



Háskólinn
á Akureyri
University
of Akureyri

Auðkenning CYP gena í rjúpu

Auðkenning *CYP1A1* og *CYP1A2* genanna í rjúpu
(*Lagopus muta*) og hönnun genatjáningarprófs

Rakel Birta Guðnadóttir

Auðlindadeild
Viðskipta- og raunvísindasvið
Háskólinn á Akureyri
2021

Auðkenning CYP gena í rjúpu

Auðkenning *CYP1A1* og *CYP1A2* genanna í rjúpunni
(*Lagopus muta*) og hönnun genatjáningarprófs

Rakel Birta Guðnadóttir

12 eininga lokaverkefni í líftækni
sem er hluti af
Baccalaureus Scientiarum-prófi í raunvísindum

Leiðsögukenningar
Kristinn Pétur Magnússon
Olga Ýr Björgvinsdóttir

Auðlindadeild
Viðskipta- og raunvísindasvið
Háskólinn á Akureyri
Akureyri, apríl 2021

Titill: Auðkenning *CYP1A1* og *CYP1A2* genanna í rjúpu (*Lagopus muta*) og hönnun genatjáningaprófs

Stuttur titill: Auðkenning CYP gena í rjúpu

12 eininga bakkalárprófsverkefni sem er hluti af Baccalaureus Scientiarum-prófi í raunvísindum.

Höfundarréttur © 2021 Rakel Birta Guðnadóttir

Öll réttindi áskilin

Auðlindadeild

Viðskipta- og raunvísindasvið

Háskólinn á Akureyri

Sólborg, Norðurslóð 2

600 Akureyri

Sími: 460 8000

Skráningarupplýsingar:

Rakel Birta Guðnadóttir, 2021, bakkalárprófsverkefni, Auðlindadeild, viðskipta- og raunvísindasvið, Háskólinn á Akureyri, 38 bls.

Prentun: Ásprent

Akureyri, apríl, 2021

Ágrip

CYP ensím gegna því lykilhlutverki í að afvirkja eitrefni og stuðla að samvægi í frumuefnaskiptum. Þau hafa fundist í dýrum, plöntum, sveppum, bakteríum og fornbakteríum. Hugmyndir eru uppi um að Cytochrome P450 (CYP) ensím í lifur gætu gengt því hlutverki að brjóta niður eitrefni í plöntum sem íslenska rjúpan neytir, svo hún geti nýtt fæðuna. Markmið verkefnisins var að hanna tjáningapróf fyrir CYP kandiðat gen í rjúpunni. Notast var við nýtt hágæða PacBio erfðamengi, denovo umritamengi og íslensku rjúpunnar (*Lagopus muta*) úr átta vefjagerðum til að staðsetja og skilgreina CYP genin. Einangrað var RNA úr lifur og milta nokkurra rjúpa úr Þingeyjarsýslu sem var umbreytt í cDNA sem var tilraunaefniviður prófsins. Í verkefninu voru staðsett tvö CYP gen, *CYP1A1* og *CYP1A2* og skilgreind bygging þeirra í erfðamengi rjúpunnar ásamt tjáningu í vefjum rjúpunnar. Upplýsingarnar um byggingu genanna og tjáningu þeirra lögðu þannig grunninn að hönnun tjáningarprófsins. Hannaðir voru prímerar í útröðum *CYP1A1* og *CYP1A2*, og tveimur viðmiðunargenum *RPL4* og *GAPDH*. Að lokum voru valin prímerapör sem komu best út í PCR. CYP tjáningarprófið gerir kleift á að skoða einstaklingsbreytileika í tjáningu og mismun í svörun við eitrefnum úr plöntum sem eru til staðar í lifrinni.

Lykilorð: Auðkenning gena, erfðamengi, RNA, PCR, eitrefnalíffræði

Abstract

CYP enzymes play a key role to inactivate xenobiotics and promote homeostasis in metabolism in cells. They have been found in animals, plants, fungi, bacteria and archaea. There are ideas that the Cytochrome P450 (CYP) enzyme in the liver could play the role of degradation toxins in plants that the Icelandic ptarmigan consumes, so she can use this feed. The aim of the project was to design an expression test for CYP candidate genes in rock ptarmigan (*Lagopus muta*). A new high quality PacBio genome, and denovo transcriptomes generated from eight different tissues to define and annotate the CYP genes. RNA was isolated from liver and spleen of several rock ptarmigans from Þingeyjarsýsla and transformed into cDNA, which was the experimental material of the test. In this project CYP1A1 and CYP1A2 were located, and annotated screened for expression. Rock ptarmigan specific primers were designed for CYP1A1 and CYP1A2 together with the reference genes RPL4 and GAPDH. The primer pairs that worked best in PCR were chosen for the expression assay. The expression assay makes examining of individual variability in expression related to genetic variation in the gene possible. In addition, it will be possible to examine the relationship between expression and toxins in the liver.

Keywords: Gene annotation, genome, RNA, PCR, xenobiology

Þakkarorð

Lokaverkefnið mitt er hluti af rannsóknarverkefni Kristins P. Magnússonar sem styrkt er af Rannís, Visterfðamengi rjúpunnar nr. 206529-051.

Ég vil þakka Kristni Pétri Magnússyni og Olgu Ýr Björgvinsdóttur fyrir góða leiðsögn og vera tilbúin til þess að aðstoða mig við gerð þessara verkefnis. Einnig vil ég þakka Laia Bosch De Basea fyrir alla þá aðstoð við verklega þáttinn í þessu verkefni. Öll sú hvatning og trú frá samnemendum á líftæknibraut auðlindaeildar HA, og þá sérstaklega frá Kolfinnu Ólafsdóttur og Diljá Töru Pálsdóttur er ég mjög þakklát fyrir. Þakkir eru til nánustu fjölskyldu minnar sem er alltaf til staðar fyrir mig. Að lokum eru svo sérstakar þakkir til Þuríðar Vigfúsdóttur, föðurömmu minnar sem hefur verið stoð mín og stytta síðustu árin og haft þá trú á mér að ég gæti allt sem ég ætlaði mér. Þessi stuðningur hefur sannarlega skilað sér og væri ég ekki hér í dag að klára mína fyrstu háskólagráðu án hennar.

Formáli

Erfðamengjavistfræði sameinar vistfræði, erfðamengjafræði og þróunarlíffræði og byggir á vísindalegum aðferðum erfðamengjagreininga sem fást við að svara vistfræðilegum spurningum. Í rannsóknarverkefninu „Visterfðamengi rjúpunnar“ sem styrkt er af Rannís er beitt nálgun visterfðamengjafræðinnar til að skilgreina og rannsaka erfðamengi rjúpunnar, í því augnamiði að meta fylgni erfðabreytileika við stofnsveiflur og svipgerð hjá íslensku rjúpunni. Í nýloknu umfangsmiklu langtíma rannsóknarverkefni „Heilbrigði rjúpunnar og stofnsveiflur“ sem var framkvæmd í Þingeyjarsýslu á árunum 2006-2018, var vefjum og gögnum safnað sem eiga sér enga hliðstæðu í heiminum. Í rannsókninni er leitast við að reyna að skilja áhrif innri þátta á borð við breytileika í örverusamfélögum þarma rjúpunnar, gagnvirkt samband plantna og grasætunnar og áhrif eiturefna. Til þess að hægt sé að nýta sér heilsupættina og vefina í gagngerri rannsókn eru notuð erfðamengi og tjáningarmengi. Þá er hægt að útfæra samanburð á erfðamengjum og tjáningarmengjum fyrir rjúpunna með það að markmiði að skilgreina ákveðin svæði í erfðamenginu sem tengjast náttúruvali/aðlögun og til að rannsaka gen sem taka þátt í líffræðilegu ferli á borð við ólífrænt og lífrænt áreiti

Cytochrome P450 (CYPs) er stórfjölskylda ensíma sem innihalda heme sem kófaktor sem virka eins og monooxygeanasar. Í hryggdýrum oxa þessi prótín stera (e. *steroids*), fitusýru og eiturefni (e. *xenobiotics*) og eru mikilvæg í að hreinsa í burt ýmis efnasambönd, einnig við hormónamyndun og í niðurbroti. Í þessu verkefni nýtir rannsakandi sér nýsamsett erfðamengi rjúpunnar til að skima eftir genum með aðstoð lífupplýsingaforrita.

Markmið verkefnisins er tvíþætt. Annars vegar að staðsetja og skilgreina tvö Chytochrome P450 gen í rjúpunni, *CYP1A1* og *CYP1A2* og hins vegar að hanna tjáningarpróf fyrir genin. Væntanlegur ávinningur þessa verkefnis er að rannsaka hlutverk CYP gena í villtum fuglum eins og rjúpunni í að vinna bug á eiturefnum í plöntum sem þær neyta til lífviðurværis.

Aðgangsbann í skólanum vegna Covid hindraði að hægt væri að keyra tjáningaprófið og sömuleiðis vannst ekki tími til að einangra RNA og búa til meira cDNA.

Efnisyfirlit

1	INNGANGUR	1
1.1	RJÚPAN	1
1.2	CYP450	3
	<i>CYP450</i> ENSÍM	4
	<i>CYP450</i> Í FUGLUM.....	5
	<i>CYP1A1</i> OG <i>CYP1A2</i>	6
1.3	PCR OG qPCR	7
1.4	MARKMIÐ OG RANNSÓKNARSPURNING.....	8
2	EFNI OG AÐFERÐIR	9
2.1	NOTKUN LÍFUPPLÝSINGAFORRITA AÐ LEIT AÐ CYP GENI Í RJÚPU	9
2.2	BYGGING GENA SKILGREIND	10
2.3	EINANGRUN RNA, cDNA OG PCR	11
	<i>PCR</i> ERFÐAMENGI RJÚPU	13
2.4	SKYLDLEIKI Í ÞRÓUNARTRÉ.....	13
3	NIÐURSTÖÐUR	15
3.1	<i>CYP1A1</i> OG <i>CYP1A2</i> GENI Í RJÚPU.....	15
3.2	PCR	17
	<i>cDNA</i>	17
	<i>ERFÐAMENGI</i>	19
3.3	ÞRÓUNARTRÉ.....	20
4	UMRÆÐUR	23
5	SAMANTEKT	27
	HEIMILDIR	29
	VIÐAUKAR	33
	<i>VIÐAUKI 1 – SÝNIN ÚR RJÚPUNNI OG CYP1A1/CYP1A4 OG CYP1A2/CYP1A5 ÚR ÖÐRUM TEGUNDUM</i>	33
	<i>VIÐAUKI 2 – CYP1A1 OG CYP1A2 GENARÆÐIR OG AMÍNÓSÝRURÆÐIR RJÚPU OG KJÚKLINGS</i>	35

Myndayfirlit

Mynd 1: Umbreyting CYP gena í ensím (Gates & Davies, 2006).	3
Mynd 2: Bygging CYP1A1 (efri rauða línan) og CYP1A2 (neðri rauða línan) genanna í kjúklingi.	10
Mynd 3: Bygging CYP1A1 gensins í rjúpunni.	15
Mynd 4: Bygging CYP1A2 gensins í rjúpunni.	15
Mynd 5: Staðsetning og bygging CYP1A1 og CYP1A2 ásamt prímerum í rjúpunni.	16
Mynd 6: Staðsetning prímera (græn box) í CYP1A1 rjúpunnar.	16
Mynd 7: Staðsetning prímera (græn box) í CYP1A2 rjúpunnar.	16
Mynd 8: PCR með CYP1A1 short prímerapari á cDNA úr lifur.	18
Mynd 9: GAPDH PCR á cDNA úr lifur	18
Mynd 10: RPL4 PCR á cDNA úr lifur og milta	19
Mynd 11: PCR úr erfðamengi (gDNA) rjúpunnar	20
Mynd 12: Maximum Likelihood tré fyrir <i>CYP1A1</i> og <i>CYP1A2</i> . Skammstafanirnar í heitum raðanna standa fyrir latnesku heiti lífveranna.	21

Töfluyfirlit

Tafla 1: Prímerapör sem voru hönnuð út frá erfða-og umritamengi rjúpunnar	11
Tafla 2: Stærð gena og fjöldi exona á CYP1A1 og CYP1A2 í rjúpunni	15
Tafla 3: Styrkur cDNA úr milta og lifur rjúpunnar	17
Tafla 4: Þyngd rjúpusýna úr milta og lifur	33
Tafla 5: CYP1A1 og CYP1A2 gen kjúklings	33
Tafla 6: Númerin fyrir tré	34

1 Inngangur

Fuglar verða fyrir margvíslegum eiturefnum (e. *xenobiotics*) í náttúrunni á lífsleiðinni, það geta m.a. verið lyf, varnarefni (e. *pesticides*) og þungmálmur (Kawai o.fl., 2019). Ekki er gert ráð fyrir að eiturefnin séu í líkamanum og eru venjulega því ekki framleidd þar (Gu & Manautou, 2012). Sum eiturefnin eru efnaskiptalega virkjuð, þar sem efnasambönd efnanna breytast af völdum CYP og milliefnin frá því valda heilsutruflun (Kakehi o.fl., 2015). Efnaskipti eru mikilvægasti þátturinn til að spá fyrir um efnafræðilega næmni og það felur í sér hvötun með mörgum ensímum sem stuðla að efnaskiptum eiturefna. Lifrin gegnir mikilvægu hlutverki í efnaskiptum á eiturefnum strax eftir frásog þeirra úr meltingarvegi. Lifrin hefur einnig mesta fjöldann af ummyndunar ensímum (e. *biotransformation enzymes*) allra líffæra, þess vegna hefur hún það lykilhlutverk að afvirkja eiturefni og vernda gegn eiturefnaáhrifum (Gu & Manautou, 2012). Cytochrome P450 monooxygenase kerfið í lifur oxar eiturefni og önnur skaðleg efni og er því lykilþáttur í lifrinni (Lorr o.fl., 1992).

1.1 Rjúpan

Fuglategundir eru töluvert breytilegar, og fer það eftir fæðu, sérstakri aðlögun og dreifingu um allan heim. Því verða fuglar fyrir fjölbreytilegum eiturefnasamböndum, svo sem lyfjum og umhverfisefnum. Fuglar eru gagnlegir fyrir rannsóknir á erfðamengja- og erfðaþróun vegna þess að þeir eru þróunarlega á milli spendýra og lægri flokka (Ren o.fl., 2019).

Rjúpan (*Lagopus muta*) er hæsnafugl (*Galliformes*), og mynda hæsnafuglar stóran og alþjóðlegan hóp sem samanstendur af meira en 250 tegundum sem finnast í næstum öllum heimsálfum um allan heim (Dyke o.fl., 2003). Rjúpan flokkast svo í undirætt orrafugla (*Tetraoninae*), sem dreifast umhverfis norðurhvel jarðar og eru venjulega aðgreindir frá öðrum hæsnafuglum með aðlagaða formgerð að köldu umhverfi og atferliseiginleika sem tengjast vönduðu tilhugalífi (Dimcheff o.fl., 2002; Náttúrufræðistofnun Íslands, e.d.; Salgado-Flores o.fl., 2019).

Íslenska rjúpan er staðfugl sem ferðast innanlands oft landshorna á milli, bæði á haustin og vorin. Hún er útbreidd og algengur varpfugl. Rjúpan er jurtaæta og breytist fæðuval hennar innan árs þar sem fæðuframboð er mismunandi á sumrin og veturna. Á sumrin og haustin étur hún aðallega lauf, blóm, ber og fræ en á veturna étur hún aðallega runna. Vetrafæðan er því grófari, trefjaríkari og tormeltari sem endurspeglar breytingar í meltanleika fæðunnar. Meltingakerfi rjúpunnar stækkar á haustin og er stærst yfir veturinn og minnkar svo aftur á vorin og er minnst yfir sumarið. Rjúpan hefur þá tilhneigingu að byrja að borða vetrafæðu á haustin áður en veturinn kemur, í þeim tilgangi að undirbúa sig fyrir harðari vetrafæðu. Þá stækkar meltingakerfið í takt við trefjainnihald fæðunnar (Náttúrufræðistofnun Íslands, e.d.; Stokkan, 1992).

Fæða rjúpunnar er því mismunandi eftir árstíðum, en hún inniheldur aðallega plöntur eða hluta af plöntum með hátt næringargildi, og einnig eitruð annars stigs umbrotsefni plantna, hér eftir kallað PMS (e. *plant secondary metabolites*). Flestar plöntutegundir innihalda flókna samsetningu eiturefnablöndu af mismunandi PMS, eins og fenólum, flavonóíðum (e. *flavonoids*) og terpenóíðum (e. *terpenoids*). Þessi efnasambönd hindra bragðgæði og meltanleika í meltingarvegi hryggdýra og eru talin hafa þróast sem efnavörn fyrir jurtaætur og hafa því oft fælandi áhrif fyrir þær. Út frá mynstri jurtaæta á fóðurvali er talið að þær forðist þessi efnasambönd. PMS eru í meira magni í fæðu rjúpunnar að vetri til, sem getur hamlað meltinguna og í sumum tilfellum getur það jafnvel valdið eitrunaráhrifum (Liukkonen-Anttila o.fl., 2003; Oh o.fl., 2019; Salgado-Flores o.fl., 2019). Þær fuglategundir sem nýta sér fæðu með PMS hafa bæði atferlis- og lífeðlisfræðilega mótaðlögun (e. *counter-adaptions*) sem draga úr áhrifum þess. Með lífeðlisfræðilegri aðlöguninni eru myndun af minna hvarfgjörnum samsettra efnasambanda, aðlögun á umhverfi, líkt og pH, til að hindra að efnahvörf og niðurbrot eigi sér stað í þörmunum. Sem leiðir til þess að óvirk eða niðurbrotin efnasambönd verði minna skaðleg eftir frásog. Ef þessar varnaraðferðir mistakast og frásog þessara efnasambanda verða, verður lifrin aðal staðurinn fyrir frekari afeitrun (Goldstone o.fl., 2007; Liukkonen-Anttila o.fl., 2003; Oh o.fl., 2019).

1.2 CYP450

CYP stórfjölskyldan inniheldur fleiri en 13.000 gen sem tákna yfir 400 genafjölskyldur sem má finna í öllum líffræðilegum ríkjum. CYP ensímin eru tilnefnd með bókstöfunum „CYP“ og tölu sem tákna CYP fjölskylduna (t.d. CYP1, CYP2, CYP3). Þessu fylgir svo bókstafur sem gefur til kynna undirfjölskylduna (t.d. CYP1A) og þar á eftir kemur tala sem tákna einstakt gen/samsætuensím/ísóform (t.d. CYP1A1). Þannig vísar CYP1A1 til CYP fjölskyldu 1, undirfjölskyldu A og próteins 1 í undirfjölskyldu. cDNA er skrifað skáletrað (*CYP1A1*) en mRNA og próteinin táknuð með venjulegum hástöfum (*CYP1A1*) (Manikandan & Nagini, 2017).

CYP er flokkað í tvo megin flokka, þeir sem taka þátt í af virkjun eitrefna og þeir sem taka þátt í líffræðilegri myndun innrænna efnasambanda (Manikandan & Nagini, 2017). Tjáning CYP er undir umritunarstýringu af mörgum hvarfgöngum (e. *mechanism*) og þáttum, svo sem erfðafræðilegusniði, eitrefnum, ónæmisboðefni (e. *cytokine*), hormónum, efnaskiptum, mataræði og sjúkdómsástandi og aldri (Ren o.fl., 2019).

Cytochrome P450 monooxygenases er flokkur ensíma sem nota upphafsrafeindir frá NADH (e. *nicotin amide adenine dinuclotide*) til að oxu ákveðin sameindarhvarfefni. Flestar heilkjarnategundir búa yfir mörgum CYP genum sem kóða fyrir mismunandi CYP450 ensímum. Sum CYP gen kóða ensím sem að gerir ákveðnum efnasamböndum kleift að umbrotna (e. *metabolized*) til að verða næmari (e. *reactive*) fyrir stórsameindum. Stafirnir CYP tilgreina bæði genið og próteinið sem það kóðar. Þá er t.d. *CYP1A1* genið sem kóðar fyrir Chytochrome P450 1A1 ensíminu. Umritunarstýringa tjáningu CYP450 má sjá á mynd 1, sem sýnir umbreytingu og þýðingu á CYP50 geni sem verður að tilteknu CYP ensímpróteini (Gates & Davies, 2006).



Mynd 1: Umbreyting CYP gena í ensím (Gates & Davies, 2006).

CYP450 ensím

Cytochrome P450 (P450, CYP) ensím voru uppgötvuð snemma á sjöunda áratugnum (Guengerich o.fl., 2016). CYP ensímin eru himnubundin blóðprótein (e. *hemoproteins*) sem gegna lykilhlutverki í að afvirkja eitrefni og stuðla að samvægi í frumuefnaskiptum. Þau mynda stórfjölskyldu af blóðpróteinum sem hafa fundist í dýrum, plöntum, sveppum, bakteríum og fornbakteríum því má áætla að CYP ensím megi finna í öllum lifandi tegundum á jörðinni (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001; Manikandan & Nagini, 2017). CYP ensím gegna einnig lykilhlutverki í oxunar ummyndun á innrænum (e. *endogeneous*) og útrænum (e. *exogeneous*) sameindum (Meunier o.fl., 2004). Í spendýrum má finna CYP ensím í öllum vefjum með mesta styrk í lifur og smápörnum. Þetta eru himnubundin prótein sem eru í miklum mæli í lifrinni og spila stórt hlutverk í myndun gallskýru og efnaskiptum utanaðkomandi efnasambanda svo sem lyfja, umhverfismengunarefna og krabbameinsvaldandi efna (Manikandan & Nagini, 2017). Hlutverk CYP ensíma eru mörg og eru þau tengd við þörfina fyrir ákveðin hlutverk. Hjá bakteríum getur fjöldi CYP tegunda verið allt að 20 í einni tegund en í mönnum eru áætluð allt upp í 60 tegundir CYP ensíma. Að því sögðu getur heildarfjöldi CYP ensímtegunda í plöntum verið allt að 300 talsins. CYP ensím í plöntum hafa tvö meginhlutverk annars vegar myndun litarefna og hins vegar myndunar eitrefna sem vörn gegn til dæmis jurtaætum (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001).

CYP ensím hefur leikið stórt hlutverk í þróunarsögu dýra og plantna þegar þau stóðu frammi fyrir miklum breytingum á ytra umhverfi. Þegar plöntur fluttu úr vatnsumhverfi yfir á þurrlandi þróuðust ný CYP til að gera plöntum kleift að lifa á landi. Í kjölfar plantna fluttust dýr einnig úr sjó eða yfir á þurrlandi. Mörg þessara dýra voru jurtaætur og plönturnar sem þegar höfðu sest að og dafnað á landinu þurftu að búa til nokkrar varnaraðferðir til að vernda sig gegn árásum ýmissa jurtaæta. Einn árangursríkasti varnarmátinn var að framleiða ný umbrotsefni sem eru eitruð eða slæm fyrir jurtaætur. Tilurð næstum allra þessara baeliefna (e. *allelochemicals*) krafðist P450-hvata hvarfs og fjölmörg ný CYP komu fram og voru notaðar til að mynda fjölbreytt úrval eittraða baeliefna hjá ýmsum plöntum. Á hinn bóginn þurftu jurtaætandi dýr að afeitra sameindaefnin í matvælum til að borða og lifa af og þróuðu ýmsar afeitrunaraðferðir, þar sem P450-hvata oxandi afeitrun var lykilatriði (Omura, 2018).

Eitrefnaumbrot CYP eru fyrst og fremst tjáð í lifur og mikilvægustu CYP ísóensímin tilheyra fjölskyldunum CYP1-3. mRNA tjáningarstig CYP er í fylgni við ensímvirkni þeirra, en hver fylgni

fer eftir CYP ísóforminu (Temesvári o.fl., 2012). Ísóensím eru breytileg form af sömu ensímvirkni sem er í mismunandi stærð í mismunandi vefjum. Ísóensím eru mismunandi hvað varðar samsetningu og röð amínósýru. Tjáning þeirra í tilteknum vef er virkni á stjórnun á geninu fyrir viðkomandi (eða hlutaðeigandi) undireiningu (eða byggingareining). Hvert ísóensím hefur mismunandi hreyfi og/eða stjórnunareiginleika sem endurspeglar hlutverk þess í þeim vef (Pelley, 2012).

CYP450 í fuglum

Ummyndun (*e. biotransformation*) vísar til þess ferils þar sem utanaðkomandi eiturefni eða innræn efni eru umbrotin af ensímum í efni sem verða frábrugðin hvað varðar útskiljun (*e. excretability*) (vatnsfælin vs. vatnssækin), líffræðilega virkni (virkjun vs. óvirkjun) og eituráhrif (afeitrun vs. eitrun) (Rourke & Sinal, 2014). Ummyndunarkerfið í lifur samanstendur af virkni Cytochrome P450 (CYP) ensíma og tengingarefnaskipta (*e. conjugation reactions*) sem er talið mikilvægasta ferlið gegn eitrun í jurtaætum. Með að draga úr áhrifum eiturefna á sér stað afvirkjun eiturefna í lifrarensímum í Cytochrome P450 stórfjölskyldu. Það eru þá sérstaklega CYP1 og CYP2 fjölskyldan sem eru talin mikilvægust fyrir ummyndun og er skýr fjölbreytileiki innan og utan tegundar í tilgreindum próteinkóðandi genum talið endurspeglar niðurstöðurnar á samþróunar aðlögunarkapphlaupi á milli plantna og jurtaæta (Goldstone o.fl., 2007; Liukkonen-Anttila o.fl., 2003; Oh o.fl., 2019).

Misjafnt er hvernig hæfni efnaskipta er varðandi afvirkjun á eiturefnum bæði innan og á milli lífvera. Hjá fuglum er Cytochrome P450 ensímkerfið nátengt fóðurvenjum tegundar, með sérhæfðum kröfum um ensímafeitrun á eiturefnum í fæðunni. Tegundir sem borða einsleita fæðu hafa litla monooxygenase virkni gagnvart eiturefnum, en fjölbreytt fæða (t.d. alætur) skilar meiri virkni. Ránfuglar hafa lægri gildi heldur en aðrir fuglar, þar sem þeirra fæða er einsleitari. Fuglategundir sem nærast á mismunandi mataræði, geta þó haft svipaða ummyndunarvirkni í lifur eins og hver önnur (Liukkonen-Anttila o.fl., 2003).

Rannsóknir á CYP í fuglategundum munu veita nýja innsýn í eiturefnaskiptum fugla og CYP fjölskylduna. Hins vegar er þekking á auðkenni og tjáningar einkennum á CYP genum fugla takmörkuð fyrir undirfjölskyldur CYP1-3. En undirfjölskyldur CYP1-3 eru helstu eiturefnaskipta ensímin og eru fyrst og fremst tjáð í lifur (Ren o.fl., 2019).

CYP1A1 og CYP1A2

CYP í genafjölskyldu 1 hafa víðtæka sækni fyrir fjölrhringjum (e. *polycyclic*), oft halógenaða, arómatísk kolvetni og einnig arómatísk amín og nokkur innræn hvarfefni. CYP1 gegna mikilvægu hlutverki bæði við að miðla og draga úr líffræðilegum áhrifum þessara efna og geta ákvarðað sóttnæmi fyrir eituráhrifum eða sjúkdómum (Goldstone & Stegeman, 2006). Undirfjölskyldur CYP1 hryggdýra eru CYP1A, CYP1B, CYP1C og CYP1D, en ekki hafa allir ættleggir hryggdýra allar undirfjölskyldurnar. Spendýr hafa þrjú CYP1 gen: CYP1A1, CYP1A2 og CYP1B1. Hryggdýr önnur en spendýr hafa gen úr öllum undirættum CYP1A. Líkt og spendýr hafa fuglar tvö CYP1A gen á meðan froskdýr og fiskar hafa eitt CYP1A gen, að undanskildum fjöllitna tegundum, sem eru meðal annars laxfiskar og sumir froskar (Goldstone o.fl., 2007; Scornaienchi o.fl., 2010)

CYP1A undirfjölskyldan virðist hafa átt upptök snemma í ætt hryggdýra. Fiskar sem bera CYP1A deila marktækri röð sem svipar til bæði CYP1A1 og CYP1A2 en eru taldir líkari CYP1A1 á grundvelli þess að hafa örlítið hærra stig af pörun og líkara í tjáningarmynstri. Talið er að CYP1A1 og CYP1A2 hafi klofnað eftir að landdýr skildu frá fiskum fyrir um 400 milljónum ára (Caroll, 1988; Goldstone & Stegeman, 2006; Morrison o.fl., 1995)

Fuglar hafa einnig tvö CYP1A gen í ísóformi. Kjúklingurinn (*Gallus gallus*) sem er eitt af mikilvægustu líkönnum fuglategunda hefur tvö CYP1A gen (CYP1A4 OG CYP1A5) sem eru orthologous við CYP1A1 og CYP1A2 spendýra, gen sem hafa aðskilist með tegundaskiptingu og hafa þau svipuð hvataeinkenni. Ensímvirkni CYP1A kjúklinga ætti ekki að vera einfaldlega ályktuð út frá CYP1 spendýra vegna mun á tegundum. CYP1A í kjúkling eru sítjáð í lifur og eru ensímin virkjuð af utanaðkomandi efnasamböndum eins og 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) og fleiri skyldum efnasamböndum, sem er áhyggjuefni fyrir heilsu umhverfisins (Gilday o.fl., 1996; Lee o.fl., 2009; Yang o.fl., 2013). Bindlar (e. *ligands*) eins og TCDD bindast við aryl hydrocarbon (AH) viðtaka í frymisvökva, sem kemur af stað flutningi þess í kjarnann. Í kjarnanum er virkjað AH viðtaka af bindli sem vinnur með aryl hydrocarbon nuclear translocator (ARNT) og hafa samskipti við varðveitta eitrefna svörunarþætti (XRE) (e. *xenobiotic response elements*) staðsett í 5' nærliggjandi röð á CYP1A1 geninu. Þættir sem leiða til aukinnar tjáningar á CYP1A1 geninu eru m.a. AHR/ARNT samhliða XRE í CYP1A1 stýril (e. *promoter*) og eftirfarandi

nýliðun á samvinnu og almennir umritunarþættir leiða til aukinnar tjáningar á CYP1A1 geninu (Lee o.fl., 2009).

Framköllun á CYP1 hvatavirkni (e. *catalytic activity*) getur verið mæld sem ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) virkni, og tjáning (próteina og umritunar) hafa verið mikið notuð sem lífmerki fyrir útsetningu og áhrifum á planar halógenaða arómatísk kolvatnsefni (e. *planar halogenated aromatic hydrocarbons*) í hryggdýrum (Scornaienchi o.fl., 2010). Virkni EROD í CYP1A1 og CYP1A4 er um það bil tífalt meiri en CYP1A2 og CYP1A5, CYP1A2 og CYP1A5 spila stóran þátt á uroporphyrinogen oxun (Goldstone & Stegeman, 2006; Yang o.fl., 2013).

Bæði CYP1A4 og CYP1A5 eru virkjuð með AH viðtaka bindli líkt og TCDD og sýna hvata sérhæfni annað hvort fyrir efnaskipti innrænna efnasambanda eða fyrir umbreytingu á eiturefnum. Út frá rannsóknum Yang o.fl. (2013) sýndi CYP1A5 í kjúkling meiri virkni á litlum hvarfefnum heldur en CYP1A4 og lítil efni sýna sterkari hömlun á MROD virkni á CYP1A5 heldur en CYP1A4. Mismunur á sérhæfingu hvarfefna og hindrunar vali ræðst af breytingu á amínósýruröðum þeirra, sem gæti skýrst að hluta til af byggingarröðun á samsvörun líkananna sem sýna þéttari virkni staðbundins CYP1A5 heldur en CYP1A4.

1.3 PCR og qPCR

PCR (polymerase chain reaction) er aðferð sem hægt er að nota til þess að fjölfalda ákveðin bít af DNA. Þá er hægt að greina og bera kennsl á genaraðir með því að nota sjónræna tækni byggða á stærð og hleðslu. Fyrir PCR greiningu þarf DNA sýni, prímera, núkleótíð og DNA pólýmerasa. DNA pólýmerasinn er lykilensímið sem tengir einstök núkleótíð saman til að mynda PCR afurðina. Núkleótíðin fela í sér fjóra basa – adenín, týmín, cytósín og gúanín (A,T,C og G), sem finna má í DNA og virka þeir sem byggingaeiningar sem eru notaðir til að búa til PCR afurðina. Prímerarnir í hvarfinu tilgreina DNA bítinn sem á að magna. Prímerarnir eru stuttir DNA bútar með passa við röðina í erfðamenginu sem á að magna. Algengasta aðferðin við greiningu PCR afurðarinnar er rafdráttur á agarósa geli, það aðskilur DNA afurðina út frá stærð og hleðslu. Afurðin er þá keyrð samtímis með viðmiðunarmarki (e. *ladder*) af þekktri stærð á gelinu sem er stöðluð til að hjálpa við greiningu á stærð afurðarinnar (Garibyan & Avashia, 2013).

qPCR (quantitative real-time PCR) gefur til kynna hversu mikið af tilteknu DNA eða geni er til staðar í sýninu. Með qPCR er bæði hægt að greina og magna PCR afurðina í rauntíma og

gagnlegt til að rannsaka tjáningu gena. Tvær aðferðir eru almennt notaðar til að greina og magna afurðina, önnur þeirra er að nota ósértækt flúrljómandi litarefni sem binst við tvíþátta DNA og hin notar sértæka röð DNA þreifara sem samanstendur af fákirnum sem eru merkt með flúrljómun, þá verður aðeins greining eftir blöndun á þreifurum við samfallandi röð þeirra.

Fyrir rannsókn á tjáningu á geni þá er notað RT-qPCR (reverse-transcriptase qPCR), þá þarf að einangra RNA og umbreyta því í cDNA. Það er gert vegna þess að magn RNA er tengt við umritun á geninu sem áhugi er fyrir, þ.e. hvort kveikt er á því og hvort það sé tjáð, þá er hægt að fá að vita hversu mikið genið er tjáð við ákveðin skilyrði. Þegar verið er að rannsaka genatjáningu er mikilvægt að hafa viðmiðunargen til samanburðar á tjáningu á geninu sem á að skoða. Yfirleitt eru notuð viðmiðunargen sem eru grundvallaratriði fyrir lífveru og er síjtáð sem breytist ekki mikið við mismunandi áreiti í umhverfinu þar sem það getur haft áhrif á tjáningu á geninu sem á að skoða (Garibyan & Avashia, 2013; Maddocks & Jenkins, 2017).

1.4 Markmið og rannsóknarspurning

Markmið verkefnis er tvíþætt, annars vegar að finna CYP gen í lifur rjúpunnar sem gegnir því hlutverki að brjóta niður eitrefni í plöntum og staðsetja það og skilgreina. Hins vegar að hanna tjáningapróf (qPCR) fyrir CYP kandídat genið í rjúpunni. Væntanlegur ávinningur þessa verkefnis er að rannsaka hlutverk CYP gena í villtum fuglum eins og rjúpunni í að vinna bug á eitrefnum í plöntum sem þær neyta til lífviðurværis.

2 Efni og aðferðir

Skimað var eftir CYP genum sem eru tjáð í lifur rjúpunnar með erfðamengi og umritamengi hennar. Notaðar voru CYP genaraðir úr kjúkling til að blasta erfða- og umritamengi rjúpunnar staðbundið í CLC genomics workbench til að finna samsvarandi raðir í erfðamengi og umritamengjum. Við blöstun fannst umrit gensins í rjúpu sem síðan er notað til að blasta erfðamengi rjúpunnar til að staðsetja genið.

Þegar búið er að staðsetja genin var bygging gena skilgreind, notast var við Augustus forritið. Við keyrslu forritsins var notað umrit sem fengið var úr rjúpunni með blöstun á mRNA röð kjúklings ásamt litningabút gensins úr erfðamengi rjúpunnar. Hannaðir voru prímerapör fyrir genið fyrir PCR greiningu. Þá þurfti að einangra RNA erfðaefni úr vefja sínum úr lifur og milta úr rjúpunni og búið var til cDNA (complementary DNA) með öfugri umritun.

Útbúið var skyldleika þróunartré fyrir genin í CLC genomics workbench.

2.1 Notkun lífupplýsingaforrita að leit að CYP geni í rjúpu

“In silico” leit var framkvæmd í CLC genomic workbench v21 (Qiagen) þar sem notast var við erfðamengi sem hafa verið búin til úr íslenskum rjúpum úr N-Þingeyjarsýslu þ.e. erfðamengi úr DNA með PacBio SMRT raðgreiningatækni (LifSciLab, Uppsala, Svíþjóð) og umritamengi úr átta vefjum úr RNA (Íslensk Erfðagreining ehf., Reykjavík) sem var raðað saman með de novo aðferð í CLC. Við leitina voru notaðar CYP genaraðir úr kjúkling sem sóttar voru úr NCBI gagnabanka (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) og notaðar til að blasta erfða- og umritamengi rjúpunnar staðbundið í CLC genomics workbench, til að finna samsvarandi raðir í erfðamengi og umritamengjum. Sérstök áhersla var lögð á að finna gen sem voru tjáð í lifur rjúpunnar til að hægt væri að hanna tjáningarpróf á cDNA úr lifur. Lögð var áhersla á að skima eftir CYP genum sem talin eru líkleg til að taka þátt í niðurbroti eitrefna úr plöntum. Eftir umfangsmikla skimun

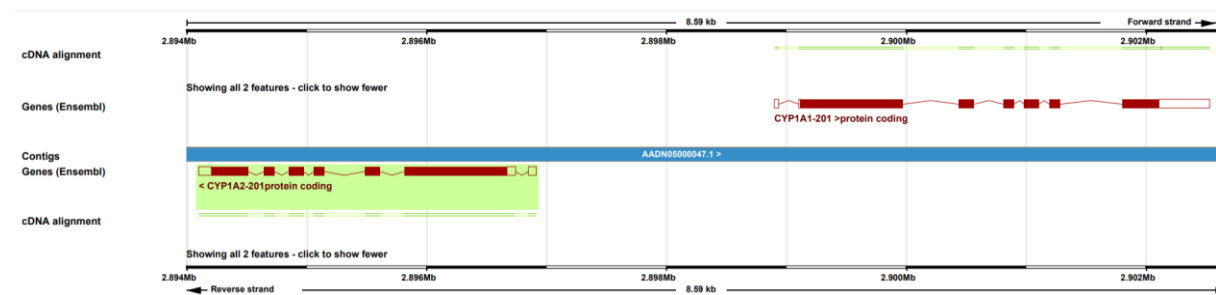
fyrir álitlegum CYP genum í umritamengi urðu systurgenin CYP1A1 og CYP1A2 (samsvarandi nöfn á þeim genum í fuglum er CYP1A4 og CYP1A5) fyrir valinu.

Þegar gen eru staðsett og samsetning þeirra skilgreind í nýsamsettu erfðamengi (rjúpunni) þá er eftirfarandi skrefum fylgt í grundvallaratriðum. Umriti eða amínósýruröð kandídatgens úr skyldri tegund er blastað í umritamengi rjúpunnar. Við blöstin finnst umrit gensins sem síðan er notað til að blasta erfðamengi rjúpunnar til að staðsetja genið í erfðamenginu. Næst er erfðamengjábútur sem inniheldur allt genið notaður til að skilgreina introns (í. *innraðir*) og exons (í. *útraðir*)

Tekið var afrit rjúpunnar með bestu samsvörun fyrir genið. Afrit gensins var blastað með öllu erfðamengi rjúpunnar til að finna röðina (e. *contig*) sem samsvarar bæði CYP1A1 og CYP1A2 í rjúpunni. Notast var við fengna erfðamengja röð til frekari greiningar. GAPDH og RPL4 úr kjúkling var notað sem viðmiðunargen (e. *reference gen*), gen sem stjórnar virkni og er sameiginleg mörgum frumugerðum.

2.2 Bygging gena skilgreind

Til þess að staðsetja exon og intron CYP1A1 og CYP1A2 genanna í rjúpu var notast við Augustus forritið (augustus.gobics.de). Við keyrslu forrítisins var notað umrit sem var fengið úr lifur rjúpu með blöstin á mRNA röð kjúklings frá Ensembl (ensembl.org) ásamt litningabútur úr erfðamengi rjúpunnar sem innihélt þá annaðhvort CYP1A1 eða CYP1A2 genið. Á mynd 2 má sjá byggingu CYP1A1 og CYP1A2 í kjúkling.



Mynd 2: Bygging CYP1A1 (efri rauða línan) og CYP1A2 (neðri rauða línan) genanna í kjúklingi.

2.3 Einangrun RNA, cDNA og PCR

Einangrað var RNA erfðaefni úr 5 lifrarsýnum og 4 miltasýnum úr rjúpu með Maxwell® RSC simplyRNA Tissue Kit (promega). Búin var til lausn af 40 µL af 1-Thioglycerol og 1960 µL af Homogenization solution. 200 µL af lausninni var svo komið fyrir í 2 mL Eppendorfglös. Lifrarsýni og miltasýni voru tekin og vigtuð, u.þ.b. 15 mg af lifrarsýnum og 10 mg af milta. Þeim var komið fyrir í viðeigandi Eppendorf glas. Til þess að leysa vefinn upp voru þau hituð í 70°C í 2 mín og vortexað hvert sýni í um 1-3 mín til þess að merja vefina betur. Því næst var bætt 200 µL af Lysis Buffer í hvert glas og 25 µL af Proteinase K og hvert sýni vortexað í 20 sek. Sýnin biðu við herbergishita í 10 mínútur. 400 µL af sýni var sett í viðeigandi brunn í deck tray. Búið var til “complementary DNA” með öfugri umritun með High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (AppliedBiosystem). Búið var til 2X RT hvarfblöndu með RNase inhibitor. Fyrir hvert sýni þurfti 10 µL af master mixinu. Magn cDNA var mælt til að meta hreinleika DNA. Gleyfnin er notuð til þess að meta hreinleika DNA og hlutfall yfir 1,8 er almennt viðurkennt sem „hreint“ DNA og hlutfall yfir 2 er almennt viðurkennt sem „hreint“ fyrir RNA. Hlutfall 260/230 er gildi fyrir „hreina“ kjarnsýru og eru oft hærri en 260/280, þau eru almennt á bilinu 1,8-2,2 (*Nucleic Acid Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers*, 2010).

Hannaðir voru prímerar fyrir CYP1A41, CYP1A2, GAPDH og RPL4 fyrir PCR (Polymerase Chain Reaction). Notað var Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) til þess að hanna prímera fyrir PCR greiningu á CYP1A1 og CYP1A2 genunum í rjúpunni og einnig aðlagð prímera að rjúpunni sem hafa verið notaðir fyrir genin í kjúkling (sjá töflu 1 í viðauka 1). Fundin voru PCR skilyrði með NEB online TM reiknivél (<https://tmcaculator.neb.com/#!/main>). Í töflu 2 má sjá prímeranna sem hannaðir voru fyrir genin.

Tafla 1: Prímerapör sem voru hönnuð út frá erfða-og umritamengi rjúpunnar

Target gene	Primers (5'-3')	PCR afurð út frá cDNA (bp)	PCR afurð út frá gDNA
CYP1A1	F: CCCAAGAACACCTGCGTATT	152	
short	R: GCCAAAGATCACCTTGT		

CYP1A2-1	F: GGACCGCTGCGTGTTTAT	193	326
NCBI	R: CTCCCCTTGCCTATGTTTT		
CYP1A2-2	F: AAATACGGGGATGTGATGGA	175	175
PRIMER3	R: TGTCAGTGCTGAAGGTCAGG		
CYP1A1-1	F: TGTTTGCCCCAACCAAGACT	145	389
NCBI	R: AAGGCAGCGTACAATATGCA		
CYP1A1-2	F: TCCCGAATGTGCTCCTTATC	164	
PRIMER3	R: GATGTGACTGCTGCTGGAAA		
RPL4	F: TGTTTGCCCCAACCAAGACT	136	175
	R: TCCTCGATGCGGTGACCTTT		
GAPDH	F: GATCCCTTCATCGATCTGAA	77	
	R: ACAGTGCCCTTGAAGTGTCC		

Fyrir PCR var notast við 5 cDNA sýni úr lifur rjúpunnar og 4 cDNA úr milta hennar. Búið var til PCR blöndu fyrir Tag polymerase frá New England Biolabs (NEB), 1 µL af cDNA í loka rúmmáli af 25 µL hvarfblöndu (2,5 µL af 10X buffer, 2 µL dNTP, 1,5 µL af forward prímer og reverse prímer, 0,2 µL Tag polymerase og ddH₂O þar til loka rúmmál er 25 µL). Notað var ddH₂O sem neikvæðan kontról og 100 bp viðmiðunarmörk (e. *ladder*) (NEB) notað sem samanburður á sýnunum. Fyrir öll genin var notað tækið Thermal cycler (SimpliAmp™ ABI) fyrir PCR og eftirfarandi hitastig notað í keyrslu þess:

CYP1A1 short: (95°C í 1 mín, 35 hringir af 95°C í 15 sek, 52°C í 20 sek, 60°C í 30 sek og að lokum 60°C í 7 mín og átt var von á 152 bp bút og keyrt var á 4% agarósa geli við 120 V í 30 mín.

GAPDH: 95°C í 30 sek, 35 hringir af 95°C í 15 sek, 60°C í 30 sek og 68°C í 30 sek og að lokum skrefið 68°C í 7 mín og átt var von á 77 bp bút og var keyrt á 3% agarósa geli við 120V í 45 mín.

RPL4: 95°C í 1 mín, 35 hringir af 95°C í 15 sek, 60°C í 15 sek og 72°C í 30 sek og að lokum 72°C í 7 mín og átt var von á 136 bp bút og keyrt var á 4% agarósa geli við 120 V í 30 mín.

PCR erfðamengi rjúpu

Fyrir PCR úr erfðamengi rjúpunnar var notast við prómera CYP1A1-1, CYP1A2-1, CYP1A2-2 og RPL4. Notað var DNA úr þremur rjúpnafuglum G1: LM09-012, G2: LM10-198 og G3: LM18-43. Sýnin voru sett í thermal cycler og sett á: 95°C í 1 mín, 35 hringir af 95°C í 15 sek, 60°C í 15 sek og 72°C í 30 sek og að lokum 72°C í 7 mín og voru þau voru keyrð á 2% agarósa geli við 120 V í 30 mín. Þá var átt von á 389 bp frá CYP1A1-1, 326 bp frá CYP1A2-1, 175 bp fyrir bæði CYP1A2-2 og RPL4. Gelunum komið fyrir undir UV ljósi og myndir teknar.

2.4 Skyldleiki í þróunartré

Búið var til eitt þróunartré með heilum röðum fyrir annars vegar CYP1A1 og hins vegar CYP1A2 sem voru fundnar inn á gagnagrunn NCBI fyrir aðrar fuglategundir, mýs, fiska og menn. Þá er hægt að bera genin saman úr mismunandi tegundum og sjá hvaða tegund er líkust rjúpunni fyrir þessi gen. Raðirnar voru bornar saman og klippt af báðum endum þar sem svæði voru lítið samræmd. Notað var Maximum likelihood tree tool í CLC genomics workbench. Framkvæmdaraðferðin var Neighbor Joining, protein substitution model var WAG.

3 Niðurstöður

3.1 CYP1A1 og CYP1A2 gen í rjúpu

Fundin voru bæði CYP1A1 og CYP1A2 gen í rjúpunni. Exons og introns voru greindar með Augustus forritinu, genaröð rjúpunnar var sett inn og amínósýruröð kjúklings. Uppbygging genanna var síðan skráð í CLC.

Í töflu 2 má sjá stærð genanna og fjölda exons. CYP1A2 er 2136 bp langt og inniheldur 5 exon við samanburð á CYP1A2 sem er 2580 bp langt og inniheldur 6 exon.

Tafla 2: Stærð gena og fjöldi exona á CYP1A1 og CYP1A2 í rjúpunni.

Gen	Lengd (bp)	fjöldi exona
CYP1A1 (CYP1A4)	2136	5
CYP1A2 (CYP1A4)	2580	6

Á mynd 3 er bygging CYP1A1 gensins í rjúpunni með merktum exons og introns á geninu. Sjá má að exon 1 er lang stærst eða rúmlega 800 bp langt og hinar 4 í svipaðri stærð þar á eftir, um 100 bp. Einnig er intron 1 stærst eða í kringum 400 bp. Genið snýr fram á við.



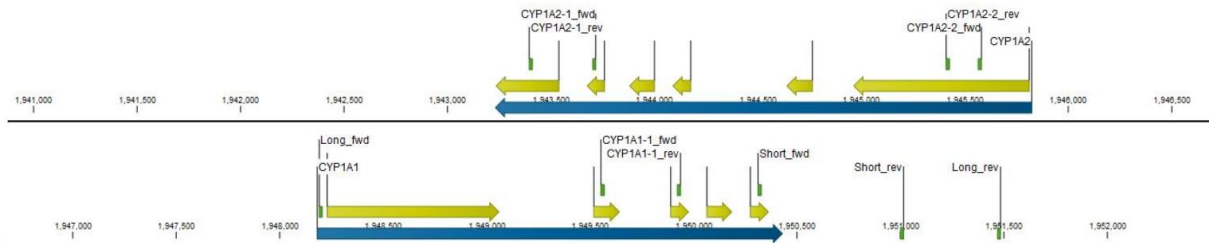
Mynd 3: Bygging CYP1A1 gensins í rjúpunni.

Á mynd 4 er bygging CYP1A2 gensins í rjúpunni með merktum exons og introns á geninu. Eins og fyrir CYP1A1 er exon 1 einnig stærst en intron 2 er stærst fyrir CYP1A2 og intron 3 minnst. Genið snýr til baka.



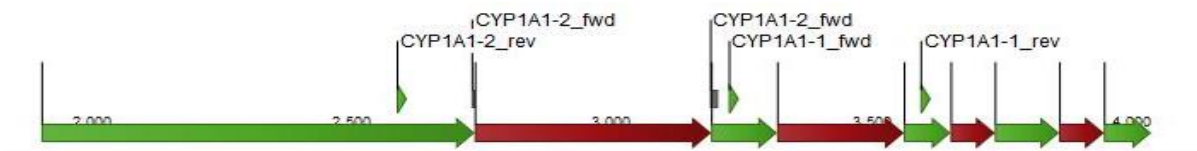
Mynd 4: Bygging CYP1A2 gensins í rjúpunni.

Á mynd 5 má sjá bæði CYP1A1 og CYP1A2 genin ásamt exons og hvernig þau snúa að hvort öðru í rjúpunni. Bilið á milli CYP1A1 og CYP1A2 er 2414 bp og samtals er svæðið í heild sinni 7130 bp, þá frá CYP1A2 til CYP1A1. Einnig má sjá prímerpör sem hönnuð voru fyrir cDNA lifur rjúpunnar.



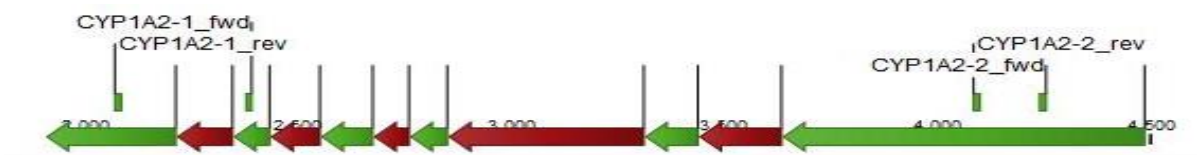
Mynd 5: Staðsetning og bygging CYP1A1 og CYP1A2 ásamt prímerum í rjúpunni.

Mynd 6 sýnir nærmynd af staðsetningu prímerana sem notaðir voru fyrir PCR í erfðamengi rjúpunnar fyrir CYP1A1 genið. Fyrir prímerparið CYP1A1-1 er forward prímerinn á exon 2 og reverse á exon 3.



Mynd 6: Staðsetning prímera (græn box) í CYP1A1 rjúpunnar.

Mynd 7 sýnir nærmynd af staðsetningu prímerana sem notaðir voru fyrir PCR í erfðamengi rjúpunnar fyrir CYP1A2 genið. Sjá má að CYP1A2-1 prímerarnir er á exon 5 og 6 en CYP1A2-2 prímerarnir eru bæði á fyrsta exon.



Mynd 7: Staðsetning prímera (græn box) í CYP1A2 rjúpunnar.

3.2 PCR

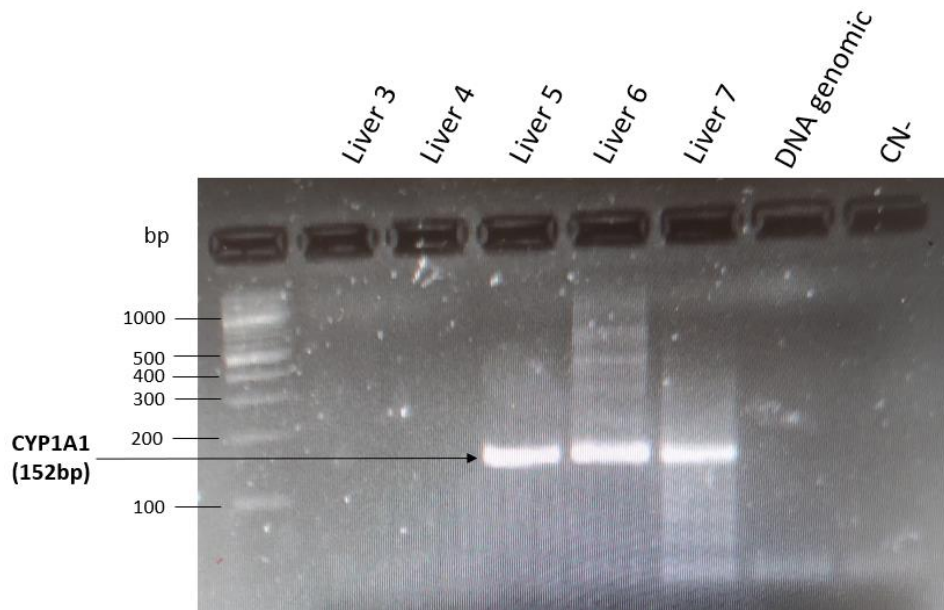
cDNA

Í töflu 3 fyrir neðan má sjá styrk cDNA sem fékkst úr milta og lifrar sýnunum rjúpunnar. SPL4 stendur fyrir milta og LVR fyrir lifur. Hér má sjá að hlutfall gleypni 260/280 er yfir 1,8 í öllum sýnum nema í LVR3. Gleypnin á milli 260/230 er yfir 2,0 í öllum sýnum.

Tafla 3: Styrkur cDNA úr milta og lifur rjúpunnar

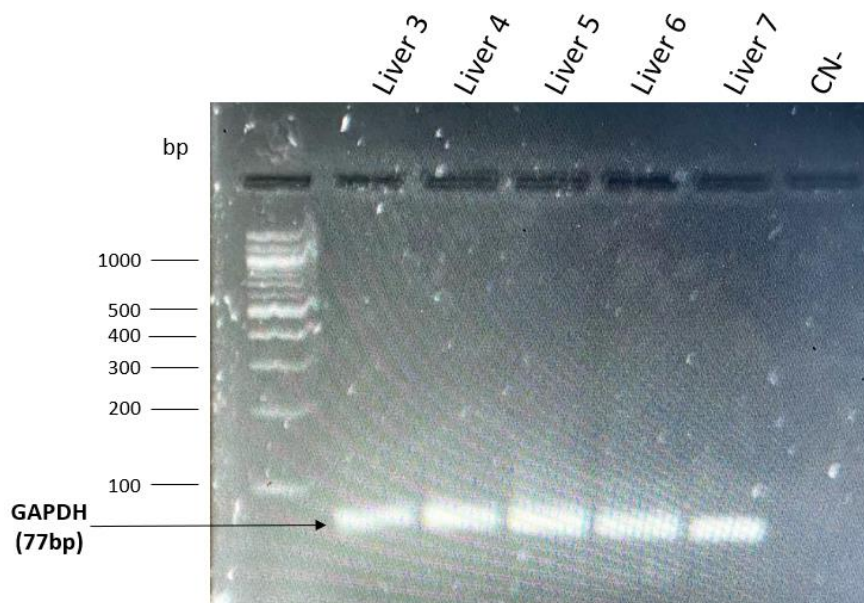
Sýni	Styrkur (ng/μl)	A260	A280	260/280	260/230	Cursor abs.	340 raw
SPL4	2574	51,473	27,800	1,85	2,24	51.506	0.063
SPL5	3091	61,826	34,331	1,80	2,17	61.841	0.021
SPL6	2646	52,924	28,871	1,83	2,22	52.970	-0.038
SPL7	2474	49,481	26,612	1,86	2,27	49.488	0.024
LVR3	3350	66,993	37,412	1,79	2,14	66.988	0.021
LVR4	2902	58,044	31,480	1,84	2,21	58.088	0.011
LVR5	2671	53,427	28,903	1,85	2,24	53.428	0.022
LVR6	2347	46,948	25,360	1,85	2,22	46.923	-0.024
LVR7	2307	46,136	25,078	1,84	2,23	46.145	-0.034

Mynd 8 sýnir sterk og greinileg bönd fyrir CYP1A1 í cDNA lifrar sýnum 5,6 og 7, en þó aðallega í 5 þar sem bandið inniheldur enga skugga. Notast var við þrjú primera sem fengnir voru úr bestu röð eftir blast CYP1A1 kjúklings við lifur rjúpunnar. Þeir primera sem notaðir voru hér að neðan má finna í töflu 6 í viðauka 3 undir CYP1A1 short.



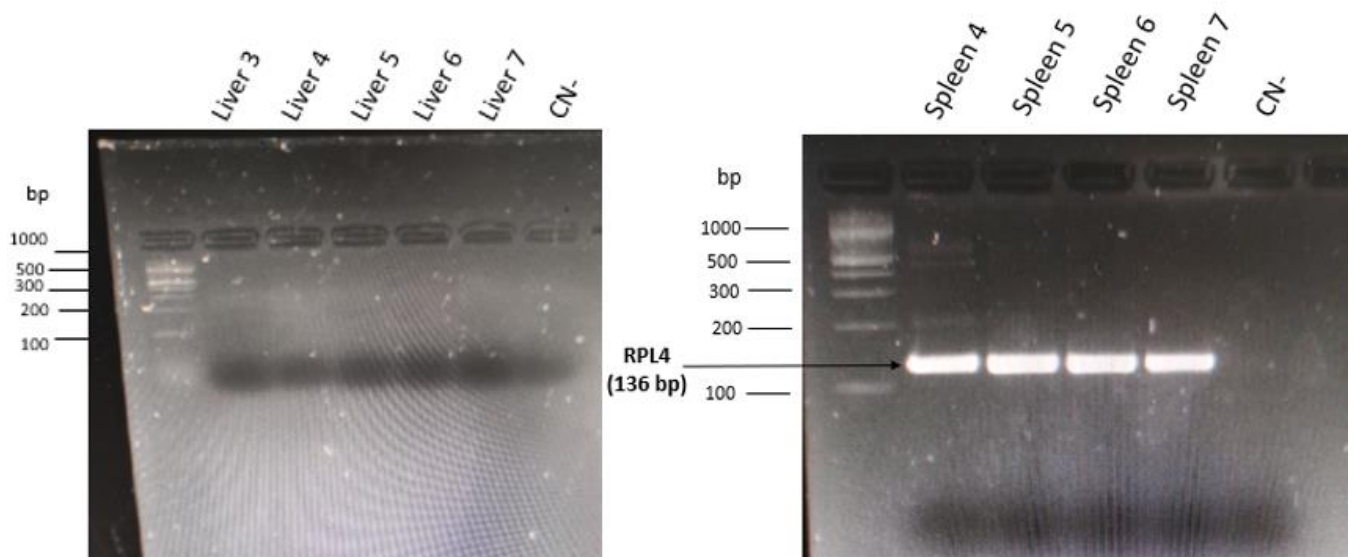
Mynd 8: PCR með CYP1A1 short prímerapari á cDNA úr lifur

Viðmiðunargenið GAPDH var sýnilegt í öllum cDNA lifrarsýnum sem skoðuð voru úr rjúpunni, sjá mynd 9. Búist var við 77 bp má að böndin á gelinu eru á því svæði.



Mynd 9: GAPDH PCR á cDNA úr lifur

Á mynd 10 má sjá RPL4 viðmiðunargenið fyrir cDNA í lifur og milta rjúpunnar en engin bönd fengust úr lifrinni. Greinileg bönd er að sjá úr sýni frá miltanu, búist var við 136 bp frá RPL4 og eru böndin í kringum þann fjölda í samanburði við viðmiðunarmörk.

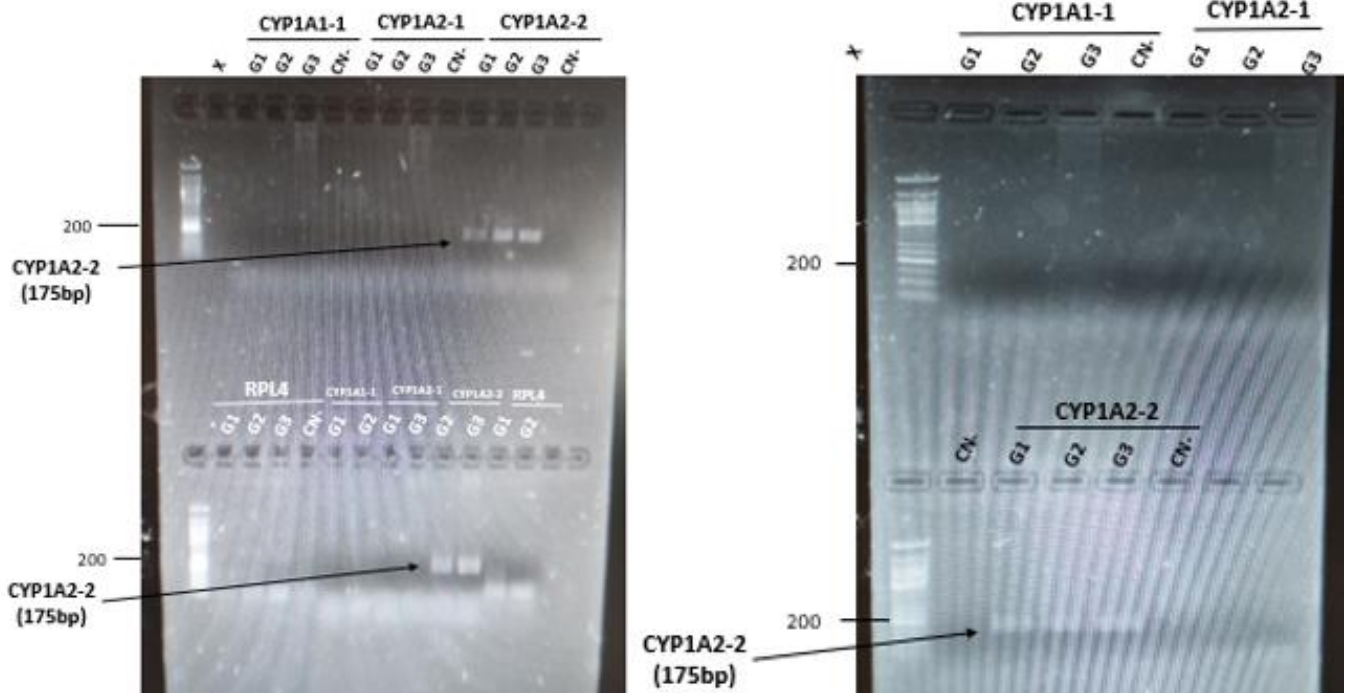


Mynd 10: RPL4 PCR á cDNA úr lifur og milta

Erfðamengi

Við hönnun á prímerum í CYP1A1 og CYP1A2 var notast við PacBio erfðamengið og umritunarmengi. Við hönnun á prímerum fyrir viðmiðunargeninn voru notaðar raðir úr birtum rannsóknum, RPL4 (ref) og GAPDH (ref) og notaðar voru samsvarandi raðir úr PacBio erfðamenginu.

Í fyrstu tilraun á PCR með nýjum prímerum var notast við allt erfðamengi rjúpunnar, 1 μ L loading buffer + 5 μ L sýni (mynd 11 til vinstri). Ekki fengust nein skýr bönd en þó má sjá bönd fyrir CYP1A2-2 á. Þar sem vitað var að CYP1A2-2 prímerinn var á sama exon var búist við 175 bp löngum bút. Hér má sjá daufu línurnar vera á þeim stað. Fyrir seinni PCR var notast við tvöfalt meira af sýni eða 2 μ L loading buffer + 10 μ L sýni (mynd 11 til hægri) en niðurstöður komu einnig aftur aðeins hjá CYP1A2-2.

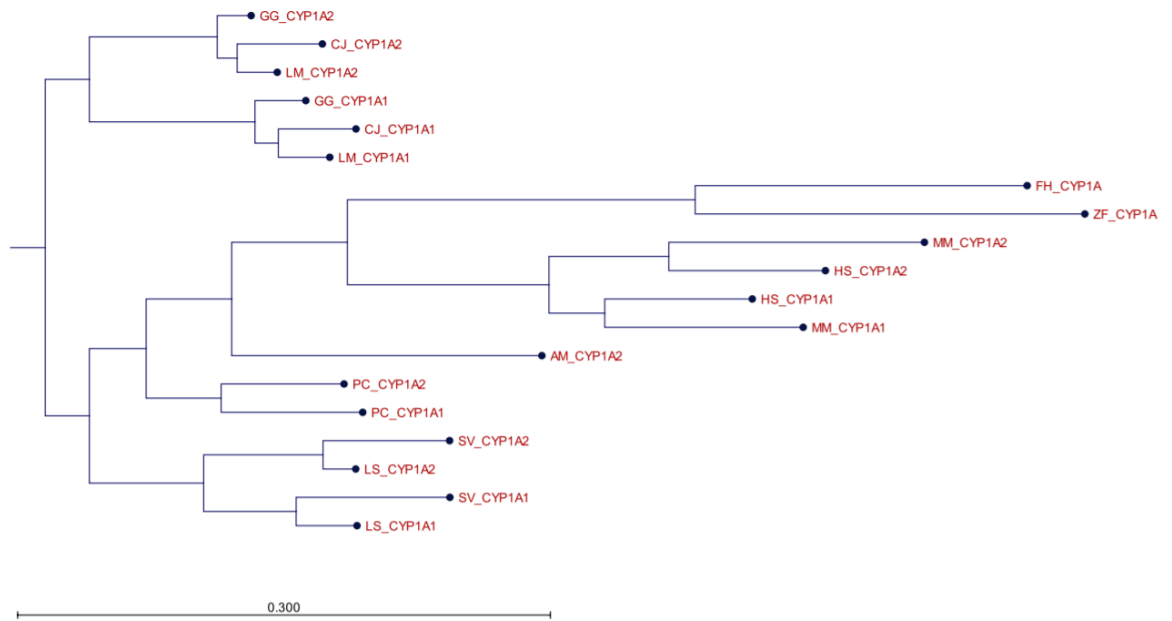


Mynd 11: PCR úr erfðamengi (gDNA) rjúpunnar

3.3 Þróunartré

Útbúið var eitt þróunartré fyrir skyldleika genaþaða í tegundum fyrir bæði CYP1A1 (CYP1A4) og CYP1A2 (CYP1A5). Genaðir rjúpunnar (LM-CYP1A1 og LM-CYP1A2) voru bornar saman við sambærilegar genaþaðir í öðrum fuglategundum, mús, mann, krókódíl og fiskum. Notast var við nokkra úthópa til þess að skýra enn frekar líkindin á milli fugla og mismun þeirra frá til dæmis mönnum og músum.

Á mynd 12 er tréð og sjá má að fyrir bæði CYP1A4 (CYP1A1) og CYP1A5 (CYP1A2) er rjúpan mest skyld Japanese quail (*Coturnix Japonica*), en þar á eftir kemur kjúklingurinn sem er með þeim í þyrpingu. Það myndast einnig annar hópur fyrir fuglategundirnar starra (*Sturnus vulgaris*) og white-rumped munia (*Lonchura striata domestica*). Sjá má að mús (*Mus musculus*) og maðurinn (*Homo sapiens*) hafa mikil líkindi á þessum genum. CYP1A1 og CYP1A2 dílaskarfs (*Phalacrocorax carbo*) mynda sinn hóp ein.



Mynd 12: Maximum Likelihood tré fyrir *CYP1A1* og *CYP1A2*. Skammstafanirnar í heitum raðanna standa fyrir latnesku heiti lífveranna.

4 Umræður

Talið er að CYP gen séu til staðar í nánast öllum lífverum, þau gegna mismunandi hlutverkum eins og þau eru mörg. Undirfjölskyldur CYP1-3 eru helstu eiturefnaskiptu ensímin og eru fyrst og fremst tjáð í lifur (Ren o.fl., 2019). CYP1A1 og CYP1A2 ensímin gegna því helsta hlutverki að brjóta niður eiturefni í lifur dýra. Með þessari rannsókn hefur verið staðfest að þau gen er að finna í íslensku rjúpunni út frá erfðamengi þeirra.

Gen rjúpunnar sýndu mikla samsvörun í byggingu exona og introna í samanburði við kjúkling. Þó eru gen rjúpunnar örlítið lengri og athyglisvert er að CYP1A1 er styttra en CYP1A2 í rjúpu en öfugt í kjúkling, þar er CYP1A2 lengra. Ef borin er saman mynd af uppbyggingu kjúklings (mynd 2) og rjúpunnar (mynd 3,4 og 5) má sjá líkindi þeirra. Lengd CYP1A1 gensins í kjúkling er 2062 bp og fjöldi exona er 7. Lengd CYP1A2 gensins í kjúkling er 1843 bp en 2580 bp í rjúpu og er þetta gen því einnig lengra í rjúpunni en fjöldi exona í kjúkling eru 7. Röð rjúpunnar og kjúklings snúa eins fyrir bæði CYP1A1 og CYP1A2 genin, áfram fyrir það fyrra og aftur fyrir það seinna.

cDNA magn sem mældist fyrir bæði í milta og lifur rjúpunnar kom mjög vel út. Magn DNA mældist frekar hátt en það gæti stafað af því að blankið var vatn og gæti því verið að hvarfblandan mældist með sýnunum. Það hafði engin áhrif að blankið hafi verið vatn þar sem góð staðfesting fékkst á að cDNA væri í sýnunum með góðum niðurstöðum úr PCR.

PCR úr cDNA lifur rjúpunnar og GAPDH (ref.) prímeranna kom vel út, bönd fengust í öllum sýnum lifrarinnar þar sem búist var við þeim eða um 77 bp bút. Því næst var athugað hvort RPL4 (ref.) væri tjáð í milta rjúpunnar í CLC og það var tjáð þar. Því var prófað PCR með cDNA miltans og RPL4 prímeranna. Niðurstöður komu mjög vel út, bönd vel sýnileg úr öllum sýnum þar sem búist var við 136 bp bút og böndin voru á þeim stað í samanburði við viðmiðunarmörkin. Það gefur okkur staðfestingu á því að prímerarnir virka fyrir RPL4. Þessi viðmiðunargen henta í öllum genatjáningaprófum sem fyrirhuguð eru í rjúpunni, þar sem staðfest er að þau eru tjáð í rjúpunni. Viðmiðunargen eru síttjáð í mismunandi gerðum frumna og eru notuð til að staðla gögn (Rebouças o.fl., 2013).

cDNA lifurs úr rjúpunni var af skornum skammti og prófað var að þynna sýnin (x10) áður en nýju prímerarnir voru keyrðir í PCR. Engin bönd fengust úr þeim rafdrætti. Þá var prófað að notast við RPL4 viðmiðunargenið þar sem staðfest var að það prímerar virkuðu út frá rafdrætti úr cDNA milta rjúpunnar (mynd 8). En engin bönd voru sjáanleg úr lifrar cDNA og því staðfest að það sé eitthvað í ólagi varðandi þau sýni.

Út frá niðurstöðum úr PCR erfðamengi rjúpunnar mátti aðeins sjá óskýr bönd fyrir prímerparið CYP1A2-2. Það gæti verið vegna þess að það prímerpar er á sama exoni sem gildir ekki fyrir hin prímerpörin, sem sjá má á mynd 7 í niðurstöðum. Ekki var hægt að notast við CYP1A1-2 prímerparið þar sem intron 1 kemur inn í röð forward prímersins. Þar sem þeir voru hannaðir í upphafi út frá cDNA lifur rjúpunnar en ekki öllu erfðamenginu.

Á þróunartrénu má sjá að allar fuglategundirnar þyrpast ekki saman. Finna má smáfuglana saman í hóp, starra og white-rumped munia. *Japanese quail*, rjúpan og kjúklingur mynda saman eina þyrpingu, sem gæti stafað af því að þeir eru allir hæsnafuglar (Mills o.fl., 1997). Rjúpan og *J. quail* mynda einættaðan (e. *monophyletic*) hóp fyrir bæði genin, sem segir okkur að *J. quail* CYP1A1 og CYP1A2 eru líkust við genin í rjúpunni. Kjúklingurinn myndar vanættaðan (e. *paraphyletic*) hóp við rjúpuna og *J. quail*. Þá er hægt að nýta sér rannsóknir á CYP1A1 og CYP1A2 genum í *J. quail* fyrir áframhaldandi rannsóknir á rjúpunni þar sem þeirra gen eru líkust en einnig er hægt að notast við kjúkling. Út frá þróunarsögunni hefðu killifish (*Fundulus heteroclitus*) og zebrafish (*Danio rerio*) átt að vera úthópur þar sem talið er að CYP1A1 og CYP1A2 hafi þróast út frá CYP1A í fiskum. En útkoman er önnur í trénu sem gæti stafað af því að raðir þeirra voru stýstar og því ekki hægt að bera þau saman við lengri genaraðir svo rétt útkoma fáist.

Út frá þessum niðurstöðum hefur fengist staðfesting á því að prímerpörin sem hönnuð voru henta til að magna upp umrit úr vefjum rjúpunnar. Því er hægt að nota þau í áframhaldandi rannsóknir það sem CYP1A1 og CYP1A2 tjáningarprófið er tilbúið til magngreiningar á tjáningu gena sem gætu varpað í ljósi á einstaklingsbreytileika og svörun við eiturefnum í lifur rjúpunnar.

Fyrir enn frekari greiningu á milli þessara gena er hægt að greina ensím eiginleika CYP1A1 og CYP1A2 með AROD (alkoxyresorufinO-dealkylase) prófi, AROD virkni er vel þekkt fyrir dæmigerða hvötun á mörgum CYP ensímum, og þá sérstaklega CYP1A undirfjölskyldunnar (Yang o.fl., 2013). Það mælir virkni MROD (methox-yresorufinO-demethylase), EROD, PROD (pentoxyresorufinO-depentyllase) og BROD (benzyloxyresorufinO-debenzylase) sem hafa mikla

möguleika til að varpa ljósi á örvun CYP fyrir efnaáreiti. (Kubota o.fl., 2009) EROD prófið fylgist með aukinni eiturefna breytingu ensímsins CYP1A1 og er mikið notað lífmerki fyrir útsetningu á dýralífi fyrir efni sem binda aryl hydrocarbon (AH) viðtakann (Petrulis o.fl., 2001).

Markmið verkefnisins var náð þar sem það tókst að staðsetja CYP1A1 og CYP1A2 gen í rjúpunni. CYP1 gegna því hlutverki að draga úr líffræðilegum áhrifum eiturefna og því líklegt að þau gegni því hlutverki að brjóta niður eiturefni í plöntum sem rjúpan neytir. Hannað var tjáningapróf fyrir þessi gen þar sem góðar niðurstöður fengust fyrir prímerana fyrir bæði genin og viðmiðunargenin. Þá er hægt að nýta það áfram fyrir CYP tjáningaprófið til magngreiningar á tjáningu gena fyrir einstaklingsbreytileika í tjáningu sem tengjast erfðabreytileika í geninu ásamt sambandi tjáningar og eiturefna í lifur.

5 Samantekt

Í þessu verkefni tókst að staðsetja Cytochrome P450 genin tvö *CYP1A1* og *CYP1A2* og skilgreina byggingu þeirra í erfðamengi rjúpunnar og tjáningu í átta ólíkum vefjum íslensku rjúpunnar. Notast var við nýtt hágæða PacBio erfðamengi og denovo umritamengi. Genin voru kortlögð, staðsett, auðkennd og tjáning þeirra könnuð. Upplýsingar um byggingu gena og tjáningu þeirra lögðu grunninn að hönnun tjáningarprófs genanna. Í verkefninu hannaði rannsakandi sértæk prímerapör fyrir bæði CYP genin sem henta til að magna upp umrit úr vefjum rjúpunnar, ásamt prímerapörum fyrir RPL4 og GAPDH genin sem henta vel sem viðmiðunargen. Prímerapörin voru öll prófuð á cDNA úr rjúpnavefjum og reyndust gefa góða og sértæka mögnun. *CYP1A1* og *CYP1A2* tjáningarprófið er því tilbúið til magngreiningar á tjáningu gena sem gætu varpað ljósi á einstaklingsbreytileika og svörun við eitufnum í lifrinni.

Heimildir

- Anzenbacher, P., & Anzenbacherová, E. (2001). Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(5–6), 737–747. <https://doi.org/10.1007/PL00000897>
- Caroll, R. L. (1988). *Vertebrate Paleontology and Evolution*. N.Y: W.H. Freeman and Company.
- Dimcheff, D. E., Drovetski, S. V., & Mindell, D. P. (2002). Phylogeny of Tetraoninae and other galliform birds using mitochondrial 12S and ND2 genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 24(2), 203–215. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(02\)00230-0](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(02)00230-0)
- Dyke, G. J., Gulas, E. B., & Timothy, M. C. (2003). Suprageneric relationships of galliform birds (Aves, Galliformes): a cladistic analysis of morphological characters. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 137(2), 227–244. <https://doi.org/10.1046/j.1096-3642.2003.00048.x>
- Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), 1–4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>
- Gates, B. J., & Davies, N. M. (2006). AmpliChip for cytochrome P-450 genotyping: The epoch of personalized prescriptions. *Hospital Pharmacy*, 41(5), 442–454. <https://doi.org/10.1310/hpj4105-442>
- Gilday, D., Gannon, M., Yutzey, K., Bader, D., & Rifkind, A. B. (1996). Molecular cloning and expression of two novel avian cytochrome P450 1A enzymes induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Journal of Biological Chemistry*, 271(51), 33054–33059. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.51.33054>
- Goldstone, H. M. H., & Stegeman, J. J. (2006). A revised evolutionary history of the CYP1A subfamily: Gene duplication, gene conversion, and positive selection. *Journal of Molecular Evolution*, 62(6), 708–717. <https://doi.org/10.1007/s00239-005-0134-z>
- Goldstone, J. V., Goldstone, H. M. H., Morrison, A. M., Tarrant, A., Kern, S. E., Woodin, B. R., & Stegeman, J. J. (2007). Cytochrome P450 1 Genes in Early Deuterostomes (Tunicates and Sea Urchins) and Vertebrates (Chicken and Frog): Origin and Diversification of the CYP1 Gene Family. *Molecular Biology and Evolution*, 24(12), 2619–2631. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm200>
- Gu, X., & Manautou, J. E. (2012). Molecular mechanisms underlying chemical liver injury. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 14, 4. <https://doi.org/10.1017/S1462399411002110>
- Guengerich, F. P., Waterman, M. R., & Egli, M. (2016). Recent Structural Insights into Cytochrome P450 Function. *Trends in Pharmacological Sciences*, 37(8), 625–640. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.05.006>

- Takehi, M., Ikenaka, Y., Nakayama, S. M. M., Kawai, Y. K., Watanabe, K. P., Mizukawa, H., Nomiya, K., Tanabe, S., & Ishizuka, M. (2015). Uridine Diphosphate-Glucuronosyltransferase (UGT) Xenobiotic Metabolizing Activity and Genetic Evolution in Pinniped Species. *Toxicological Sciences*, *147*(2), 360–369. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv144>
- Kawai, Y. K., Shinya, S., Ikenaka, Y., Saengtienchai, A., Kondo, T., Darwish, W. S., Nakayama, S. M. M., Mizukawa, H., & Ishizuka, M. (2019). Characterization of function and genetic feature of UDP-glucuronosyltransferase in avian species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, *217*, 5–14. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.11.001>
- Kubota, A., Kim, E. Y., & Iwata, H. (2009). Alkoxyresorufin (methoxy-, ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyresorufin) O-dealkylase activities by in vitro-expressed cytochrome P450 1A4 and 1A5 from common cormorant (*Phalacrocorax carbo*). *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, *149*(4), 544–551. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.12.004>
- Lee, J. S., Kim, E. Y., & Iwata, H. (2009). Dioxin activation of CYP1A5 promoter/enhancer regions from two avian species, common cormorant (*Phalacrocorax carbo*) and chicken (*Gallus gallus*): Association with aryl hydrocarbon receptor 1 and 2 isoforms. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *234*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.09.007>
- Liukkonen-Anttila, T., Honkanen, H., Peltokangas, P., Pelkonen, O., & Hohtola, E. (2003). Cytochrome P450 enzyme activity in five herbivorous, non-passerine bird species. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, *134*(1), 69–77. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00211-9](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00211-9)
- Lorr, N. A., Golemboski, K. A., Hemendinger, R. A., Dietert, R. R., & Bloom, S. E. (1992). Distribution and inducibility of a P450I activity in cellular components of the avian immune system. *Archives of Toxicology*, *66*(8), 560–566. <https://doi.org/10.1007/BF01973386>
- Maddocks, S., & Jenkins, R. (2017). Quantitative PCR. Í *Understanding PCR* (bls. 45–52). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802683-0.00004-6>
- Manikandan, P., & Nagini, S. (2017). Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. *Current Drug Targets*, *19*(1). <https://doi.org/10.2174/1389450118666170125144557>
- Meunier, B., de Visser, S. P., & Shaik, S. (2004). Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Chemical Reviews*, *104*(9), 3947–3980. <https://doi.org/10.1021/cr020443g>
- Mills, A. D., Crawford, L. L., Domjan, M., & Faure, J. M. (1997). The behavior of the Japanese or domestic quail *Coturnix japonica*. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *21*(3), 261–281. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(96\)00028-0](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(96)00028-0)
- Morrison, H. G., Oleksiak, M. F., Cornell, N. W., Sogin, M. L., & Stegeman, J. J. (1995). Identification of cytochrome P-450 1A (CYP1A) genes from two teleost fish, toadfish

- (Opsanus tau) and scup (Stenotomus chrysops), and phylogenetic analysis of CYP1A genes. *Biochemical Journal*, 308(1), 97–104. <https://doi.org/10.1042/bj3080097>
- Náttúrufræðistofnun Íslands. (e.d.). *Rjúpa (Lagopus muta)*. Sótt 21. mars 2021, af <https://www.ni.is/biota/animalia/chordata/aves/galliformes/rjupa-lagopus-muta>
- Nucleic Acid Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers*. (2010).
- Oh, K. P., Aldridge, C. L., Forbey, J. S., Dadabay, C. Y., Oyler-McCance, S. J., & Baer, C. (2019). Conservation Genomics in the Sagebrush Sea: Population Divergence, Demographic History, and Local Adaptation in Sage-Grouse (*Centrocercus* spp.). *Genome Biology and Evolution*, 11(7), 2023–2034. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz112>
- Omura, T. (2018). Future perception in P450 research. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 186, 264–266. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.06.002>
- Pelley, J. W. (2012). Enzymes and Energetics. Í *Elsevier's Integrated Review Biochemistry* (bls. 29–37). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-07446-9.00004-0>
- Petruelis, J. R., Chen, G., Benn, S., Lamarre, J., & Bunce, N. J. (2001). Application of the ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) assay to mixtures of halogenated aromatic compounds. *Environmental Toxicology*, 16(2), 177–184. <https://doi.org/10.1002/tox.1022>
- Rebouças, E. de L., Costa, J. J. do N., Passos, M. J., Passos, J. R. de S., Hurk, R. van den, & Silva, J. R. V. (2013). Real time PCR and importance of housekeeping genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(1), 143–154. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000100019>
- Ren, J., Yang, L., Li, Q., Zhang, Q., Sun, C., Liu, X., & Yang, N. (2019). Global investigation of cytochrome P450 genes in the chicken genome. *Genes*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/genes10080617>
- Rourke, J. L., & Sinal, C. J. (2014). Biotransformation/Metabolism. Í *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition* (bls. 490–502). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00007-5>
- Salgado-Flores, A., Tveit, A. T., Wright, A. D., Pope, P. B., & Sundset, M. A. (2019). Characterization of the cecum microbiome from wild and captive rock ptarmigans indigenous to Arctic Norway. *PLoS ONE*, 14(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213503>
- Scornaienchi, M. L., Thornton, C., Willett, K. L., & Wilson, J. Y. (2010). Functional differences in the cytochrome P450 1 family enzymes from Zebrafish (*Danio rerio*) using heterologously expressed proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 502(1), 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.06.018>
- Stokkan, K. A. (1992). Energetics and adaptations to cold in ptarmigan in winter. *Ornis Scandinavica*, 23(3), 366–370. <https://doi.org/10.2307/3676662>
- Temesvári, M., Kóbori, L., Paulik, J., Saívaíry, E., Belic, A., & Monostory, K. (2012). Estimation of

drug-metabolizing capacity by cytochrome P450 genotyping and expression. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 341(1), 294–305.
<https://doi.org/10.1124/jpet.111.189597>

Yang, J., An, J., Li, M., Hou, X., & Qiu, X. (2013). Characterization of chicken cytochrome P450 1A4 and 1A5: Inter-paralog comparisons of substrate preference and inhibitor selectivity. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 157(4), 337–343. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2013.02.005>

Viðaukar

Viðauki 1 – Sýnin úr rjúpunni og CYP1A1/CYP1A4 þg CYP1A2/CYP1A5 úr öðrum tegundum

Tafla 4: Þyngd rjúpusýna úr milta og lifur

Sýni nr.	Nafn	Þyngd sýnis (mg)
1	SPL4	12
2	SPL5	9
3	SPL6	10
4	SPL7	8
5	LVR3	15
6	LVR4	18
7	LVR5	18
8	LVR6	15
9	LVR7	13

Tafla 5: CYP1A1 og CYP1A2 gen kjúklings

Gen	Tegund	No.
CYP1A1 (CYP1A4)	<i>Gallus gallus</i>	NM_205147.1
CYP1A2 (CYP1A5)	<i>Gallus gallus</i>	NM_205146.2

Tafla 6: Númerin fyrir tré

Gen	Tegund	No.
CYP1A1	<i>Homo sapiens</i>	NM_001319217.2
CYP1A2	<i>Homo sapiens</i>	NM_000761.5
CYP1A1	<i>Mus musculus</i>	NM_001136059.2
CYP1A2	<i>Mus musculus</i>	NM_009993.3
CYP1A4 (CYP1A1)	<i>Phalacrocorax carbo</i>	NM_001302368.1
CYP1A5 (CYP1A2)	<i>Phalacrocorax carbo</i>	XM_009504530.1
CYP1A4 (CYP1A1)	<i>Coturnix japonica</i>	NM_001323212.1
CYP1A5 (CYP1A2)	<i>Coturnix japonica</i>	NM_001323211.1
CYP1A4 (CYP1A1)	<i>Lonchura striata domestica</i>	XM_021547237.1
CYP1A5 (CYP1A2)	<i>Lonchura striata domestica</i>	XM_021547238.1
CYP1A4 (CYP1A1)	<i>Sturnus vulgaris</i>	XM_014879225.1
CYP1A5 (CYP1A2)	<i>Sturnus vulgaris</i>	XM_014879226.1
CYP1A2	<i>Alligator mississippiensis</i>	XM_019477918.1
CYP1A	<i>Danio rerio</i>	NM_131879.2
CYP1A	<i>Fundulus heteroclitus</i>	AF026800.1

Viðauki 2 – CYP1A1 og CYP1A2 genaraðir og amínósýruraðir rjúpu og kjúklings

mRNA CYP1A1_LM

CAGGATCGGGCCCTCGTGGGACAGCAGCACCCAGAGGTTCACTTCCAGATGGCAGCGGGATCGCAG
GCAGCGATGGCATAGGTGGGCAGCTCAGGTCTCATCTCGGCCACCGAGGTGCTGGTGGCAGCTGCC
ACTTTCTGCCTGCTCCTGCTGCTGACCCAGACCCGCCGGCAGCACACACCCAAGGGGCTGCGCAGACC
CCCGGGTCCCCGTGGGCTCCCAATGCTGGGCAGTGTGCTGGAGCTGAGGAAGGACCCACACTTGGT
GCTCACCCAGATGAGCCGCAAATACGGGGATGTGATGGAGGTGACCATTGGCTCCCGGCCCGTGGT
GGTGCTCAGCGGGCTGGAACCATCAGGAAAGCCTTGGTGAGGCAAGCAGAAGACTTCATGGGACG
CCCTGACCTGCCAGCTTTAAGTACATCTCCAATGGCCACAGCCTGGCATTAGCTACGAATGTGGGG
ATGCCTGGAAAGCCCGTAGGAAGCTGGCACAGAACGCCCTGAAGACCTTCTCCATCGCCGCCAGCCC
CACGGCCTCCTCCAGCTGCCTCTTGGAGGAACACGTCACCACCGAGGCCAGCTACCTGGTCACCAAAT
TCCTGCAGCTGATGGAGGGGAAGCAGAGCTTTGACCCCTACAGCTACCTGGTGGTGCATCTGTGCC
ATTTGCTTTGGCAAGCGTTACGACCACGACGACCAGGAGCTGCTCAGCGTGGTGAACATGAACACTG
AGTTTGGGGATGTGACTGCTGCTGGAACCCCTCTGACTTCATCCCGCTGCTCCGGTACCTCCCCAAC
CGTGCCATGGCTGCCTTTAAGGATGTCAACATTCGTTTCGATGCCTTCATACAGAAAATCGTCCAGAAC
CATTACACTACCTTTGATAAGGAGCACATTCGGGACGTCACGGACTCGTTGATTGGGCACTGCCAGGA
GAAGAAGACAGGGGAGGATGTCCGTGTCCAACCCTCTGATGAGAGCATCATCTCCATCGTCAACGAC
CTCTTTGGGGCAGGCTTTGAAACCGTGACAACCACCCTGTCTTGGTGCATATTGTACGCTGCCTGTAC
CCCCACATCCAGAAGAAGATCCAGGCAGAGCTGGATCAGACCATCGGCCAGGAGAGGACACCACGG
CTGTCTGACCGAGGCATGCTGCCCTACACAGAAGCCTTCATCCTGGAGGTGTTCCGGCACACCTCCCT
CCTGCCCTTACCATCCCACATAGTACAACAAAAGACACTGTACTGAATGGTTATTACATCCCCAAGAA
CACCTGCGTATTTGTGACCAAGTGGCAAGTGAACCACGATGAGAAGATCTGGAAGGATCCTTCCTCCT
TCAAGCCCGAGCGCTTCTCAATGCATCTGGCACCGAAATCAACAAGATGGAGGGTGACAAGGTGGT
GATCTTTGGCCTGGGGAAGAGGCGGTGCATCGGGGAATCCATCGGGCGCTGGGAGGTCTTCCTCTTC
CTGACCACCATCCTGCAGCAGCTGGAGATCAGCCTGGCCCCGGCCAGCAGGTGGACATCACCCCTC
AGTACGGGCTGACCATGAAGTACAAGCAGAGCGAGTGCTTCCAGATGAAGAAGCGCTTTGCCACCAA
GAGCTCTGCGTGAGGAGGGAGGAGTGAGCCAAGCCTTGTGGGGTTGAGGGCATGGAGAAGCTCCC
ATCTCCGCTATGCTTCGCTCTGCCGTGCTCAGGACGAGTGCCCTGAAATGACTTCACGCAGGGGATCC
CCCAGCATTTCACACTGCTGGCAGCCTGACTATAGAAATGCATTATACAAGTAGCGCTGCTCGCACA

TGAAATAATTAGCTGGCCTCCTAATGAGAAGCCTCTAGGAAATACCAAATGAATGATAAGAAGGGA
CACAGAGCAATAAGAGGCACAGGAAAACACTTATGGCTTCCAGATTATGAATTATGCTGCTT

CYP1A1 – RC cDNA

ATGGCACAGGTGGGCAGCTCAGGTCTCATCTCGGCCACCGAGGTGCTGGTGGCAGCTGCCACTTTCT
GCCTGCTCCTGCTGCTGACCCAGACCCGCCGGCAGCACACACCCAAGGGGCTGCGCAGACCCCGGG
TCCCCGTGGGCTCCCAATGCTGGGCAGTGTGCTGGAGCTGAGGAAGGACCCACACTTGGTGTCCACC
CAGATGAGCCGCAAATACGGGGATGTGATGGAGGTGACCATCGGCTCCCGGCCCGTGGTGGTGCTC
AGCGGGCTGGAAACCATCAGGCAAGCCTTGGTGAGGCAAGCAGAAGACTTCATGGGACGCCCTGAC
CTGCCAGCTTTAAGTACATCTCCAATGGCCACAGCCTGGCATTACAGCTACGAATGTGGGGATGCCTG
GAAAGCCCGTAGGAAGCTGGCACAGAACGCCCTGAAGACCTTCTCCATCGCCGCCAGCCCCACGGCC
TCCTCCAGCTGCCTCTTGGAGGAGCACGTCACCACCGAGGCCAGCTACCTGGTCACCAAATTCCTGCA
GCTGATGGAGGGGAAGCAGAGCTTTGACCCCTACAGCTACCTGGTGGTGTGGTGGCCAACGTCATC
TGTGCCATTTGCTTTGGCAAGCGTTACGACCACGACGACCAGGAGCTGCTCAGCGTGGTGAACATGA
ACACTGAGTTTGGGGATGTGACTGCTGCTGGAAACCCCTCTGACTTCATCCCGCTGCTCCGGTACCTC
CCCAACCGTGCCATGGCTGCCTTTAAGGATGTCAACATTCGTTTCGATGCCTTCATACAGAAAATCGTC
CAGAACCATTACACTACCTTTGATAAGGAGCACATTCGGGACGTCACAGACTCGTTGATTGGGCACTG
CCAGGAGAAGAAGACAGGGGAGGATGTCCGTGTCCAACCCTCTGATGAGAGCATCATCTCCATCGTC
AACGACCTCTTTGGGGCAGGCTTTGAAACCGTGACAACCACCCCTGTCTTGGTGCATATTGTACGCTGC
CTTGTACCCCCACATCCAGAAGAAGATTCAGGCAGAGCTGGATCAGACCATCGGCCAGGAGAGGACA
CCACGGCTGTCTGACCGAGGCATGCTGCCCTACACAGAAGCCTTCATCCTGGAGGTGTTCCGGCACAC
CTCCCTCCTGCCCTTACCATCCCACATAGTACAACAAAAGACACTGTAAGTGGTTATTACATCCC
CAAGAACACCTGCGTATTTGTCAACCAGTGGCAAGTGAACCACGATGAGTGA

Protein sequence prediction (Augustus) CYP1A1

MAQVGSSGLISATEVLVAAATFCLLLLLTQTRRQHTPKGLRRPPGPRGLPMLGSLVLELRKDPHLVLTQMSR
KYGDVMEVTIGSRPVVLSGLETIRQALVRQAEDFMGRPDLPSFKYISNGHSLAFSYECGDAWKARRKLAQ
NALKTFSIAASPTASSCLLEEHVTEASYLVTKFLQLMEGKQSFDPYSYLVSVANVICAICFGKRYDHDDQ
ELLSVVMNTEFGDVTAAGNPSDFIPLLRYLPNRAMAAFKDVNIRFDAFIQKIVQNHYYTFDKEHIRDVTDS
LIGHCQEKKTGEDVRVQPSDESIIVNDLFGAGFETVTTTSLWCILYAALYPHIQKKIQAELDQTIGQERTPR
LSDRGMLPYTEAFILEVFRHTSLLPFTIPHSTTKDVTNLNGYYIPKNTCVFVNQWQVNHDE

CYP1A2 – RC cDNA

TCAGTTTGAGCTCTTCATGGAGAAGCGTTTCTTGACTTGAAAGTGCTCACATCTCTTGCTTGATGGA
CAGTCCATATATAGGTGTCATGTCTGCCTTCTTGCCATCGCGGATGCTGAACTCCAGTTGCTGGAGCA
ACGTGGACAGGAAAAGGAACACCTCCCACCTGCCTATGTTTTCCCAATGCACCTCCTTTCCCCAGGC
CAAAAGTCATCACCTTCTCCGCATCCACTTTGTTTCAGTTCAGTCCCTTCAGCATTGAGGAAACGCTCTG
GGTTGAAAGCCTGTGGATCCTTCAAAGTTTCTCATCGTGATTCACTTGCCACTGGTTGATAAACACGC
AGCGGTCCTTTGGGATATAGTAGCCATTACAGCACCGTGTCTCTGGTCGTGCTGTGTGGGATGGTGAA
GGGTATGAAGGAGGTGTGCCGGAACACCTCCAGGATGAAGGCTTCTGTGTAGGGCAGCATGCCTCG
GTCAGACAGCCGTGGTGTCTCTCCCGCCGATGGTCTGATCCAGCTCTGCCTGAATCTTCTTCTGGA
TGTGGGGATACGTCACGAGGTACATGAGGCTCCAGGACAGGGCAGTTGTCACAGTGTCAAAGCCTGC
TCCAAAGATGTCATTCACCAGGTTGATGATCTTCTCATTTGGGATCTGTGTGGCACTGTTGGCTTCGGC
TTTTTCTCCATGCACTGCTCAATGAGGGAGTCGGTGACATCTCGGATGTTGTTCTTGTCAAAGTCTG
GTAGTGCTCTTCCACAGCTGTCTTCAACAATTCATGAATCGCTTGTTGAAATCCAGAAATAAATCCAT
GTTGCGACTGGGGAGGTACCGGAGCAGCGGGATGAAGTCAGCTGGGTTGCCAACAGCAGTCACATC
CACAACTCATCCACCAGTTCACCACGTTGAGCAGCTCCTGGTCATCGTGGTCGTAACGCTTGCCAA
AGCAAATGGCACAGATGACATTGGCCACCGACACCACCATGTAGCGGTAGGGGTCAAAGCTCTGCTT
CTCCTCCATCAGCTGCAGGAATTTGGTGACCAGGTAGCTGGCCTCGCTGGTGACGTGTTCTCCAAGA
GGCAGCTGGAGGAGGCCGTGGGGCTGGCGCGATGGAGAAGGTCTTTAGGGCGTTCTGTGCCAGCT
TCCTACGGGCTCTCCACATTTCCCCGTGTCAGTGCTGAAGGTCAGGCTCTGTCCATCCGTAATGTGTC
GGAAGCTGTAGAGGTCAGGGCGTCCCATGAAGTCTTCTGCTTGCTCACCAAGGCTTGCTGATGGTT
TCCAACCCGCTGAGCACCACCACGGGCCGGGAGCCGATGGTCACCTCCATCACATCCCCGATTTTGC
GCTCATCTGGGTGAGCACCAGGTGTGGGTCTTCTCAGCTCCAGCACACTGCCAGCATTGGGAGC
CCACGGGGACCCGGGGTCTGCGCAGCCCCTGGGTGTGTGCTGCCGGTGGGTCTGGGTGAGCAGC
AGGAGCAGGCAGAAAGTGGCAGCTGCCACCAGCACCTCGGTGGCCAAGATGAGACCTGAGCTGCCC
ACCTGTGCCATCACTTCTCTGGCCCCAT

Protein sequence prediction (Augustus) CYP1A2

MLGSVLELRKDPHLVLTQMSRKYGDVMEVTIGSRPVVVLSGLETIRQALVRQAEDFMGRPDLYSFRHITDG
QSLTFSTDTGEMWRARRKLAQNALKTFSIAASPTASSCLLEHVTSEASYLVTKFLQLMEEKQSFDPYRYM
VVSVANVICAICFGKRYDHDDQELLNVVNVVDEFVDVAVGNPADFIPLLRYPNMDLFLDFNKRFMKL
LKTAVEEHYQTFDKNNIRDVTDLSLIEQCMEKKAANSATQIPNEKIINLVNDIFGAGFDTVTTALSWSLMYL
VTYPHIQKKIQAELDQITIGRERTPRLSDRGMLPYTEAFILEVFRHTSFIPFTIPHSTTRDRTLNGYYIPKDRCVFI

NQWQVNHDEKLWKDPQAFNPERFLNAEGTELNKVDAEKVMTFGLGKRRICIGENIGKWEVFLFLSTLLQQ
LEFSIRDGKKADMTPIYGLSIKHKRCEHFQVKKRFSMKSSN

Protein sequence CYP1A1 Gallus gallus

Maagpqaameqasspglisatevlvaaatfclllltqtrrqhapkglrsppgprglpmlgnvlelrkdphlvtrlsrkygdvmevtig
srpvvvlsgletikqalvrqaedfmgprdpdpswqyvsngslafsyecgdawkarrklaqnalktfsiaasptassscleehvsteas
ylvtkflqmeekqsfnpsylmvsvanvicaicfgkrydhddqellsvnmntefgdvaaagnpadfipllrylprnramaafkdv
arfsafvqkivqnhystfdkehirdvtdslighcqeprtgedvrvqpsdesiisvndlfgagfdvttslswcmmyaalyphiqkqi
aeldqtigrerrprlsdrgmlyteaflefrhssllpftiphcttkdvtlgyyypkdtcvfinqwqanhdekiwkdppsfskperflna
agtelsrteadkvlifglgkrrcigesigrwevflfttilqqleislappqrvditpqqyltmkykqcecfqmkkrfpskgsa

Protein sequence CYP1A2 Gallus gallus

mgpeevmvqasspglisatevlvaaatfclllltqtrrqhapkglrsppgprglpmlgsvlelrkdphlvtrlsrkygdvmevtigsrp
vvvlsgletikqalvrqaedfmgprdpdlysrhitdgsstfstdtgemwkarrklaqnalknfsiaasptassscleehvsteasyvtkf
lqlmeekqsfdpyrymvsvanvicaicfgkrydhddqellsvnnvdefvdvtaagnpadfipllrylpsrnmfslfdnkrfmkl
qtaveehyqtdknnirdvtdslieqcvekkaeangatqipnekiinlvndifgagfdvttslswslmylvtyphmqkqiqaeldqt
igrerrprlsdrgmlyteaflefrhssfmpftiphsttrdvtlgyyypkdrvcvfinqwqvnhdeklwkdppqafnperflnaegt
evnkvdakvmtfglgkrrcigenigkwevflflstllqqlefsiqdgkkadmtpiyglsmkhkrcehfqvkkrfsmkssn