger á 30 minutter ved romtemperatur. Vevene ble videre behandlet med 50 % deionisert formamid i 2X SSC (Tabell 2.14) ved 65 °C i 30 minutter.

Tabell 2.14: *50 % deionisert formamid*

Komponent	Mengde
Deionisert formamid	25 mL
2 x SSC	25 mL
Totalt	50 mL

Prøvene ble så vasket to ganger med 2X SSC ved 37 °C i 10 minutter. For å inhibere RNaser i vevet ble vevene behandlet med 0,02 mg/mL RNase A (Tabell 2.15a) i 20 minutter ved 37 °C. Vevene ble videre behandlet med RNase buffer (Tabell 2.15b) på 65 °C i 20 minutter.

MATERIAL OG METODE

Tabell 2.15: RNase behandling og tilhørende RNase buffer

a RNase behandling		b RNase buffer	
Komponent	Mengde	Komponent	Mengde
RNase A		1M Tris-HCl (pH 7.5)	1 mL
RNase buffer	50 mL	NaCl	2,9 g
		0.5 M EDTA	1 mL
		Autoklavert vann	<98
Totalt:	50 mL	Totalt:	100 mL

For å detektere genuttrykkene immunohistokjemisk ble vevene videre vasket i 2,5 timer i 2x SSC, 0,05 % triton x-100 og 2 % blokkeringsløsning (Tabell 2.16) og vasket 1X maleat buffer to ganger i 5 minutter.

Tabell 2.16: Immunobuffer

Komponent	Mengde
2XSSC	40 mL
Triton x-100	25 µL
10 % blokkeringsløsning	10 mL
Totalt:	50 mL

100 µL antistoffløsning med antideoxigenin-alkalin fosfatase FAB (anti-DIG FAB)-fragment løst i 1x maleatbuffer, 1 % blokkeringsbuffer og 0,3 % triton x-100 (Tabell 2.17) ble inkubert ved romtemperatur over natten i et luftfuktig kammer med vått papir fuktet med destillert vann.

Tabell 2.17: Antistoffløsning

Komponent	Mengde
Anti-DIG FAB (1:2000)	0,5 µL
5X Maleat buffer	200 µL
10 % blokkeringsløsning	100 µL
Triton x-100	3 µL
Autoklavert vann	696,5 µL
Totalt	1000 µL

Overskudd av antistoff ble skylt bort ved hjelp av 1x maleatbuffer og vasket i ti minutter, to ganger. Snittene ble så vasket i en visualiseringsbuffer (Tabell 2.18b) i 10 minutter. For å

visualisere de ulike genene ble 200 μL av nylaget kromogan substrat (NBT/BCIP) tilsatt (Tabell 2.18a).

Tabell 2.18: Reaksjonsløsning (a) for visualisering av proben med NBT og BCIP og tilhørende visualiseringsbuffer (b)

a) Reaksjonsløsning		b) Visualiseringsbuffer	
Komponent	Mengde	Komponent	Mengde
Levamisole	50 μL	1 M Tris-HCl	10 mL
NBT	45 μL	1 M MgCl	500 μL
BCIP	35 μL	NaCl	0,59 g
Visualiseringsbuffer	10 mL	Autoklavert vann	87,5 mL
200 μL per objektglass		Totalt	100 mL

Glassene ble dekt med dekkbrønner og inkubert i mørket. Fargeleggingen ble så sjekket under mikroskop hvert 30. minutt. Reaksjonen ble stoppet ved å ta av dekkbrønnene og prøvene ble vasket i en stop-buffer (Tabell 2.19) i 1 time.

Tabell 2.19: Stopbuffer ved endt visualisering av NBT og BCIP, pH 7.5

Komponent	Mengde
1M Tris-HCl (pH 7.5)	500 μL
0.5 M EDTA (pH 8.0)	100 μL
5M NaCl	1,5 mL
Totalt:	50 mL

For å studere vevsnittene i mikroskopet ble objektglassene tørket med et Kimtech Science Delicate Task papir (Kimberly-Clark® Professional). En dråpe av 70 % glycerol ble påført og et Menzel-Gläser dekkglass (Thermo Science) ble lagt over prøvene og et lag gjennomsiktig neglelakk ble lagt rundt dekkglasset for å forhindre fordampning av glycerolen. Alle bildene av snittene i resultatdelen er fotografert ved hjelp av mikroskopet DM6000B (Leica) og mikroskopkameraet DFC320R2 (Leica).

2.13 Kvantitativ polymerase kjedereaksjon (qPCR)

Induksjonen som var observerbar ved ISH ble samtidig analysert med kvantitativ sanntids polymerase kjedereaksjon (qPCR). qPCR er en metode som benyttes til å kvantifisere mengde cDNA-kopier (transkriptmengde) og benyttes for å fastslå relative eller absolutte verdier av genekspresjon. I denne oppgaven blir mengden PCR produkt kvantifisert ved hjelp av SYBR green. Denne bindes kun til dobbeltrådet DNA og avgir et fluoriserende lys og økningen av fluorescens gir slik et mål på mengde PCR produkt. En analyse av utviklingen av fluorescens kan gi et bilde på mengden *cyp1a* ved start.

2.13.1 Prøvetillaging

Det ble laget en reaksjonsmiks med 10 µL SYBR green mastermiks (Roche) og 5 µL genspesifikke fremover og bakover primerpar (0,5 µM) per reaksjon. 15 µL ble tilsatt i hver brønn i 96 brønnsplater (BioRad) som ble holdt på is og beskyttet mot lys. 5 µL fortynnet cDNA (1:10) ble tilsatt brønnene og qPCR reaksjonene ble kjørt i CFX96™ Thermal Cycler (BioRad) med temperatursyklusene som vist i Tabell 2.20. Prøvene ble kjørt med primeren for målgenet *cyp1a* og referansegenene *rlp22* og *arp* (Tabell 6.28).

Tabell 2.20: Temperatursykluser for qPCR

Temperatur	Tid	Sykluser
95 °C	5 min	
95 °C	10 s	X 39
54 °C	10 s	
72 °C	20 s	
95 °C	10 s	
95 °C	10 s	

2.13.2 Standardkurve

I denne oppgaven er det blitt benyttet en relativ standardkurve, da det kun er nødvendig å måle folds økning av transkriptet og ikke den spesifikke mengden transkript i vevene. Det ble produsert en standardkurve fra en cDNA miks fra de ulike prøvene, som ble fortynnet 1:10 og videre seriefortynnet i en 10 folds fortynningsrekke. Forsøksspesifikke primere av *cyp1a*, *rlp22* og *arp* ble benyttet til å amplifisere gensekvensen som forklart i Metode 2.13.1.

2.13.3 Analyse av qPCR resultat

I en PCR reaksjon vil hver syklus medføre en 2 folds amplifisering av det spesifikke gentranskriptet. Dette vil medføre en eksponentiell økning, men syklusen dette skjer ved er avhengig av den initielle mengden gentranskript i løsningen. Kvantifiserings syklusen (C_q) er det antall sykluser som kreves før fluorescensen overgår bakgrunnsfargingen og forteller når terskelverdien er nådd, slik at det vil oppstå en eksponentiell økning i gentranskript (Bustin et al., 2009; Taylor et al., 2015). Denne verdien gir slik et godt mål på mengde gentranskript ved start. Ved en induksjon av gensekvensen som følge av en eksponering vil det ta færre sykluser før en når terskelverdien, sammenlignet med dersom det initielle nivået er lavere. Denne informasjonen kan benyttes til å beregne relativ folds økning. Da mengde templat kan variere noe mellom prøvene ble det benyttet to referansegen for å kalibrere den reelle induksjonen av det spesifikke målgenet. Det er viktig at dette referansegenet ikke blir påvirket av eksponeringsstoffet. Da det tilsynelatende oppsto en oppregulering av *arp* ved eksponering for 1 og 10 μM BNF ble kun *rlp22* benyttet i analysene og beregningen av folds økning. For å beregne ekspressionsratioen ble det benyttet Pfaffl metoden (Pfaffl, 2001).

$$Ratio = \left(\frac{E_{m\ddot{a}l}^{\Delta C_q, m\ddot{a}l (kalibrator-test)}}{E_{ref}^{\Delta C_q, referanse (kalibrator-test)}} \right).$$

Her vil *cyp1a* være målgenet (mål) og *rlp22* er referansegenet. Kontrollgruppen blir benyttet som kalibrator og 1 μM og 10 μM BNF er testgruppene. For å beregne effektiviteten til målgenet (*cyp1a*) og referansegenet (*rlp22*) ble standardkurver benyttet (Metode 2.13.2). Den initielle startkonsentrasjonen ble plottet logaritmisk langs x-aksen og C_q til standardkurvene er plottet langs y aksen. Stigningstallet til standardkurven ble benyttet til å beregne effektiviteten for primerene til målgenet og referansegenet ved hjelp av ligningen:

$$E = (10^{-1/\text{stigningstall}}) - 1$$

2.13.4 Smeltekurveanalyse

For å kontrollere at det ikke er dannet fragmenter av primerdimerer eller uspesifikk binding av primerene under qPCR reaksjonen, ble reaksjonsmiksen ved endt temperatursyklus varmet opp fra 65 $^{\circ}\text{C}$ og opp til 95 $^{\circ}\text{C}$, med en økning på 0,5 $^{\circ}\text{C}$ per 5. sekund. Det vil da oppstå en reduksjon i mengden fluorescens som er et mål på at DNA trådene denatureres, da SYBR green kun binder

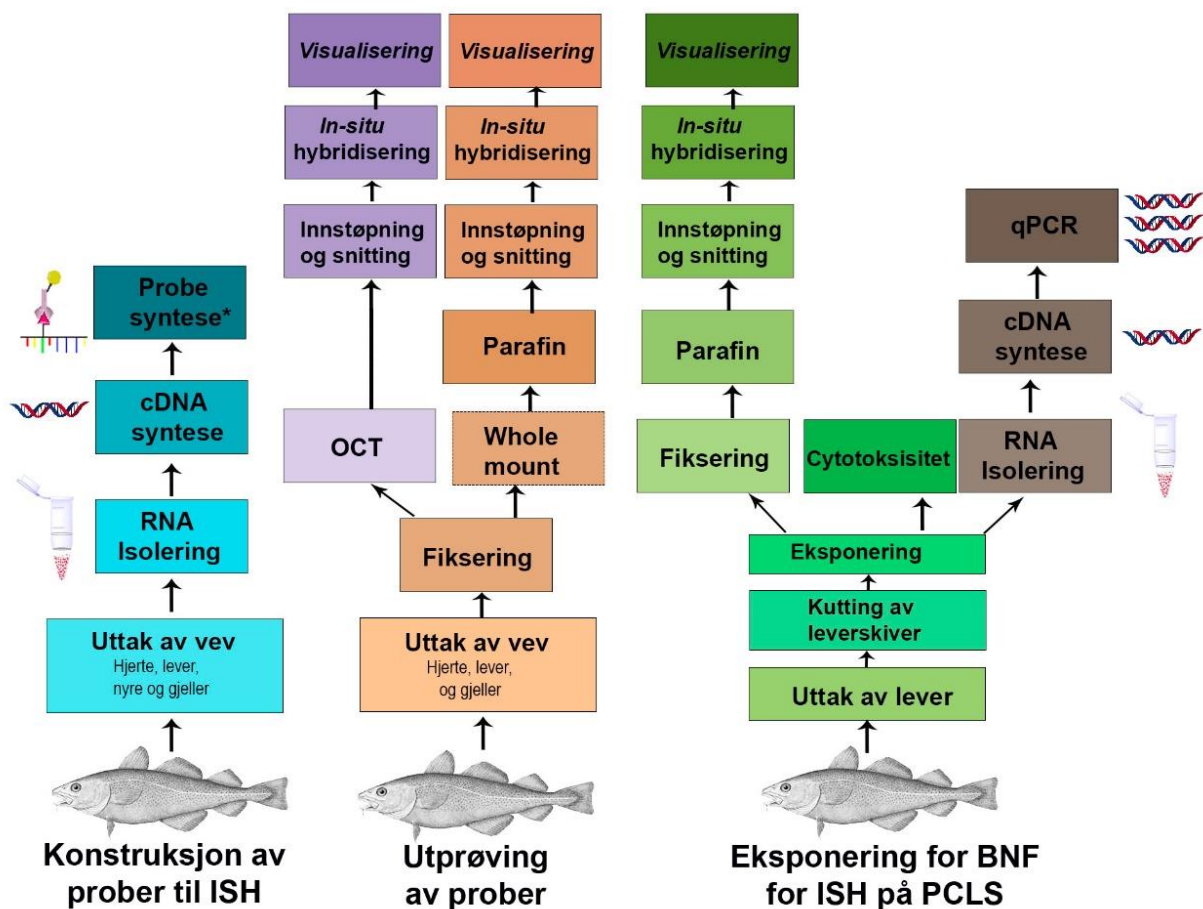
MATERIAL OG METODE

til dobbeltrådet DNA. Den temperaturen med høyest reduksjon i fluorescens under oppvarming av PCR produktene gir en topp i smeltekurven og er smeltepunktet til PCR produktet. Dersom det er amplifiserte primer-dimerer eller uspesifikke produkter vil det dannes ekstra topper i tillegg til den ønskede toppen som indikerer smeltepunktet for det ønskede PCR produktet.

3

RESULTATER

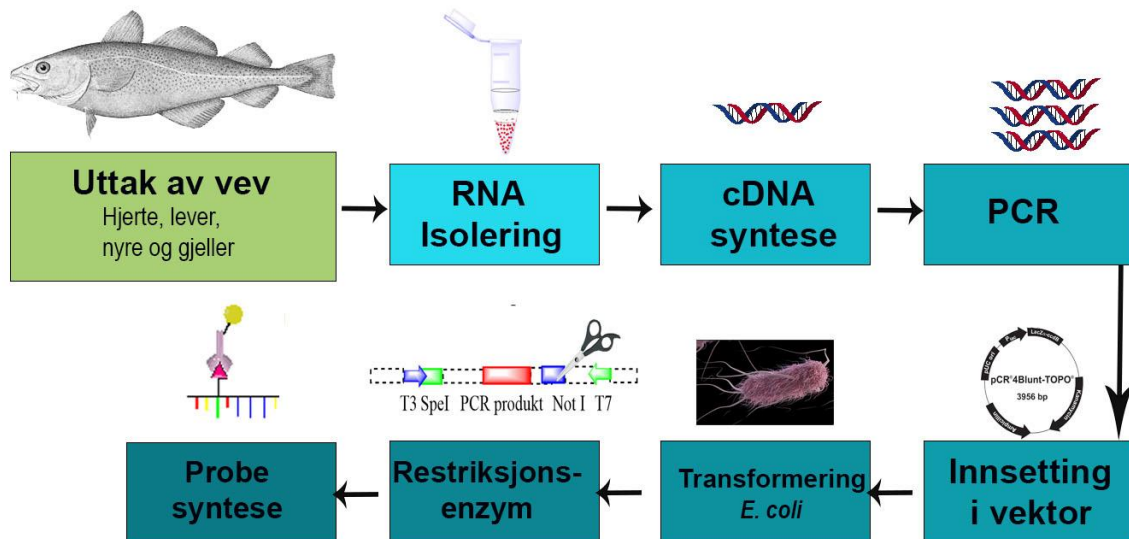
For å etablere ISH på torskelever og PCLS ble først prober rettet mot *cyp1a* og β -aktin konstruert og syntetisert. Probene ble videre karakterisert og prøvd ut på både hjertevev og levervev støpt inn i OCT og/eller parafin. ISH ble til sist utført på PCLS (Figur 3.1) eksponert for BNF for å følge induksjonen og lokaliseringen av *cyp1a* i PCLS. Induksjonen av *cyp1a* i PCLS ble også samtidig fulgt med qPCR. Jeg vil starte med å beskrive resultatene fra syntese av probene (blått), før jeg ser nærmere på hvordan innstøpningsmediumene OCT (lilla) og parafin (oransje) påvirket ISH eksperimentene av vev fra hjerte og lever. Videre vil jeg beskrive ISH på PCLS innstøpt i parafin etter eksponering for BNF (grønn), inkludert data for cytotoxicitet (mørk grønn) og kvantifisering av induksjonen av *cyp1a* ved hjelp av qPCR (brunt) (Figur 3.1).



Figur 3.1: Figuren viser flytdiagrammet over resultatdelen

3.1 Konstruksjon av probe til ISH

RNA ble isolert og komplementært DNA (cDNA) syntetisert før *cyp1a* og β -aktin ble amplifisert med PCR. PCR produktene ble ekstrahert fra agarosegel og videre ligert inn i en vektor og transformert inn i *E. coli* for å klonere de ønskede genene. Det rensede vektorplasmidet ble så kuttet ved hjelp av restriksjonsenzymene NotI og SpeI før en sense og antisense probe ble syntetisert (Figur 3.2)



Figur 3.2: Flyttdiagram for syntetisering av ISH probe

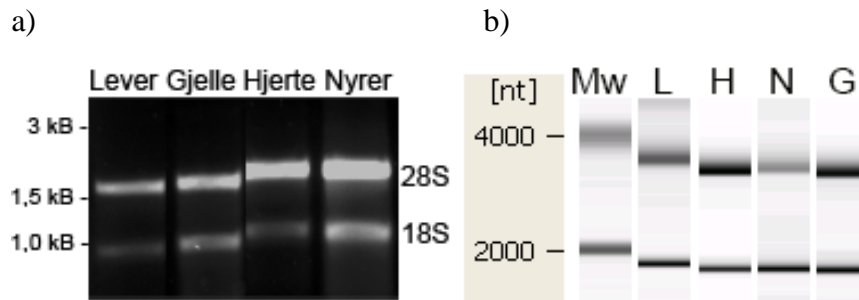
3.1.1 RNA isolering

Total RNA fra lever, hjerte, nyre og gjeller ble isolert som beskrevet i Metode 2.6 (s. 24). Det ble tatt ut flere vevsprøver fra ulike vev, da det var uvisst hvilken RNA kvalitet og mengde *cyp1a* en ville finne i de ulike vevene. Fire prøver, ett fra hvert av de fire organene, med RIN verdi fra 8,2 til 9,8 og en 260/280 absorpsjonsratio ($A_{260/280}$) på 1,86 til 2 (Tabell 3.1), ble benyttet videre i syntese av cDNA.

Tabell 3.1: Konsentrasjon, renhet og RIN-verdi for RNA ved probelaging

Prøve	ng/ μ l	$A_{260/280}$	RIN-verdi
Lever	765,93	1,86	9,4
Gjeller	1198,77	1,95	8,8
Hjerte	641,73	1,99	9,8
Nyre	1634,04	2	8,2

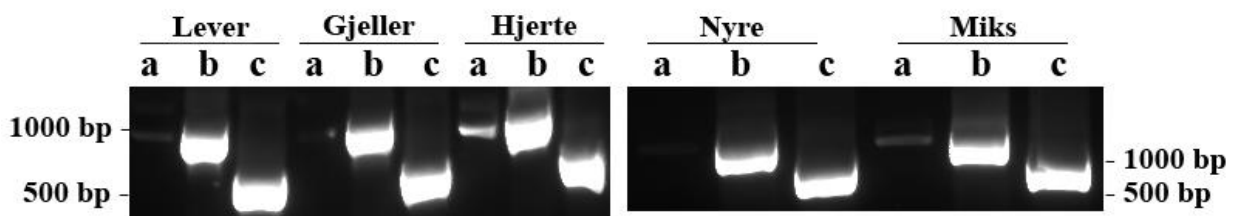
RNA integriteten til de ulike vevsprøvene ble målt både ved hjelp av en agarosegelelektroforese (Figur 3.3a) og med en Agilent 2100 Bioanalyser (Figur 3.3b). Både agarosegelen og elektroferogrammet viser distinkte bånd for 28S og 18S, noe som indikerer liten grad av nedbrytning og høy integritet av RNAet.



Figur 3.3: Kvalitetskontroll av RNA ved hjelp av agarosegelelektroforese (AGE og Agilent 2100 Bioanalyser) Utsnitt av (a) AGE og (b) AGE ved hjelp av Agilent 2100 Bioanalyser med RNA fra lever (L), hjerte (H), nyre (N) og gjeller (G). Molekylvektstandard er indikert til venstre for a og b.

3.1.2 cDNA syntese og PCR av *cyp1a* og β -aktin

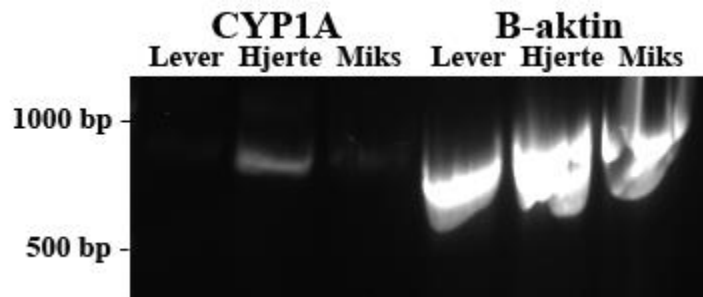
RNAet ble benyttet til å produsere cDNA som beskrevet i Metode 2.7. cDNA fra de fire ulike vevene, samt en cDNA miks av de ulike vevene, ble brukt som templat for å amplifisere ønskede fragmenter av *cyp1a* (Vedlegg 6.5.1) og β -aktin (Vedlegg 6.5.2) med PCR (Metode 2.8). Det ble samtidig benyttet et primersett for β -aktin (Lille-Langøy (2013)) som amplifiserer et kortere fragment som en positiv kontroll på cDNA-syntesen (Figur 3.4). PCR produktene for *cyp1a* og β -aktin ble kontrollert med AGE. Agarosegelen viste at primerne amplifiserte produkter av forventet lengde og at det samtidig er tilsynelatende ulik mengde PCR-produkt fra *cyp1a* og β -aktin. Dette kan indikerer at grunnivået av *cyp1a* transkriptet i vevene er markant lavere enn β -aktin.



Figur 3.4: AGE av PCR-produkter fra ulike vev med ulike primere. (a) *cyp1a* primersett for probesyntese, (b) β -aktin primersett for probesyntese og (c) β -aktin primersett fra Lille-Langøy (2013)

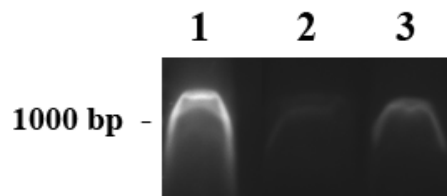
3.1.3 Kloning av *cyp1a* og β -aktin gensekvenser

PCR produktene amplifisert fra lever, hjerte og vevsmiksen viste det høyeste nivået av *cyp1a*. Disse prøvene ble kjørt på ny i en gel for å ekstrahere og rense det ønskede fragmentet av både *cyp1a* og β -aktin (Figur 3.5).



Figur 3.5: AGE av *cyp1a* og β -aktin PCR-produkter til gel-ekstrahering. Figuren viser gel med PCR produkt fra lever, hjerte og en miks av de fire ulike vevstypene. Innholdet i de ulike brønnene er indikert over gelen.

På grunn av lite utbytte av *cyp1a* etter den første runden med PCR (Figur 3.5) ble det kjørt en ny PCR med PCR-produktet for *cyp1a* fra hjertet som templat. Dette ga økt mengde av det ønskede *cyp1a* fragmentet (Figur 3.6).

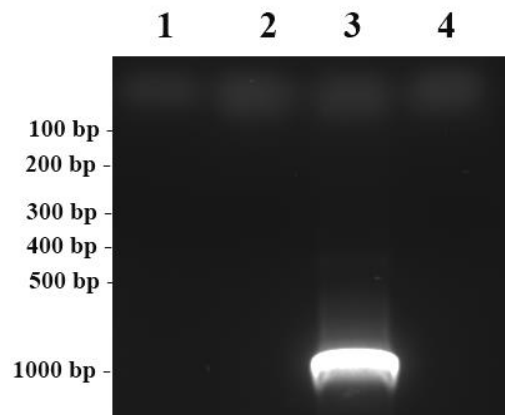


Figur 3.6: AGE av *cyp1a* PCR-produkt til gelekstraksjon. I brønn 1 er PCR produktet hvor det initielle PCR-produktet for *cyp1a* fra hjertet ble benyttet som templat. Brønn 2 inneholder PCR-produktet som ble amplifisert fra cDNA fra hjerte og brønn 3 inneholder PCR-produkt som ble amplifisert fra cDNA preparert fra en vevsmiks av de ulike vevene.

DNA fragmentene av *cyp1a* og β -aktin ble isolert med gel-ekstraksjon (Metode 2.8.1) og ligert inn i kloningsvektoren Topo[®] TA (Invitrogen) (Vedlegg 6.1) som videre ble transformert inn i kompetente *E. coli* (Invitrogen). Disse ble strøket ut på agarplater og videre dyrket og inkubert over natten. Bakteriekolonier ble så dyrket i overnatte-kulturer og plasmidet fra positive transformanter ble deretter renset fra bakteriecellene og videre sekvensert for å verifisere sekvensen til de innsatte DNA fragmentene (resultat vises ikke)

Gensekvensen med β -aktin var tilstede i to av plasmidene som ble sendt til sekvensering, men ingen av plasmidene inneholdt *cyp1a*. Det ble derfor kjørt en ny runde hvor *cyp1a* på nytt ble

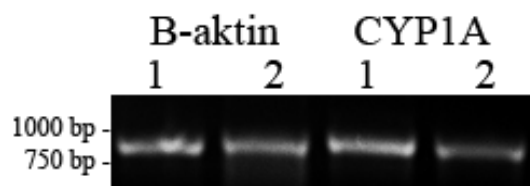
ligert inn i kloningsvektoren og transformert inn i *E. coli* celler. I denne omgangen ble det i tillegg benyttet både en blue-white screening og PCR screening (Metode 2.9.2) for å identifisere positive transformanter (Figur 3.7). Bakteriekolonier som inneholdt kloningsplasmidet med innsatt fragment av korrekt lengde ble så dyrket i overnattekultur. Plasmid ble renset fra overnattekulturen og det innsatte fragmentet ble verifisert med sekvensering.



Figur 3.7: *Screening av transformanter med AGE.* AGE av PCR produkter fra screening for positive transformanter.

3.1.4 Syntese av probe til ISH

Da korrekte *cyp1a* og β -aktin fragmenter var klonet inn i egnet vektor kunne proben videre bli syntetisert som beskrevet i Metode 2.9. Probesyntesen ble kontrollert med AGE (Figur 3.8) og alle de fire probene hadde en forventet størrelse på omlag 855 bp (Vedlegg 6.5.1 og 6.5.2)



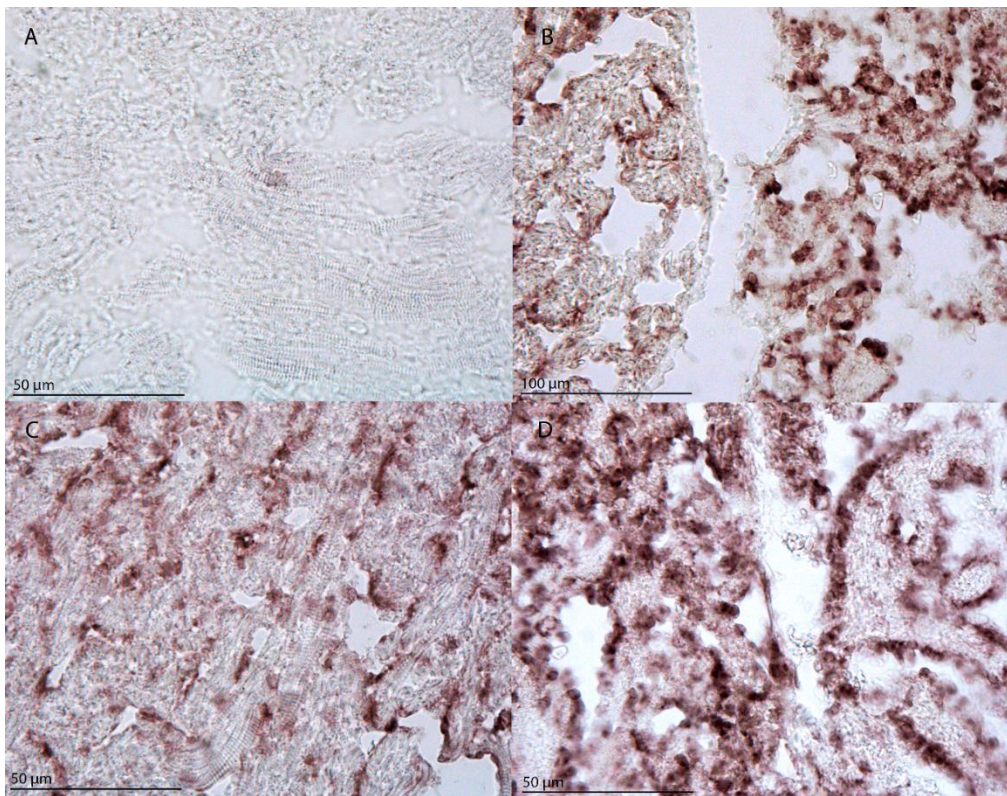
Figur 3.8: *Kontroll av probesyntesen med AGE.* Figuren viser de to probene til gensekvensene β -aktin og *cyp1a*. 1 er fremover prober hvor plasmidet er kuttet med restriksjonsenzymene *NotI* og proben syntetisert ved hjelp av RNA polymerasen T3. 2 er en bakoverprobe hvor plasmidet er kuttet med restriksjonsenzymet *SpeI* og proben er syntetisert ved hjelp av RNA polymerasen T7. Innholdet i de ulike brønnene er indikert over gelen.

3.2 Sense og anti-sense bestemmelse av probene

Ved sekvensering kan man analysere hvilken vei gensekvensen er plassert og slik se hvilken probe som er sense og hvilken som vil binde komplementært til gentranskriptene (antisense). For å teste ut om probene fungerte med ISH og for å finne ut hvilken probe som korresponderte til sense og antisense ble alle probene testet enkeltvis i et ISH oppsett på hjerte og leverprøver som var støpt inn i OCT embedding matrix, kryopressert og kryosnittet.

3.2.1 ISH på hjertevev

Det første vevet probene ble testet på var vev fra hjertet som ble kryopressert og –snittet, da det er vist at hjerte har et høyt nivå av CYP1A (Husøy et al., 1996). Kryosnittingen ga snitt hvor morfologien ble godt bevart (Figur 3.9)



Figur 3.9: *In situ* hybridisering av *cyp1a* (rødbrunt) i uekspont hjertevev fra atlantehavstorsk. A) CYP1A sense probe på hjertemuskelatur, B) CYP1A anti-sense probe. Figuren viser skille mellom atrium og ventrikkel. C) Viser cellulær lokalisasjon av *cyp1a* i ventrikkel, mens D) viser uttrykkningen i atriumet.

Utprøvingen av probene med ISH på hjertevev viste at *cyp1a* plasmidet kuttet med restriksjonsenzymet NotI etterfulgt av probesyntese med polymerasen T3 ga en antisenseprobe som bandt seg komplementært til *cyp1a* mRNA i vevet (Figur 3.9b-d). Vektorplasmidet kuttet med restriksjonsenzymet SpeI etterfulgt av probesyntese med polymerasen T7 bandt seg ikke

til *cyp1a* transkripter i vevet og er derfor en sense probe (Figur 3.9a). Tilsvarende ISH på hjertevev ble utført med probene konstruert mot β -aktin. Dette forsøket viste at proben syntetisert med T7 polymerasen fra SpeI-kuttet β -aktin plasmid bandt seg til β -aktin mRNA (antisense). Proben syntetisert med T3 polymerasen fra NotI kuttet β -aktin plasmid bandt seg ikke til transkriptet i hjertevevet (sense) (se Vedlegg 6.2.2, s. 83). Ingen av sense probene produserte farging, noe som tyder på transkriptsesifikk binding (Vedlegg 6.2.1 og 6.2.2)

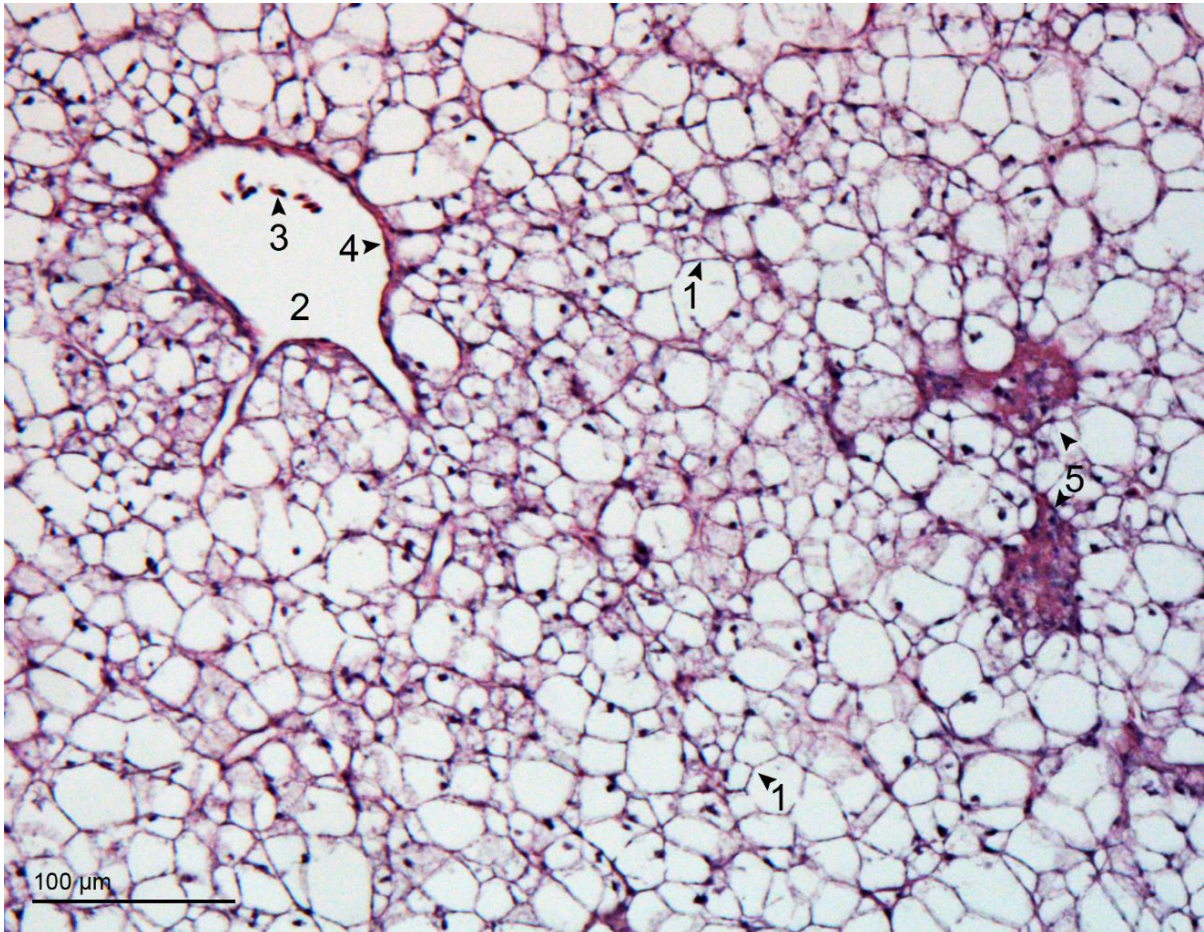
ISH forsøket viste at *cyp1a* transkriptet er lokalisert i endotele celler og endokardiumet i både ventrikkelen og atriumet (Figur 3.9b-d). Figur 3.9b viser en interessant observasjon hvor uttrykkningen av *cyp1a* i to av hjertets fire kamre, ventrikkelen (c) og atriumet (d), er tilsynelatende ulik med en høyere uttrykning av *cyp1a* i atrielle endotele celler. Dette er også observerbart hos sebrafisk ved IHC der man finner et lavere nivå av CYP1A i hjertemuskelaturen i ventrikkelen (Zodrow et al., 2004).

3.2.2 ISH på levervev

Det ble også testet et ISH oppsett for leverprøver for å se om en kan detektere de ulike probene i fettrike organ som kan være mer utfordrende ved histologiske metoder. Ved kutting av levervev med kryosnitting ble levercellene presset sammen, noe som vanskeliggjorde histologiske undersøkelser og cellulær lokalisering av transkriptene. Det ble forsøkt å variere både temperatur og tykkelse på snittene, men dette hjalp ikke (Resultat vises ikke). Forskyvningen av levercellene kan være på grunn av leverens høye innhold av fett og dermed lave frysepunkt. Det er likevel mulig å observere probbinding ved hybridisering av antisense proben både for β -aktin og *cyp1a* (Vedlegg 6.2.3).

3.3 Histologi og ISH på levervev innstøpt i parafin

Da det tidligere arbeidet med lever ikke ga god histologi var det nødvendig å utforske andre innstøpningsmetoder. Eide et al. (2014) benyttet resin for histologiske undersøkelser av PCLS, men da det ikke er mulig å gjennomføre ISH på resininnstøpte vevsbiter ble parafin-innstøpning og snitting testet ut. Kutting av parafininnstøpt lever ga rene snitt, med god og oversiktlig morfologi.



Figur 3.10: *Histologisk parafinsnitt av ueksponert levervev fra atlantehavstorsk* En kan en for det meste observere hepatocytter med intracellulære fettdråper (1), men og en blodåre (2) med erytrocytter (3) som er omringet med endotele celler (4). 5 viser områder med endotele celler som mest sannsynlig danner blodårer eller ansamling av blodceller. Snittet er farget med HE og fotografert ved hjelp av mikroskopet DM6000B (Leica) og mikroskopkameraet DFC320R2 (Leica) med 10X forstørring. Bar = 100 μm.

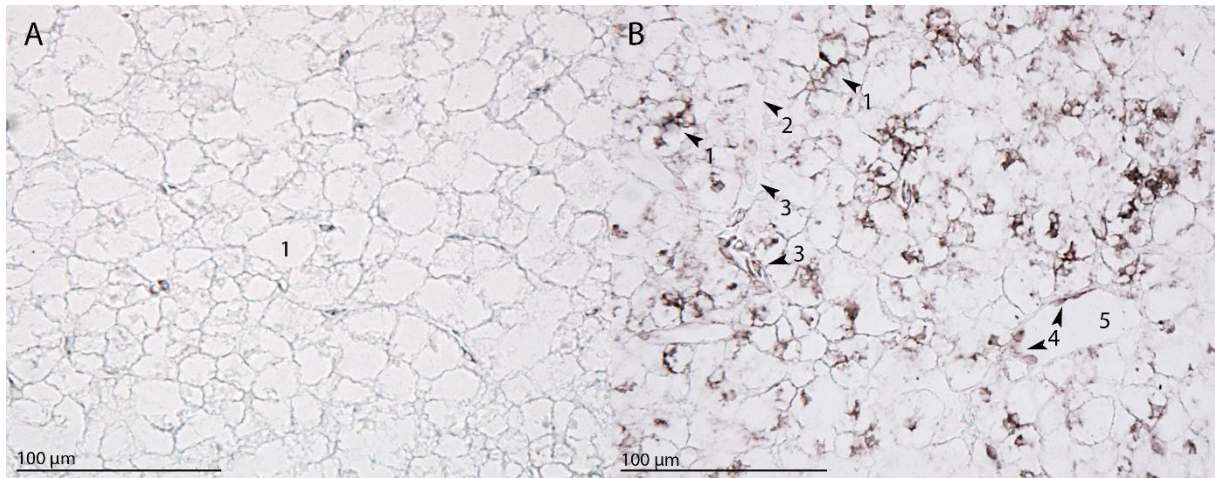


Figur 3.11: Utsnitt av det histologiske parafinsnitt i Figur 3.10 av ueksponert levervev fra atlantehavstorsk. En kan også her observere en blodåre (1) med erythrocytter (2). Blodåren er bygget opp av kapillærer dannet av plateformede endotele celler (3), som videre er omringet med hepatocytter med intracellulære fettdråper (4). Snittet er farget med HE og fotografert ved hjelp av mikroskopet DM6000B (Leica) og fotografert med mikroskopkameraet DFC320R2 (Leica) med 20X forstørrelse. Bar = 100 μm.

I Figur 3.10 og Figur 3.11 kan man observere hepatocytter med store intracellulære fettdråper, blodårer med erythrocytter og endotele celler som kan danne grunnlaget til vaskulære kapillærer eller blodårer. Det kan være mulig å observere antydninger til gallekapillærene, men da disse er svært små og lokalisert mellom de fettfylte hepatocyttene kan ikke dette fastsettes med sikkerhet i disse snittene. Snittene er farget med hemotoxylin og eosin og ved nærmere studier kan man se at cellemembranene for det meste er intakte og at de intracellulære fettdråpene er hovedkomponenten i hepatocyttenes cytoplasma.

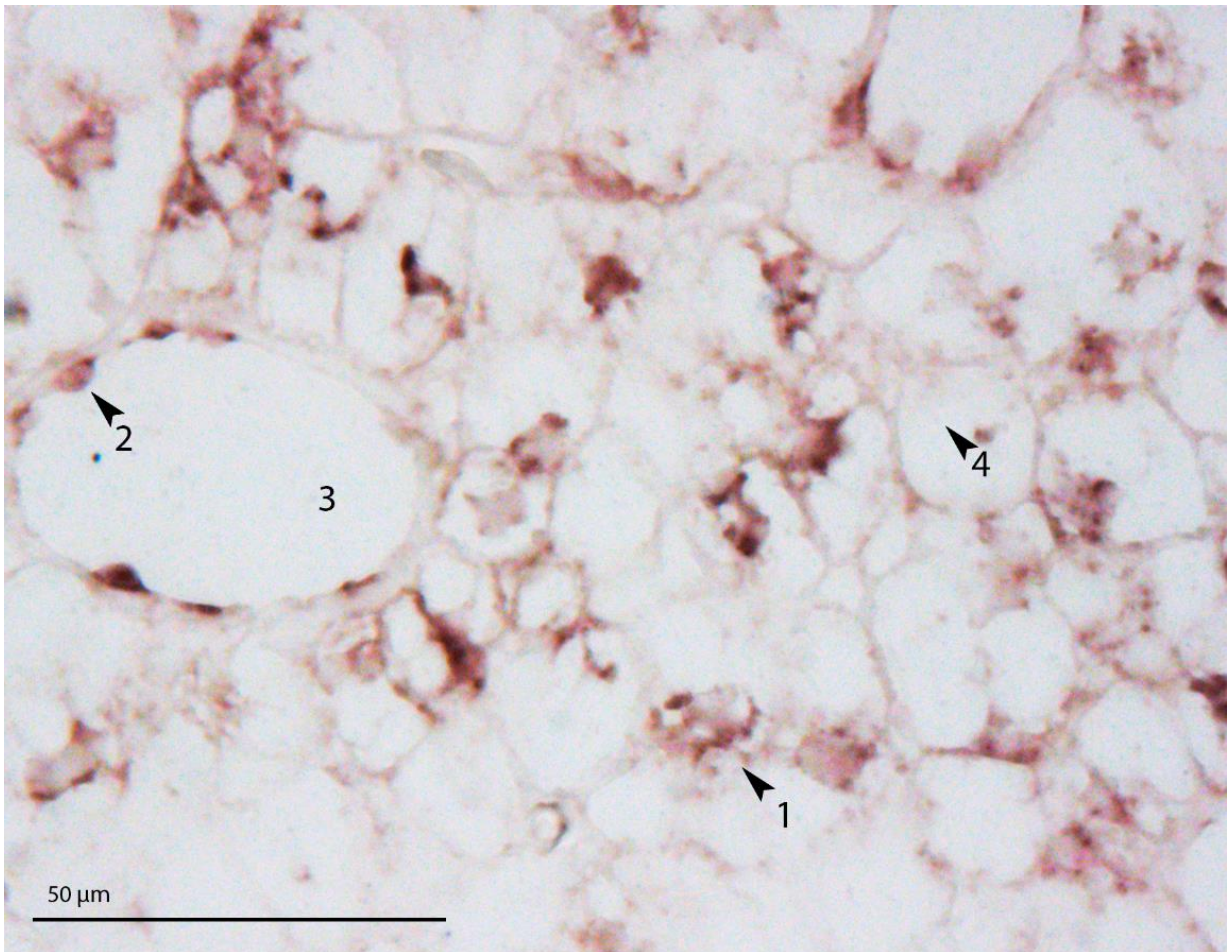
RESULTAT

De initielle histologiske undersøkelsene av det parafininnstøpte levervevet viste at snittene ble godt bevart og gjenspeilet morfologien i levervevet godt. De parafininnstøpte snittene ble så videre benyttet til ISH. Figur 3.12 viser parafinnsnittene ved *in situ* hybridisering med *cyp1a*.



Figur 3.12: Sense og antisense *in situ* hybridisering av *cyp1a* (rødbrunt) på uekspont levervev fra atlantehavstorsk innstøpt i parafin. Figuren viser en tydelig hybridisering av antisense proben (B) og en klar forskjell mellom sense (A). En kan observere en blodåre(2) som går igjennom snitt b fylt med erythrocyter (3) og omringet av lipidfylte hepatocytter (1). En kan også observere endotele celler (4), som mest sannsynlig danner vaskulære eller gallegapillærer (5). Snittet er fotografert ved hjelp av mikroskopet DM6000B (Leica) og fotografert med mikroskopkameraet DFC320R2 (Leica) med 10X forstørrelse. Bar = 100 μm.

I disse snittene kan man se en uniform fordeling av *cyp1a* transkripter i snittet som er hybridisert med antisense proben. Denne distribusjonen er også uniform i nærheten av blodåren. Uttrykkningen av *cyp1a* er lokalisert i hepatocyttenes cytoplasma og i endotele celler rundt det som mest sannsynlig er en blodåren (Punkt 5 i Figur 3.12)..



Figur 3.13: *In situ* hybridisering av *cyp1a* (rødbrunt) på ueksponert levervev fra atlantehavstorsk innstøpt i parafin. Figuren viser hybridisering av *cyp1a* antisense proben. En kan man mest sannsynlig observere en blodåre (3), med årevegger dannet av endotele celler(2), som videre er omringet av hepatocytter (1) med store fettdråper (4). Snittet er fotografert ved hjelp av mikroskopet DM6000B (Leica) og mikroskopkameraet DFC320R2 (Leica) med 20X forstørrelse. Bar = 50 μm.

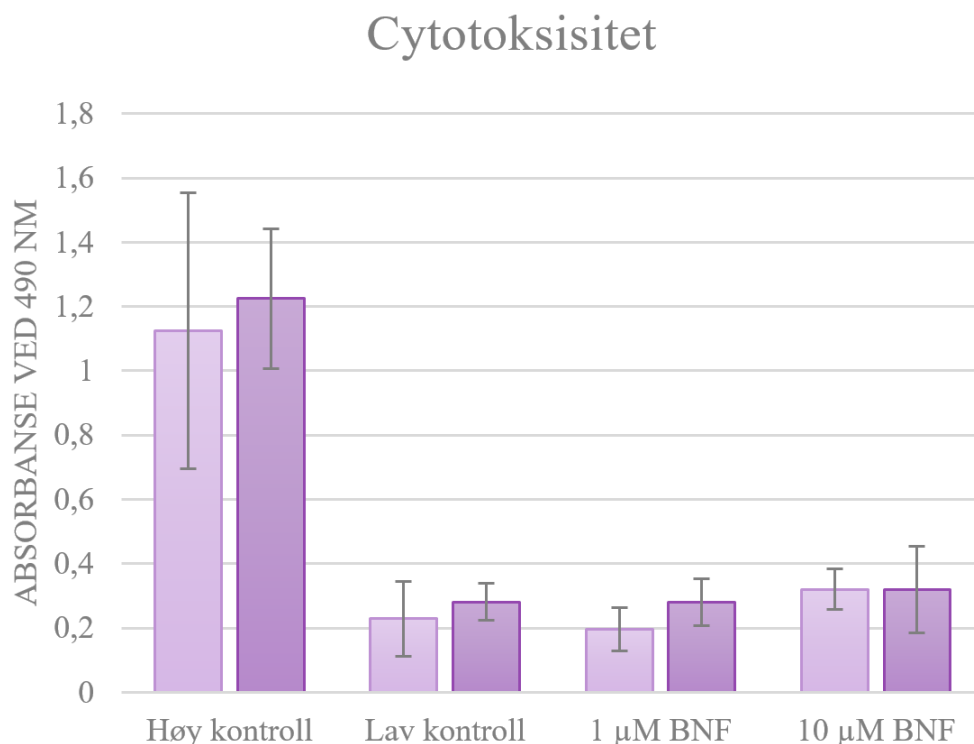
I Figur 3.13 kan man også observere en uniform uttrykning av *cyp1a* i hepatocytterne med intracellulære fettdråper, men og langs kanten av den vaskulære kapillæren eller gallegangen. Denne kapillæren inneholder ikke erythrocytter eller andre blodårer og en kan derfor ikke si for sikkert hvorvidt dette er en blodåre eller gallegang. Galleganger er derimot vanligvis svært tynne og omringet av hepatocytter, men dersom vevsprøven er snittet skjevt kan det merkede punktet også være en gallegang. Derimot kan man anta at punkt 3 er en blodåre, da det kan se ut som det er endotele celler som omringer kapillæren.

3.4 ISH på PCLS eksponert for BNF

Da de initielle histologiske undersøkelsene og ISH eksperimentene viste at parafinunnstøpning av torskelever fungerte best for å bevare vevets morfologi og integritet under snittingen, ble denne fremgangsmåten videre benyttet i ISH analysene av PCLS.

3.4.1 Eksponering av PCLS for BNF

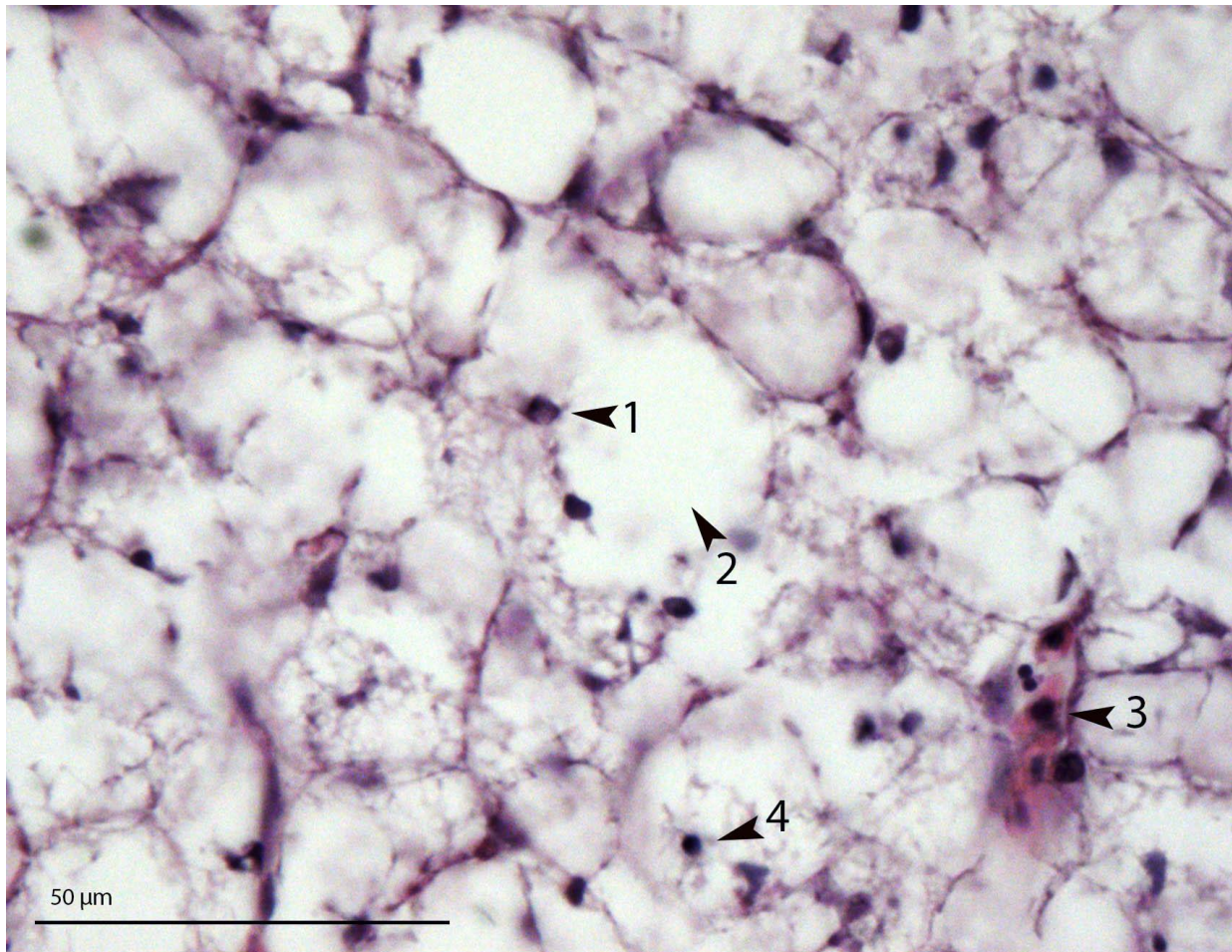
PCLS ble opparbeidet fra en torsk av 714 g som beskrevet i Metode 2.4. PCLS ble videre benyttet i et eksponeringsforsøk med ulike konsentrasjoner av AhR agonisten, BNF, for å følge induksjonen av *cyp1a*. I tillegg til en kontrollgruppe eksponert for løsemiddelet, ble PCLS eksponert for to ulike konsentrasjoner av BNF i 48 timer, henholdsvis 1 μM og 10 μM BNF. Viabiliteten til PCLS ble fulgt ved å måle nivået av LDH i mediumet etter 24 og 48 timer (Figur 3.14). Ved hjelp av student t test var det en signifikant forskjell i celledød etter 24 timer for leverskivene tilsatt 10 μM BNF ($p = 0,01$) med en 10 % økt celledød sammenlignet med kontrollen. Celledøden var derimot ikke signifikant for leverskiver eksponert for 1 μM BNF etter både 24 og 48 timer eller for PCLS som var eksponert for 10 μM BNF etter 48 timer (Figur 3.14).



Figur 3.14: Stolpediagrammet viser absorbansen til de ulike konsentrasjonene, med standardavvik

3.4.2 ISH av *cyp1a* på parafininnstøpte PCLS

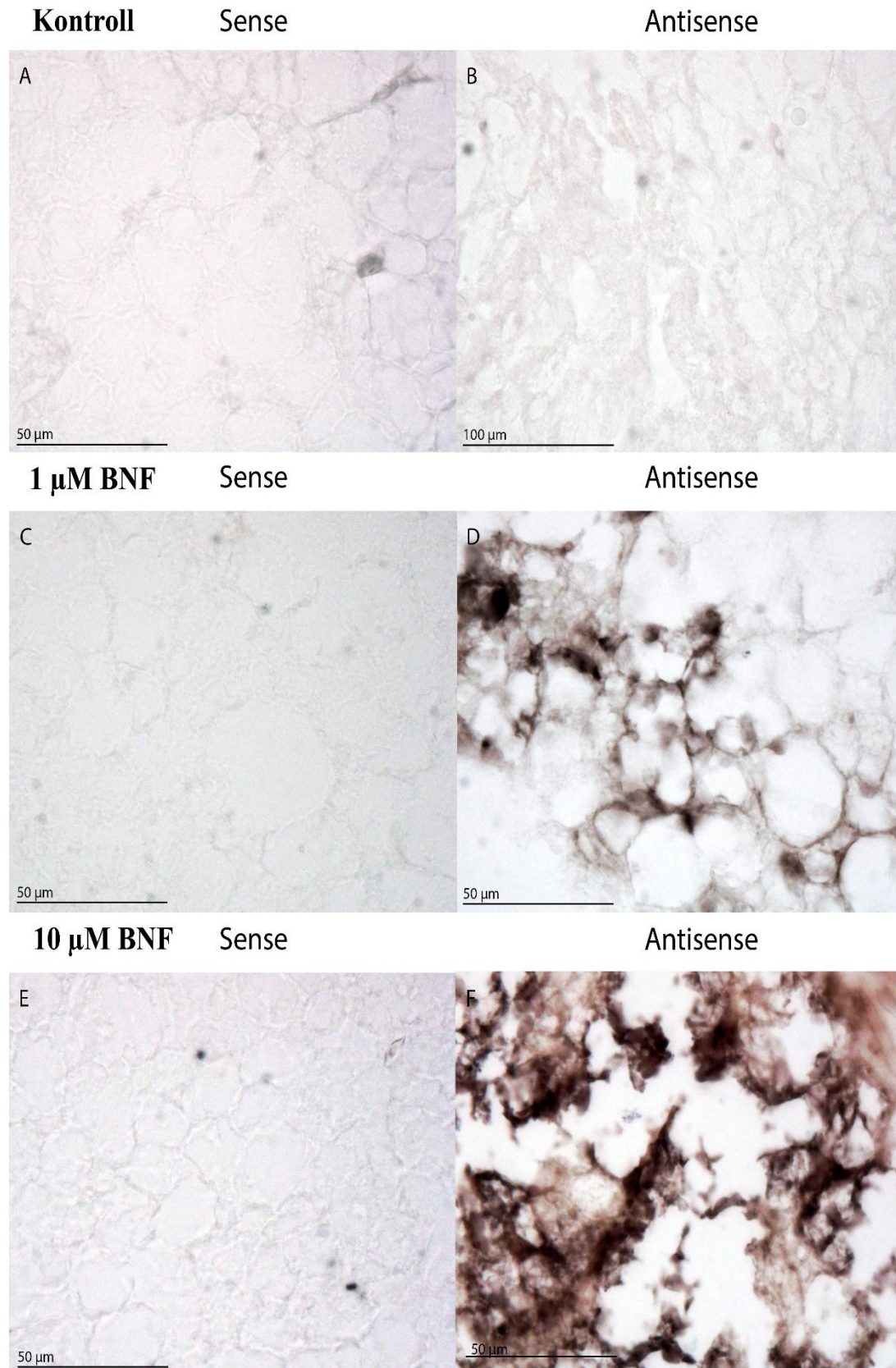
Ved parafininnstøpning og snitting av PCLS ble morfologien godt bevart og en kan også her tydelig se store intracellulære lipiddråper i hepatocytene og det som i stor grad ser ut som rent fettvev. En kan også i dette snittet se blodåre med erythrocytter. Lipiddråpene er større i dette PCLS snittet enn i snittet fra pilotforsøket og vevet ble her kuttet 12 μm tykke snitt. Snittene er farget med hemotoxylin og eosin.



Figur 3.15: HE-farging av BNF eksponert PCLS fra atlantehavstorsk. Her kan man se store intracellulære fettdråper (2) i hepatocytene (1) og en blodåre med erythrocytter eller andre typer blodceller (3). Punkt 4 er en meget rund celle som ser ut som en pyknotiske cellekjerne. Bar = 50 μm

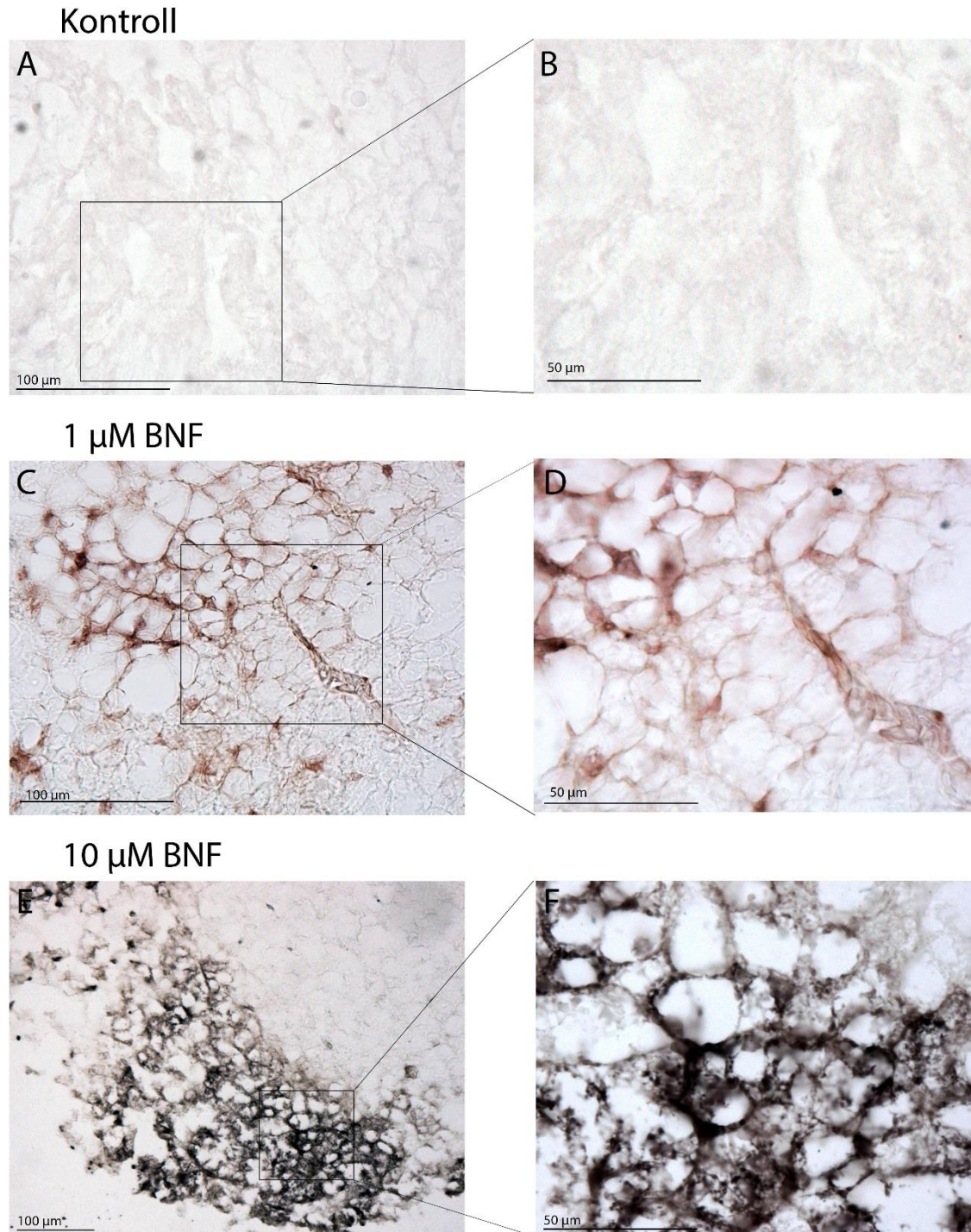
I eksponeringsforsøket med BNF på PCLS kan man i vevsprøven fra kontrollen, som ikke er eksponert for forbindelsen, se en liten forskjell mellom sense og antisense (Figur 3.16a og b). Dersom en ser nærmere på de eksponerte PCLS ser man derimot en tydelig hybridisering med antisense (d og f) sammenligne med sense (c og e), i PCLS eksponert for henholdsvis 1 μM (c og d) og 10 μM BNF (e og f) (Figur 3.16).

RESULTAT



*Figur 3.16: ISH med *cyp1a* sense og antisense prober på PCLS fra antlanterhavstorsk eksponert mot BNF. Figuren viser forskjellen mellom sense og antisense for de forskjellige eksponeringsgruppene, kontrollgruppen og PCLS eksponert for 1 μM og 10 μM BNF. A, C og E viser prøver med sense og B, D og F viser prøver hvor proben har hybridisert komplementert med *cyp1a* transkriptene (rødbrunt).*

Dersom en ser nærmere på de eksponerte gruppene, sammenlignet med kontrollen kan man også se en relativ økning i *cyp1a* transkriptmengden mellom 1 μM og 10 μM BNF eksponerte PCLS. For PCLS eksponert for 10 μM BNF er det en tydelig større mengde *cyp1a* transkripter over et større område, og disse snittene er på kanten til overeksponerte.



Figur 3.17: *In situ* hybridisering av *cyp1a* (rødbrunt/svart) på PCLS fra torsk eksponert for 0 μM (kontroll) (a & b), 1 μM (c & d) og 10 μM (e & f) BNF. Snittet er fotografert ved hjelp av mikroskopet DM6000B (Leica) og mikroskopkameraet DFC320R2 (Leica) med 5X, 10X og 20X forstørrelse. Bar = 100 og 50 μm , som markert på hvert enkelt bilde.

3.5 Induksjon av *cyp1a* i PCLS

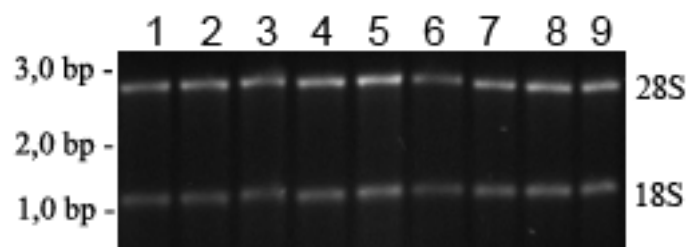
Denne økte induksjonen av *cyp1a* i PCLS ble verifisert ved å gjøre qPCR målinger av mengden *cyp1a* transkript. To og to PCLS fra samme eksponeringsgruppe ble slått sammen. Disse ble videre homogenisert, RNA ble isolert ved RNeasy® Mini Kit (Qiagen) og cDNA syntetisert (Metode 2.6 og 2.7). Mengde *cyp1a* tilstede ble så målt ved qPCR målinger ved hjelp av en CFX96™ Thermal Cycler (BioRad) (Metode 2.8).

3.5.1 Syntese av cDNA til qPCR

Kvaliteten og integriteten til RNAet ble kontrollert spektrofotometrisk ved hjelp av en Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) og ved bruk av AGE. Konsentrasjonen av RNA fra PCLS var på 63,36 – 187,28 ng/μl og en 260/280 absorpsjonsrate på 2,09 - 2,18 (Tabell 3.2). Integriteten til de ulike prøvene viser to distinkte bånd ved henholdsvis 1200 og 2800 bp (Figur 3.18).

Tabell 3.2: Konsentrasjon og renhet til de ulike prøvene

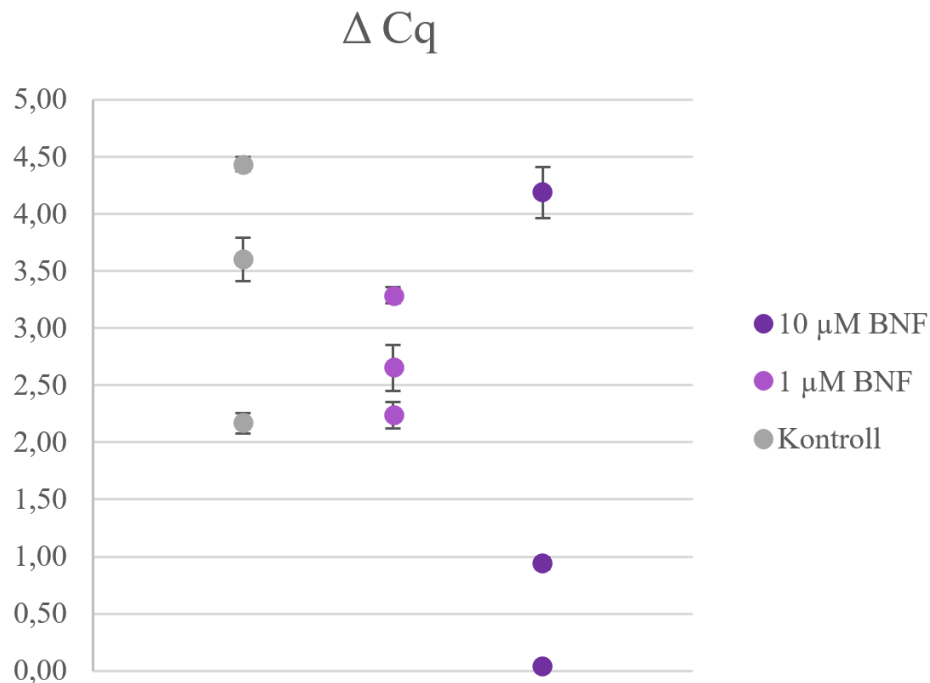
Eksponeringsgruppe	Prøve	ng/μl	A _{260/280}	A _{260/230}
10 μM	1	63,36	2,18	2,33
	2	146,14	2,10	2,24
	3	187,28	2,13	2,36
1 μM	4	147,56	2,10	2,37
	5	139,51	2,12	1,86
	6	101,51	2,11	2,37
Kontroll	7	83,71	2,12	2,16
	8	69,2	2,13	1,83
	9	87,65	2,09	1,66



Figur 3.18: AGE av RNA isolert fra PCLS benyttet i BNF eksponering. Brønn 1-3 er tilsatt prøver eksponert for 10 μM BNF, brønn 4-6 er PCLS eksponert for 1 μM BNF og brønn 7-9 er fra kontrollgruppen eksponert for løsemiddelet (DMSO).

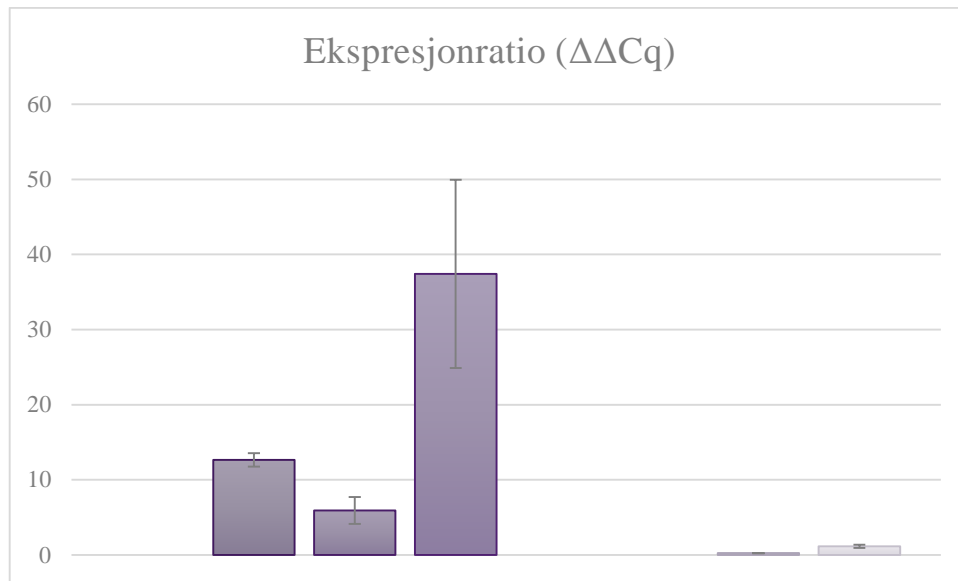
3.5.2 Måling av induksjon av *cyp1a* med qPCR

Den kvantitative sanntids PCRen (qPCR) viste en oppregulering av referansegenet *arp* ved eksponering for BNF og utregninger av induksjoner ble derfor kun gjort ved hjelp av *rlp22*. Endringen i terskelsyklusen (ΔCq) fra de ulike vevsprøvene ble målt ved å subtrahere terskelsyklusen til referansegenet fra målgenet (Figur 3.19). Dette kan vise i hvilken grad CYP1A er indusert i de ulike leverskivene da en lavere ekspresjonsendring tilsier en lavere terskelverdi for målgenet *cyp1a* og dermed et høyere nivå av *cyp1a* ved start. Som en kan se i Figur 3.19 er standardavviket mellom de ulike triplikatene fra samme vevsprøve relativt liten, men forskjellen mellom de tre parallellene fra samme eksponeringsgruppe er store, spesielt for PCLS tilsatt 10 μM BNF.



Figur 3.19: Endring i terskelverdi mellom målgen og referansegen ved qPCR etter PCLS eksponering for 0, 1 og 10 μM BNF

Ekspresjonsrasjon ($\Delta\Delta Cq$) ble målt ved hjelp av Pfaffl metoden (Pfaffl, 2001) (Metode 2.13.3). Standardkurvene til de to primerparene ble benyttet til å finne effektiviteten til primerparene til *cyp1a* og *rlp22*. Disse beregningene viste at primerparet til *cyp1a* hadde en effektivitet på 2,42 med en R-kvadrert verdi på 0,88. Primerparet til *rlp22* hadde derimot en effektivitet på 0,82 og en R-kvadrert verdi på 0,9.



Figur 3.20: *Ekspresjonsratio til PCLS eksponert for 10 μM BNF (til venstre) og 1 μM BNF (til høyre). En PCLS eksponert for 1 μM BNF er fjernet da denne viste en usannsynlig ekspresjonsratio.*

Ekspresjonsratioen til PCLS eksponert for 1 μM og 10 μM ble normalisert ved å benytte en kalibrator, som i dette forsøket er ueksponerte leverskiver. Analysen viste en 17,8 folds økning av *cyp1a* i PCLS eksponert for 10 μM BNF sammenlignet med kontrollen, med et standardavvik på 15. For PCLS eksponert for 1 μM BNF var det en 0,69 folds økning, med et standardavvik på 0,13 (Figur 3.20). Da er derimot den ene PCLS eksponert for 1 μM BNF fjernet da denne viste en 220,21 folds økning, med et standardavvik på 49,02, noe som ikke er reelt.

Figur 3.19 er ikke en standard metode for å fremstille qPCR data, men viser interforskjellene mellom leverskivene eksponert for samme mengde BNF. Figur 3.19 viser derimot at selv om interforskjellene er store er intraforskjellene mellom triplikatene fra samme cDNA relativt liten. Dette har mest sannsynlig medført de store standardavvikene i foldsberegningene for PCLS eksponert for 10 μM BNF. Årsaker til de store standardavvikene og dette resultatet vil bli diskutert videre i Avsnitt 4.2.3.

DISKUSJON

I denne oppgaven har målsetningen vært å utarbeide og validere prosedyre for *in situ* hybridisering for studier av den cellulære lokalisasjonen av genuttrykk i lever og presisjonskuttete leverskiver (PCLS) fra torsk. *Cyp1a* og β -*aktin* har blitt benyttet som målgener i dette arbeidet. *In situ* hybridisering av PCLS fra torsk har ikke blitt utført tidligere og etableringen av denne metoden vil i videre arbeid kunne frembringe histologiske data som komplementerer andre analysemetoder som i dag gjøres på PCLS.

Ulike strategier har blitt utforsket for å optimalisere forsøkene og jeg vil her diskutere valg av forsøksdesign, samt utfordringer knyttet til disse valgene. Den cellulære lokaliseringen av *cyp1a* i PCLS ved BNF-eksponering vil bli beskrevet og sammenlignet med *in situ* hybridiseringsforsøk der *cyp1a* uttrykkningen i lakselever har tilsvarende blitt studert ved eksponering for BNF (Olsvik et al., 2007). Hvilken betydning arbeidet i denne oppgaven kan ha på videre studier, samt bruk av ISH på torskelever og PCLS for studier av *cyp1a* ekspresjon og ekspresjon av andre målgener vil også bli diskutert.

4.1 Etablering av ISH på PCLS

Ved å benytte PCLS vil man i likhet med primære hepatocyttkulturer gjennomføre *in vitro*-forsøk i tråd med 3R prinsippet (Russell og Burch, 1959). I motsetning til primære hepatocyttkulturer vil man ved å benytte PCLS både bevare den opprinnelige tredimensjonale strukturen i vevet og vevsintegriteten med de ulike celletypene som finnes i lever. PCLS vil slik bedre etterligne naturlige organsystemer og dermed ligne mer på en *in vivo* situasjon (Boess et al., 2003; Elferink et al., 2008).

PCLS er nylig blitt etablert for torsk og det er vist at systemet kan benyttes i eksponeringsstudier ved å se på responser i genekspressjon (Eide et al., 2014), noe som samtidig muliggjør ISH studier for å se på den cellulære lokaliseringen av det induserte gentranskriptet i leveren

4.1.1 In situ hybridisering (ISH)

Den cellulære lokaliseringen av spesifikke enzymer i ulike celletyper og vev kan studeres ved å se på lokaliseringen av transkriptet, med ISH, eller ved å studere lokaliseringen av selve enzymet med immunohistokjemi (IHC). IHC ble først introdusert i 1941 av Albert Coons og fungerer ved at ett primært antistoff bindes til proteinet man vil studere. Videre benyttes et sekundært antistoff til å detektere den cellulære lokalisasjonen til protein-antistoff komplekset. I motsetning til å gjøre enzymaktivitetsmålinger, Western Blot, Northern Blott, qPCR og ELISA, som alle krever homogenisering av vev før analyser kan utføres, kan man gjennom både ISH og IHC preservere den cellulære strukturen og integriteten til vevsprøvene. Lokaliseringsstudier av CYP1A i lever ble første gang utført ved hjelp av IHC på torsk av Goksøyr et al. (1987a). Den første komparative analysene av vevsuttrykkningen av CYP1A i torsk ble senere utført av Husøy et al. (1994) ved å benytte IHC til å studere uttrykkningen av CYP1A i vevssnitt fra lever, hjerte, nyre, gjeller, milt, tarmer, pylorus blindsekker og gonader eksponert for BNF.

En utfordring knyttet til IHC er at det kan være tidkrevende og vanskelig å konstruere gode antistoff som er kompatible med metoden, samtidig som det kommersielle utvalget av antistoff som er rettet mot proteiner i fisk (inkludert torsk) er svært begrenset. Torskegenomet ble nylig sekvensert og annotert (Star et al., 2011) og genssekvensen til torskens proteiner er nå kartlagt. I så måte er ISH en mer anvendelig metode, da man selv kan produsere genspesifikke prober mot alle torskens gener med grunnleggende molekylærbiologiske metoder som beskrevet i denne oppgaven. ISH er derfor en egnet metode for å studere den cellulære ekspresjonen av gener. IHC kan likevel gi nyttig tilleggsinformasjon om den subcellulære lokalisasjonen av proteinene. For enzymer med etablerte antistoff kan ISH komplementere standard IHC prosedyrer og muliggjør en kryss-sjekk av spesifisiteten til IHC. Det hadde vært mulig å gjennomføre begge prosedyrene med PCLS, men da IHC tidligere er gjort av Husøy (1996) og Goksøyr et al. (1987a) mot CYP1A i torskelever var det av interesse å etablere en ISH prosedyre på PCLS.

I forberedelsen til syntesen av ISH probene ble to primersett for henholdsvis *cyp1a* og β -*aktin* designet og videre benyttet for å amplifisere ønskede DNA fragmenter med PCR (Metode 2.8). Probesevensene hadde en amplifiseringslengde på 855 bp og ble valgt slik at den ble lagt i den åpne leserammen for å få en sammenhengende mRNA hybridisering i cytosol. Siden det er ulikt grunnivå av *cyp1a* i ulike vev, og en finner høyest grunnivå av *cyp1a* i lever, hjertet og nyre (Husøy et al., 1994) ble det tatt ut ulike vev. Både vev fra hjerte, lever,

gjeller og nyre ble rensset og ekstrahert for RNA (Resultat 3.1.1, s. 44). Da renheten, integriteten og mengden *cyp1a* transkript var høyest for vevsprøven fra hjertet (Figur 3.5 og Figur 3.6) ble *cyp1a* og β -*aktin* klonet fra dette vevet og benyttet videre i probesyntesen (Resultat 3.1.3 og 3.1.4).

4.1.2 Forberedelse av vev til ISH analyser

For å forberede vev til ISH analyser må vev fikseres og preserves. Valg av metode er avhengig av vevstype, hvilke prosesser vevet skal gå gjennom og hvilke metoder som skal benyttes i forsøkene.

4.1.2.1 Valg av fikseringsmiddel

For å preservere morfologien til vevet må det før studier bli fiksert (Ostrander, 2000). Det ideelle fikseringsmiddelet gjør vevet hardere, noe som vil vanskeliggjøre morfologiske endringer av vevet og motvirke dekomponering, forråtnelse og autolyse (Ostrander, 2000). Formaldehyd er enkelt å håndtere og preserverer og bevarer den morfologiske strukturen til vevet (Fox et al., 1985; Thavarajah et al., 2012). Fikseringen med paraformaldehyd medfører kryss-bindinger mellom proteinene og skaper slik en rigiditet i vevet, men medfører også en degradering og fragmentering av mRNA og rRNA. Dette kan medføre en redusert RNA integritet og lavere nivåer av ønskede transkripter (Kashofer et al., 2013).

Fikseringstid er avhengig av vevstørrelse, da det tar lengre tid å diffundere innover og gjennom flere celledag. En tommelfingerregel er at vevsbitene ikke bør være større enn 0,5 cm x 0,5 cm, for å sikre tilstrekkelig fiksering av hele vevet før degradering oppstår, og at en bør benytte 10 volumenheter fikseringsvæske per 1 volumenet vev. Ved en forlenget fikseringstid vil kvaliteten på vevsegmentet, tilgjengeligheten for antistoffer med IHC og RNA preservering bli påvirket negativt (Kashofer et al., 2013). Derimot er det nødvendig å fikser vevet for å motvirke morfologiske endringer og fiksering med paraformaldehyd ble derfor benyttet i denne oppgaven.

For at fikseringsmiddelet skulle diffundere inn i alle celledagene ble det i pilotforsøkene benyttet kardiovaskulær perfusjon med paraformaldehyd (PF) for å fjerne blod og preservere vevet optimalt. Fikseringsmiddelet vil ved hjelp av fiskens sirkulasjonssystem bli fordelt i de ulike vevene og paraformaldehyden vil slik få mulighet til å diffundere inn i de ulike vevene. Videre postfiksering ble gjort med paraformaldehyd rett etter uttak av vev eller etter endt eksponering for å unngå tap av RNA og endring av morfologien til vevet gjennom de etterfølgende dehydrerings- og rehydreringsprosessene (Braissant og Wahli, 1998).

4.1.2.2 Ulike innstøpningsmetoder av vevene

Siden leveren er fettrik ble det antatt at denne kunne være vanskelig å jobbe med og flere ulike vev ble derfor preservert for uttesting og karakterisering av probene i et ISH oppsett i pilotforsøkene. Sammen med lever ble det tatt ut vev fra hjertet, som tidligere er vist at har et høyt grunnuttrykk av *cyp1a* (Husøy et al., 1994), og gjeller, som medveileder Tom Ole Nilsen (Uni) har mye ISH erfaring med (Ebbesson et al., 2011; Ebbesson et al., 2005; Rønnestad et al., 2007). Gjeller er et tynt og permeabelt organ som ofte er enkelt å jobbe med i forhold til fiksering, histologi og dermed testing av ISH prober (Nilsen, 2016, pers. kommentar). I pilotforsøket ble det primært klargjort for innstøpning i OCT embedding matrix (OCT) (CellPath), da dette er en rask, veletablert og godt fungerende metode som ivaretar morfologien og strukturen til de fleste vev (Steinbrecht og Zierold, 1984). Derimot er kryopreservering mindre stabilt enn parafin og resin-innstøpning. Eide et al. (2014) benyttet resin-innstøpning på PCLS for histologiske undersøkelser og dette fungerte godt, men for ISH blir det vanligvis benyttet enten parafin eller kryosnitning (Braissant og Wahli, 1998). Da det var usikkerhet hvorvidt kryopreservering ville fungere med det fettrike levervevet ble det samtidig tatt ut vevsbiter og preservert vev til såkalt «whole mount» ISH (Vedlegg 6.2.5). Parafin-innstøpning var et tredje alternativ, men som ikke lengre blir benyttet i så stor grad i forskningsgruppen marin utviklingsbiologi ved Institutt for biologi (UiB). Grunnen til dette er at parafininnstøpingen tar lengre tid en kryopreservering og parafininnstøpingen skjer ved ulike varmeteg, noe som kan påvirke histologien til vevet og morfologien vil ikke nødvendigvis bevares like godt. Det ble derfor valgt å starte opp de initielle ISH forsøkene i pilotforsøket med kryopreservering av alle de ekstraherte vevene fra torsk og kryosnitning og ISH av hjerte og lever.

Kryosnitningen fungerte godt for hjertet (Figur 3.9) hvor morfologien til hjertevevet var godt bevart og hvor snittene viste lokalisering av *cyp1a* i endotele celler og endokardium i atriumet og ventrikkelen, i likhet med funn gjort ved IHC (Husøy et al., 1994). En kan i Figur 3.9 og Figur 6.2 se en lavere uttrykning av *cyp1a* i hjertemuskelaturen i ventrikkelen enn i atriumet, i samsvar med funn gjort i sebrafisk (Zodrow et al., 2004). Den økte bakgrunnsuttrykningen i endotele celler i torskens ventrikkel hadde vært interessant å sett nærmere på. Det hadde også vært interessant å sett hvordan hjertet responderer ved eksponering for giftstoffer og om en vil få en forskjell i induksjon mellom de to hjertekamrene. Primære kardiale endotele cellekulturer fra atlantehavstorsk er forsøkt isolert for toksisitetstudier av PAHer i en masteroppgave ved molekylærbiologisk institutt, men dette ble ikke etablert (Stuart, 2013). Dersom det er ulik

utrykning av *cyp1a* også mellom de ulike kamrene, som funnene i denne oppgaven kan indikere, vil det i kardiale toksisitetstester hvor en måler induksjon av CYP1A vil det være viktig å være klar over denne forskjellen og være konsekvent i uttaksområdet som blir benyttet. Da hjertet ikke er fokusområdet for denne masteren og på grunn av tidsbegrensninger fikk jeg dessverre ikke sett nærmere på dette i denne oppgaven.

På grunn av leverens høye fettinnhold og dermed lavere frysepunkt var vevet fremdeles svært bevegelig ved temperaturene benyttet under snittingen, noe som medførte forflytting av levervevet (Vedlegg 6.2.3). Histologien til leversnittene ble svært dårlig ved at det ikke var mulig å differensiere mellom de ulike cellene og celletypene og at cellemembranene fremsto som ødelagte (Figur 6.6 og Vedlegg 6.2.4). Det er mulig å observere probebinding, men umulig å studere den cellulære lokalisasjonen av gentranskriptet (Figur 6.6). For å få gode og oversiktlige snitt som er egnet for ISH, som samtidig bevarer vevsintegriteten, den romlige strukturen og ikke har flere cellelag over hverandre er det viktig å ha så tynne snitt som mulig. Da hjertet er et fastere vev ble det her benyttet en tykkelse på 12 μm , mens levervevet hovedsakelig ble kuttet med en tykkelse på 16 μm . For å forsøke å forbedre snittene ble PCLS satt i 0,1 M Sørensen med 25% sukrose og 10% OCT (Tabell 6.4) over natten før innstøpning. Dette i håp om at OCTen ville penetrere bedre inn i vevet og slik bedre bevare integriteten til vevet under snittingen. Det ble også eksperimentert med ulike temperaturer (-18 - -25 °C), forskjellig tykkelse på snittene (10-20 μm) og orientering av PCLS (resultater vises ikke). Til tross for ulike optimaliseringsforsøk forflyttet levervevet seg og ble sammenstuet, noe som resulterte i forringing av histologiske strukturer hvor vevets morfologi ikke ble bevart (Figur 6.6).

Et litteratursøk viste at de fleste som snitter lever for histologiske studier gjør dette med parafininnstøpning av vevet (Husøy et al., 1994; Myers et al., 1995; Olsvik et al., 2007; Wahlang et al., 2016). Braissant og Wahli (1998) observerte at fettvev er svært vanskelig å prosessere ved kryosnitting og at hvitt fettvev derfor bør støpes inn i hydrofobe medium, slik som parafin. Med denne fremgangsmåten minimaliseres endringer i morfologien som oppstår ved snitting (Braissant og Wahli, 1998). Derimot er det vist at innstøpning i parafin vil medføre en RNA fragmentering og lavere RNA intergitet, renhet og kvalitet (Kashofer et al., 2013). På tross av dette er parafin den foretrukne innstøpningsmiddelet da det preserverer morfologien utmerket (Kashofer et al., 2013). En leverbit som var dehydrert og lagt i 100% metanol originalt tiltenkt «whole mount» ble derfor rehydrert til 70% etanol og sendt til Molecular Imaging Center (MIC) ved Institutt for biomedisin (UiB). Dette var en juvenil fisk, med relativt små

lipiddråper i hepatocytene. Parafinsnittingen resulterte i meget god histologi for vevet og gode bilder både ved histologifarging og ISH med *cyp1a* (Figur 3.12 og Figur 3.13).

Parafininnstøpning ble derfor valgt i det videre arbeidet med ISH på PCLS.

4.1.3 Morfologien til levervevet

Konsistensen og den cellulære oppbygningen av leveren varierer mellom ulike arter (Akiyoshi og Inoue, 2004), men leveren har ytterst vanligvis ett 1-2 cellelag tykt peritoneum som skiller leveren fra bukhulen (Kryvi og Totland, 1995). Den dominerende celletype i leverparenchymet er hepatocytter som kan utgjøre opptil 90 % av den totale levermassen (Akiyoshi og Inoue, 2004; Alpini et al., 1994), noe en kan se i alle histologisnittene fra lever (Figur 3.10, Figur 3.11 og Figur 3.15). Gallekapillærene er vanligvis tynne og omgitt av eller plassert mellom grupper av hepatocytter (Kmiec, 2001). Mellom leverparenchymcellene ligger blodfylte sinusoider som er kledd med plateformede, endotele celler (som en kan se i Figur 3.11). I rommet som skiller blodet og hepatocytene, Disses rom, finnes de nevnte sinusoidale endotele cellene, hepatiske stellate celler (tidligere kalt fettlagringsceller, ito celler, lipocyter eller perisinusoidale celler) og makrofager som er festet til den sinusoidale veggen (Kmiec, 2001; Kryvi og Totland, 1995). I motsetning til hos mennesket finner man ikke Kupfferceller hos fisk og morfologien til hepatocytene kan variere fra art til art (Alpini et al., 1994; Kjær et al., 2009). Torskens hepatocytter er som man kan se i Figur 3.11 er ekstra store, sammenlignet med for eksempel laksen (Figur 6.7), da torskens hepatocytter inneholder store intracellulære fettdråper. Dersom en sammenligner histologien til leverprøven fra pilotforsøket med levervev (Figur 3.10) og PCLS (Figur 3.15), kan man se at det er større intracellulære fettdråper i PCLS enn i pilotforsøket.

Innstøpningen av PCLS i parafin var vanskeligere enn med levervesbiten fra pilotforsøket, da det var vanskeligere å få orientert de tynne PCLS i korrekt posisjon, noe som medførte at snittene lettere ble brettet og buktet. Morfologien er derfor ikke like godt bevart i PCLS sammenlignet med pilotforsøket. Grunnen til dette er antakelig fordi kuttingen av PCLS medførte ødeleggelse av cellemembranen og at strukturen muligens ble deformert. En kunne blant annet se at mye fett ség ut fra leverkjernen ved PCLS kuttingen og dette kan medføre at den intracellulære fettdråpen forlot cellen og at strukturen dermed kollapset. PCLS gjennomgikk også en eksponeringsprosess som kan påvirke oppbygningen og celledød i vevet. Student t-test viste derimot at det kun var en signifikant celledød i PCLS tilsatt 10 µM BNF etter 24 timer (Resultat 3.4.1). I tillegg til celledød ved eksponeringer er PCLS tynne og

cellestrukturen kan derfor påvirkes og det kan oppstå ødeleggelser ved håndtering, flytting mellom medium og de ulike prosesseringsstegene for innstøpning i parafin. Dette kan optimaliseres ved trening på håndtering av PCLS under innstøpningsprosessen.

Morfologien i vevssnittene fra PCLS (Figur 3.15) ble i denne oppgaven derfor ikke like godt bevart sammenlignet med bildene tatt under pilotforsøket (Figur 3.12 og Figur 3.13). En kan derimot se en tydelig uttrykning av *cyp1a* i hepatocytene også i vevsnittene fra PCLS (Figur 3.17). Leveren er svært fettrik, men dersom en sammenligner vevsprøvene hybridisert med antisense med vevsprøvene hybridisert med sense kan man observere en genspesifikk probehybridisering (Figur 3.12 og Figur 3.16).

I denne oppgaven var planen også å gjennomføre organ-«whole mount» ISH, men på grunn av tidsbegrensninger og at resultatene fra parafininnstøpningen var vellykkede, ble ikke organ-«whole mount» ISH av PCLS og vevsbiten fra pilotforsøket gjennomført.

4.1.4 utfordringer med overeksponering

Å treffe tidspunktet hvor en kan visualisere proben, uten at det oppstår overeksponering og bakgrunnsfarging er utfordrende. Dette gjorde at det måtte gjennomføres fire runder hvor flere av snittene i de innledende rundene ble overeksponert. Det er ulikt når de ulike vevene er klare for visualisering avhengig av tykkelse og type vev. Hvilken innstøpningsmetode som blir benyttet vil også innvirke på eksponeringstiden, da det blant annet tok lengre tid å visualisere snitt innstøpt i parafin. Snitt eksponert for BNF vil ha en økt induksjon av *cyp1a* og tiden før vevet blir overeksponert er derfor kortere for disse sammenlignet med kontrollgruppen. For å ha et godt sammenligningsgrunnlag må de eksponerte vevene og kontrollgruppen stå like lenge. Da det kun er plass til 15 objektglass i en kuvette, er det begrensninger på hvor mange replikater en kan kjøre parallelt. I et ISH oppsett er det flere steg med hurtige tidsintervaller mellom noen steg og jeg valgte derfor å ikke kjøre flere kuvetter samtidig. Siden det var uvisst hvor lang tid visualiseringen tok og at det var mange faktorer som spilte inn på resultatet medførte dette at noen snitt ble overeksponert. For fremgangsmåte for å motvirke overeksponering, se Vedlegg 6.2

4.2 Tilstedeværelse av *cyp1a* i PCLS

CYP1A kan man finne cellulært i flere organer, slik som i leveren, nyre, hjertet, tarmer og hjerne (Husøy et al., 1996). I ekstrahepatisk vev finnes CYP1A hovedsakelig i endotele celler, mens man i lever hovedsakelig finner CYP1A uttrykt i hepatocytter og endotele celler (Husøy et al., 1996; Husøy et al., 1994; Stegeman og Hahn, 1994). I alle ISH forsøkene med PCLS kan man observere en tydelig lokalisering av *cyp1a* i de endotele cellene som danner grunnlaget for galleganger eller blodårer og i hepatocytene, men ingen gentranskripter i hepatocyttenes intracellulære fettdråper i likhet med funn gjort ved IHC utført av Husøy et al. (1994) (Figur 3.12). Snittene viser også en tydelig forskjell mellom prøvene med sense og antisense og en kan i disse snittene se at det kun er en komplementær binding mellom antisense proben og transkriptene (Figur 3.9, Figur 3.12 og Figur 3.16).

4.2.1 Tilstedeværelse av *cyp1a* i fettfylte hepatocytter

Husøy et al. (1994) så at store, fettfylte hepatocytter har en lavere CYP1A induksjon enn de mindre cellene. Dersom en sammenligner vev fra pilotforsøket (Figur 3.12), som ikke var eksponert for giftstoffer, med kontrollen i PCLS (Figur 3.17) kan man se at fettdråpene er større i PCLS. Dette er naturlig i og med at fisk 2 var større og eldre enn fisk 1.

Det hadde vært interessant å sammenligne grunnuttrykkningen av *cyp1a* mellom fiskene av ulik størrelse, men da visualiseringen ble stoppet i henhold til når leverprøvene eksponert for 10 µM og 1 µM BNF var klare, fikk ikke kontrollen fra PCLS stått lenge nok til at en kunne visualisere *cyp1a* i disse vevsprøvene. Grunnuttrykkningen i kontrollen har derfor ikke kommet til syne og det er derfor ikke mulig å sammenligne *cyp1a* lokalisasjonen mellom fiskene av ulik størrelse som begge var eksponert for giftstoffer.

4.2.2 Lokalisering av *cyp1a* ved eksponering av PCLS for BNF

Dersom en sammenligner eksponerte PCLS kan en se en tydelig oppregulering av *cyp1a* for både PCLS som var eksponert for 1 µM og 10 µM, sammenlignet med kontrollen (Figur 3.17). Dersom en sammenligner de eksponerte vevsnittene med pilotforsøket kan man se at det i pilotforsøket (Figur 3.12) er en jevn uttrykning av *cyp1a* i hele vevet, både i hepatocytene og de endotele cellene som danner kapillærveggen i det som mest sannsynlig er en blodåre (Figur 3.13). I de ser man en uttrykning både i hepatocytene og de endotele cellene, men i de eksponerte PCLS kan man derimot og se en antydning til en økt visualisering av probene desto lengre unna blodårene hepatocytene er lokalisert (Figur 3.17c-f). Det er også mulig å observere

større områder med høyere transkriptnivå av *cyp1a* i vevsbitene eksponert for 10 μ M (Figur 3.17e og f).

4.2.3 qPCR for verifisering av *cyp1a* induksjon

In situ hybridisering er en kvalitativ og semikvantitativ prosess og selv om en kan se en økt uttrykning av mRNA transkript ved eksponering, er det behov for et annet verktøy for å kvantifisere den økte uttrykningen av *cyp1a*. Dette ble gjort med kvantitativ sanntid PCR (qRT-PCR, her kalt qPCR)

4.2.3.1 Referansegene ved qPCR

For å standardisere uttrykningen av målgenet og for å kunne sammenligne den eventuelt økte uttrykningen av transkriptet er det behov for et referansegen som er konstitutivt uttrykt i vevet og som har om lag samme kopiantall som genet man studerer (Bustin et al., 2009). I tillegg burde primerparet til referansegenet ha det samme, eller et høyere smeltepunkt enn primerparet til det ønskede målgenet.

De to referansegenene jeg benyttet var aktin relatert protein (*arp*) som bidrar i dannelsen av aktin i cytoskjelettet. Da ett referansegen i noen tilfeller kan la seg påvirke av eksponeringen er det viktig å benytte to ulike referansegen (Olsvik et al., 2007). Det andre referansegenet som ble valgt er ribosomalt protein 22 (*rlp22*). Det ble observert en eksponeringsindusert oppregulering av *arp*, noe som medførte at kun *rlp22* ble benyttet som referansegen i analysene av qPCR resultatene. Olsvik et al. (2008) så at *arp* ikke er det beste referansegenet for studier på lakselever, da denne kan bli påvirket ved eksponering, og at denne ikke nødvendigvis bør benyttes som en normaliseringsfaktor i toksikogenomiske studier av atlantehavslaks (Olsvik et al., 2007). På grunn av oppreguleringen ble det derfor kun benyttet ett referansegen i analysene av oppreguleringen av *cyp1a*.

Da SYBR Green ikke tar hensyn til om den binder seg til primerdimerer eller uspesifikke PCR-produkter ble det gjennomført en smeltekurveanalyse for å vurdere renheten til DNA-fragmentet dannet i qPCR reaksjonen. Denne viste at det var ikke var tilstedeværelse av andre primerdimerer eller uspesifikke PCR-produkter for både *cyp1a*, *rlp22* og *arp*.

4.2.3.2 *Bruk av standardkurve til å måle primerparenes effektivitet*

I denne oppgaven er det blitt benyttet en relativ standardkurve for å beregne effektiviteten til primerparene. Det ble ikke benyttet en absolutt standardkurve, da det kun var ønskelig å studere en relativ økning i uttrykkningen i forhold til kontrollprøvene og ikke en absolutt kvantifisering av antall transkripter tilstede.

Standardkurven for *cyp1a* viste at primerene hadde en effektivitet på 2,42, med en R^2 verdi på 0,89. På den andre siden var effektiviteten til *rlp22* primerparet kun 0,82 og R^2 verdien på 0,9. De lave kvadratverdiene av R forteller at standardavvikene mellom fortynningsrekken er større enn det de burde være da den kvadrerte verdien av R burde være tilnærmet lik 1. Denne qPCR reaksjonen viste videre en 17,8 folds induksjon av *cyp1a* i PCLS tilsatt 10 μ M BNF og en 0,69 folds økning for PCLS tilsatt 1 μ M BNF, beregnet ut fra Pfaffl metoden (Pfaffl, 2001). Denne viser at det er en tydelig oppregulering av *cyp1a* for PCLS som var eksponert for 10 μ M, sammenlignet med kontrollen (Resultat 3.5). Derimot dersom en ser på standardavvikene var denne på 15 for PCLS eksponert for 10 μ M og 0,13 for PCLS eksponert for 1 μ M.

Standardavviket mellom de ulike PCLS replikatenes ekspresjonsratio var store, selv om triplikatene fra samme PCLS hadde en C_q verdi som var tilnærmet lik for målinger gjort for målgenet *cyp1a* og referansegenet *rlp22*. Forsøket ble gjentatt og også denne gangen viste resultatene den samme tendensen. En kan derfor stille spørsmålstegn ved validiteten til disse målingene.

Det hadde vært ønskelig å repetere eksponeringsforsøket for å oppnå mer valide resultat, men på grunn av tidsbegrensninger var dette dessverre ikke mulig å gjennomføre. Resultatet viser derimot en induksjon av *cyp1a*, noe som korrelerer med kjent kunnskap om induksjon av *cyp1a* ved BNF eksponering.

4.2.4 **Ulike soner**

Ofte deles leveren inn i tre ulike soner avhengig av distansen fra blod- og næringstilførselen. Sone 1 får tilfredsstillende tilgang på blod fra både *v. portae hepatis* og *a. hepatica*, mens sone 3 ligger lengst unna tilførsel av både oksygen- og næringsrikt blod (Timbrell, 2000). Hepatocytene i sone 3 vil dermed motta blod som har mistet mye næringsstoffer og oksygen. Denne sonen er derfor spesielt sensitiv for toksiske forbindelser. Hepatocytene i sone 3 har derimot hos pattedyr et høyere nivå av CYP og NADPH reductaser og lipidsyntese (Timbrell, 2000). En heterogene distribusjonen er mulig å observere i vinterflyndre (*Pseudopleuronectes*

americanus) (Smolowitz et al., 1989). Sonedeling er det også antydning til å i Figur 3.17 c og d hvor en ser en sterkere innfarging av *cyp1a* i celler desto lengre unna blodåren en kommer, noe som kan tyde på en høyere induksjon i disse områdene. På grunn av den høyere metabolismen og lavere nivåer av oksygen og næringsstoffer er sone 3 er oftere utsatt for skader, fettvevdegenerering og lipidakkumulering, steatosis. Sone 1 har høyere nivå av oksygenrikt blod hvor det er lettere å bryte ned fett ved β -oksidasjon. Her finnes høyere mengder av glutathion, glutathion peroksidaser og alkohol dehydrogenaser (Timbrell, 2000). I pilotforsøket var fordelingen av *cyp1a* jevn, men ved eksponerte PCLS er det en antydning til en differensiering og en reduksjon i *cyp1a* transkript desto nærmere blodårene hepatocytene befinner seg. Dette kommer tydeligst frem i vevsprøven som er eksponert for 1 μ M BNF (Figur 3.17d), men på grunn av manglende replikater kan ikke dette sies for sikkert. Denne hypotesen hadde derimot vært interessant å testet ut videre.

4.2.5 *Cyp1a* lokalisering i PCLS ved eksponering for BNF

Ved eksponering er det tydelig samlinger i enkelte områder av PCLS (Figur 3.17) hvor det er en antydning til at det er økt induksjon i spesifikke områder, spesielt i nærheten av kantene og svært lite i midten av PCLS. Dette kan komme av ulike grunner. Det kan være at BNF ikke har klart å trenge inn i vevet og eksponere hepatocytene i midten av PCLS, og at sone 3 områdene i disse snittene lå i nærheten av kantene. En annen mulighet er at visualiseringen skjedde fortere langs kanten av vevsbiten og at den ble stoppet for tidlig i forhold til probene i midten. Et tredje alternativ er at proben eller de andre reaksjonselementene ikke har festet seg til mRNAet i midten av PCLS. Dette kan medføre at en ikke vil få visualisert mRNAet som eventuelt er til stede.

4.3 Forskjeller i uttrykning av *cyp1a* mellom laks og torsk

Responsen en organisme får ved eksponering for et giftstoff er ulik både mellom dyrearter og mellom forskjellige fiskearter (Beyer et al., 1996; Ellesat et al., 2011; Henry et al., 2004). En arts ømfintlighet overfor et giftstoff er avhengig av giftstoffets karakter og organismens måte å håndtere fremmedstoffet på, artens habitat, matvalg, ernæringsstatus og fysiologi (Ellesat et al., 2011). Ellesat et al. (2011) så blant annet at det er ulik sensitivitet for kobber og statin eksponering hos ulike marine fiskearter, og at hepatocytene hos rødspette og gapeflyndre er mer ømfintlig til stoffene som ble testet sammenlignet med torskens hepatocytter. En forklaringsmodell for dette er at giftakkumuleringen og artenes forsvarsmekanismer er ulik (Henry et al., 2004). Sedimentassosierte giftstoffer vil gi en økt eksponering for fisk som lever

i eller ved sedimentene. Bentiske arter, slik som flatfisken piggvar (*Scophthalmus maximus*), kan bli eksponert enten direkte fra sedimentene eller gjennom kosten (Ellesat et al., 2011; Goksøyr et al., 1991b; Myers et al., 2003a), mens pelagiske fisker ikke vil bli eksponert i like stor grad fra sedimentene.

Artens respons er også avhengig av størrelsen på hepatocytterne og lipidinnholdet i disse. Flere studier har vist at torskens hepatocytter er relativt sett mindre responsive til giftstoffer sammenlignet med andre arter ved eksponering for kjente CYP1A indukere (Beyer et al., 1996; Hektoen et al., 1994; Husøy et al., 1996). Torskens økte hepatocyttevolum varierer avhengig av ernæringsstatus og mengde intracellulært lagrede lipider og det høye lipidinnholdet kan bidra til en økt toleranse for miljøgifter hos atlantehavstorsk, da torsk med et høyt lipidinnhold ser ut til å være mindre responsive til giftstoffer (Husøy et al., 1996; Kjær et al., 2009; Søfteland et al., 2010). En ser også individuelle forskjeller mellom ulike kjønn i uttrykkningen av CYP1A, hvor modne hunner har en lavere uttrykning enn hanner, spesielt i de senere reproduktive stadiene (Goksøyr, 1995). Husøy et al. (1996) så, gjennom immunohistokjemiske undersøkelser, at også hunntorsken fikk en sterk CYP1A induksjon i hepatocytterne i forurensede områder, sammenlignet med fisk fra referanseområder.

I fisk er uttrykkningen av CYP1A vanligvis høyest i leveren og hovedsakelig lokalisert i hepatocytterne (Goksøyr et al., 1991a; Goksøyr et al., 1987a; Goksøyr og Husøy, 1998; Husøy et al., 1994; Olsvik et al., 2007). En høy uttrykning i leverens hepatocytter kan man observere i leverprøvene fra torsk i denne oppgaven. Dersom man sammenligner hepatocytterne hos laks (Figur 6.7) med hepatocytter hos torsk (Figur 3.13) kan man se at laks ikke har store intracellulære fettdråper, slik man finner hos torsk, men at *cyp1a* er lokalisert i begge artenes cytosoliske områder der en ikke finner fettdråper.

Selv om et lignende ISH forsøk er gjort på laks (Olsvik et al., 2007) er det viktig å studere uttrykkningen i torsk, da artene har ulik morfologi og potensielt ulike responsmønstre. Laksen har i utgangspunktet et lavere fettinnhold i leveren sammenlignet med torsken da laksen hovedsakelig lagrer fett muskulært eller rundt de indre organene (NIFES, 2015). I tillegg ble laksen sultet i 24 timer før forsøket (Olsvik et al., 2007), noe som kan ha medført et enda lavere fettnivå i hepatocytterne i laksen enn det en kan se hos torsk (Figur 3.17 & Figur 6.7).

For laks kan en tydelig se en bakgrunnsuttrykning av *cyp1a* i kontrollen (Figur 6.7B) og ikke så stor forskjell i *cyp1a* transkript mengde mellom den levervevet som er eksponert for 50 mg BNF/kg kroppsvekt sammenlignet med kontrollen. Derimot så man en tydeligere forskjell hos torsk i forsøkene utført i denne oppgaven. Dersom kontrollen hadde stått til visualisering lengre

kan det godt hende vi også hos torsk hadde sett en mer uniform uttrykning av *cyp1a* i lever. I bildene publisert i Olsvik et al. (2007) (Figur 6.7) av *cyp1a* lokalisering i lakselever er det ikke mulig å se en soneinndeling i uttrykkningen av *cyp1a* i forhold til blodårene, slik prøvene i denne oppgaven antyder. Det er mulig at man også finner en lignende soneinndeling hos laks, men at dette ikke kommer frem i forskningsartikkelen og de publiserte bildene.

I motsetning til hos laks er cellekjernene i ISH forsøket på torsk ikke farget og det er derfor vanskelig å differensiere mellom de ulike cellene og celletypene.

4.4 Oppgavens relevans for videre forskning

4.4.1 En nordligere kystindustri

Utslipp av ulike kjemikalier og avfallsprodukter fra olje- og kystnære industrier kan være en helsetrussel for organismer i havet (Murchelano, 1990). Kysttorsk er svært stasjonær og slik lett påvirkelig av både industriell og urban forurensning og det oppstår derfor en konflikt mellom kyst- og oljeindustrien sine interesser og de akvatiske organismenes helse. Det er derfor essensielt med kunnskap om de ulike miljøgiftenes effekter på ulike arter og økosystemer. Det er samtidig viktig å øke kunnskapen og utvikle metoder slik at en kan få en økt forståelse og mulighet til å predikere effekten og endringene miljøgifter kan påføre fisker og andre sårbare arter.

I 1994 ble atlantehavstorsken karakterisert som en truet og sårbar dyreart og den ble derfor satt på International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN) sin rødliste (Sobel, 1996). Med miljøforandringer og overutnyttelse har atlantehavstorsken de siste årene blitt ytterligere utfordret (Johansen, S. D. et al., 2009). I tillegg møter man utfordringer knyttet til økt bruk av antibiotika, nye sykdommer og medisiner fra oppdrettsanlegg. Rømming av fisk og spredning av torskerogn fra oppdrettsanlegg har tidligere vært et stort problem, noe som kan ha medført økt spredning av sykdommer og utvanning av villfiskens genetisk materiale. I tillegg påvirker menneskelig aktivitet på land og offshore torskebestanden ved at torskens habitat blir invadert og utslipp fra ulike aktiviteter kan føre til at torskebestanden blir ytterligere påvirket ved at kjemikalier kan ha en innvirkning på torskens vekst, reproduksjon og helse (Aas et al., 2000; Meier et al., 2010; Sundt og Björkblom, 2011; Yadetie et al., 2013). Derimot ser man også at bestandene av skrei har økt betraktelig de siste årene, i motsetning til kysttorsk,

noe som kan skyldes en bedre forvaltning og regulering av skreipopulasjonen (Durant et al., 2008; Johansen, T. et al., 2013).

Et økende antall miljøgifter i polare og arktiske strøk medfører et økt behov for å karakterisere effektene av ulike miljøgifter på ulike akvatiske arter, hvor torsken ofte blir benyttet som en modellorganisme. Kjemikalier i biotaen kan også påvirke toksisiteten til andre giftstoffene og det er derfor nødvendig å studere effektene av både nye og kjente giftstoffer kan ha enkeltvis og i blandinger.

4.4.2 Bruk av PCLS

PCLS er et nyttig *in vitro* system for å studere effektene av kjemikalier på levervev ved at den romlige strukturen blir opprettholdt. Som en kunne se i Figur 3.12 var grunnivået jevnt fordelt i pilotforsøket, men ved eksponering virket det som det var høyere nivåer i visse områder, spesielt i periferien av blodårene. Dette kan påvirke resultatet ved bruk av PCLS forsøk da forskningsmetoden potensielt kan gi ulike data avhengig om det for eksempel er flere områder med blodårer i leverskivene. Hvilket område en velger å ta ut vevsprøver fra leveren viste seg at hadde en betydning ved eksponering for BNF på atlantehavslaks, med en økt induksjon i nærheten av den hepatiske portåren (Olsvik et al., 2007). Dette kan også være tilfelle for atlantehavstorsk og inntil kunnskapen om dette er blitt etablert er det viktig å ta vevskjerner fra et representativt område og alltid velge det samme området ved sammenligning mellom individer. Dette er fordi det kan være ulikheter i induksjon av for eksempel CYP-enzymet avhengig av hvilken av leverens tre fliker en velger, nærhet til den hepatiske portåren og tilstedeværelse av blodårer.

PCLS en invasiv metode, men i motsetning til *in vivo* forsøk, kan en redusere antall forsøksdyr drastisk da en fisk kan benyttes til å kjøre flere paralleller og ulike eksponeringer hvor en kan studere responser av ulike molekyler på ulike biologiske nivåer (transkriptom, proteom, metabolom). Ved hjelp av en fisk kan en studere ulike målgener ved ulike konsentrasjoner av giftstoffer, ulike typer giftstoffer eller blandinger av disse (Eide, 2016). Dette gir et godt sammenligningsgrunnlag, da en kan velge å se bort fra individuelle responsforskjeller mot de ulike giftstoffene. I tillegg er det mulig å kjøre biologiske paralleller og slik studere individsforskjeller i responsen på de ulike giftstoffene.

4.5 Videreutvikling av ISH på torskelever

I dette forsøket er det gjort noen interessante funn og jeg har i denne oppgaven begynt å etablere en metode for bruk av ISH på PCLS og torskelever. Det gjenstår likevel en vei å gå for å verifisere mine funn og ISH prosedyren som er utviklet i denne masteroppgaven.

4.5.1 Få forsøksdyr

Individer fra samme art kan respondere ulikt til giftstoffer og det er derfor viktig å benytte biologiske replikater for å undersøke artens og ikke kun individets respons på giftstoffet. Dette er det i liten grad gjort i denne oppgaven på grunn av tidsbegrensning. Det er kun to fisk, en for pilotforsøket og en i eksponeringsforsøket, som er undersøkt og ingen biologiske replikater ble inkludert for eksponeringsforsøket.

Ved å benytte PCLS er det derimot benyttet tekniske replikater og triplikater i qPCR målingene, som består av to og to sammenslåtte PCLS. Det er dermed totalt 6 tekniske replikater i eksponeringen for de tre ulike konsentrasjonene. I *in-situ* forsøk er det hensiktsmessig å analysere de ulike vevsbitene samtidig for å få et godt sammenligningsgrunnlag. Dersom jeg ikke hadde hatt tidsbegrensninger ville det vært ønskelig å kjørt flere biologiske replikater for å øke validitetene til funnene mine og utelukke individforskjeller og metodologiske intra- og intervariasjoner.

4.5.2 Cytotoksisitet

Det er avgjørende at cellene er levedyktige gjennom forsøket og det ble derfor gjennomført en laktatdehydrogenase (LDH) måling, siden LDH frigjøres til mediumet fra døde celler (Figur 3.14). Det burde også vært gjennomført et forsøk som måler den metabolske aktiviteten til cellene. Det var originalt planlagt å gjennomføre en 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT)-måling, som er en kolometrisk måling av aktiviteten til NADPH-avhengig cellulær oksidoreduktase enzymer som er lokalisert i cellens mitochondria (Berridge og Tan, 1993). Disse reduserer MTT til det lilla, uløselige stoffet formazan. Mengden formazan kan så måles kolometrisk i en plateleser. Denne eller en annen viabilitetsmåling hadde vært interessant å benyttet under eksponeringen for å se i hvor stor grad cellene er levedyktige gjennom eksponeringsforsøkene.

4.5.3 Ulik *cyp1a* uttrykning i ulike regioner av leveren

Hos atlanterhavslaks er det vist ulik uttrykning av *cyp1a* i de ulike lobulene og induksjonen av *cyp1a* ser ut til å være avhengig av nærheten til portåren ved eksponering for BNF (Olsvik et al., 2007). Siden jeg hadde behov for mange PCLS (n=57) førte dette til at leverkjerner ble tatt fra ulike områder av leveren. Uttak av vev skjedde med ulik nærhet til portåren og dette kan muligens påvirke resultatet og mengde *cyp1a* som ble indusert ved BNF.

Grunnivået er relativt lavt hos laks som ikke er eksponert, men de BNF-eksponerte individene har en høyere uttrykning i de midtre partiene i leveren i forhold til de proksimale og distale regionene (Olsvik et al., 2007). Det ble derfor tatt ut vev fra både den distale og proksimale delen av leveren i torsk, i forhold til den hepatiske portåren i pilotforsøket, men på grunn av tidsbegrensninger ble dette ikke sett nærmere på i denne oppgaven. Det hadde derimot vært spennende å sett nærmere på om dette også er tilfelle ved torsk, da dette kan ha påvirkning på hvor en velger å ta vevsprøver fra torsk ved *in vivo* forsøk og hvor en tar ut leverkjerner ved PCLS analyser på torskelever. Det er viktig med kunnskap om ulik basaluttrykning og uttrykning ved eksponering da dette kan påvirke resultatene og reproduserbarheten til forsøket.

4.5.4 Optimalisering av parafinnstøpning

De parafinnstøpte PCLS brettet og buktet seg og morfologien ble derfor ikke like god som ønsket. Innstøpningen i parafin ble gjort en gang av Anne Nyhaug (MIC) som ikke er vant til å jobbe med PCLS. Jeg fikk ikke observert da innstøpningen skjedde, men jeg antar at det er mulig å unngå at PCLS brettet og buktet seg ved en optimalisering av innstøpningen.

4.5.5 Ulik vekt på PCLS til qPCR

Det var ulik vekt på de ulike PCLS ($10,4 \pm 3,4$ mg våtvekt, n = 18). Grunnen til det store standardavviket kan ha flere ulike årsaker. Utskjæringsverktøyet kan ha blitt brukt på ulike måter, slik at diameteren på de ulike leverkjernene varierte og det kan hende Vibratome line VT1200 (Leica) ikke kuttet med lik tykkelse for alle vevene. Leverkjernen var og litt topptung, noe som medførte at denne bøyde seg og beveget seg ved kutting, noe som kan ha medført at det var ulik flate som ble kuttet hver gang. Noen leverceller delte seg også ved kutting og alle ble ikke alltid like sirkulære. Ved kutting var det og en del fett som seg ut fra kjernen. Dette er fettdråper fra cellene og minsket fett i levercellen kan gi en lavere vekt på PCLS.

Et forslag til senere studier er å støpe cellekjernen inn i agarosegel eller ett annet medium som holder kjernen mer på plass. Det er avgjørende at innstøpningsmiddelet ikke vil påvirke eksponeringen og at denne kan fjernes uten å påvirke resultatene.

4.6 Forslag til videre studier

4.6.1 Studie av andre målgener

Etablering av ISH på PCLS er ett nyttig verkøy for å validere distribusjonen av genekspressjon, inkludert genekspressjon som induseres etter eksponering for ulike stoffer. Med ISH kan en da studere distribusjonen ved induksjonen av målgener, om disse er homogent eller heterogent distribuert i levervevet. Dette kan gi verdifull informasjon og kunnskap om ulike responser avhengig av området PCLS blir tatt ut fra. Det er derfor viktig å innhente denne kunnskapen, slik at en i valg av uttaksområdet for PCLS får PCLS som vil reagere någenlunde likt. Dette kan løses ved å studere den cellulære lokalisasjonen av de ulike målgenene ved å benytte ISH. I motsetning til IHC trenger man her ikke kjente antistoff, noe som vil forenkle prosessen med å studere den cellulære lokaliseringen av målgener, men også transkripsjonsfaktorene selv, slik som AhR og ARNT.

4.6.2 Andre vev

Jeg har her i hovedsak sett på den cellulære uttrykkingen av *cyp1a* i torskelever. Selv om grunnivået av *cyp1a* er svært lavt i gjeller og hodenyre, vil også enzymet induseres her ved eksponering for BNF (Olsvik et al., 2007). I uttestingen av proben observerte jeg at det var markant ulik grunnuttrykning av *cyp1a* i atriumet og ventrikkelen (Figur 3.9B), hvor det var en høyere genuttrykning i atriumet (Figur 3.9D) enn i ventrikkelen (Figur 3.9C). Dette hadde vært interessant å sett nærmere på. Det hadde også vært interessant å sett hvordan en eksponering for giftstoffer vil påvirke induseringen av *cyp1a* i hjertet. For sebrafisk vil en eksponering for 10 ng TCDD/g fisk gi en markant økning av *cyp1a*, mens den gir en sterk økning i lever (Zodrow et al., 2004).

4.6.3 Sammenligne fettinnhold, alder og respons til giftstoffer

Alder, fettinnholdet i ernæringen til fisken og fettinnholdet i leveren kan medføre ulik respons på giftstoffer. De større, fettfylte cellene vil ha en lavere overflate-volum ratio enn mindre celler, noe som vil føre til et lavere opptak av giftstoffer (Echeveste et al., 2010). Det var dessverre ikke mulig å sammenligne grunnuttrykkingen i pilotforsøket og kontrollen fra PCLS, da disse ikke sto lenge nok ved ISH visualiseringen.

Et økt antall fettdråper kan påvirke toksisiteten til giftstoffene og Geyer et al. (1993) så en negativ korrelasjon mellom fettinnholdet og ømfintlighet mot γ -heksaklorosykloheksan hos 14 fiskearter. Da mange giftstoffer er lipofile vil hepatocyttenes fettdråper kunne absorbere disse

giftstoffene og lagre disse. Dette kan dermed føre til en lavere toksisk respons da fettdråpene skjuler disse lipofile stoffene fra reseptorsystemene i cellene. En annen mulighet er at hepatocytter omgitt av fett vil ha en høyere kapasitet til å vedlikeholde den cellulære metabolismen og detoksifiseringen, da de har et høyt energi reservoar (Kjær et al., 2009; Sheridan, 1988). Det hadde derfor vært interessant å sammenligne responsen til giftstoff hos individer med ulike aldre og fettinnhold, som er eksponert for ulike giftstoffer.

Dette er viktig å se nærmere på, da alder og fettinnhold muligens kan påvirke forsøksresultatene. Dersom dette gir ulik respons kan det være avgjørende hvordan man legger opp forsøkene for å øke validiteten og sammenligningsgrunnlaget til forsøkene. Forsøkene må i så fall gjøres på samme tid, med fisk av lik størrelse og med lik fettprosent.

4.6.4 Studie av hele PCLS

Det er også mulig å benytte organ-«whole mount» til å studere den cellulære lokalisasjonen i PCLS. «Whole mount» benyttes vanligvis på hele individer eller tykkere prøvemateriale. Da vi ved start var usikre på om kryopresservering ville fungere valgte vi å også ta ut vev til organ-«whole mount». Da PCLS er 250 µm tykke vil de være litt for tykke til å være transparente, men kan gi et interessant bilde av genuttrykkningen i PCLS. Ulempen med tykkelsen er at hepatocytter vil ligge oppå hverandre og det kan derfor være vanskeligere å tolke resultatet. Da parafininnstøpning fungerte godt, og på grunn av tidsbegrensninger, ble ikke organ-«whole mount» prioritert. Det hadde derimot også vært interessant å sett hvordan den cellulære uttrykkningen i PCLS hadde vært ved å benytte «whole mount»-metoden, da denne kan gi et interessant blikk på uttrykkningen av *cyp1a* i PCLS.

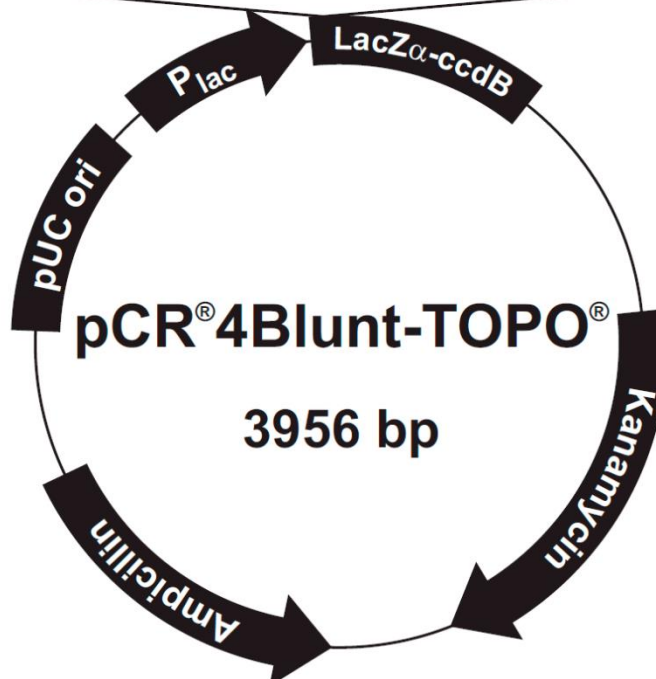
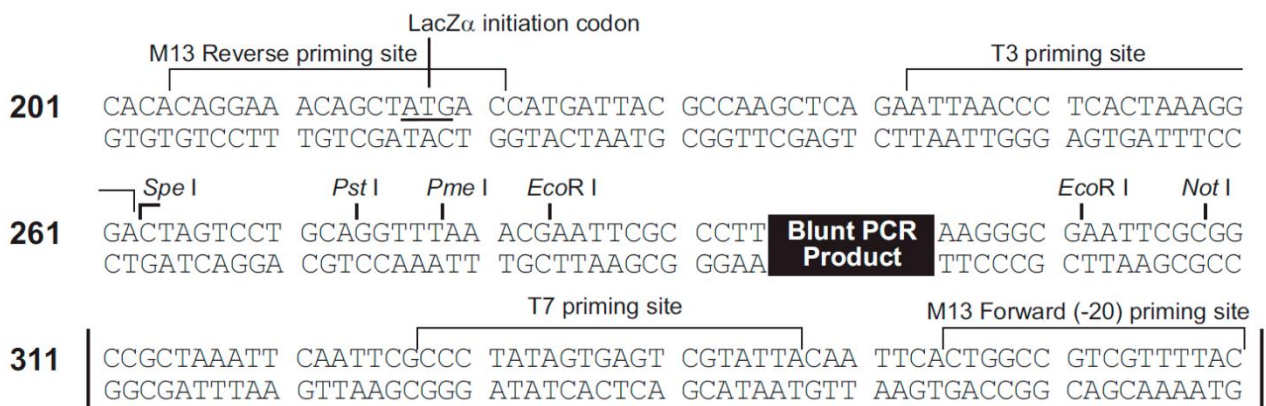
KONKLUSJON

I denne oppgaven er det blitt utviklet en metode for å studere den cellulære lokaliseringen av *cyp1a* i PCLS ved å benytte *in situ* hybridisering. Ulike strategier for preparering av levervevet ble forsøkt, og ved kryosnitning forflyttet levervevet seg, noe som mest sannsynlig er på grunn av leverens høye fettinnhold og dermed lave frysepunkt. Cellens morfologi og vevets integritet ble dermed ikke tilstrekkelig bevart slik at det var mulig å gjøre histologiske undersøkelser. Videre arbeid i oppgaven viste at ved å støpe leveren inn i ett hydrofobt medium, ble derimot cellenes morfologi godt bevart i snitteprosessen. ISH analyser av *cyp1a* på PCLS viste en antydning til at grunnuttrykket av transkriptet er uniformt distribuert, primært i hepatocytene. Ved eksponering for AhR agonisten BNF oppstår det en induksjon av *cyp1a* og en heterogen distribuering av *cyp1a* i hepatocytene og vaskulære endotele celler. Induksjonen av *cyp1a* ble samtidig målt med kvantitativ sanntids PCR (qPCR), men på grunn av svært store standardavvik er ikke disse resultatene valide, og det er derfor nødvendig å verifisere dette på nytt.

In situ hybridisering kombinert med andre histologiske analyser er en god metode for å studere tilstedeværelse av transkripter, cellulær lokalisasjon og induksjon av spesifikke gener. Det er viktig å validere kvantitative analysemetoder, slik som qPCR med histologiske undersøkelser og etablering av ISH på PCLS vil i så måte kunne være et nyttig verktøy i videre arbeid med dette systemet for å studere effekter av ulike forbindelser og miljøgifter på torskelever.

6.1 Oppbygging av vektor

Vektoren som ble brukt i kloningen av *cyp1a* og β -aktin er illustrert i Figur 6.1.



Figur 6.1: Oppbygging av kloningsvektor for kloning av *cyp1a* og β -aktin

Kilde: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/life-sciences/Cloning/Images/1113/pcr-4-blunt-topo.jpg>

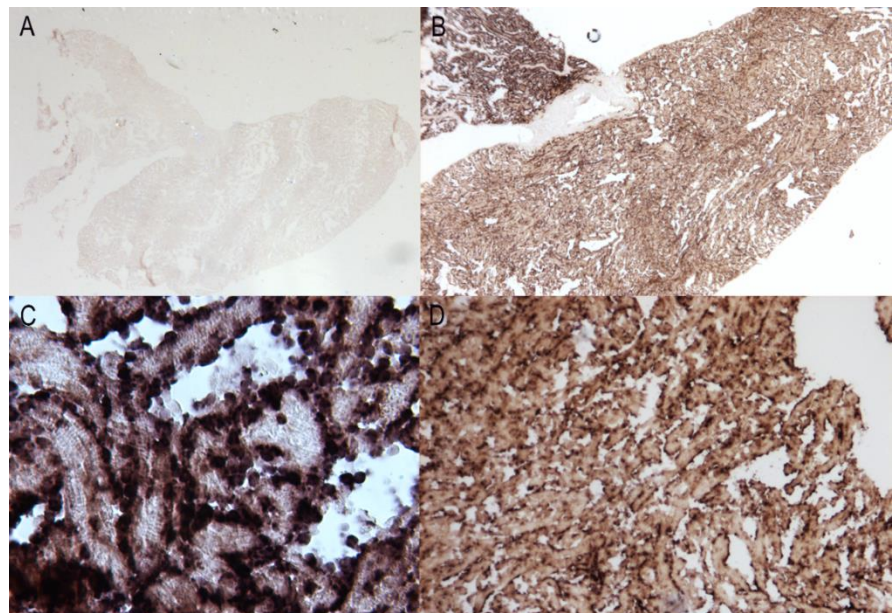
6.2 Utvikling av ISH på vev fra torsk

Å utvikle ISH på nye vev og med proben som hybridiseres med transkripter krever en del prøving og feiling, da tiden det tar å visualisere og reaksjonstiden er vevavhengig og avhengig av mengden transkripter i det spesifikke vevet. BCIP-NBT reaksjoner er relativt trege, slik at dersom visualiseringen bruker for lang tid vil intermediatet indoksyleres og diffunderer inn i mediumet og bidra til bakgrunnsfarging. Dette vanskeliggjør lokaliseringen av hybridiseringslokaliteten og reduserer hybridiseringssignalet (Van Noorden og Jonges, 1987).

Det ble totalt kjørt fire ulike runder med ulike slides. Den første runden ble det kjørt ISH på kryosnittet vev fra hjerte med probe som bandt *cyp1a* og β -aktin (Vedlegg 6.2.1 og 6.2.2). Runde nummer to ble benyttet til å kjøre ISH på kryosnittet levervev med prober mot som merket *cyp1a* og β -aktin (Vedlegg 6.2.3). Den tredje runden ble benyttet til å gjenta hybridisering med *cyp1a* på hjerte (Figur 3.9), kryosnittede PCLS fra eksponert (10 μ M BNF) og kontrollgruppen (Figur 6.6) og parafininnstøpt levervev (Figur 3.12). I den fjerde og siste runden var metoden for ISH på torsklever utviklet, slik at det ble kjørt ISH på eksponerte PCLS for cellulær lokalisering av *cyp1a* både på skiver eksponert for 10 og 1 μ M BNF og kontroll.

6.2.1 Cellulær lokalisasjon av *cyp1a* i hjertet

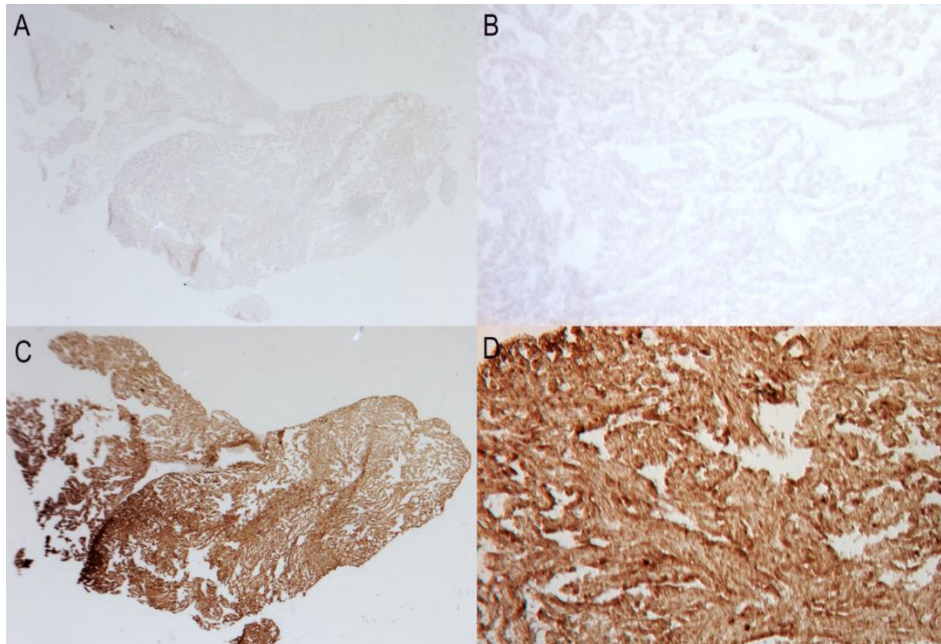
På grunn av forhold ved laboratoriet og at det tok lengre tid å visualisere probene til *cyp1a* og β -aktin uttrykt i hjertevevet enn ventet, ble de første prøvene stående i kjøleskap i 36 timer. Dette førte dessverre til en overeksponering av snittene hybridisert med både *cyp1a* og β -aktin og høy bakgrunnsfarging (Figur 6.2 og Figur 6.3). En ser i likhet med Figur 3.9 at det er en ulik uttrykning mellom de to ulike kamrene hvor det er en klart høyere uttrykning av *cyp1a* i atriumet sammenlignet med ventrikkelen for hjertevevet hybridisert med *cyp1a*.



Figur 6.2: Cellulær lokalisasjon av *cyp1a* i hjertevev. Figur A viser 7X forstørrelse av snitt fra hjertet hybridisert med senseprobe av *cyp1a*. B viser en 20X forstørrelse og figur C og D viser en 42X forstørrelse av snitt fra hjertet hybridisert med antisenseprobe av *cyp1a*. Bildene er tatt med mikroskopet DMLB (Leica) og CoolSNAP-Pro Color (Media Cybernetics™)

6.2.2 Cellulær lokalisasjon av β -aktin i hjertet

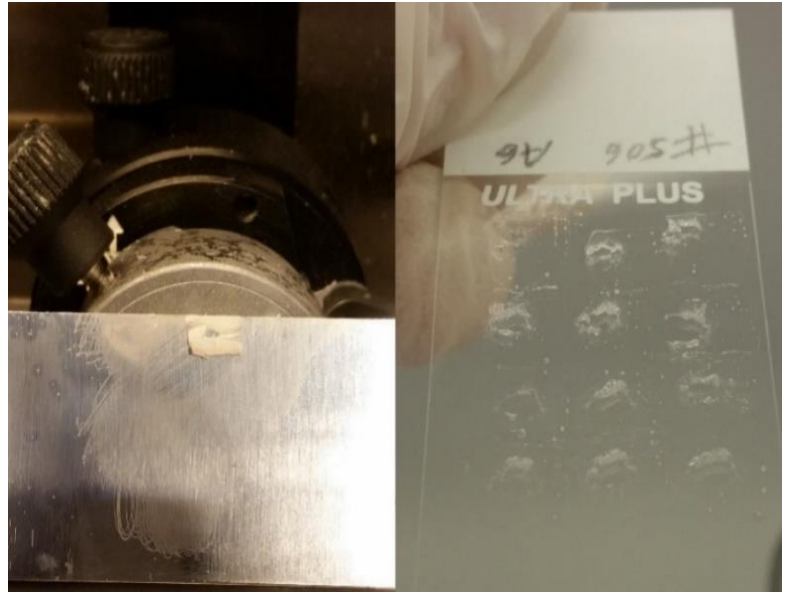
Både proben for *cyp1a* og β -aktin ble testet på hjertevevet. Den cellulære lokalisasjonen av β -aktin i hjertet er uniform i hele leveren (Figur 6.3). En ser her at det også er lik uttrykning mellom de to ulike kamrene og at også dette vevet ble overeksponert.



Figur 6.3: **Cellulær lokalisasjon av β -aktin i hjertet.** Figur A viser 7X forstørring og figur B viser en 42X forstørring av snitt fra hjertet hybridisert med senseprobe av β -aktin. Figur C viser en 7X forstørring og figur D viser en 20X forstørring av snitt fra hjertet hybridisert med antisenseprobe av β -aktin. Bildene er tatt med mikroskopet DMLB (Leica) og CoolSNAP-Pro Color (Media Cybernetics™)

6.2.3 Cellulær lokalisasjon av β -aktin og *cyp1a* i lever

Den andre runden det ble kjørt ISH ble det benyttet leverprøver som var støpt inn i OCT. På grunn av leverens høye fettinnhold og dermed lavere frysepunkt var vevet fremdeles svært bevegelig ved temperaturene benyttet under snittingen. Dette førte til forflytting av vevet ved fronten av kniven, noe som resulterte i en oppsamling av vevet i OCT-kanten (Figur 6.4).

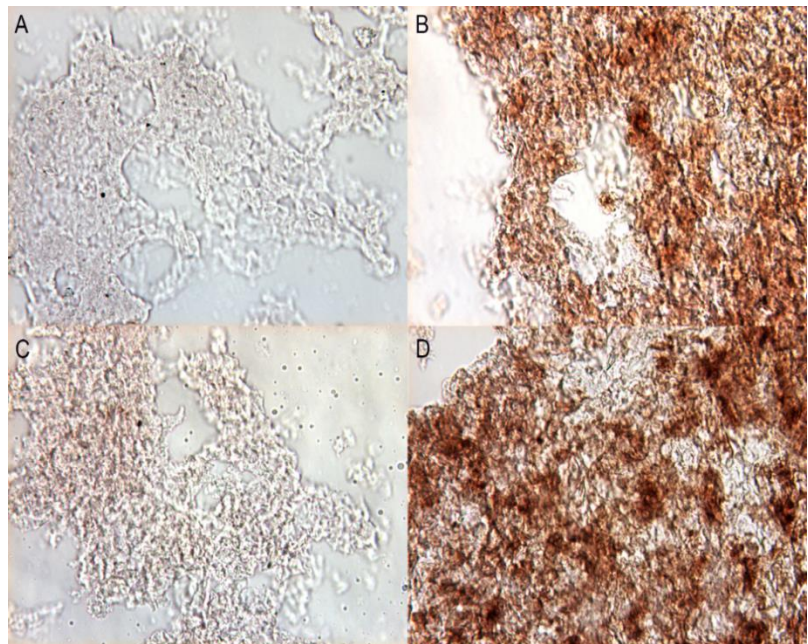


Figur 6.4: *Forskyvning av leverceller ved kutting i på kryostatten CM3050 S (Leica). Figur A) viser hvordan OCTen og levervevet så ut etter ved kuttinger og hullrommet som ble dannet der vevet opprinnelig skulle vært. Figur B) viser hvordan vevet er presset sammen på objektglasset.*

På grunn av denne bevegelsen var det ikke mulig å studere morfologien og den cellulære lokaliseringen av *cyp1a* og β -aktin i levercellene ved ISH (Figur 6.5).

Det var derimot tydelig å se forskjell mellom sense og antisense-snittene og at proben bandt seg til mRNA transkripter til β -aktin og *cyp1a* i vev fra lever.

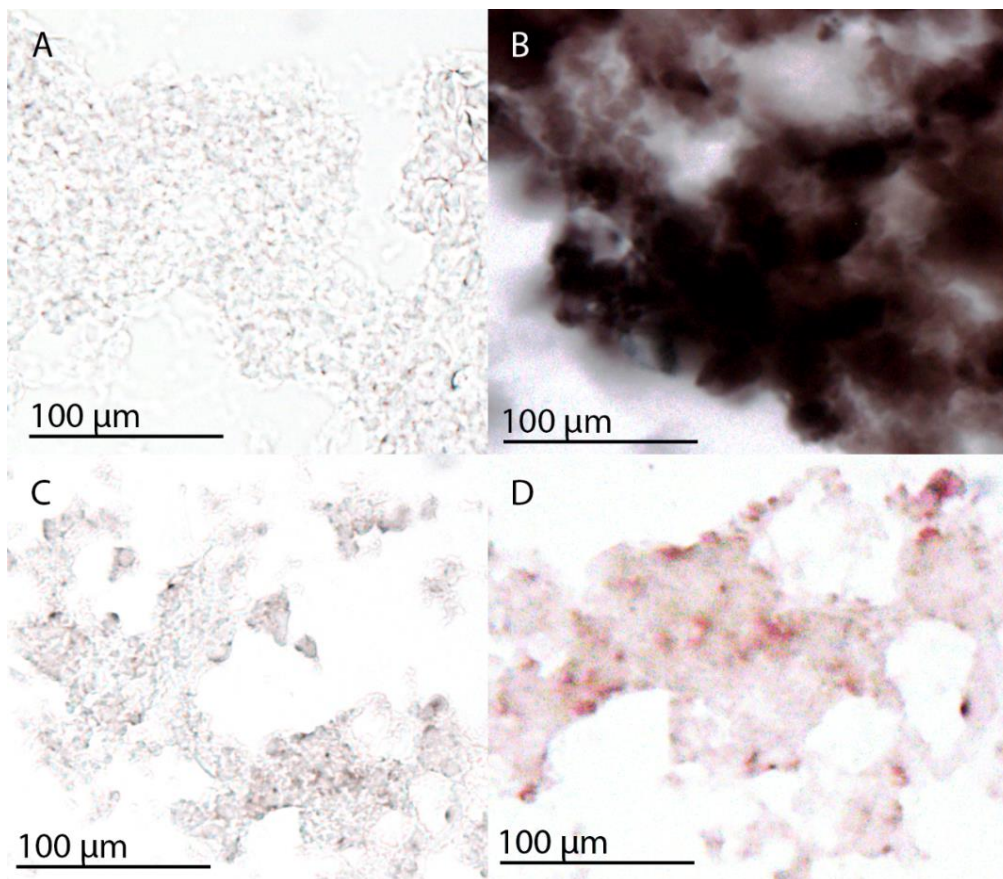
En kan og i disse forsøkene se en liten overeksponering og bakgrunnsfarging på både sense og antisense-snittene, noe som indikerer at de er inkubert noe lenge under fremkallingen.



Figur 6.5: *ISH på levervev merket med β -aktin (B) og *cyp1a* (D). A) S β -aktin, B) AS – β -aktin, C) sense *cyp1a* og D) antisense *cyp1a*.*

6.2.4 Cellulær lokalisasjon av *cyp1a* i PCLS eksponert for 10 μ M BNF

Da PCLS kun er 250 μ m tykke var det en mulighet for at OCTen ville penetrere bedre inn i PCLS og slik motvirke bevegelse av leversnitte og gi bedre snitt ved kryosnitting. Ett annet optimaliseringsforsøk var å la leverskivene stå i 10 % OCT (Tabell 6.4) over natten, men også i dette forsøket ble cellene presset sammen, noe som medførte vanskeligheter med å gjøre morfologiske undersøkelser (Figur 6.6). Det er derimot tydelig å se en klar økt induksjon av *cyp1a* i vevet eksponert for 10 μ M BNF (Figur 6.6B) og en tydelig forskjell mellom vevsprøvene tilsatt senseprobe (Figur 6.6A og C) og vevsprøvene som har hybridisert komplementært med antisenseproben (Figur 6.6B og D). Den eksponerte vevsprøven ble derimot også dessverre tydelig overeksponert.



Figur 6.6: *In situ* hybridisering på kryopreserverte PCLS. Delfigur A og B er PCLS eksponert for 10 μ M BNF, mens delfigur C og D er kontrollen. Delfigur B og C er hybridisert med *cyp1a* antisenseprobe, mens A og C viser probekontrollen (sense).

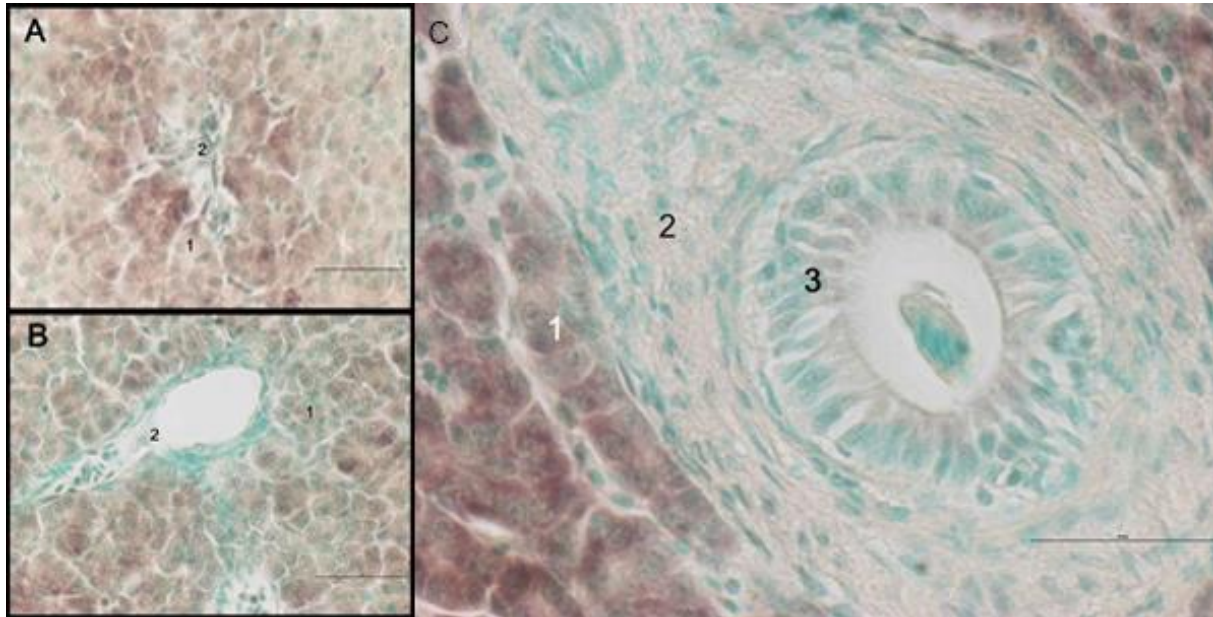
6.2.5 Forberedelse for «whole mount»

Det ble også forberedt vev til å gjøre organ-«whole mount» på vevsbiter fra pilotforsøket og PCLS fra eksponeringsforsøket. Etter fiksering ble vevsprøvene vasket i 0,1 M Sørensen (Tabell 6.2, s. 88) i 30 minutter for å fjerne rester av fikseringsmiddelet PF. Vevsbitene ble så dehydrert i 50 %, 70 % og 90 % etanol i 30 minutter for hvert dehydreringssteg og tilslutt dehydrert i 100 % etanol i 15 minutter før prøvene ble overført til 100 % metanol i 30 minutter. Prøvene ble så lagret i 100 % metanol ved – 20 °C.

Vevsbiten til pilotforsøket ble tatt fra levervev som originalt var tiltenkt «whole mount» og som lå lagret i 100 % metanol ved -20 °C. Leverbiten ble rehydrert med 90% og 70% etanol i 30 minutter for hvert rehydreringssteg, før det ble tatt med opp til MIC.

6.3 Cellulær lokalisering av *cyp1a* hos atlantehavslaks

Olsvik et al. (2007) har gjort en lignende cellulær lokalisering av *cyp1a* ved å benytte ISH på BNF eksponert atlantehavslaks (*Salmo salar*). I motsetning til torsk finner man ikke intracellulære fettdråper og hepatocytene er markant mindre hos laks enn hos torsk.



Figur 6.7: *In situ* hybridisering av *cyp1a* (brunt) i lever av atlantehavslaks (*Salmo salar*) eksponert for 50 mg β -naftioflavone/kg kroppsvekt (A) og (C) og kontroll (B). Farging av kjerner med metylgrønn. For (A) og (B) 1: hepatocytter, 2: blodåre. For (C): 1: hepatocytter, 2: bindevev og 3: gallegang. Scalebar = 50 μ m. Kilde: (Olsvik et al., 2007), sammenstilling av bilde ved Marie Nohre.

6.4 Materialliste

Jeg vil her vise til de ulike produktene, løsningene og apparatene som er benyttet i oppgaven.

6.4.1 Torsk

Tabell 6.1: Størrelse på og formålet til fiskene i forsøkene

Nr.	Vekt	Kjønn	LSI	Formål	Dato
1	50 g	Hann	-	Vevsbiter til ISH pilotforsøk	02.02.2016
2	714 g	Hann	7,6	Eksponeringsforsøk, PCLS	16.03.2016
3	1056 g	Hunn	7,4	Isolasjon av RNA til probesyntese	07.01.2016

6.4.2 Løsninger og buffere

6.4.2.1 Buffere

Tabell 6.2: 0,1 M Sørensen-buffer, pH 7.2

Komponent	Mengde
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	0,77 g
Na ₂ HPO ₄ * H ₂ O	1,96 g
dH ₂ O	<200 mL
Totalt	200 mL

Tabell 6.3: 0,1 M Sørensen-buffer med 25 % sukrose, pH 7.2

Komponent	Mengde
Sukrose	25 g
0,1 M Sørensen	<100 mL
Totalt	100 mL

Tabell 6.4: 0,1 M Sørensen-buffer med 25 % sukrose og 10 % OCT embedding matrix (OCT), pH 7.2

Komponent	Mengde
Sukrose	25 g
OCT embedding Matrix	10 g
0,1 M Sørensen	<100 mL
Totalt	100 mL

Tabell 6.5: 0,2 M Sørensen-buffer, pH 7.2

Komponent	Mengde
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	2,76 g
Na ₂ HPO ₄ * H ₂ O	2,72 g
(Evt. Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O)	3,56 g
dH ₂ O	<200 mL
Totalt	200 mL

Tabell 6.6: 4% paraformaldehyd (PF), pH 7.2. 8 % paraformaldehyd og vannet varmes til 65 °C og røres til pulveret er løst ut.

Komponent	Mengde
8 % paraformaldehyd	40 g
dH ₂ O	500 mL
NaOH	1 tablett
0,2 M Sørensen-buffer	500 mL
Totalt	1 L

Tabell 6.7: 5X tris-borsyre-EDTA (TBE) buffer, pH 8.3, Løsningen fortynnes til 0,5X ved bruk i agarosegelelektroforese.

Komponent	Mengde
Tris	27 g
Borsyre	13,75 g
EDTA (0,5 M)	10 mL
dH ₂ O	< 500 mL
Totalt	500 mL

Tabell 6.8: 50 X Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer, Løsningen fortynnes til 1X ved bruk i agarosegelelektroforese

Komponent	Mengde
Tris base	242 g
Glacial Acetic Acid	57,1 mL
0,5M EDTA	20 mL
dH ₂ O	< 2 L
Totalt	2 L

Tabell 6.9: *PCLS buffer, pH 8.4. Løsningen holdes på 4 °C og sterilfiltreres (0,22 µm porer) i en autoklavert flaske*

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

6.4.2.2 Standardløsninger til in situ hybridisering

Tabell 6.10: *0,5 M Etylendiamin tetraeddiksyre (EDTA), pH 8.0. Løsningen autoklaveres før bruk.*

Komponent	Mengde
Na ₂ EDTA	37.5 g
dH ₂ O	<200 mL
Totalt	200 mL

Tabell 6.11: *10 % blokkeringsløsning. Løsningen autoklaveres før bruk.*

Komponent	Mengde
Blocking reagent	10 g
1X Maleate buffer	<100 mL
Totalt	100 mL

Tabell 6.12: *1 M Natriumhydroksid (NaOH)*

Komponent	Mengde
NaOH	80 g
Autoklavert dH ₂ O	<200 mL
Totalt:	200 mL

Tabell 6.13: *1 M Tris-HCl, pH 7.5, 8.0 og 9.5, Løsningene autoklaveres før bruk.*

Komponent	Mengde
Tris-base	121,1 g
dH ₂ O	<1000 mL
Totalt:	1 L

Tabell 6.14: 20 X SSC, Løsningen autoklaveres før bruk.

Komponent	Mengde
Natriumklorid	175,3 g
Natrium sitrat	88,2 g
Autoklavert vann	<800 mL
Totalt	800 mL

Tabell 6.15: 5 X KPBS, pH 7.4. Løsningen autoklaveres før bruk.

Komponent	Mengde
NaCl	40,0 g
KCl	1,0 g
Na ₂ HPO ₄	7,2 g
KH ₂ PO ₄	1,2 g
dH ₂ O	<1000 mL
Totalt:	1000 mL

Tabell 6.16: 5X Maleatbuffer, pH 7.5, Løsningen autoklaveres før bruk.

Komponent	Mengde
Maleisk syre	58 g
NaCl	43,8 g
dH ₂ O	<1000 mL
Totalt:	1000 mL

Tabell 6.17: Hybridiseringsbuffer, 5 g dekstransulfat løses i 5 mL autoklavert vann. Løsningen varmes til 65 °C for å løse opp saltet. Autoklavert vann tilsettes, slik at totalvolumet på 50 % dekstransulfat blir 10 mL.

Komponenter	Mengde
1 M Tris-HCl, pH 7.5	500 µL
0,5 M EDTA	100 µL
5 M NaCl	300 µL
Autoklavert dH ₂ O	2,7 mL
100 % formamid	25 mL
50 % dekstransulfat løst i vann	10 mL
Tween 20	100 µL
Totalt	38,7 mL

6.4.2.3 Agarosegel

Tabell 6.18: 0,7 % agarosegel i 0,5 X Tris-borisk syre-EDTA

Komponent	Mengde
Agarose	350 mg
0,5 X TBE	60 mL
GelRed	6 µL

Tabell 6.19: 1 % agarosegel i 1X TAE

Komponent	Mengde
Agarose	60 mg
1X TAE	60 mL
GelRed	6 µL

6.4.2.4 Vekstmedium

Tabell 6.20: *Lysogeny Broth (LB)-agar, pH 7.0*, Løsningen ble autoklavert og ampicilin 100 µg/mL ble tilsatt når temperaturen på løsningen var på ca. 50 °C.

Komponent	Mengde
Trypton	5 g
NaCl	5 g
Gjæreekstrakt	2,5 g
Agar-agar	7,5 g
H ₂ O	<500 mL
Amficilin	50 mg

Tabell 6.21: *Lysogeny Broth(LB)-medium, pH 7.0*. Løsningen ble autoklavert

Komponent	Mengde
Trypton	5 g
NaCl	5 g
Gjæreekstrakt	2,5 g
H ₂ O	<500

Tabell 6.22: *Super-stripped Leibowitz-15 (L-15) vekstmedium med 10 % fetal bovin serum (FBS) og 1 % ampicilin til eksponering*

Komponent	Mengde
10 % fetal Bovine serum, kull super-stripped	10 mL
1 % Amficilin	1 mL
L-15 media (uten fenol rødt)	<100 mL
Totalt	100 mL

6.4.2.5 Molekylvektstandarder

Tabell 6.23: *Molekylvektstandard ved agarosegelelektroforese*

Navn	Molekylvekt	Katalognr.	Produsent
SmartLadder	1700-10	GC04C22	Eurogentec

6.4.3 Eksponeringsstoffer

Tabell 6.24: *Eksponeringskonsentrasjoner* *BNF er løst i 0,01 M DMSO

Konsentrasjon	Antall	Eksponeringsmedium	Vekstmedium
10 µM BNF	25	25 µL av 10 mM BNF*	24975 µL
1 µM BNF	20	20 µL av 1 mM BNF*	19980 µL
Kontroll	20	20 µL av 0,01 M DMSO	19980 µL
1 % triton	7	70 µL Triton X	6930 µL

6.4.4 Produsenter

Tabell 6.25: *Produsenter bak utstyr og kjemikalier benyttet i oppgaven*

Produsent	Forkortelser	Adresse	Land
Agilent Technologies	Agilent	CA 95051	USA
Amersham Bioscience	Amersham	SE-751	Sverige
Applied Biosystems		CA 94404	USA
Axygen A Corning Brand	Axygen	CA 94587	USA
BD		New Jersey	USA
Biochrom AG	Biochrom	I 2247 Berlin	Tyskland
Bioline		London	England
Bio-Rad Laboratories	BioRad	CA 94547	USA

Biosense Laboratories	Biosense	Bergen	Norge
Brand GMBH	Brand	97861 Wertheim	Tyskland
CellPath		<i>SY16 4LE</i>	Wales
Cronus		Gloucester	UK
Eppendorf		22339 Hamburg	Tyskland
Eurogentec		4102 Seraing	Belgia
Gilson		WI 53562-0027	USA
Grace Bio-Labs		OR 97702	USA
Grant Boekel	Boekel	855 Pennsylvania	USA
Greiner Bio One GmbH	GBO	4550 Kremsmünster	Tyskland
IKA Labortechnik	IKA	79219 Staufen	Tyskland
Infors HT		4103 Bottmingen	Sveits
Invitrogen by Life Technologies	Invitrogen	Carlsbad, CA	USA
Kendro Laboratory Products	Kendro	NC 28787	USA
Kimberly-Clark® Professional	KCProfessional	GA 30076	USA
Leica		Wetzlar	Tyskland
Lonza Group	Lonza	Basel	Sveits
Media Cybernetics™	MediaCy	MD 20850	USA
Merck KGaA	Merck	64271 Darmstadt	Tyskland
Microsoft Corporation	Microsoft	Washington	USA
Millipore		Bedford, MA	USA
PerkinElmer		CT 06851	USA
Porkka		15210 Lahti	Finland
Quanta bioscience	Quanta Bio	MD 20877	USA
Radiometer analytical	Radiometer	69100 Villeurbanne	Frankrike
Roche Diagnostics Norge AS	Roche	Oslo	Norge
Sarstedt		NC 28658	USA
Scan Aqua AS	Scan	2151 Årnes	Norge
Sigma-Aldrich	Sigma	MO 63103	USA
Swann-Morton®		South Yorkshire	UK
Syngene		Cambridge	England
TaKaRa Bio Inc.	TaKaRa	Shiga	Japan
Termaks		5057 Bergen	Norge
Thermo Scientific	Thermo	Massachusetts	USA
Thomson Reuters Corporation	Thomson	New York	USA
Ultra-Violet Products Ltd.	UVP	CA 91786	USA
VWR		5068 Bergen	Norge

6.4.5 «Kit»

Tabell 6.26: Ulike «kitbenyttet i oppgaven

Navn	Cat. No.	Produsent	Bruk
Agilent RNA 6000 Nano Kit	506-1511	Agilent	Mål av RIN-nummer
LDH Cytotoxicity detection kit	04744928001	Roche	Cytotoksitetetsmålinger
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	04707516001	Roche	qPCR
PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase	#R050Q	TaKaRa	DNA polymerase
QIAprep Spin Miniprep Kit	151038735	Qiagen	Plasmidrens
QIAquick Gel Extraction Kit	28704	Qiagen	Ekstraksjon av gener
qScript cDNA Synthesis kit	95047-100	Quanta	Syntese av cDNA fra RNA
RNeasy® Mini Kit	151040219	Qiagen	Rensing av RNA
SuperScript™ III Reverse transkriptase	18080-085	Invitrogen	Syntese av cDNA fra RNA
TOPO TA Cloning Kit, pCR® 4 – TOPO® Vector	45-0030	Invitrogen	For innsetting av PCR produkt i vektor

6.4.6 Primere

6.4.6.1 Primere til probelaging for ISH

Tabell 6.27: **Primere til probe.** Probene til torsk er designet av Tom Ole Nilsen (Uni) og primerene designet for sebrafisk er designet av Roger Lille-Langøy. Alle primerene er produsert av Sigma Aldrich.

ID	Målgen	Primer retning	Dyr	Primersekvens
MT1069	β -Aktin	Fremover	Torsk	5'-GGGTGTGATGGTTGGTATG
MT1070	β -aktin	Bakover	Torsk	5'-ACGGAGTACTTCCTCTCTG
MT1071	<i>cyp1a</i>	Fremover	Torsk	5'-ATCACCGTGTGTCTGATCTA
MT1072	<i>cyp1a</i>	Bakover	Torsk	5'-CTGGATGTTGGAGTTCTCATC
MT74	β -Aktin	Fremover	Zebrafisk	5'-GAGAAGATCTGGCATCACACCTTC
MT75	β -Aktin	Bakover	Zebrafisk	5'-GGTCTCGTGGATACCGCAAGATTC

6.4.6.2 Primere til kvantitativ sanntids PCR (qPCR)

Tabell 6.28: **Primere til qPCR.** Primerene er designet av Marta Eide og produsert av Sigma Aldrich

ID	Målgen	Primerretning	Primersekvens
MT1031	<i>Arp</i>	Fremover	5'-TGATCCTCCACGACGATGAG
MT1032	<i>Arp</i>	Bakover	5'-CAGGGCCTTGGCGAAGA
MT1033	<i>Rlp22</i>	Fremover	5'-AGAAGTCCAAAAAAGGAGCTTCCT
MT1034	<i>Rlp22</i>	Bakover	5'-GTTACCGGTCTTCCCCGTTGA
MT1079	<i>Cyp1a</i>	Fremover	5'-GCAGGAAGGAGGAGTGACGGAA
MT1080	<i>Cyp1a</i>	Bakover	5'-CACCAGGAGATCAAGGACAAG

6.4.7 Utstyr og programvarer

6.4.7.1 Forbruksmateriale

Tabell 6.29: **Forbruksmateriale benyttet i oppgaven**

Komponent	Lot.	Produsent	Bruk
0,2 mL Thin Wall, Clear PCR® Tubes	321-02-051	Axygen®	PCR rør
50 mL Polypropylene Conical Tube	352070	Falcon	50 mL Falkonrør
BD Microlance™ 3 21G	304432	BD	21G nål
BD Microlance™ 3 23G	300800	BD	23G nål
BD Microlance™ 3 25G	300600	BD	25 G nål
BD Plastipak™	302188	BD	Sprøyte
Cellstar® Tubes	188271	GBO	15 mL Falkonrør
Cellstar® Tubes	210261	GBO	50 mL Falkonrør
DakoCytomatio Pen	S 2002	DakoCytomation	PAP-pen
Diamond® Tipack	DF10ST, DF30ST, DF200ST, DF1000	Gilson	Pipettespisser fra 0,2 – 1000 µL
Hard-Shell® 96-Well	HSP9601	BioRad	96-brønnsplater til qPCR
HybriSlip™ Hybridization Cover	716022-100EA	Grace Bio-Labs	Hybridiseringsdekkglass
Kimtech Science Delicate Task wipes	7102	KCProfessional	Papir
Laboratory film	PM-999	Parafilm	Parafilm
Menzel-Gläser	9874575	Thermo Science	Dekkglass
Menzel-Gläser Superfrost® plus	J1800AMNZ	Thermo Science	Mikroskop slides
Microcentrifuge tube rack	4341052	Brand	
Microseal® 'B' Film	115044	BioRad	PCR sealers
Microtubes, 1,5 mL Clear	311-08-051	Axygen®	
Nailpolish	05516, nr. 033	Depend	Forsegle ISH prøver
Petriskål		Greiner bio-one	Vekstskål for <i>E. coli</i>

Pipetman Neo	P2N, P10N, P20N, P100N og P200N	Gilson	Pipetter fra 0,2 – 1000 µL
PS-Mikroplate Flat Bottom	655101	GBO	96-brønnsplate
RNeasy Mini Spin Column	148017964	Qiagen	RNA ekstrahering
Secure seal hybrid chambers		EMS	
Skrukork	0832TB-100	Cronus	
Steritop Millipore Express™Plus	Z660515	Millipore	0,22 µm filtrering
Super Glue Precision	1577386	Loctite	Lim til PCLS
Surgical Blade	2491003	S-Morton®	Kutting av OCT
Tissue Culture Plate 24-Well	83.1836	Sarstedt	24-brønnsplate m. lokk
Universal-Alufolie 30	521501030		Aluminiumsfolie
VWR ® Slide box	612-2708	VWR	Slideboks

6.4.7.2 Apparater

Tabell 6.30: Apparater benyttet i oppgaven

Apparat	Leverandør	Brukt til
Advantage A10 Milli-Q	Millipore	Rensing av vann
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent	Analyse av RNA prøver
B8054	Termaks	Inkuberingsskap - agarplater
Centrifuge 5415 R	Eppendorf	Sentrifuge
CFX96™ Thermal Cycler	BioRad	qPCR
CoolSNAP-Pro Color	Media Cybernetics™	Kamera til mikroskop
Doppio Thermocycler	VWR	Termosykler
EnSpire™ 2300 Multilabel Reager	PerkinElmer	Absorbans plateleser
G:BOX	Syngene	Bildetaking av agarosegel
GasPak™ EZ	BD	In-situ kammer
GeneAmp PCR system 2700	Applied Biosystems	PCR
Heraeus Function Line	Kendro	Varmeskap
Heraeus Multifuge X3R	Thermo Scientific	Centrifuge
High Performance Ultraviolet Transilluminator	UVP	Kutting av gel til genestraksjon
Himac CT15RE Centrifuge	VWR	Sentrifuge
INCU-Line	VWR	37oC og 65oC varmeskap
KF185	Porkka	Ismaskin
Leica CLS150	Leica	Lys til mikroskopiering
Leica CM3050 S	Leica	Kryostat
Leica DFC320R2	Leica	Mikroskopkamera
Leica DM6000 B	Leica	Mikroskop
Leica DMLB	Leica	Mikroskop

Leica L5 FL	Leica	Lys til mikroskopiering
Leica M420	Leica	Mikroskop
Leica RM2155	Leica	Parafinsnitting
MultiTempII	Amersham	Varmebad
Multitrom Standard	Infors HT	Inkubator for vekstmedium
Nanodrop Spectrophotometer ND1000	Thermo	Måling av RNA/DNA
Olympus SZ51	Olympus	Linse
PHM210	Radiometer	pH-meter
PowerPac HC	BioRad	Kjøre Agarosegel
RCT basic	IKA	Varmeplate med magnetrører
SM30	Boekel	Hybridiseringskammer
Vibratome line VT1200	Leica	PCLS snitning
VS-C7	VWR	Magnettrører

6.4.7.3 Programvare

Tabell 6.31: Programvarer benyttet i oppgaven

Navn	Versjon	Leverandør	Brukt til
Bio-Rad CFX	3.1	BioRad	qPCR måling og analyse
ChemDraw Professional	15.0.0.106	PerkinElmer	Illustrasjoner og kjemikaliestrukturformler
EndNote	X7.5	Thomson	Kildelisteverktøy
EnSpire manager	4 .0.3006.25	PerkinElmer	Mål og analyse av absorbanse
GeneSnap Image	7.12	Syngene	Bilde av agarosegel
Microsoft Office Excel 2013	15.0.4815.1000	Microsoft®	Tabeller og analyser
Microsoft Office Word 2013	15.0.4815.1001	Microsoft®	Skriveprogram
ND-1000	03.03.2000	Thermo Scientific	Måling og analyse av RNA/DNA
Photoshop CC	20160113.r.355	Adobe	Bilredigering og illustrasjoner

6.5 Fragmenter

6.5.1 Primerpar og fragment til *cyp1a* probe

Fremover primer: ATCACCGTGTGTCTGATCTA (Sense)

Bakover primer: CTGGATGTTGGAGTTCTCATC (AntiSense)

Fremover og bakoverprimeren er markert med uthevet skrift

Amplifiseringslengde: 855 bp

*ATGGCTCTCATGATCCTCCCCCTGATTGGCTCGGTGTCTGTGTCTGAGACCCTGGTTGC
CATGATCACCGTGTGTCTGATCTACATGCTCATGAAGTTCCTCCACACCGACGTC
CCGGAGGGGCTCCGCCGGCTCCCGGGCCCAAGCCCCTCCCCATCATCGGGAACG
CCCTGGAGCTGGGCGACCGGCCCTACCTGAGCCTCACGGCCATGGCCCAGCGCTA
CGGGGACATCTTCCAGATCCAGATCGGGATGCGTCCGGTGGTGGTGTCTCAGCGGC
CACGAGACGGTGCGGCAGGCGCTCATCAAGCAGGGCGACGACTTCGCCGGCCGC
CCGGACCTCTACAGCTTCCAGTTCATCAACGAAGGCAAGAGCCTGGCCTTCAGCA
CCGACCAGGCTGGCGTATGGCGCGCCCGCCGCAAGCTGGCCATGAGCGCCCTGC
GCTCCTTCTCCACGCTGGAGGGCACCACGCCGGAGTACTCCTGCATGCTGGAGGA
GCACGTCTGCAAGGAGGGCGACTACCTCATCAAGCAGCTGTCCAGCGTCATGGTA
GCCGATGGCAGCTTCGACCCCTTCCGCCACATCGTGGTGTCCGTGGCCAACGTGA
TCTGCGGCATGTGCTTCGGCCGGCGCTACGGCCACGAGGACCAGGAGCTGGTGA
GCCTGGTCAACCTCTCGGACGAGTTCGGGAAGGTTGTGGGCAGCGGCAACCTGGC
CGACTTCATCCCGCTGCTGCGCTTCTCCCAACGCCACCATGAAGAGGTTTCATG
GCCATCAACGAACGCTTCGTGACCTTTGTGCAAGAAGATCGTCACCGACCACTACA
ACACTTATGACAAGGACAACATCCGGGACATCACCGACTCCCTGATCGACCACTG
TGAGGACAGGAAGCTGGATGAGAACTCCAACATCCAGATGTCCGACGAGAAGGT
CGTGGGCATTGTCAACGATCTGTTCCGGAGCCGGCTTCGACACGGTGAGCACGGCACT
GTCCTGGTCCGTCATGTACCTGGTGGCCACCCCGAGATGCAGGAGAGGCTTCACCA
GGAGATCAAGGACAAGGTGGGCCTGAGCCGGTCCCCCGTGCTCGCCGACAGAAACAA
CCTACCCGTCTTGAGGCTTTTATTTTTGAAATCTTCCGTCACTCCTCCTTCTGCCCCT
CACCATCCCTCACTGCGCCACAAAAGACACGTCTCTCGATGGCTACTTCATCCCCAAAG
ACACCTGCGTCTTCATCAACCAGTGGCAGATCAACCACGACCCGGAGCTGTGGAAGGA
ACCGTCCACCTTCAACCCCGACCGCTTCTGAGCGCCGACGGCTCGGAGCTGAACAA
GCTGGCGGGGGAGAAGGTGATGCTCTTCGGCATGGGCAAGAGGGCGCTGCATCGGCG
AGATGGTGGCGCGCAACGAGGTCTTCTTCTTCTGGCCATCCTGGTGCAGAGGCTGAC
CTTCCACGCGGTGCCGGGCAAGCCACTGGACATGACGCCTGAGTACGGCCTCACCAT
GAGGCACAAACGCTGCCACCTGCGCGCCATGCTGCGGAGCACGGAGTGA*

6.5.2 Primerpar og fragment til β -aktin probe

Fremover primer: GGGTGTGATGGTTGGTATG (Sense)

Bakover primer: ACGGAGTACTTCCTCTCTG (AntiSense)

Fremover og bakoverprimeren er markert med uthevet skrift

Amplifiseringslengde: 855 bp

*ATGGAAGATGATATCGCTGCCCTCGTTGTTGACAACGGATCTGGCATGTGCAAAGCTG
GCTTTGCTGGTGATGATGCGCCACGTGCTGTGTTCCCTCCATTGTTGGACGCCAAG
ACATCA**GGGTGTGATGGTTGGTATGGGTC**GAGAAGGACAGCTATGTTGGAGACGA
GGCACAGAGCAAGAGGGGTATCCTGACTCTGAAGTACCCATTGAGCACGGTAT
CGTCACAAACTGGGATGACATGGAGAAGATCTGGCATCACACCTTCTACAACGA
GCTCCGTGTAGCCCCAGAGGAGCACCCCGTCCTGCTCACAGAGGCTCCCTCAAC
CCCAAGGCTAACAGGGAGAAGATGACCCAGATCATGTTTCGAGACGTTCAACACC
CCAGCCATGTACGTGGCCATCCAGGCCGTGCTCTCCCTGTACGCCTCTGGCCGTA
CCACAGGTATCGTCATGGACTCTGGTGACGGTGTACCCACACAGTGCCCATCTA
CGAAGGGTATGCCCTCCCCATGCCATCCTCAGGTTGGACCTGGCCGGCAGGGAC
CTCACGGACTACCTCATGAAGATCCTGACCGAGCGCGGCTACAGCTTCACCACCA
CAGCCGAGCGTGAGATTGTGCGTGACATCAAGGAGAAGCTGTGCTACGTGGCGC
TGGACTTCGACCAGGAGATGCAAACCGCCTCTAGCTCGTCCACCCTAGAGAAGAG
CTATGAGCTTCCCGACGGGCAGGTCATCACCATCGGCAACGAGCGGTTCCGCTGT
CCCGAGGCCCTTTTCCAGCCCTCCTTCCTCGGAATGGAGTCTTGTGGCATCCATGA
GACCACCTTCAACAGCATCATGAAGTGTGACGTTGACATCCGTAAGGACCTGTAC
GCCAACACTGTCCTGTCCGGCGGCACCACCATGTACCCCGGCATCGCCGACCGCA
TGCAGAAGGAGATCACCTCTCTGGCCCCTAGCACCATGAAAATCAAGATCATCGC
CCCACCAGAGAGGAAGT**ACTCCGTCTGGATCGGAGGCTCCATCCTGGCCTCCCTC**
TCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCAGCAAGCAGGAGTACGACGAGTCCGGCCCCAGC
ATTGTCCACAGGAAGTGCTTCTAA*

6.6 Kilder

- Aas, E., Baussant, T., Balk, L., Liewenborg, B. og Andersen, O.K. (2000). PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. *Aquatic Toxicology*, 51(2), 241-258. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X\(00\)00108-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00108-9)
- Akiyoshi, H. og Inoue, A. (2004). Comparative histological study of teleost livers in relation to phylogeny. *Zool Sci*, 21. doi:10.2108/zsj.21.841
- Alpini, G., Phillips, J.O., Vroman, B. og Larusso, N.F. (1994). Recent advances in the isolation of liver cells. *Hepatology*, 20. doi:10.1002/hep.1840200231
- Berg, P.R., Star, B., Pampoulie, C., Sodeland, M., Barth, J.M.I., Knutsen, H., . . . Jentoft, S. (2016). Three chromosomal rearrangements promote genomic divergence between migratory and stationary ecotypes of Atlantic cod. *Scientific Reports*, 6, 23246. doi:10.1038/srep23246
- Berridge, M.V. og Tan, A.S. (1993). Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys*, 303(2), 474-482. doi:10.1006/abbi.1993.1311
- Beyer, J., Sandvik, M., Hylland, K., Fjeld, E., Egaas, E., Aas, E., . . . Goksøyr, A. (1996). Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) exposed by caging to polluted sediments in Sjørfjorden, Norway. *Aquatic Toxicology*, 36(1-2), 75-98. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X\(96\)00798-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X(96)00798-9)
- Boess, F., Kamber, M., Romer, S., Gasser, R., Muller, D., Albertini, S. og Suter, L. (2003). Gene expression in two hepatic cell lines, cultured primary hepatocytes, and liver slices compared to the in vivo liver gene expression in rats: possible implications for toxicogenomics use of in vitro systems. *Toxicol Sci*, 73(2), 386-402. doi:10.1093/toxsci/kfg064
- Braissant, O. og Wahli, W. (1998). A Simplified In Situ Hybridization Protocol Using Non-radioactively Labeled Probes to Detect Abundant and Rare mRNAs on Tissue Sections. *Biochemica*, 1, 10-16.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., . . . Wittwer, C.T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, 55(4), 611-622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797
- Casarett, L.J., Klaassen, C.D., Doull, J. og Watkins, J.B. (2010). *Casarett & Doull's essentials of toxicology* (2nd ed. ed.). New York: McGraw-Hill.
- Chung-Davidson, Y.W., Rees, C.B., Wu, H., Yun, S.S. og Li, W. (2004). beta-naphthoflavone induction of CYP1A in brain of juvenile lake trout (*Salvelinus namaycush* Walbaum). *J Exp Biol*, 207(Pt 9), 1533-1542.
- Coghlan, J.P., Aldred, P., Haralambidis, J., Niall, H.D., Penschow, J.D. og Tregear, G.W. (1985). Hybridization histochemistry. *Analytical Biochemistry*, 149(1), 1-28. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90472-5](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(85)90472-5)
- Coon, M.J., Ding, X.X., Pernecky, S.J. og Vaz, A.D. (1992). Cytochrome P450: progress and predictions. *Faseb j*, 6(2), 669-673.
- Cravedi, J.P., Perdu-Durand, E. og Paris, A. (1998). Cytochrome P450-dependent metabolic pathways and glucuronidation in trout liver slices. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 121(1-3), 267-275. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0742-8413\(98\)10047-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0742-8413(98)10047-6)

- Cremer, T., Popp, S., Emmerich, P., Lichter, P. og Cremer, C. (1990). Rapid metaphase and interphase detection of radiation-induced chromosome aberrations in human lymphocytes by chromosomal suppression in situ hybridization. *Cytometry*, 11(1), 110-118. doi:10.1002/cyto.990110113
- Denison, M.S. og Nagy, S.R. (2003). Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 43, 309-334. doi:10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.135828
- Denison, M.S., Pandini, A., Nagy, S.R., Baldwin, E.P. og Bonati, L. (2002). Ligand binding and activation of the Ah receptor. *Chem Biol Interact*, 141, 3-24.
- Denison, M.S. og Whitlock, J.P.J. (1995). Xenobiotic-inducible transcription of cytochrome P450 genes. *J Biol Chem*, 270(31), 18175-18178.
- Dettmeyer, R.B. (2011). *Forensic Histopathology*. Dordrecht: Springer.
- Durant, J.M., Hjermann, D.O., Sabarros, P.S. og Stenseth, N.C. (2008). Northeast Arctic cod population persistence in the Lofoten-Barents Sea system under fishing. *Ecol Appl*, 18(3), 662-669.
- Ebbesson, L.O., Nilsen, T.O., Helvik, J.V., Tronci, V. og Stefansson, S.O. (2011). Corticotropin-releasing factor neurogenesis during midlife development in salmon: genetic, environmental and thyroid hormone regulation. *J Neuroendocrinol*, 23(8), 733-741. doi:10.1111/j.1365-2826.2011.02164.x
- Ebbesson, L.O., Tipsmark, C.K., Holmqvist, B., Nilsen, T., Andersson, E., Stefansson, S.O. og Madsen, S.S. (2005). Nitric oxide synthase in the gill of Atlantic salmon: colocalization with and inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase. *J Exp Biol*, 208(Pt 6), 1011-1017. doi:10.1242/jeb.01488
- Echeveste, P., Agusti, S. og Dachs, J. (2010). Cell size dependent toxicity thresholds of polycyclic aromatic hydrocarbons to natural and cultured phytoplankton populations. *Environ Pollut*, 158(1), 299-307. doi:10.1016/j.envpol.2009.07.006
- Edson, K.Z. og Rettie, A.E. (2013). CYP4 enzymes as potential drug targets: focus on enzyme multiplicity, inducers and inhibitors, and therapeutic modulation of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) synthase and fatty acid omega-hydroxylase activities. *Curr Top Med Chem*, 13(12), 1429-1440.
- Eide, M. (2010). *Kjernereseptorar i sebrafisklever som mål for hormonforstyrrende stoff*. (Master), Universitetet i Bergen, Bergen.
- Eide, M. (2016). *Experimental systems for studying toxicological responses in teleost species; in vitro, ex vivo and in silico studies of zebrafish (Danio rerio) and Atlantic cod (Gadus morhua)*. (Ph.D), Universitetet i Bergen, Bergen.
- Eide, M., Karlsen, O.A., Kryvi, H., Olsvik, P.A. og 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. doi:10.1016/j.aquatox.2013.10.027
- Elferink, M.G.L., Olinga, P., Draaisma, A.L., Merema, M.T., Bauerschmidt, S., Polman, J., . . . Groothuis, G.M.M. (2008). Microarray analysis in rat liver slices correctly predicts in vivo hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 229(3), 300-309. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2008.01.037>
- Ellesat, K.S., Yazdani, M., Holth, T.F. og Hylland, K. (2011). Species-dependent sensitivity to contaminants: An approach using primary hepatocyte cultures with three marine fish species. *Marine Environmental Research*, 72(4), 216-224. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.09.003>

- Fao. (2004). Cultured Aquatic Species Information Programme. *Gadus morhua*. *FAO Fisheries and Aquaculture Department*. Retrieved from http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Gadus_morhua/en
- Fox, C.H., Johnson, F.B., Whiting, J. og Roller, P.P. (1985). Formaldehyde fixation. *J Histochem Cytochem*, 33(8), 845-853.
- Fujita, H., Tatsumi, H., Ban, T. og Tamura, S. (1986). Fine-structural characteristics of the liver of the cod (*Gadus morhua macrocephalus*), with special regard to the concept of a hepatoskeletal system formed by Ito cells. *Cell and Tissue Research*, 244(1), 63-67. doi:10.1007/bf00218382
- Fukunaga, B.N., Probst, M.R., Reisz-Porszasz, S. og Hankinson, O. (1995). Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem*, 270(49), 29270-29278.
- Geyer, H.J., Steinberg, C.E., Scheunert, I., Brüggemann, R., Schütz, W., Kettrup, A. og Rozman, K. (1993). A review of the relationship between acute toxicity (LC50) of γ -hexachlorocyclohexane (γ -HCH, Lindane) and total lipid content of different fish species. *Toxicology*, 83(1), 169-179. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0300-483X\(93\)90100-7](http://dx.doi.org/10.1016/0300-483X(93)90100-7)
- Goksøyr, A. (1985). Purification of hepatic microsomal cytochromes P-450 from β -naphthoflavone-treated Atlantic cod (*Gadus morhua*), a marine teleost fish. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 840(3), 409-417. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0304-4165\(85\)90222-3](http://dx.doi.org/10.1016/0304-4165(85)90222-3)
- Goksøyr, A. (1994). Use of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish as a biomarker of aquatic pollution. *Toxicology Letters*, 74, Supplement 1, 29-30. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0378-4274\(94\)90283-6](http://dx.doi.org/10.1016/0378-4274(94)90283-6)
- Goksøyr, A. (1995). Use of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish as a biomarker of aquatic pollution. *Arch Toxicol Suppl*, 17, 80-95.
- Goksøyr, A., Andersson, T., Buhler, D.R., Stegeman, J.J., Williams, D.E. og Forlin, L. (1991a). Immunochemical cross-reactivity of beta-naphthoflavone-inducible cytochrome P450 (P4501A) in liver-microsomes from different fish species and rat. *Fish Physiol Biochem*, 9. doi:10.1007/bf01987606
- Goksøyr, A., Andersson, T., Hansson, T., Klungsøyr, J., Zhang, Y. og Förlin, L. (1987a). Species characteristics of the hepatic xenobiotic and steroid biotransformation systems of two teleost fish, Atlantic cod (*Gadus morhua*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Toxicol Appl Pharmacol*, 89(3), 347-360.
- Goksøyr, A., Andersson, T., Hansson, T., Klungsøyr, J., Zhang, Y. og Förlin, L. (1987b). Species characteristics of the hepatic xenobiotic and steroid biotransformation systems of two teleost fish, Atlantic cod (*Gadus morhua*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Toxicol Appl Pharmacol*, 89(3), 347-360. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0041-008X\(87\)90154-2](http://dx.doi.org/10.1016/0041-008X(87)90154-2)
- Goksøyr, A. og Förlin, L. (1992). The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquatic Toxicology*, 22(4), 287-311. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0166-445X\(92\)90046-P](http://dx.doi.org/10.1016/0166-445X(92)90046-P)
- Goksøyr, A. og Husøy, A.-M. (1998). Immunochemical approaches to studies of CYP1A localization and induction by xenobiotics in fish. In Braunbeck, T., Hinton, D.E. og Streit, B. (Eds.), *Fish Ecotoxicology* (pp. 165-202). Basel: Birkhäuser Basel.
- Goksøyr, A., Husøy, A.M., Larsen, H.E., Klungsøyr, J., Wilhelmsen, S., Maage, A., . . . Pesonen, M. (1991b). Environmental contaminants and biochemical responses in flatfish from the Hvaler Archipelago in Norway. *Arch Environ Contam Toxicol*, 21(4), 486-496.
- Goksøyr, A., Serigstad, B., Solberg, T.S. og Stegeman, J.J. (1988). The Fourth International Symposium on Responses of Marine Organisms to Pollutants Response of cod (*Gadus morhua*) larvae and

- juveniles to oil exposure detected with anti-cod cytochrome P-450c IgG and anti-scup cytochrome P-450E MAb 1-12-3. *Marine Environmental Research*, 24(1), 31-35. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0141-1136\(88\)90249-8](http://dx.doi.org/10.1016/0141-1136(88)90249-8)
- Goksøyr, A., Solbakken, J.E. og Klungsøyr, J. (1986). Regioselective metabolism of phenanthrene in Atlantic cod (*Gadus morhua*): Studies on the effects of monooxygenase inducers and role of cytochromes P-450. *Chemico-Biological Interactions*, 60(3), 247-263. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0009-2797\(86\)90056-6](http://dx.doi.org/10.1016/0009-2797(86)90056-6)
- Goksøyr, A. og Solberg, T.S. (1987). Cytochromes P-450 in fish larvae: Immunochemical detection of responses to oil pollution. *Sarsia*, 72(3-4), 405-407. doi:10.1080/00364827.1987.10419747
- Gonzalez, F.J. og Nebert, D.W. (1990). Evolution of the P450 gene superfamily: animal-plant 'warfare', molecular drive and human genetic differences in drug oxidation. *Trends Genet*, 6(6), 182-186.
- Grøsvik, B.E., Larsen, H.E. og Goksøyr, A. (1997). Effects of piperonyl butoxide and β -naphthoflavone on cytochrome P4501A expression and activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16(3), 415-423. doi:10.1002/etc.5620160304
- Guengerich, P.F. (1999). Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 39, 1-17. doi:10.1146/annurev.pharmtox.39.1.1
- Guengerich, P.F. (2015). Human Cytochrome P450 Enzymes. In Ortiz De Montellano, R.P. (Ed.), *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry* (pp. 523-785). Cham: Springer International Publishing.
- Hahn, M.E., Karchner, S.I., Shapiro, M.A. og Perera, S.A. (1997). Molecular evolution of two vertebrate aryl hydrocarbon (dioxin) receptors (AHR1 and AHR2) and the PAS family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(25), 13743-13748. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC28377/>
- Hansen, J.Ø., Berge, G.M., Hillestad, M., Krogdahl, Å., Galloway, T.F., Holm, H., . . . Ruyter, B. (2008). Apparent digestion and apparent retention of lipid and fatty acids in Atlantic cod (*Gadus morhua*) fed increasing dietary lipid levels. *Aquaculture*, 284(1-4), 159-166. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.07.043>
- Harris, C.A., Santos, E.M., Janbakhsh, A., Pottinger, T.G., Tyler, C.R. og Sumpter, J.P. (2001). Nonylphenol affects gonadotropin levels in the pituitary gland and plasma of female rainbow trout. *Environmental Science Technology*, 35(14), 2909-2916. doi:doi:10.1021/es0002619
- Hektoen, H., Bernhoft, A., Ingebrigtsen, K., Utne Skaare, J. og Goksøyr, A. (1994). Response of hepatic xenobiotic metabolizing enzymes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and cod (*Gadus morhua*) to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (2,3,7,8-TCDD). *Aquatic Toxicology*, 28(1), 97-106. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0166-445X\(94\)90023-X](http://dx.doi.org/10.1016/0166-445X(94)90023-X)
- Henry, F., Amara, R., Courcot, L., Lacouture, D. og Bertho, M.L. (2004). Heavy metals in four fish species from the French coast of the Eastern English Channel and Southern Bight of the North Sea. *Environment International*, 30(5), 675-683. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2003.12.007>
- Hoffman, E.C., Reyes, H., Chu, F.F., Sander, F., Conley, L.H., Brooks, B.A. og Hankinson, O. (1991). Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science*, 252(5008), 954-958.
- Holmes, J.L. og Pollenz, R.S. (1997). Determination of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein concentration and subcellular localization in hepatic and nonhepatic cell culture lines: development of quantitative Western blotting protocols for calculation of aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein in total cell lysates. *Mol Pharmacol*, 52(2), 202-211.

- Husøy, A.M., Myers, M.S. og Goksøy, A. (1996). Cellular localization of cytochrome P450 (CYP1A) induction and histology in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) and European flounder (*Platichthys flesus*) after environmental exposure to contaminants by caging in Sjørfjorden, Norway. *Aquatic Toxicology*, 36(1–2), 53-74. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X\(96\)00797-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X(96)00797-7)
- Husøy, A.M., Myers, M.S., Willis, M.L., Collier, T.K., Celander, M. og Goksøy, A. (1994). Immunohistochemical localization of CYP1A and CYP3A-like isozymes in hepatic and extrahepatic tissues of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.), a marine fish. *Toxicol Appl Pharmacol*, 129(2), 294-308.
- Ikuta, T., Tachibana, T., Watanabe, J., Yoshida, M., Yoneda, Y. og Kawajiri, K. (2000). Nucleocytoplasmic shuttling of the aryl hydrocarbon receptor. *J Biochem*, 127(3), 503-509.
- Incardona, J.P., Day, H.L., Collier, T.K. og Scholz, N.L. (2006). Developmental toxicity of 4-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish is differentially dependent on AH receptor isoforms and hepatic cytochrome P4501A metabolism. *Toxicol Appl Pharmacol*, 217(3), 308–321. doi:10.1016/j.taap.2006.09.018.
- Johansen, S.D., Coucheron, D.H., Andreassen, M., Karlsen, B.O., Furmanek, T., Jørgensen, T.E., . . . Jakobsen, K.S. (2009). Large-scale sequence analyses of Atlantic cod. *New Biotechnology*, 25(5), 263-271. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2009.03.014>
- Johansen, T., Nedreaas, K., Westgaard, J.I. og Aglen, A. (2013). Skrei og kysttorsk, Kronikk. *Sunnmørsposten*. Retrieved from http://www.imr.no/nyhetsarkiv/2013/mars/skrei_og_kysttorsk/nb-no
- John, H.A., Birnstiel, M.L. og Jones, K.W. (1969). RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature*, 223(5206), 582-587.
- Johnson, E.F. (1991). A partnership between the dioxin receptor and a basic helix-loop-helix protein. *Science*, 252(5008), 924-925.
- Karlsen, O.A., Bjørneklett, S., Berg, K., Brattås, M., Bohne-Kjersem, A., Grøsvik, B.E. og Goksøy, A. (2011). Integrative Environmental Genomics of Cod (*Gadus morhua*): The Proteomics Approach. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 74(7-9), 494-507. doi:10.1080/15287394.2011.550559
- Karlsen, O.A., Puntervoll, P. og Goksøy, A. (2012). Mass spectrometric analyses of microsomal cytochrome P450 isozymes isolated from β -naphthoflavone-treated Atlantic cod (*Gadus morhua*) liver reveal insights into the cod CYPome. *Aquatic Toxicology*, 108, 2-10. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.08.018>
- Karlsen, O.A., Sheehan, D. og Goksoyr, A. (2014). Alterations in the Atlantic cod (*Gadus morhua*) hepatic thiol-proteome after methylmercury exposure. *J Toxicol Environ Health A*, 77(9-11), 650-662. doi:10.1080/15287394.2014.887427
- Kashofer, K., Viertler, C., Pichler, M. og Zatloukal, K. (2013). Quality control of RNA preservation and extraction from paraffin-embedded tissue: implications for RT-PCR and microarray analysis. *PLoS One*, 8(7), e70714. doi:10.1371/journal.pone.0070714
- Kazlauskas, A., Sundström, S., Poellinger, L. og Pongratz, I. (2001). The hsp90 Chaperone Complex Regulates Intracellular Localization of the Dioxin Receptor. *Molecular and Cellular Biology*, 21(7), 2594-2607. doi:10.1128/MCB.21.7.2594-2607.2001
- Kjær, M.A., Vegusdal, A., Berge, G.M., Galloway, T.F., Hillestad, M., Krogdahl, Å., . . . Ruyter, B. (2009). Characterisation of lipid transport in Atlantic cod (*Gadus morhua*) when fasted and fed high or low fat diets. *Aquaculture*, 288(3–4), 325-336. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.12.022>

- Kloepper-Sams, P.J. og Stegeman, J.J. (1989). The temporal relationships between P450E protein content, catalytic activity, and mRNA levels in the teleost *Fundulus heteroclitus* following treatment with beta-naphthoflavone. *Arch Biochem Biophys*, 268(2), 525-535.
- Kmiec, Z. (2001). Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 161, lii-xiii, 1-151.
- Kryvi, H. og Totland, G.K. (1995). *Fiskeanatomi*. Bergen: Universitetet i Bergen.
- Langeland, A.L. (1992). Torskfisker. In Semb-Johansson, A., Jonsson, B. og Frislid, R. (Eds.), *Norges dyr : 1 : Fiskene Krypdyr, amfibier, ferskvannsfisker* ([3. utg.]. ed., pp. 171-174). Oslo: Cappelen.
- Lautt, W.W. (2009). Hepatic Circulation: Physiology and Pathophysiology. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53072/>. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53072/>
- Lemaire, B., Beck, M., Jaspert, M., Debier, C., Calderon, P.B., Thome, J.P. og 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. *Toxicol In Vitro*, 25(1), 335-342. doi:10.1016/j.tiv.2010.10.002
- Lindebro, M.C., Poellinger, L. og Whitelaw, M.L. (1995). Protein-protein interaction via PAS domains: role of the PAS domain in positive and negative regulation of the bHLH/PAS dioxin receptor-Arnt transcription factor complex. *The EMBO Journal*, 14(14), 3528-3539. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC394421/>
- Lythgoe, J. og Lythgoe, G. (1991). *Fishes of the Sea - The North Atlantic and Mediterranean*. London: Blandford.
- Meier, S., Andersen, T.E., Norberg, B., Thorsen, A., Taranger, G.L., Kjesbu, O.S., . . . Svardal, A. (2007). Effects of alkylphenols on the reproductive system of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquatic Toxicology*, 81(2), 207-218. doi:10.1016/j.aquatox.2006.12.002.
- Meier, S., Craig Morton, H., Nyhammer, G., Grøsvik, B.E., Makhotin, V., Geffen, A., . . . Svardal, A. (2010). Development of Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to produced water during early life stages: Effects on embryos, larvae, and juvenile fish. *Marine Environmental Research*, 70(5), 383-394. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2010.08.002>
- Miller, L.L., Bly, C.G., Watson, M.L. og Bale, W.F. (1951). THE DOMINANT ROLE OF THE LIVER IN PLASMA PROTEIN SYNTHESIS: A DIRECT STUDY OF THE ISOLATED PERFUSED RAT LIVER WITH THE AID OF LYSINE- ϵ -C14. *The Journal of Experimental Medicine*, 94(5), 431-453. doi:10.1084/jem.94.5.431
- Murchelano, R.A. (1990). Fish health and environmental health. *Environ Health Perspect*, 86, 257-259. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1567750/>
- Myers, M.S., Johnson, L.L. og Collier, T.K. (2003a). Establishing the Causal Relationship between Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Exposure and Hepatic Neoplasms and Neoplasia-Related Liver Lesions in English Sole (*Pleuronectes vetulus*). *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 9(1), 67-94. doi:10.1080/713609853
- Myers, M.S., Johnson, L.L. og Collier, T.K. (2003b). Establishing the causal relationship between polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and hepatic neoplasms and neoplasia-related liver lesions in English sole (*Pleuronectes vetulus*). *Hum. Ecol. Risk Assess.*, 9(1), 67-94. doi:10.1080/713609853.
- Myers, M.S., Willis, M.L., Husøy, A.-M., Goksøy, A. og Collier, T.K. (1995). Immunohistochemical localization of cytochrome P4501A in multiple types of contaminant-associated hepatic lesions

- in English sole (*Pleuronectes vetulus*). *Marine Environmental Research*, 39(1–4), 283-288. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0141-1136\(94\)00059-X](http://dx.doi.org/10.1016/0141-1136(94)00059-X)
- Nakamura, R.M. (1990). Overview and principles of in-situ hybridization. *Clinical Biochemistry*, 23(4), 255-259. doi:10.1016/0009-9120(90)80051-J
- Nebert, D.W. og Gonzalez, F.J. (1987). P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu Rev Biochem*, 56, 945-993. doi:10.1146/annurev.bi.56.070187.004501
- Nebert, D.W., Petersen, D.D. og Fornace, A.J. (1990). Cellular responses to oxidative stress: the [Ah] gene battery as a paradigm. *Environ Health Perspect*, 88, 13-25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1567995/>
- Nebert, D.W. og Russell, D.W. (2002). Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet*, 360(9340), 1155-1162. doi:10.1016/s0140-6736(02)11203-7
- Nelson, D.R. (2011). Progress in tracing the evolutionary paths of cytochrome P450. *Biochim Biophys Acta*, 1814(1), 14-18. doi:10.1016/j.bbapap.2010.08.008
- Nelson, D.R., Goldstone, J.V. og Stegeman, J.J. (2013). The cytochrome P450 genesis locus: the origin and evolution of animal cytochrome P450s. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1612), 20120474. doi:10.1098/rstb.2012.0474
- Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., . . . Nebert, D.W. (1996). P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 6(1), 1-42.
- Nifes. (2015, 05.10.15). Fat storage -The composition of the fish feed affects how lipids are stored in fish. Retrieved from <https://www.nifes.no/en/research-topics/aqua-culture/robust-fish/fat-storage/>
- Olsvik, P.A., Lie, K.K., Sæle, Ø. og Sanden, M. (2007). Spatial transcription of CYP1A in fish liver. *BMC Physiology*, 7(1), 1-10. doi:10.1186/1472-6793-7-12
- Olsvik, P.A., Sjøfteland, L. og Lie, K.K. (2008). Selection of reference genes for qRT-PCR examination of wild populations of Atlantic cod *Gadus morhua*. *BMC Research Notes*, 1(1), 1-9. doi:10.1186/1756-0500-1-47
- Ortiz De Montellano, P.R. (2005). *Cytochrome P450 - Structure, Mechanism, and Biochemistry*: Springer US.
- Ospar. (2009). *Assessment of impacts of offshore oil and gas activities in the North-East Atlantic* (No.453/2009). Retrieved from London: <http://www.ospar.org/documents?v=7154>
- Ostrander, G.K. (2000). *The Laboratory fish*. San Diego, Calif: Academic Press.
- Owens, M.A., Horten, B.C. og Da Silva, M.M. (2004). HER2 Amplification Ratios by Fluorescence In Situ Hybridization and Correlation with Immunohistochemistry in a Cohort of 6556 Breast Cancer Tissues. *Clinical Breast Cancer*, 5(1), 63-69. doi:<http://dx.doi.org/10.3816/CBC.2004.n.011>
- Peakall, D.B. (1994). Biomarkers: The way forward in environmental assessment. *Toxicol. Ecotoxicol. News.*, 1, 55-60.
- Pethon, P. og Nyström, B.O. (1994). *Aschehougs store fiskebok: alle norske fisker i farger*. Oslo: Aschehoug.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45. doi:10.1093/nar/29.9.e45
- Pinkel, D., Landegent, J., Collins, C., Fuscoe, J., Segreaves, R., Lucas, J. og Gray, J. (1988). Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and

- translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(23), 9138-9142. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC282679/>
- Poland, A. og Knutson, J.C. (1982). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 22, 517-554. doi:10.1146/annurev.pa.22.040182.002505
- Pollenz, R.S., Sattler, C.A. og Poland, A. (1994). The aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein show distinct subcellular localizations in Hepa 1c1c7 cells by immunofluorescence microscopy. *Mol Pharmacol*, 45(3), 428-438.
- Pretti, C., Salvetti, A., Longo, V., Giorgi, M. og Gervasi, P.G. (2001). Effects of beta-naphthoflavone on the cytochrome P450 system, and phase II enzymes in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, 130(1), 133-144. doi:10.1016/s1532-0456(01)00231-9
- Reynaud, S. og Deschaux, P. (2006). The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: a review. *Aquatic Toxicology*, 77(2), 229-238. doi:10.1016/j.aquatox.2005.10.018.
- Roche. (2008). DIG Application Manual for Nonradioactive In Situ Hybridization, 4.th edition.
- Russell, W.M.S. og Burch, R.L. (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*. London: Methuen.
- Rønnestad, I., Gavaia, P.J., Viegas, C.S., Verri, T., Romano, A., Nilsen, T.O., . . . Cancela, M.L. (2007). Oligopeptide transporter PepT1 in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): cloning, tissue expression and comparative aspects. *J Exp Biol*, 210(Pt 22), 3883-3896. doi:10.1242/jeb.007898
- Sanger, F., Nicklen, S. og Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463-5467. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/74/12/5463.abstract>
- Schuster, I., Egger, H., Herzig, G., Reddy, G.S. og Vorisek, G. (2003). Combination of Vitamin D Metabolites with Selective Inhibitors of Vitamin D Metabolism. In Reichrath, J., Tilgen, W. og Friedrich, M. (Eds.), *Vitamin D Analogs in Cancer Prevention and Therapy* (pp. 169-188). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Segner, H. (1998). Isolation and primary culture of teleost hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 120(1), 71-81. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S1095-6433\(98\)10012-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1095-6433(98)10012-0)
- Sheridan, M.A. (1988). Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 90(4), 679-690. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0305-0491\(88\)90322-7](http://dx.doi.org/10.1016/0305-0491(88)90322-7)
- Sigma-Aldrich. (2016). Introduction to Blue-White Screening – Background and Protocols for Colony Selection. Retrieved from <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/blue-white-screening.html>
- Smolowitz, R.M., Moore, M.J. og Stegeman, J.J. (1989). Responses of Marine Organisms to Pollutants Cellular distribution of cytochrome P-450E in winter flounder liver with degenerative and neoplastic disease. *Marine Environmental Research*, 28(1), 441-446. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0141-1136\(89\)90276-6](http://dx.doi.org/10.1016/0141-1136(89)90276-6)
- Sobel, J. (1996). *Gadus morhua*. The IUCN Red List of Threatened Species 1996. Retrieved from <http://www.iucnredlist.org/details/8784/0>
- Star, B., Nederbragt, A.J., Jentoft, S., Grimholt, U., Malmstrom, M., Gregers, T.F., . . . Jakobsen, K.S. (2011). The genome sequence of Atlantic cod reveals a unique immune system. *Nature*,

- 477(7363), 207-210.
doi:<http://www.nature.com/nature/journal/v477/n7363/abs/nature10342.html#supplementary-information>
- Stegeman, J.J. og Hahn, M.E. (1994). Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: Current perspectives on forms, functions and regulation of Cytochrome P450 in aquatic species *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives* (pp. 87-204). Boca Raton, FL: Lewis.
- Steinbrecht, R.A. og Zierold, K. (1984). A cryoembedding method for cutting ultrathin cryosections from small frozen specimens. *J Microsc*, 136(Pt 1), 69-75.
- Stuart, H. (2013). *Mechanistic studies of Atlantic cod responses to alkyl-substituted naphthalene and phenanthrene: Current and potential future biomarkers of exposure in atrial and hepatic tissues*. (Master), Universitetet i Bergen, Bergen.
- Sturve, J., Hasselberg, L., Fälth, H., Celander, M. og Förlin, L. (2006). Effects of North Sea oil and alkylphenols on biomarker responses in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquatic Toxicology*, 78(Suppl 1), 73-78. doi:10.1016/j.aquatox.2006.02.019
- Sundt, R.C. og Björkblom, C. (2011). Effects of Produced Water on Reproductive Parameters in Prespawning Atlantic Cod (*Gadus morhua*). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 74(7-9), 543-554. doi:10.1080/15287394.2011.550563
- Søfteland, L., Holen, E. og Olsvik, P.A. (2010). Toxicological application of primary hepatocyte cell cultures of Atlantic cod (*Gadus morhua*) — Effects of BNF, PCDD and Cd. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 151(4), 401-411. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.01.003>
- Taylor, S., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M. og Nguyen, M. (2015). A Practical Approach to RT-qPCR - Publishing Data That Conform to the MIQE Guidelines. *Tech Note*. Retrieved from http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5859.pdf
- Thavarajah, R., Mudimbaimannar, V.K., Elizabeth, J., Rao, U.K. og Ranganathan, K. (2012). Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology: JOMFP*, 16(3), 400-405. doi:10.4103/0973-029X.102496
- Thermo-Fischer. (2008). *260/280 and 260/230 Ratios* Retrieved from <http://www.nanodrop.com/Library/T009-NanoDrop%201000-&NanoDrop%208000-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>
- Timbrell, J. (2000). *Principles of Biochemical Toxicology*. London: Taylor & Francis Ltd.
- Van Noorden, C.J. og Jonges, G.N. (1987). Quantification of the histochemical reaction for alkaline phosphatase activity using the indoxyl-tetranitro BT method. *Histochem J*, 19(2), 94-102.
- Wahlang, B., Prough, R.A., Falkner, K.C., Hardesty, J.E., Song, M., Clair, H.B., . . . Cave, M.C. (2016). Polychlorinated Biphenyl-Xenobiotic Nuclear Receptor Interactions Regulate Energy Metabolism, Behavior, and Inflammation in Non-alcoholic-Steatohepatitis. *Toxicological Sciences*, 149(2), 396-410. doi:10.1093/toxsci/kfv250
- Waxman, D.J. (1999). P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch Biochem Biophys*, 369(1), 11-23. doi:10.1006/abbi.1999.1351
- Whitlock, J.P. (1999). Induction of cytochrome P4501A1. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 39, 103-125. doi:10.1146/annurev.pharmtox.39.1.103

- Wilson, J.M., Vijayan, M.M., Kennedy, C.J., Iwama, G.K. og Moon, T.W. (1998). beta-Naphthoflavone abolishes interrenal sensitivity to ACTH stimulation in rainbow trout. *J Endocrinol*, 157(1), 63-70.
- Yadatie, F., Karlsen, O.A., Eide, M., Hogstrand, C. og Goksøyr, A. (2014). Liver transcriptome analysis of Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to PCB 153 indicates effects on cell cycle regulation and lipid metabolism. *BMC Genomics*, 15(1), 1-14. doi:10.1186/1471-2164-15-481
- Yadatie, F., Karlsen, O.A., Lanzén, A., Berg, K., Olsvik, P., Hogstrand, C. og Goksøyr, A. (2013). Global transcriptome analysis of Atlantic cod (*Gadus morhua*) liver after in vivo methylmercury exposure suggests effects on energy metabolism pathways. *Aquatic Toxicology*, 126, 314-325. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.09.013>
- Young, B., Heath, J.W., Burkitt, H.G. og Wheeler, P.R. (2000). *Wheater's functional histology : a text and colour atlas* (4th ed. by Barbara Young, John W. Heath ; with contributions by Alan Stevens, James S. Lowe ; drawings by Philip J. Deakin. ed.). Edinburgh: Churchill Livingstone.
- Zanger, U.M. og Schwab, M. (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics*, 138(1), 103-141. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>
- Zodrow, J.M., Stegeman, J.J. og Tanguay, R.L. (2004). Histological analysis of acute toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in zebrafish. *Aquat Toxicol*, 66(1), 25-38.

