

Ligandaktivering av aryl hydrokarbon  
reseptor 2 (AhR2) fra Atlanterhavstorsk  
(*Gadus morhua*) ved bruk av luciferase  
genreportersystem

Masteroppgave i biologi, retning miljøtoksikologi

Martha Sæstad Endresen



Institutt for biologi  
Universitetet i Bergen

Juni 2016

30 studiepoeng



# Takk til

Denne masteroppgaven markerer slutten på noen lærerike og flotte år som lektorstudent ved Universitetet i Bergen. Oppgaven er skrevet ved miljøtoksikologigruppen ved institutt for biologi, UIB, og er en del av forskningsprosjektet iCod 2.0. Forskningsprosjektet iCod 2.0 er finansiert av Norges Forskningsråd og Universitetet i Bergen (Prosjektnummer 244564/E40).

Jeg vil benytte muligheten til å takke mine veiledere, Odd André Karlsen og Anders Goksøyr. Takk for at dere tok imot en lektorstudent og lot meg bli en del av forskningsgruppen. Odd André, takk for å at du alltid møtte meg med åpen dør og et smil da jeg kom med mine spørsmål. Din hjelp i løpet av perioden har vært fantastisk. Jeg vil takke Anders for veiledning og hjelp under skriveprosessen. Videre vil jeg spesielt takke Roger Lille-Langøy og Alexander Klevedal Madsen for veiledning og hjelp på laboratoriet. Til alle dere andre på forskningsgruppen, takk for et hyggelig år.

Jeg må også takke samboeren min Per Morten, familie og venner for støtte, samt fine og viktige avbrekk fra laboratoriet og lesesal! Til slutt en takk til mine flotte medlektorer som har gjort årene i Bergen til en fantastisk periode fylt med mye faglig diskusjon, men mest av alt takk for alle spillopper og morsomheter! #lektorlove

Bergen, juni 2016

Martha Sæstad Endresen

# Innholdsfortegnelse

Takk til .....	iii
Sammendrag .....	vi
Forkortelser .....	vii
1 Introduksjon .....	1
1.1 Bakgrunn .....	1
1.2 Miljøgifter.....	1
1.3 Atlanterhavstorsken ( <i>Gadus morhua</i> ) .....	3
1.4 Biotransformasjon .....	4
1.5 Aryl hydrokarbon reseptor (AhR) .....	4
1.5.1 AhR hos fisk.....	7
1.6 AhR-ligander .....	7
1.6.1 Ligander benyttet for å studere aktivering av AhR2 fra torsk.....	9
1.7 AhR-mediert toksisitet ved eksponering for dioksiner og PAH.....	10
1.8 Luciferase genreportersystem.....	10
1.8.1 Optimalisering av luciferase genreportersystemet .....	11
1.9 Mål for oppgaven.....	11
2 Materiale .....	13
2.1 Kjemikalieliste.....	13
2.2 Bakterielt dyrkningsmedium .....	14
2.3 Buffere og løsninger for agarose gelelektroferese.....	14
2.4 Plasmider .....	15
2.5 Cellelinje.....	15
2.6 Vekstmedium COS-7 celler.....	15
2.7 Buffere og løsninger benyttet i luciferase genreportersystem .....	15
2.8 Celleviabilitets-forsøk .....	16
2.9 Ligander.....	17
2.10 Kit.....	18
2.11 Apparater .....	18
2.12 Programvarer .....	19
3 Metode .....	20
3.1 Oversikt over eksperimentell del.....	20
3.2 Amplifikasjon og rensing av DNA-plasmid.....	21
3.3 Kontroll av plasmider med agarose gelelektroferese (AGE).....	21

3.4	Håndtering og kultivering av COS-7 celler .....	22
3.5	Ligandaktivering ved bruk av luciferase genreportersystem .....	22
3.5.1	Utsåing av COS-7 celler til 96-brønnsplate .....	23
3.5.2	Transfeksjon av plasmider .....	23
3.5.3	Ligandeksponering .....	24
3.5.4	Lysering av celler og måling av $\beta$ -galaktosidase- og luciferaseaktivitet .....	25
3.5.5	Optimalisering av luciferase genreportersystemet .....	25
3.6	Celleviabilitet.....	26
3.7	Statistiske beregninger.....	27
4	Resultater .....	28
4.1	Kontroll av DNA-plasmider benyttet i LGS.....	28
4.2	Bestemmelse av optimalt masseforhold mellom reseptor- og reporterplasmid for ligandaktiveringsstudier.....	29
4.3	Optimalisering av luciferase genreportersystemet .....	31
4.3.1	Effekt av inkubasjonstemperatur under eksponering .....	31
4.3.2	Aktivering av AhR2 og AhR2 $\beta$ ved ulike eksponeringstider .....	32
4.4	Ligandaktivering av gmAhR2 og ssAhR2 $\beta$ .....	33
4.4.1	Ligandaktivering etter eksponering for pesticider og siloksaner .....	33
4.4.2	Aktivering av gmAhR2 og ssAhR2 $\beta$ ved eksponering for kjente AhR-ligander .....	35
4.4.3	Maksimal- og laveste signifikante aktivering av gmAhR2 og ssAhR2 $\beta$ .....	38
4.5	Celleviabilitet.....	39
5	Diskusjon .....	42
5.1	Optimalisering av luciferase genreportersystem .....	42
5.2	Utvalgte pesticider og siloksaner som mulige agonister for AhR2 .....	43
5.3	Ligandaktivering av gmAhR2 ved eksponering for kjente ligander .....	45
5.3.1	Kjente gmAhR2 ligander .....	46
5.4	Kommentarer til luciferase genreportersystemet benyttet .....	47
6	Konklusjon.....	48
6.1	Videre arbeid .....	48
7	Litteraturliste.....	50

## Sammendrag

Aryl hydrokarbon reseptor 2 fra atlantehavstorsk (gmAhR2) er en ligandaktivert transkripsjonsfaktor som tidligere har blitt klonet og karakterisert som xenobiotisk sensor. Ved Universitetet i Bergen er det blitt etablert et luciferase genreportersystem for å studere ligandaktivering av gmAhR2. Formålet med denne masteroppgaven var med dette å optimalisere det etablerte luciferase genreportersystemet, og benytte dette systemet for å studere ligandaktivering av gmAhR2 ved eksponering for kjente AhR-ligander og «nye» miljøgifter.

Luciferase genreportersystemet ble forsøkt optimalisert ved å endre cellekultur betingelser som inkubasjonstemperatur og eksponeringstiden for ligandeksponering. Tidligere studier har vist at disse endringene kan føre til økt sensitivitet og aktiveringsrespons i lignende genreportersystem. I motsetning, tyder funnene i denne oppgaven på at optimaliseringene som ble forsøkt ikke forbedret sensitiviteten eller økte aktiveringsresponsen til luciferase genreporter systemet benyttet.

Det ble i oppgaven vist at gmAhR2 fra atlantehavstorsk aktiveres av kjente AhR-ligander som blant annet 2,3,7,8-tetradiklorodibenzo-p-dioksin, benzo(a)pyren,  $\beta$ -naftoflavon, 3,3',4,4',5-pentaklorobifenyl og 6-formylindolo(3,2-b)carbazole. Videre ble ikke transkripsjonsfaktoren aktivert ved eksponering for «nye» miljøgifter som pesticidene endosulfan og klorpyrifos, samt oktametylsyklotetrasiloksan og dekametylpentasiloksan.

# Forkortelser

Forkortelse	Fullt navn
AGE	Agarose gelelektroferese
AhR	Aryl hydrokarbon reseptor
ARNT	Aryl hydrocarbon reseptor kjernetranslokator
ATP	Adenosin-5'-trifosfat
B(a)P	Benzo(a)pyren
bHLH	Basisk heliks-loop-heliks
BNF	β-naftoflavon
CALUX	Kjemisk aktivert luciferase-genuttrykking
CYP	Cytokrom P450
D <sub>4</sub>	Oktametylsyklotetrasiloksan 98%
D <sub>5</sub>	Dekametylsyklopentasiloksan
DDT	Diklordifenyiltrikloretan
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetyl sulfoksid
DTT	Ditiotreititol
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
EGTA	Etylene glykol-bis(2-aminoetyleter)-N, N, N', N' tetraeddiksyre
ELISA	Enzym-tilknyttede immunosorbent analyse
ER	Østrogenreseptor
EROD	7-etoksyresourfin-O-deetylase
FBS	Fetalt kalveserum
FICZ	6-Formylindolo(3,2-b)carbazole
gmAhR2	Aryl hydrokarbon reseptor fra atlantehavstorsk ( <i>Gadus morhua</i> )
HAH	Halogenerte aromatiske hydrokarboner
HSP90	Varmesjokk protein 90
LB	Lysogeny Broth
ONPG	2-Nitrofenyl β-D-galaktopyranosid
PAH	Polysykliske aromatiske hydrokarboner
PAS	Per-Arnt-Sim
PBB	Polybromerte bifenyler
PBDE	Polybromerte difenyleter
PBS	Fosfatbufret løsning
PCB	Polyklorerte bifenyler
PCB-105	2,3,3',4,4'-pentaklorodifenyl
PCB-126	3,3',4,4',5-pentaklorodifenyl
PCB-77	3,3',4,4'-tetraklorodifenyl
PCDD	Dibenzo-p-dioksiner
PCDF	Dibenzofuraner
PFAS	Per- og polyfluorerte alkylstoffer
pHAH	Planare halogenerte aromatiske hydrokarboner
POPs	Persistente organiske miljøgifter
RFE	Relativ fluorescense enhet
RLE	Relativ luminicens enhet
rpm	Rotasjoner per minutt
SD	Standardavvik
ssAhR2β	Aryl hydrokarbon reseptor fra laks ( <i>Salmo salar</i> )
TBE	Bris-borsyre-EDTA
TCDD	2,3,7,8-Tetraklorodibenzo-p-dioxin
UAS	Oppstrømsaktiveringssekvens
x g	x gravitasjonskraft
XAP2	Hepatitt B X-assosiert protein
XRE	Xenobiotisk responselement





# 1 Introduksjon

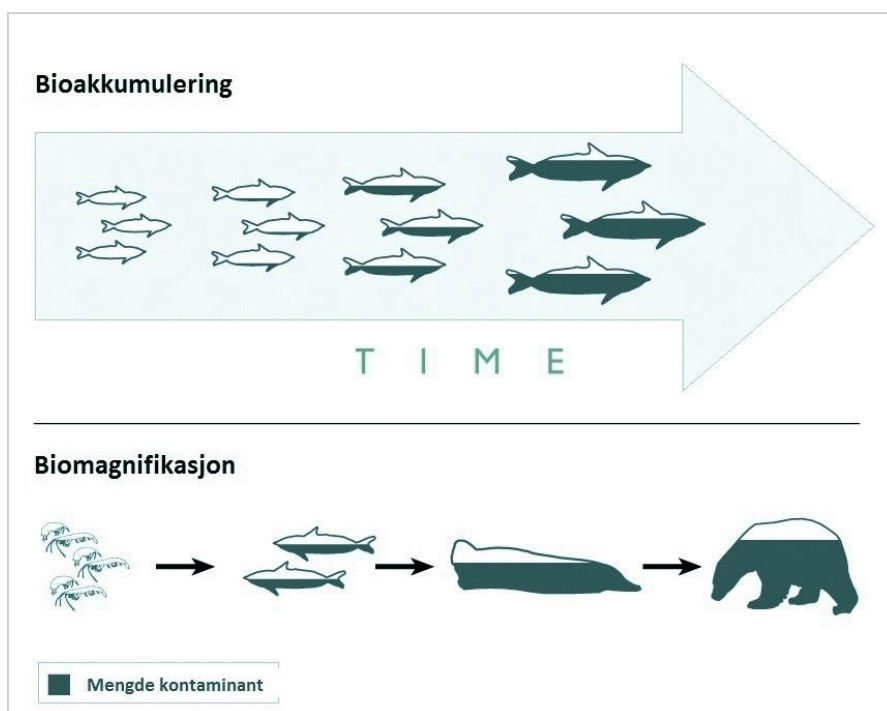
## 1.1 Bakgrunn

I dagens samfunn produseres det et stadig økende antall antropogene kjemikalier, hvor mange av disse ender opp i havet som miljøgifter (Wilson and Schwarzman, 2009). Menneskeskapt utslipp når havet via blant annet urensset kloakk, avrenning fra industri og jordbruk, og luftforurensing (Walker, 2012). Det har vist seg at enkelte områder, deriblant polare og arktiske strøk, er mer utsatt for forurensing av miljøgifter grunnet transport via hav- og luftstrømmer (Walker, 2012, Mackay, 1993, Lohmann et al., 2007). Dette vil også kunne ha konsekvenser for atlantehavstorsken (*Gadus morhua*) som er en kommersielt og økologisk viktig art, og er utbredt i det nordlige Atlanterhavet og Barentshavet. I 2011 ble atlantehavstorsken sitt genom sekvensert og delvis annotert (Star et al., 2011), og to gener som koder for AhR1b og AhR2 har blitt identifisert. Toksisitet forårsaket av flere ulike miljøgifter er mediert av aryl hydrokarbon reseptor (AhR), og som et ledd i å forstå torskens påvirkning av miljøgifter har dens aryl hydrokarbon reseptor 2 (i oppgaven referert som gmAhR2) nylig blitt klonet og karakterisert (Madsen, 2016).

## 1.2 Miljøgifter

Enkelte stoffer besitter fysikalske og kjemiske egenskaper som gjør dem potensielt skadelige for miljøet. Persistente organiske miljøgifter (POPs) er tungt nedbrytbare og lipofile stoffer som kan akkumulere både i naturen og i organismer. I tilfeller hvor absorpsjonen av et kjemikalie overstiger biotransformasjon og ekskresjon hos en organisme vil det kunne føre til en opphoping over tid, såkalt bioakkumulering (Figur 1.1) (Arnot and Gobas, 2003). Stoffer som akkumuleres i en organisme kan videre resultere i biomagnifisering i næringskjeden (Figur 1.1), noe som medfører at arter i de øverste trofiske nivåene er spesielt utsatt for miljøgifter.

«Klassiske» miljøgifter som PCB, dioksiner, tungmetaller og enkelte pesticider har etter flere tiår med omfattende bruk vist seg å være skadelige for organismer ved å være karsinogene, teratogene, hormonforstyrrende og skadelig for immun-, nerve- og reproduksjonssystemet (Walker, 2012). Pesticidet DDT er en av de mest kjente miljøgiftene, mye grunnet utgivelsen av boken «The Silent Spring» (Carson, 1962). På 1960-tallet avtok flere fuglebestander som følge av DDT eksponering, spesielt rovfugler som er på toppen av næringskjeden. DDT fører til fortynning av eggskallet hos fugler, og opphoping i rovfugler førte til at eggene ble ødelagt ved ruging (Walker, 2012). DDT er i dag forbudt i en rekke land, men fremdeles tillates bruk av pesticidet i enkelte områder i kampen mot malaria (Stockholm Convention, 2008a).



Figur 1.1: Illustrasjon over bioakkumulering og biomagnifikasjon av miljøgifter. Modifisert fra Olenick (2013).

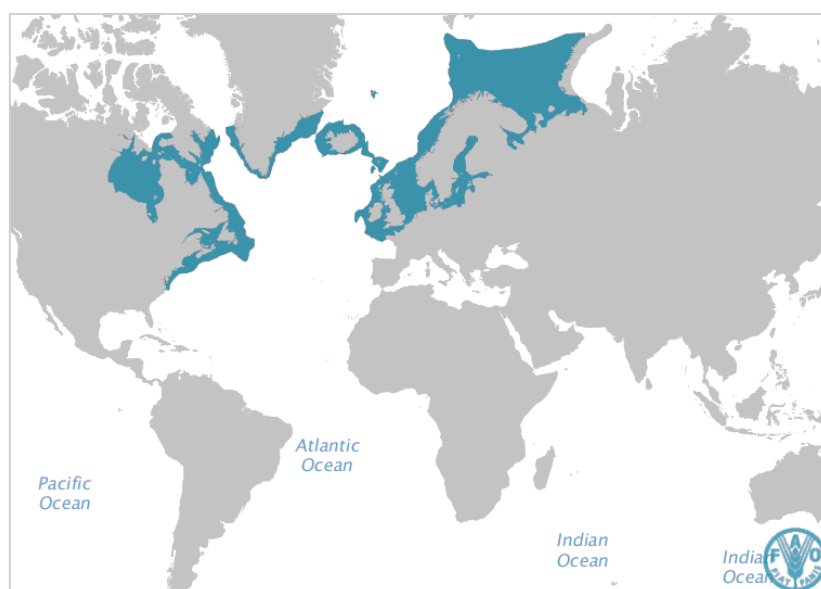
Stockholm-konvensjonen ble i 2001 signert av en rekke land som et tiltak for utfasing av enkelte POPs. Opprinnelig omfattet dette «the dirty dozen», 12 kjente pesticider (som diklordifenyltrikloretan (DDT)), industrielle kjemikalier (eks. polyklorerte bifenyler (PCB)) og biprodukter (eks. 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD)). Siden den første Stockholm-konvensjonen har flere kjemikalier blitt lagt til listen og inkluderer i dag også per- og polyfluorete alkylstoffer (PFAS), polybromerte bifenyler (PBB) og polybromerte difenyletere (PBDE) (Stockholm Convention, 2008b).

Det rapporteres i dag om «nye» miljøgifter (også kalt «emerging contaminants») i miljøet. Dette er kjemikalier som enten har oppnådd målbar konsentrasjon i biota grunnet økt bruk, opphopning over tid, eller som følge av introduksjon av nye kjemikalier på markedet (Vorkamp and Riget, 2014). Det er blitt rapportert om «nye» miljøgifter i arter fra Barentshavet, deriblant i atlantehavstorsk (Warner et al., 2014, Herzke et al., 2013). «Nye» miljøgifter omfatter blant annet siloksaner, ulike pesticider, bromerte- og klorerte flammehemmere (Vorkamp and Riget, 2014, Bao et al., 2015). Siloksaner benyttes i alt fra hygieneprodukter til impregneringsmidler, mens bromerte- og klorerte flammehemmere brukes blant annet i petroleumsindustrien. Man vet i dag lite om effektene til mange disse stoffene, og arbeidet med å kartlegge distribusjon i miljøet og mulige negative effekter på organismer og økosystemer er derfor viktig (Bao et al., 2015).

### 1.3 Atlanterhavstorsken (*Gadus morhua*)

Atlanterhavstorsken (*Gadus morhua*) er en beinfisk som gjennom historien har vært, og fremdeles er, kommersielt viktig. Arten har utbredelse hovedsakelig i det nordlige Atlanterhavet og i Barentshavet (Figur 1.2). Man skiller mellom havtorsk (skrei) og kysttorsk, hvor kysttorsken er langt mer stasjonær enn havtorsken. Atlanterhavstorsken, spesielt kysttorsken lever i områder utsatt for forurensning fra olje- og annen kystindustri, samt avrenning fra urbane områder (Julshamn et al., 2013a, Julshamn et al., 2013b, Julshamn et al., 2013c). Foruten å være kommersielt viktig er torskens samtidig en sentral økologisk art, da den både er predator og byttedyr i marine næringskjeder. Atlanterhavstorsk brukes også som en bioindikator art (Karl et al., 2016, OSPAR, 2009), og det er blitt funnet høye konsentrasjoner av både klassiske miljøgifter og «nye» miljøgifter i lever hos atlanterhavstorsk (Julshamn et al., 2013a, Karl et al., 2016, Warner et al., 2014).

De senere årene har atlanterhavstorsken også blitt en mye benyttet modellart i toksikologiske studier (Eide et al., 2014, Hasselberg et al., 2004, Eide, 2016). Atlanterhavstorskens cytokrom P450 (CYP) enzymssystem ble på 80-tallet karakterisert for første gang (Goksøy, 1985, Goksøy, 1987, Goksøy et al., 1986), og ved sekvenseringen og annoteringen av torskens genom i 2011 (Star et al., 2011), gav det nye muligheter for å kombinere proteomikk og genomikk for å få en bedre forståelse for torskens respons til ulike kjemikalier (Karlsen et al., 2011, Karlsen et al., 2012).



Figur 1.2: *Utbredelse av Atlanterhavstorsk (Gadus morhua)*. Illustrasjonen er modifisert fra FAO (2016).

## 1.4 Biotransformasjon

Gjennom biotransformasjon omdannes endogene og eksogene kjemikalier til mer polare vannløselige stoffer. For eksogene stoffer fører denne omdannelsen til et skifte fra absorpsjon til ekskresjon i en organisme, og er med dette en metode for å kvitte seg med uønskede fremmedstoffer. Biotransformasjon deles inn i tre faser, fase I, II og III reaksjoner. Fase I reaksjoner omfatter hydrolyse, reduksjon og oksidasjon som fører til innføring av en funksjonell gruppe som muliggjør fase II reaksjoner. Spesielt viktige fase I enzymer er CYP-systemet. CYP er en gruppe membranbundete hemproteiner som katalytisk detoksifiserer eller aktiverer et vidt spekter av kjemikalier ved hjelp av monooksygenasereaksjoner. Sentrale CYP-familier i biotransformasjonen er CYP1A, CYP3A og CYP2E (Casarett et al., 2010). Flere CYP-enzymmer benyttes i dag som biomarkører, hvor CYP1A er en av de mest brukte biomarkørene for eksponering av miljøgifter som virker gjennom AhR-ligandaktivering (Hestermann et al., 2000, Goksøyr, 1995). Fase II reaksjoner øker vannløseligheten til ulike stoffer gjennom konjugasjon med endogene molekyler, og inkluderer glukoronidering, sulfonering, metylering, acetylering og konjugering med glutathion eller aminosyrer. Fase III omfatter transport av metabolitten ut av cellen via spesifikke transportproteiner for videre eliminering ut organismen (Casarett et al., 2010).

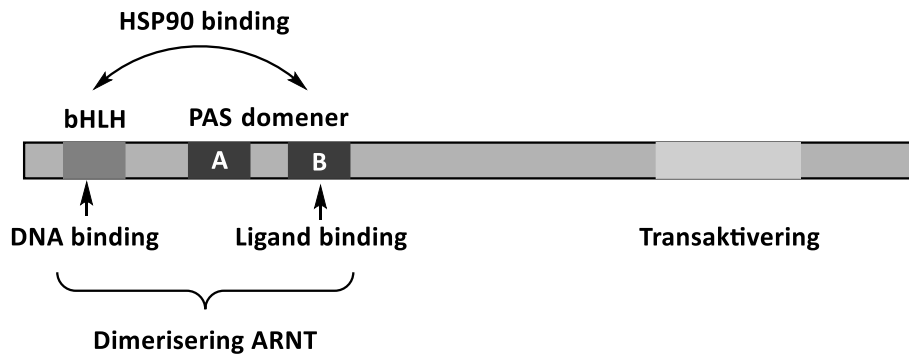
I enkelte tilfeller fører biotransformasjon av eksogene stoffer til mer reaktive kjemikalier, som aktivering av benzo(a)pyren (B(a)P) til karsinogene metabolitter via CYP1A (Figur 1.4) (Casarett et al., 2010).

## 1.5 Aryl hydrokarbon reseptor (AhR)

Aryl hydrokarbon reseptoren er en ligandaktivert transkripsjonsfaktor som siden dens oppdagelse (Poland et al., 1976) har blitt viet stor oppmerksomhet grunnet dens rolle knyttet til toksisitet forårsaket av dioksiner. I dag vet man at AhR kan binde et bredt spekter av ligander og spiller en sentral rolle som en xenobiotisk sensor i en rekke ulike organismer. De senere årene har også kartlegging av dens fysiologiske rolle vekket stor interesse innenfor flere forskningsfelt (Moyer et al., 2016, Zhu et al., 2014, Hao and Whitelaw, 2013, Barouki et al., 2007).

AhR hører til en transkripsjonsfaktor superfamilie som kjennetegnes av de to strukturelle domenene basisk heliks-loop-heliks (bHLH) og PER-ARNT-SIM (PAS) (Figur 1.3) (Hankinson, 1995, Gu et al., 2000). Det har vist seg at bHLH domenet er viktig for binding til DNA og dimerisering med partneren PAS/bHLH-proteinet aryl hydrokarbon reseptor

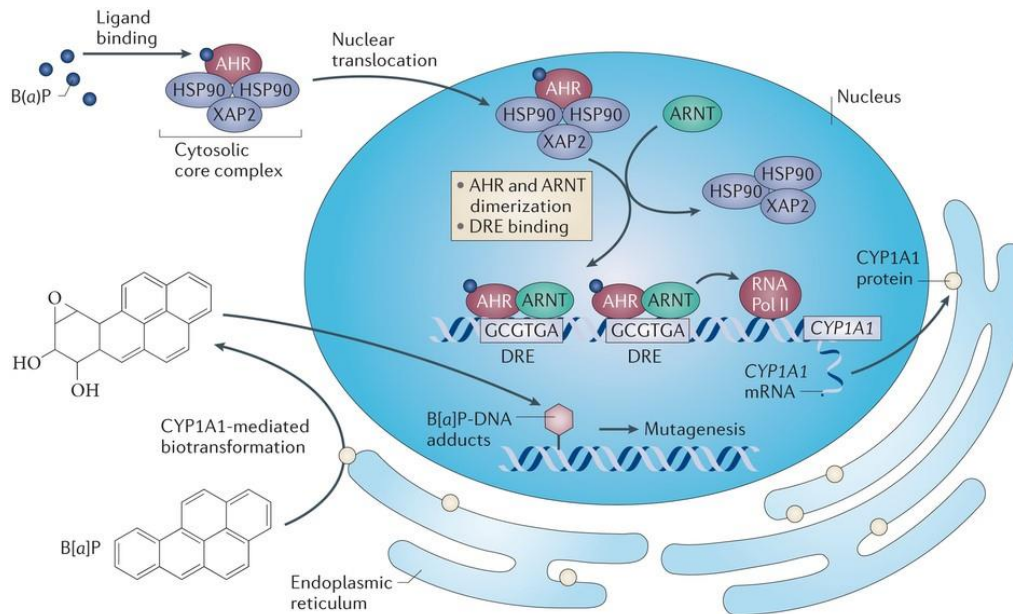
kjernetranslokator (ARNT) (Fukunaga et al., 1995, Gu et al., 2000). PAS domenet består av to subdomener (PAS A og PAS B) på om lag 50 aminosyrer hver, og fungerer som bindingssete for andre PAS proteiner, inkludert ARNT. PAS B inneholder også et ligandbindende domene (Fukunaga et al., 1995), noe som skiller AhR fra andre bHLH/PAS proteiner som ARNT og hypoksia induserbar faktor 1 (Reisz-Porszasz et al., 1994, Wang et al., 1995).



*Figur 1.3: Strukturell oppbygging av AhR og bindingssteder for kofaktorer og andre PAS-proteiner. Modifisert fra Okey (2007).*

Ubundet AhR er lokalisert i cytosol som del av et multiproteinkompleks bestående av AhR, to varmesjokk 90 proteiner (HSP90), protein p23 og hepatitt B virus X- assosiert protein (XAP2/AIP1/ARA9) (Gu et al., 2000, Abel and Haarmann-Stemann, 2010). Det har blitt vist at kofaktorene er viktig for ligandaktivering av AhR. HSP90 bindes til AhR og stabiliserer det ligandbindende domenet via interaksjon med bHLH og PAS B domenet (Beischlag et al., 2008, Fukunaga et al., 1995), og er viktig for optimal ligandbinding (Whitelaw et al., 1995, Pongratz et al., 1992). XAP2 stabiliserer bindingen mellom HSP90 og AhR, og beskytter også AhR mot ubiquitinerings og med det proteasomal nedbrytning av proteinkomplekset (Kazlauskas et al., 2000). Protein p23 er trolig viktig for stabilisering av komplekset (Kazlauskas et al., 2001, Kazlauskas et al., 1999).

Klassisk virkemekanisme for AhR er illustrert i Figur 1.4 og resulterer i transkripsjon av en rekke målgener, deriblant CYP1A, CYP2A, UDP-glukuronosyltransferaser og glutation S-transferaser (Whitlock, 1999, Barouki et al., 2012). Ved å indusere transkripsjon av ulike biotransformasjonsenzymmer er AhR en svært viktig xenobiotisk sensor.



**Figur 1.4: Klassisk aktiveringsmekanisme av aryl hydrokarbon reseptor ved ligandbinding av B(a)P.** Illustrasjon hentet fra Murray et al. (2014). Ved ligandbinding translokiseres AhR fra cytosol til cellekjernen hvor HSP90, XAP2 og p23 dissosierer som følge av strukturendring i AhR. I cellekjernen heterodimeriserer AhR med ARNT, og dimeren kan nå binde xenobiotisk responselement (XRE), som er lokalisert oppstrøms for ulike målgener og indusere transkripsjon (Denison et al., 2011, Beischlag et al., 2008). Transkripsjonen termineres med eksport av AhR ut av cellekjernen og proteosomal nedbrytning mediert av ubiquitinerings (Pollenz, 2002). I tillegg induserer AhR transkripsjonen av PAS-proteinet aryl hydrokarbon repressor (AhRR). AhRR kan dimerisere med ARNT, men dimeren kan ikke binde XRE, med dette inhiberes transkripsjon av målgener ved å konkurrere med AhR om ARNT (Mimura et al., 1999). Indusert CYP1A1 metaboliserer B(a)P og det dannes reaktive metabolitter som kan føre til DNA-addukter.

Foruten klassisk aktiveringsmekanisme kan ligandaktivert AhR også interagere og påvirke kjernereseptorer og transkripsjonsfaktorer, intracellulære signalveier, celleprofilering og cellyklus (Denison et al., 2011). Ligandaktivert AhR kan blant annet ha antiøstrogen effekt ved å hindre genuttrykk av østrogenreseptor (ER) og stimulere nedbrytning av ER (Ohtake et al., 2007, Safe et al., 1998).

Gjennom kartlegging av ulike arters genom viser det seg at AhR er betydelig konserverv fra vertebrater til invertebrater. Konserveringen tyder på at AhR besitter en viktig fysiologisk rolle, og har en funksjon utover det å være en xenobiotisk sensor (Hahn, 2002). Hos invertebrater finner man samtidig en AhR isoform som ikke er knyttet til detoksifisering av fremmedstoffer, men er vist essensiell for utvikling av øyne og vinger (Cespedes et al., 2010). Studier på knock-out AhR mus indikerer også at AhR er viktig for normal vekst og utvikling av lever, immunsystem og hjerte (Schmidt et al., 1996, Fernandez-Salguero et al., 1995, Thackaberry et

al., 2002). AhR sin fysiologiske rolle knyttes også til immunforsvaret og differensiering av T-celler (Abel and Haarmann-Stemmann, 2010).

### 1.5.1 AhR hos fisk

Hos fisk finner man i motsetning til pattedyr opptil flere gener for AhR. Man skiller mellom AhR1 og AhR2, hvor AhR1 er ortolog med AhR hos pattedyr (Hahn, 2002). De to ulike genene antas å ha oppstått som en duplikasjon av AhR i tidlig vertebratutvikling, hvor pattedyr senere har mistet AhR2 varianten. Det er store vevsforskjeller i uttrykking av AhR1 og AhR2 hos fisk, hvor det er vist at AhR2 er den dominerende varianten (Abnet et al., 1999a, Karchner et al., 1999, Tanguay et al., 1999, Hansson and Hahn, 2008). Bindingsaffiniteten for ligander varierer for AhR1 og AhR2, hvor AhR2 binder og aktiveres av eksogene stoffer i høyere grad enn AhR1. Blant annet binder AhR1b hos zebrafisk TCDD i mindre grad enn AhR2 (Karchner et al., 2005). Ulike AhR-gener har blitt påvist hos flere fiskearter, blant annet seks (to AhR1 og fire AhR2) hos laks (*Salmo salar*) (Hansson and Hahn, 2008), to hos regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) (Abnet et al., 1999a), to hos tannkarpe (*Fundulus heteroclitus*) (Karchner et al., 1999) og tre hos zebrafisk (*Danio rerio*) (Karchner et al., 2005, Tanguay et al., 1999, Andreasen et al., 2002).

I atlantehavstorsken er det funnet to gener for AhR, AhR1b og AhR2 (Madsen, 2016). Av disse har AhR2 nylig blitt klonet og karakterisert som en xenobiotisk sensor hos torsk. Gjennom ligandaktiveringsstudier viser reseptoren bindingsaffinitet for kjente AhR-agonister som B(a)P, 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) og  $\beta$ -naftoflavon (BNF) (Madsen, 2016).

## 1.6 AhR-ligander

Aryl hydrokarbon reseptoren kan binde et bredt spekter av ulike ligander (Denison and Nagy, 2003), inkludert antropogene og naturlige stoffer enten som agonister eller antagonister. Miljøgifter som planare halogenerte aromatiske hydrokarboner (pHAH) og polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH) omfatter de best karakteriserte gruppene av AhR-ligander (Denison and Nagy, 2003), hvor pHAH er den mest potente gruppen blant disse (Denison and Nagy, 2003).

Halogenerte aromatiske hydrokarboner (HAH) er en gruppe kontaminanter som omfatter halogenerte dibenzo-p-dioksiner (PCDD), dibenzofuraner (PCDF) og polyklorerte bifenyler (PCB) (Safe, 1990). Det finnes 75, 135 og 209 kongener for henholdsvis PCDD, PCDF og PCB. Av de ulike kongenerene har kun et titalls PCDFer og PCBer planar struktur og er med det dioksinlike. PCBer er lite brennbare, har god isoleringsevne og er billige å produsere. Stoffene ble derfor tidligere benyttet industrielt i store mengder i produkter som kondensatorer,

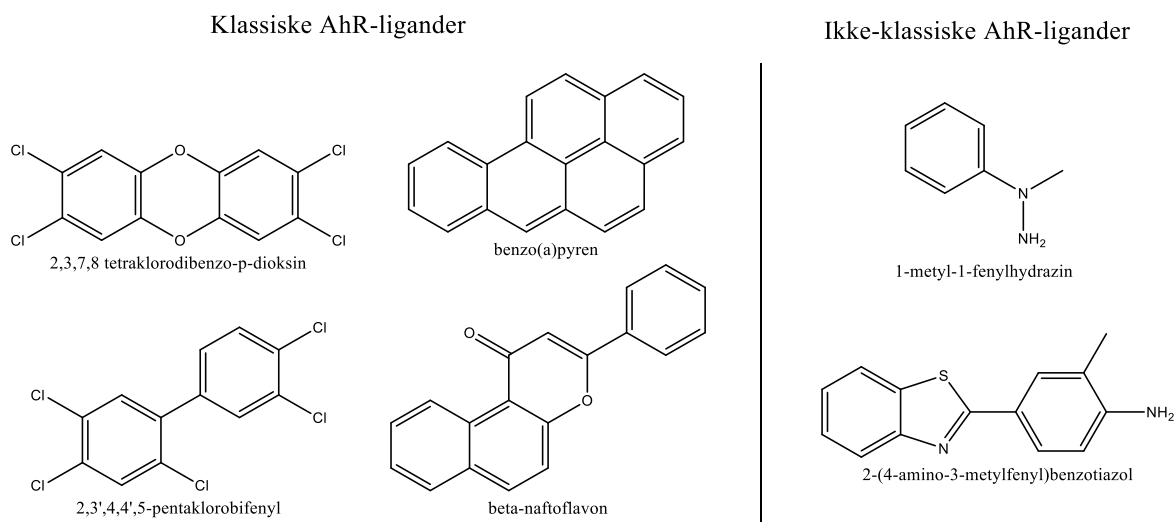
isolerglass og som tilsetningsstoff i plastikk (Baird and Cann, 2012). I dag er bruk av PCB i nye produkter forbudt, men grunnet deres persistente egenskaper og tidligere store forbruk finnes det fremdeles betydelige mengder av disse stoffene i miljøet (Baird and Cann, 2012, Steinnes, 2010, Julshamn et al., 2013a). Dioksiner dannes som et biprodukt i forbrenningsreaksjoner med tilstedeværelse av klor, hvor TCDD er den mest toksiske antropogene AhR-liganden. TCDD brukes derfor som referanse for toksisk ekvivalensfaktor (TEF), som er et mål for relativ toksisitet forårsaket av dioksinlike stoffer sammenlignet med TCDD (Van den Berg et al., 2006).

PAH er en annen gruppe AhR-ligander som dannes fra to eller flere benzenringer. PAH dannes ved ufullstendig forbrenning av organisk materiale, og en av hovedkildene for eksponering av slike stoffer i miljøet er forbrenning av fossile brensler (Baird and Cann, 2012). I motsetning til HAH er PAH langt mindre persistente mot metabolsk nedbrytning og akkumulerer ikke i samme grad i organismer.

pHAH og PAH betegnes ofte som kjemikalier som har en klassisk AhR-ligand struktur. Samtidig har det også vist seg at flere antropogene kjemikalier uten klassisk AhR-ligand struktur kan binde og aktivere AhR (Nagy et al., 2002). Disse stoffene karakteriseres hovedsakelig som svake agonister (Denison and Nagy, 2003), men evnen til å binde AhR gjør det allikevel viktig å kartlegge mulige ligander uten klassisk AhR-ligand struktur.

De senere årene har det blitt et økt fokus på endogene AhR-ligander. Det er funnet en rekke naturlige stoffer som kan binde og aktivere AhR, deriblant ulike stoffer via dietten fra planteriket og deres derivater (karotenoider og flavonoider) (Denison and Nagy, 2003, Nguyen and Bradfield, 2008). Tryptofan-derivater dannes gjennom biologiske og fysiokjemiske prosesser og flere har vist seg å kunne binde AhR, blant annet FICZ, indigo og indirubin. Tetrapyroler og arakidonsyre metabolitter kan også binde AhR og har blitt foreslått som mulige endogene ligander (Denison and Nagy, 2003, Nguyen and Bradfield, 2008).





Figur 1.5: *Eksempler på klassiske og ikke-klassiske AhR-ligander. Illustrasjon modifisert fra Denison and Nagy (2003).*

### 1.6.1 Ligander benyttet for å studere aktivering av AhR2 fra torsk

I denne masteroppgaven er det benyttet både kjente og ikke-kjente AhR-ligander for å studere aktivering av gmAhR2. TCDD er en referanseforbindelse og ble derfor inkludert i disse studiene (Van den Berg et al., 2006). Videre ble de kjente AhR-ligandene BNF, B(a)P og FICZ valgt ut fra tidligere ligandaktiveringsforsøk med gmAhR2 (Madsen, 2016). PCBene 77, 105 og 126 ble valgt ut fra kjemisk struktur som dioksinlike representanter fra denne stoffgruppen. PCB 126 og PCB 105 er videre funnet som dominerende dioksinlike PCBer i lever fra atlantehavstorsk fanget i Barentshavet (Julshamn et al., 2013a).

Som en del av forskningsprosjektet iCod 2.0 ble to pesticider (endosulfan og klorpyrifos), samt to siloksaner (D<sub>4</sub> og D<sub>5</sub>) inkludert i masteroppgaven for å studere mulig aktivering av gmAhR2. Endosulfan ble i 2011 lagt til Stockholm-konvensjonen sin liste over POPs (Stockholm Convention, 2008b), men brukes fremdeles flere steder i verden. Klorpyrifos er ikke tillatt i Norge, men er i bruk i enkelte EU-land (Regjeringen.no, 2016). Pesticidene ble valgt da det er funnet nivåer av endosulfan og klorpyrifos i arktiske miljø (Vorkamp and Riget, 2014). Siloksanene benyttet i oppgaven er å finne i flere produkter, som blant annet impregneringsmidler, fugemasser, maling, kosmetikk og pleieprodukter. D<sub>5</sub> og D<sub>4</sub> ble valgt da de nylige ble påvist i villfanget torsk utenfor Tromsø (Warner et al., 2014).

## 1.7 AhR-mediert toksisitet ved eksponering for dioksiner og PAH

Toksiske effekter forårsaket av AhR-ligandaktivering er hovedsakelig knyttet til klassisk virkningsmekanisme (Figur 1.4) (Denison et al., 2011). Fisk er spesielt sensitive for eksponering til dioksiner og dioksinlike PCBer ved tidlige utviklingsstadier (Hahn, 2001), og sensitiviteten for slike stoffer varierer mellom fiskearter (Doering et al., 2013). Zebrafisk er lite sensitiv for TCDD eksponering sammenlignet med regnbueørret, hvor LD<sub>50</sub> er beregnet til henholdsvis 2,5 ng TCDD/g egg (Henry et al., 1997) og 0,24 ng TCDD/g egg for regnbueørret og zebrafisk (Walker and Peterson, 1991). Toksiske endepunkt ved *in vivo* dioksineksponering på tidlige utviklingsstadier er plommesekk-ødem, kraniofaciale misdannelser, blødninger, nedsatt kardiovaskulær funksjon, nedsatt reproduksjonsevne og død (Henry et al., 1997, Clark et al., 2010, Yamauchi et al., 2006). Ved eksponering for polyaromatiske hydrokarboner (PAH) på tidlige utviklingsstadier er det funnet lignende toksiske endepunkter hos zebrafisk som ved dioksineksponering (Billiard et al., 2006, Incardona et al., 2004). Videre ble det etter Exxon Valdes oljeulykken observert redusert vekst og kraniofaciale- og kjeve misdannelser hos sild (Carls et al., 1999).

## 1.8 Luciferase genreportersystem

Luciferase genreportersystem er en utbredt og sensitiv *in vitro* metode som benyttes for å studere ligandaktivering av ulike transkripsjonsfaktorer (Windal et al., 2005). Det finnes flere ulike genreportersystem, og i denne masteroppgaven benyttes et UAS/GAL4-basert system. I UAS/GAL4-systemet kotransfekteres eukaryote celler med et reporter- og et reseptorplasmid. Reporterplasmidet inneholder et luciferase-gen styrt av 4 oppstrøms aktiveringssekvenser (UAS). I reseptorplasmidet er gensekvensen for AhR fusjonert til GAL4 DNA-bindendedomene. Dette resulterer i at fusjonsproteinet AhR-GAL4-DBD produseres i cellene og vil ved ligandaktivering binde UAS i reporterplasmidet og initiere transkripsjon av luciferase-genet. Et slikt system er tidligere benyttet for å studere ligandaktivering av AhR fra torsk og rotte (*rattus norvegicus*), samt kjerne reseptorer som promiskuos xenobiotisk reseptor fra isbjørn (*Ursus maritimus*) og vitamin D reseptor fra torsk (Madsen, 2016, Lille-Langoy et al., 2015, Backlund and Ingelman-Sundberg, 2004, Ueland, 2013).

I et annet lignende genreportersystem koefekteres plasmider med gener som koder for henholdsvis AhR, ARNT og luciferase, hvor luciferase-genet er kontrollert av et eller flere responselement som gjenkjennes av AhR-ARNT dimeren (XRE responselement). Denne typen genreportersystem har vært mye brukt for å studere ligandaktivering av AhR-varianter fra fisk (Abnet et al., 1999a, Karchner et al., 2005, Hansson and Hahn, 2008). I motsetning til et slikt

system er ikke UAS/GAL4-systemet avhengig av ARNT og naturlige responselementer. Et annet utbredt genreportersystem er «Kjemisk aktivert luciferase-genuttrykking» (CALUX) (Zhao et al., 2010). Dette er rekombinante cellelinjer som er stabilt transfekterte med et reporterplasmid. Reporterplasmidet inneholder et luciferase-gen styrt av ulike responselement, som for eksempel XRE (Brennan et al., 2015).

### **1.8.1 Optimalisering av luciferase genreportersystemet**

Optimalisering av genreporter system kan bidra til økt sensitivitet og forsterket aktiveringsrespons. Optimalisering av ulike luciferase genreportersystem er tidligere gjort ved blant annet modifiseringer av reporterplasmidet ved å endre antall XRE eller UAS oppstrøms for reporter-genet. Det er også blitt forsøkt å modifisere gensekvensen for luciferase-enzymet for å oppnå et mer pH- og termostabilt enzym (Branchini et al., 2015, He et al., 2011, Paguio et al., 2010, Brennan et al., 2015).

Ved enkle endringer i cellekultur betingelser er det også blitt observert at CALUX-systemet kan optimaliseres betydelig (Zhao et al., 2010). Senket inkubasjonstemperatur og endret eksponeringstid er funnet å ha en positiv effekt på to ulike CALUX-system (Chao et al., 2012, Pieterse et al., 2013).

## **1.9 Mål for oppgaven**

Med utgangspunkt i den klonede og karakteriserte gmAhR2 er målet med masteroppgaven å studere hvorvidt transkripsjonsfaktoren aktiveres av ulike kjemikalier, samt forsøke å optimalisere genreportersystemet som blir benyttet. For å studere eventuelle artsforskjeller inkluderes også AhR2 $\beta$  fra laks (i oppgaven referert som ssAhR2 $\beta$ ) i ligandaktiveringsforsøkene. Aktivering av gmAhR2 utføres i oppgaven ved bruk av et *in vitro* luciferase genreportsystem som nylig har blitt etablert i miljøtoksikologigruppen ved Universitet i Bergen. Basert på tidligere studier forsøkes systemet å optimaliseres med hensyn på sensitivitet og aktiveringsrespons ved å endre betingelser for cellekultur, som senket inkubasjonstemperatur og variere eksponeringstiden.

Masteroppgaven er en del av forskningsprosjektet iCod 2.0: Integrative environmental genomics of Atlantic cod (*Gadus morhua*); a holistic approach to characterize the biological effects of.....». Forskningsprosjektet omfatter blant annet studier med «nye» miljøgifter man finner i Atlanterhavstorsken sitt habitat. Dette innebærer at også ulike stoffer som ikke er kjente AhR-ligander inkluderes i oppgaven og forsøkes som agonister ved bruk av luciferase genreportersystemet. Resultatene fra masteroppgaven vil kunne bidra til å gi en bedre

helhetsforståelse av atlanterhavstorsken sin respons til, og potensielle effekter av kjemikalier i dens leveområde.

## 2 Materiale

### 2.1 Kjemikalieliste

Tabell 2.1: Liste over kjemikalier benyttet i masteroppgaven.

Navn	CAS #	Leverandør
10x Lastebuffer	-	TakaRa
10x Fosfatbufret løsning (PBS), pH 7,4	-	Sigma-Aldrich
2-Merkaptoetanol	60-24-2	Sigma-Aldrich
2-Nitrofenyl $\beta$ -D-galaktopyranosid (ONPG)	369-07-3	Sigma-Aldrich
2-log DNA Ladder	-	New England Biolabs
5-Carboxyfluorescein Diacetate, Acetoxymethyl Ester (5-CFDA-AM)	124412-00-6	Thermo Fisher Scientific
Adenosin 5'-trifosfat dinatrium salthydrat (ATP)	34369-07-8	Sigma-Aldrich
Agar Agar	9002-18-0	Merck
Agarose	9012-36-6	Sigma-Aldrich
Ampicillin-natriumsalt	69-52-3	Sigma-Aldrich
Borsyre	10043-35-3	Sigma-Aldrich
Bovin Serum Albumin	9048-46-8	Sigma-Aldrich
CHAPS hydrate	331717-45-4	Sigma-Aldrich
Klorpyrifos	2921-88-2	Sigma-Aldrich
Dimetyl sulfoksid (DMSO)	67-68-5	Sigma-Aldrich
Ditiotreitol (DTT)	578517	Sigma-Aldrich
D-Luciferin Firefly	115144-35-9	Biosynth®
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (høy glucose, med fenolrød)	-	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (høy glukose, uten fenolrød)	-	Sigma-Aldrich
Etanol	64-17-5	Sigma-Aldrich
Etylene glykol-bis(2-aminoetyler)-N, N, N', N' tetraeddiksyre (EGTA)	67-42-5	Sigma-Aldrich
Etylendiamintetraeddiksyre (EDTA)	6381-92-6	Sigma-Aldrich
Fetalt kalveserum (FBS)	-	Sigma-Aldrich
Gelred	-	Botium
Gjærekstrakt	-	Fluka
Glyserol	56-81-5	Sigma-Aldrich
Isooktan	540-84-1	Merck
Isopropanol	67-63-0	Kemetyl
Kaliumklorid	7447-40-7	Sigma-Aldrich
Koenzyme A	18439-24-2	Fisher Bioreagents™
L-glutamin	56-85-9	Sigma-Aldrich
L- $\alpha$ -phosphatidylcholine	8002-43-5	Sigma-Aldrich
Magnesium karbonat hydroksid pentahydrat ((MgCO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> · Mg(OH) <sub>2</sub> · 5H <sub>2</sub> O)	56378-72-4	Sigma-Aldrich
Magnesiumklorid heksahydrat (MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O)	7791-18-6	Sigma-Aldrich
Magnesiumsulfat heptahydrat (MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O)	10034-99-8	Sigma-Aldrich
Metanol	67-56-1	Sigma-Aldrich
Natrium dihydrogenfosfat monohydrat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O)	10049-21-5	Merck
Natrium fosfat dibasisk hydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O)	10028-24-7	Sigma-Aldrich
Natriumklorid (NaCl)	7647-14-5	Merck

Navn	CAS #	Leverandør
Natriumpyruvat	113-24-6	Sigma-Aldrich
OPTI-MEM I redusert serum medium	-	Gibco
Penicillin-Streptomycin	-	Sigma-Aldrich
Fenylmetanesulfonyl fluorid (PMSF)	329-98-6	Sigma-Aldrich
Resazurin natriumklorid	62758-13-8	Sigma-Aldrich
TransIT®-LT1	-	Mirus
Tricin	5704-04-1	Sigma-Aldrich
Tris/HCl-buffer pH 8,5	-	Macherey-Nagel
Triton® X-100	9002-93-1	Sigma-Aldrich
Trizma® base	77-86-1	Sigma-Aldrich
Trizma® fosfat dibasisk (Tris-PO <sub>4</sub> )	108321-11-5	Sigma-Aldrich
Trypan blue, 0,4 % løsning	72-57-1	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA (0,05% Trypsin, 0,02% EDTA)	-	Sigma-Aldrich
Trypton plus	91079-40-2	Sigma-Aldrich

## 2.2 Bakterielt dyrkningsmedium

Tabell 2.2: *Lysogeny Broth (LB) dyrkningsmedium*

Stoff	Konsentrasjon
NaCl	10 g/L
Trypton	10 g/L
Gjærekstrakt	5 g/L
Ampicillin	100 mg/L

## 2.3 Buffere og løsninger for agarose gelelektroferese

Tabell 2.3: *5x Tris-borsyre-EDTA (TBE) buffer (pH 8,8)*

Navn	Konsentrasjon
Tris	54 g/L
Borsyre	27,5 g/L
EDTA (0,5 M)	20 mL/L
MQ H <sub>2</sub> O	-

Tabell 2.4: *0.7 % Agarose gelløsning*

Navn	Konsentrasjon
TBE-buffer	1x
Agarose	0.7%
Gelred	0,0002%

## 2.4 Plasmider

Tabell 2.5: Ulike plasmider benyttet i luciferase genreportersystem.

Plasmider	Beskrivelse	Opprinnelse
(mh100)x4tk luciferase	Reporterplasmid	(Forman et al., 1995)
pCMV $\beta$ -galaktosidase	Kontrollplasmid	(Blumberg et al., 1998)
pCMX GAL4-AHR2	Reseptorplasmid AHR2 torsk	(Madsen, 2016)
pCMX GAL4-AHR2 $\beta$	Reseptorplasmid AHR2 $\beta$ laks	(Madsen, 2016)

## 2.5 Cellelinje

Tabell 2.6: Cellelinje

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

## 2.6 Vekstmedium COS-7 celler

Tabell 2.7: Vekstmedium benyttet ved kultivering av COS-7 celler.

Stoff	Konsentrasjon
DMEM *	0,87 x
Fttalt kalveserum (FBS)	8,70 %
Penicillin-streptomycin	86,96 U/mL
L-Glutamin	3,48 mM
Natrium-pyruvat	0,87 mM

\* Ved ligandeksponering ble fenolfritt DMEM og superstrippet FBS benyttet.

## 2.7 Buffere og løsninger benyttet i luciferase genreportersystem

Tabell 2.8: Oversikt lyserings basebuffer (1x) og reagens.

Navn	Konsentrasjon
<b><u>LYSERINGS BASEBUFFER (1x)</u></b>	
Tris-PO <sub>4</sub> , pH 7,8	25 mM
Glyserol	15 %
CHAPS	2 %
L- $\alpha$ -Phosphatidylcholine	1 %
BSA	1 %
<b><u>LYSERINGSREAGENS</u></b>	
Lyserings basebuffer	1x
EGTA	8 Mm
MgCl <sub>2</sub>	4 mM
DTT	1 mM
PMFS	0,4 Mm

Tabell 2.9:  $\beta$ -galaktosidase basebuffer og reagens

Navn	Konsentrasjon
<b><math>\beta</math>-galaktosidase BASEBUFFER (1x)</b>	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	60 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	40 mM
KCl	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
<b><math>\beta</math>-galaktosidase REAGENS</b>	
$\beta$ -galaktosidase basebuffer	1x
$\beta$ -merkaptoetanol	52,9 mM
ONPG	8,6 mM

Tabell 2.10: Luciferase basebuffer og reagens

Navn	Konsentrasjon
<b>LUCIFERASE BASEBUFFER (4x, pH 7,8)</b>	
Tricin	80,00 mM
MgSO <sub>4</sub>	10,68 mM
(MgCO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> · Mg(OH) <sub>2</sub> · 5H <sub>2</sub> O	4,28 mM
EDTA	0,40 mM
<b>LUCIFERASE REAGENS</b>	
Luciferase basebuffer (pH 7,8)	1x
ATP	0,5 mM
Koenzym A	0,2 mM
DTT	5,0 mM
D-Luciferin	0,5 mM
MQ-H <sub>2</sub> O	-

## 2.8 Celleviabilitets-forsøk

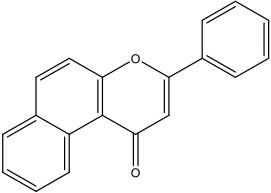
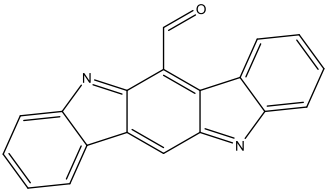
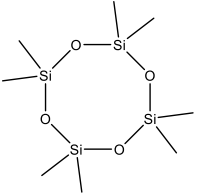
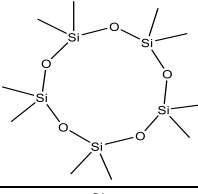
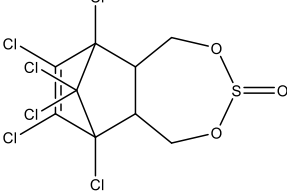
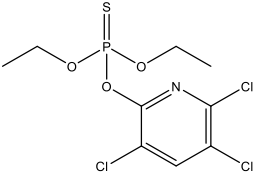
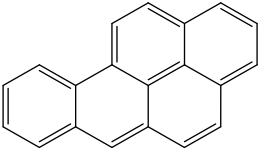
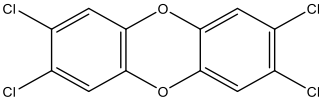
Tabell 2.11: Resazurin/CFDA-AM-løsning for bestemmelse av celleviabilitet

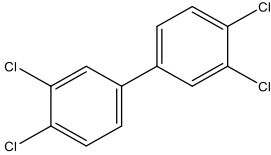
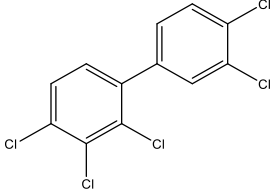
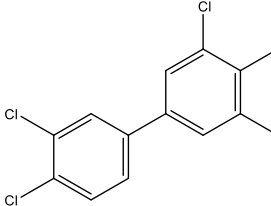
Navn	Konsentrasjon
DMEM 10% FBS	1x
Resazurin (0,15 mg/ml)	10 %
CFDA-AM (4mM i DMSO)	8 $\mu$ M



## 2.9 Ligander

Tabell 2.12: Ligander benyttet under eksponering i luciferase genreportersystem

Ligand	Beskrivelse	Struktur	Leverandør
$\beta$ -naftoflavon (BNF)	Syntetisk flavonoid		Sigma-Aldrich
6-formylindolo(3,2-b)carbazole (FICZ)	Tryptofan-derivat		ENZO
Oktametylsyklotetra-siloksan 98% (D <sub>4</sub> )	Siloksan		Sigma-Aldrich
Dekametylsyklopenta-siloksan 97% (D <sub>5</sub> )	Siloksan		Sigma-Aldrich
Endosulfan	Plantevernmiddel		Sigma-Aldrich
Klorpyrifos	Plantevernmiddel		Sigma-Aldrich
Benzo(a)pyren (B(a)P)	PAH		Sigma-Aldrich
2,3,7,8 -tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD)	Dioksin		AccuStandard®

Ligand	Beskrivelse	Struktur	Leverandør
3,3',4,4'-tetraklorobifenyl (PCB-77)	Dioksinlik PCB		Chiron
2,3,3',4,4' - pentaklorobifenyl (PCB-105)	Dioksinlik PCB		Sigma-Aldrich
3,3',4,4',5 - pentaklorobifenyl (PCB-126)	Dioksinlik PCB		Cambridge Isotope Laboratories

## 2.10 Kit

Tabell 2.13: Kit benyttet for plasmidrensing

Kitnavn	Beskrivelse	Leverandør
NucleoBond® Xtra Midi/Maxi	Rensing av amplifiserte plasmid	Macherey-Nagel

## 2.11 Apparater

Tabell 2.14: Oversikt ulike apparater benyttet og beskrivelse.

Instrument	Beskrivelse	Leverandør
Avanti® J-26 XP Centrifuge	Sentrifuge (stort volum)	Beckman Coulter®
Bürker tellekammer	Celletelling	Marienfeld
EnSpire™ 2300 Multilabel Reader	Plateleser	PerkinElmer
G:BOX	Avlesing av geler	Syngene
Heraeus Multifuge X3R Centrifuge	Sentrifuge	Thermo Scientific
HS 501 Digital	Risteplate	IKA® - Werke
Leica DM IL inverted microscope	Generelt celloarbeid	Leica
MilliQ A10 Advantage	Deionisert H <sub>2</sub> O	Merch Millipore
Multitron Standard	Inkubasjons-rister	Infors HT
Nanodrop 1000 Spectrophotometer	Spektrofotometer	Thermo Scientific
New Brunswick™ Galaxy® 170 R	CO <sub>2</sub> -inkubator	Eppendorf
PowerPac™ HC	Gelelektroferese	BioRad

## 2.12 Programvarer

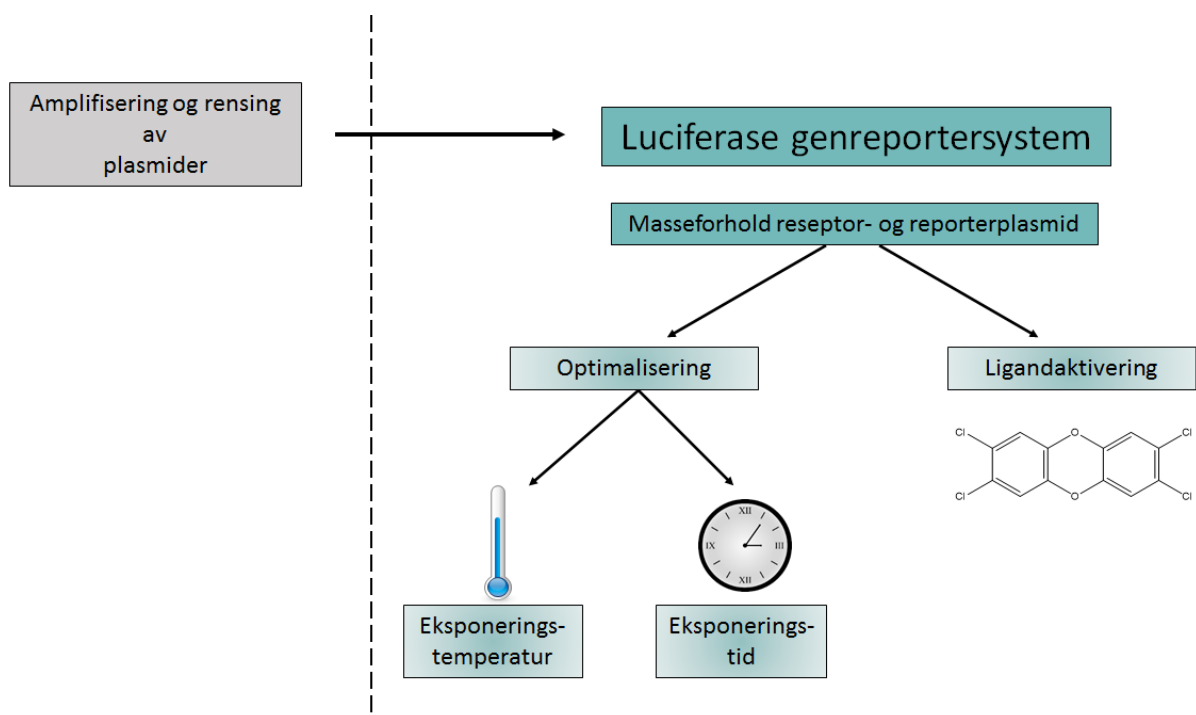
Tabell 2.15: Oversikt ulike programvarer benyttet i masteroppgaven.

Programvare	Beskrivelse	Leverandør
ChemDraw Professional 15.0	Kjemikaliestrukturer	PerkinElmer
EndNote	Kildelisteverktøy	Thomson
EnSpire Manager	Plateleser	PerkinElmer
Excel 2016	Statistiske analyser	Microsoft®
GeneSnap Image ND-1000	Visualisering agarosegel Bestemmelse av plasmid konsentrasjon og renhet	Syngene Thermo Scientific
Prism 7	Statistiske analyser og tillaging av grafer	GraphPad
PowerPoint 2016	Illustrasjoner	Microsoft®
Word 2016	Skriveprogram	Microsoft®

# 3 Metode

## 3.1 Oversikt over eksperimentell del

Det ble benyttet et etablert *in vitro* luciferase genreportersystem for å studere hvorvidt ulike kjemikalier evner å aktivere gmAhR2. ssAhR2 $\beta$  ble inkludert i forsøkene for artssammenligning. Fire plasmider, et reporterplasmid ((mh100)x4tk luciferase), et kontrollplasmid (pCMV  $\beta$ -galaktosidase) og to reseptorplasmider med innsatt genskvens for henholdsvis gmAhR2 og ssAhR2 $\beta$  (pCMX GAL4-AHR2 eller pCMX GAL4-AHR2 $\beta$ ) ble brukt i systemet. I første omgang ble reporter- og kontrollplasmid amplifisert i *E. coli* og rensset. De to reseptorplasmidene med genskvens for gmAHR2 og ssAHR2 $\beta$  var allerede rensset og tilgjengelig ved miljøtoksikologilaboratoriet, UIB. I masteroppgaven ble optimaliseringer av systemet prøvd ut ved å variere inkubasjonstid og -temperatur under ligandeksponering. Oversikt over den eksperimentelle delen av masteroppgaven er skissert i Figur 3.1.



Figur 3.1: **Oversikt over eksperimentell del av masteroppgaven.** Reporter- og kontrollplasmid ble amplifisert og rensset for bruk i luciferase genreportersystemet. Videre ble luciferase genreportersystemet forsøkt optimalisert og benyttet i ligandaktiveringsforsøk med gmAhR2 og ssAhR2 $\beta$ .

### 3.2 Amplifikasjon og rensing av DNA-plasmid

Reporterplasmidet ((mh100)x4tk luciferase) og kontrollplasmidet (pCMV  $\beta$ -galaktosidase) ble amplifisert i *E. coli* og renses ved hjelp av Nucleobond® Maxi/Midi kit som beskrevet under. Det ble tillagd startkulturer i LB-vekstmedium (Tabell 2.2) fra glyserolstamløsning (-80 °C) med *E. coli* celler som tidligere var transformert med enten ((mh100)x4tk luciferase eller pCMV  $\beta$ -galaktosidase. Startkulturer ble inkubert med risting (250 rpm) ved 37 °C i 7-8 timer før 200 mL LB-vekstmedium ble tilsatt 200  $\mu$ L startkultur og inkubert over natten med samme betingelser.

DNA-plasmidene ((mh100)x4tk luciferase og pCMV  $\beta$ -galaktosidase) ble renses fra overnatte-kulturen med bruk av Nucleobond® Midi/Maxi kit fra Macherey-Nagel. Bakterieceller ble høstet ved sentrifugering, og plasmid renses etter protokoll fra leverandør (Macherey-Nagel). I korte trekk lyseres bakteriecellene ved tilsetning av NaOH/SDS-løsning. Blandingen nøytraliseres deretter og cellekomponenter, proteiner og kromosomalt DNA felles ut for så å fjernes ved sentrifugering. DNA-plasmidene bindes deretter til en silikonmembran og gjennom ulike vaskesteg fjernes uønskede salter, metabolitter og cellekomponenter. Plasmidene elueres ved tilsetning av en alkalisk buffer og renses ytterligere ved isopropanol-utfelling (100%). Videre resuspenderes plasmidene i ønskelig buffer, som i dette tilfellet var en Tris/HCl-buffer (pH 8,5) fra Macherey-Nagel. DNA konsentrasjon og  $A_{260/280}$  ratio ble målt spektrofotometrisk med NanoDrop-1000 (Thermo Scientific). Renset plasmid ble videre kontrollert ved agarose gelelektroferese (Metode 3.3).

### 3.3 Kontroll av plasmider med agarose gelelektroferese (AGE)

Agarose gelelektroferese (AGE) ble benyttet for å kontrollere at benyttede DNA-plasmider var i en supertvinnings konformasjon. Metoden separerer nukleinsyrer ut fra størrelse i et elektrisk felt. Deprotonerte nukleinsyrer er negativt ladet og vil i den porøse gelen vandre mot den positive polen, hvor vandringslengde er avhengig av størrelsen på nukleinsyrene. En 0,7 % agarose gelløsning ble tillaget som angitt i Tabell 2.3 og satt til å polymerisere i 20 min. Prøver (Tabell 3.1) med de ulike DNA-plasmidene ble applisert i brønner på gelen. 2-log DNA Ladder (4  $\mu$ L) ble benyttet som molekylvektstandard. Separasjon ble utført på 110 V i 35 min med PowerPac™ HC (Bio-Rad). Plasmidene ble visualisert under UV-lys med G:BOX (Syngene).

Tabell 3.1: Tillaging av prøver for kontroll av plasmider med agarose gelelektroferese.

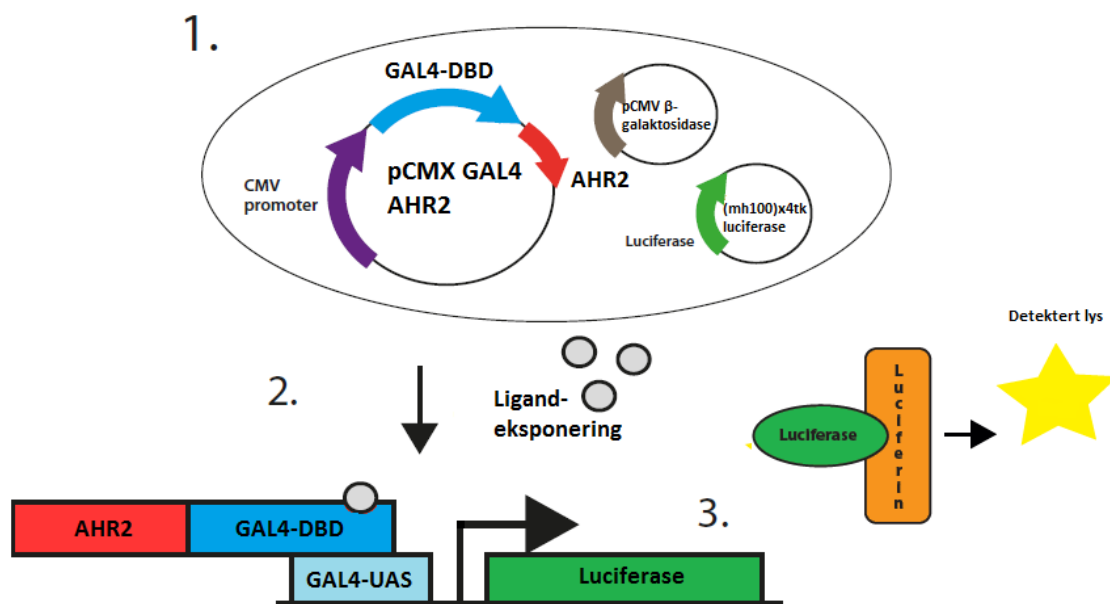
Navn	Mengde
Appliseringsbuffer	1 $\mu$ L
200 ng DNA-plasmid	x $\mu$ L
MQ H <sub>2</sub> O	9 – x $\mu$ L
Total volum	10 $\mu$ L

### 3.4 Håndtering og kultivering av COS-7 celler

Håndtering av COS-7 celler ble gjennomført med sterilteknikk på celled laboratorium. COS-7 celler lagret i frysemedium (DMEM 10 % FBS, 5 % DMSO) i flytende nitrogen ble tint og overført til friskt DMEM 10 % FBS vekstmedium (Tabell 2.7). DMSO ble fjernet ved å sentrifugere celledøsning på 500 x g i 5 min før supernatant ble fjernet og pellet resuspendert i DMEM 10% FBS. Celledøsning ble overført til en vekstskål (10 cm) og kultivert på 37 °C med 5 % CO<sub>2</sub>. Ved 70-90 % konfluens ble celler splittet. Ved splitting ble gammelt vekstmedium fjernet og cellene vasket med 1x PBS-buffer, pH 7.4. Ved å trypsinere celler ble intercellulære interaksjoner brutt og cellene løsnet fra vekstskål. Trypsin-EDTA (0,05 % trypsin, 0,02 % EDTA) ble da tilsatt i 45 sekunder før cellene ble inkubert på 37 °C med 5 % CO<sub>2</sub> i 5 min. Cellene ble resuspendert i friskt DMEM 10% FBS og en gitt mengde ble overført til en ny vekstskål med DMEM 10 % FBS etter ønsket forhold.

### 3.5 Ligandaktivering ved bruk av luciferase genreportersystem

Det ble benyttet et luciferase genreportersystem for å studere ligandaktivering av gmAhR2 og ssAhR2 $\beta$ . Metoden baserer seg på kotransfeksjon av et luciferasekodende reporterplasmid, et reseptorplasmid med rekombinant GAL4-DBD-AHR2 (evt. ssAHR2 $\beta$ ), samt et  $\beta$ -galaktosidasekodende kontrollplasmid som benyttes for normalisering av transfeksjonseffektiviteten. Reporterplasmidet reguleres av fire oppstrøms aktiveringssekvenser (UAS) for GAL4 (Forman et al., 1995). Etter transfeksjon uttrykkes fusjonsproteinet GAL4-DBD-AHR2. Ved ligandbinding til AhR2 induseres en konformasjonsendring i fusjonsproteinet og GAL4-DBD-AHR2 kan binde UAS og reportergen luciferase uttrykkes. Det translatiserte luciferase-enzymet omdanner D-luciferin til oxiluciferin i en reaksjon hvor lys frigis. Dette lyset kan detekteres og benyttes som et mål for ligandaktivering av gmAhR2/ssAhR2 $\beta$ . Ligandaktivering er illustrert i Figur 3.2.



Figur 3.2: Illustrasjon for luciferase genreportersystemet benyttet i masteroppgaven. 1. Transfeksjon av reporter-, reseptor- og kontrollplasmid inn i COS-7 celler. 2. Ligandeksponering av gmAhR2 for kjente AhR-ligander og «nye» miljøgifter. 3. Ligandaktivering av AhR2 fører til transkribering av luciferase som omdanner luciferin til oxiluciferin i en reaksjon hvor lys dannes og kan detekteres. Modifisert fra Ueland (2013).

### 3.5.1 Utsåing av COS-7 celler til 96-brønnsplate

Celler med tilnærmet 80 % konfluens ble vasket og trypsinert som beskrevet i Metode 3.4. Cellekonsentrasjon ble bestemt ved bruk av Bürker tellekammer (Marienfeld) og en løsning med  $5 \cdot 10^4$  celler/mL ble tillagd. 100  $\mu$ L celledøsning ble applisert til hver brønn på en 96-brønnsplate for å oppnå ønsket antall celler per brønn (5000 celler/brønn). Utsådde celler ble inkubert ved 37 °C med 5 % CO<sub>2</sub> i 24 timer.

### 3.5.2 Transfeksjon av plasmider

Transfeksjon ble utført et døgn etter utsåing av COS-7 celler. Cellene ble transfektert med pCMV β-galaktosidase kontrollplasmid, (mh100)x4tk luciferase reporterplasmid, samt enten reseptorplasmidet pCMX GAL4-AHR2 for torsk eller pCMX GAL4-AHR2β for laks. Transfeksjon ble utført ved bruk av TransIT®LT-1 transfeksjonsreagens (Mirus) etter protokoll fra leverandør. Transfektete celler ble inkubert på 37 °C med 5 % CO<sub>2</sub> i 24 timer.

### 3.5.2.1 Bestemmelse av masseforhold mellom reseptor- og reporterplasmid

Basert på tidligere arbeid ble optimalt masseforhold bestemt ved å variere masseforholdet mellom reseptor- og reporterplasmid (Madsen, 2016). Tre ulike masseforhold for laks og torsk ble forsøkt som vist i Tabell 3.2 og Tabell 3.3. Ut fra resultater ble reseptor- og reporterplasmid forholdet 1:50 for torsk og 1:2 for laks benyttet i videre forsøk.

Tabell 3.2: Oversikt over masseforholdet mellom plasmidene benyttet i luciferase genreportersystemet med gmAhR2.

Plasmid	1:10	1:50	1:100
pCMX $\beta$ -galaktosidase	47,62 ng	49,50 ng	49,75 ng
(mh100)x4tk luciferase	47,62 ng	49,50 ng	49,75 ng
pCMV GAL4-AHR2	4,76 ng	0,99 ng	0,50 ng
Totalt	100 ng	100 ng	100 ng

Tabell 3.3: Oversikt over masseforholdet mellom plasmidene benyttet i luciferase genreportersystemet med ssAhR2 $\beta$ .

Plasmid	1:2	1:5	1:10
pCMX $\beta$ -galaktosidase	40,00 ng	45,45 ng	47,62 ng
(mh100)x4tk luciferase	40,00 ng	45,45 ng	47,62 ng
pCMV GAL4-AHR2 $\beta$	20,00 ng	9,09 ng	4,76 ng
Totalt	100 ng	100 ng	100 ng

### 3.5.3 Ligandeksponering

Transfekterte celler ble etter 24 timers inkubering ved 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, eksponert for ulike ligander løst i DMSO eller isooktan. Seriefortynninger ble tillagd for de ulike ligandene i fenolfritt DMEM 10 % ssFBS, hvor den endelige konsentrasjonen av løsemiddel ikke oversteg 0,5 %. Vekstmedium med løsemiddel ble benyttet som negativ kontroll, mens BNF ble i forsøkene benyttet som positiv kontroll da denne er vist å kunne aktivere både gmAhR2 og ssAhR2 $\beta$  (Madsen, 2016). Tabell 3.4 viser en oversikt over ligander som ble benyttet, samt eksponeringskonsentrasjoner. Hver eksponering ble gjennomført i tre tekniske replikater i minst tre individuelle forsøk.



Tabell 3.4: Oversikt ligander benyttet i luciferase genreporterforsøk for å studere aktivering av transkripsjonsfaktorene *gmAhR2* og *ssAhR2 $\beta$* .

Kjemikalie	Høyeste kons. $\mu\text{M}$	Laveste kons. $\mu\text{M}$	Fortynningsfaktor
BNF	3,00	$1,92 \cdot 10^{-4}$	5
FICZ	0,10	$2,14 \cdot 10^{-6}$	6
Endosulfan <sup>b</sup>	10,00	$6,40 \cdot 10^{-4}$	5
Klorpyrifos <sup>b</sup>	20,00	$1,28 \cdot 10^{-3}$	5
D <sub>5</sub> <sup>b</sup>	10,00	$6,40 \cdot 10^{-4}$	5
D <sub>4</sub> <sup>b</sup>	10,00	$6,40 \cdot 10^{-4}$	5
PCB 77	0,34	$2,91 \cdot 10^{-5}$	5
PCB 105	10,00	$6,40 \cdot 10^{-4}$	5
PCB 126	10,00	$6,40 \cdot 10^{-4}$	5
TCDD	0,10	$6,40 \cdot 10^{-6}$	5
B(a)P	20,00	$1,00 \cdot 10^{-4}$	- <sup>a</sup>

a) B(a)P ble først fortynnet 1:2 og deretter med fortynningsfaktor 10.

b) Såkalte «nye» miljøgifter

### 3.5.4 Lysering av celler og måling av $\beta$ -galaktosidase- og luciferaseaktivitet

Etter ligandeksponering ble celler lysert og  $\beta$ -galaktosidase- og luciferaseaktivitet bestemt. Lyseringsreagens ble tillagd som angitt i Tabell 2.8, og 140  $\mu\text{L}$  applisert til hver brønn med celler. Cellene ble lysert i 30 min med konstant risting. Videre ble lysat (50 $\mu\text{L}$ ) fra hver brønn overført til henholdsvis en 96-brønnsplate (Nunc<sup>TM</sup>) for luminiscens måling av luciferaseaktivitet, og til en 96-brønnsplate (Nunc<sup>TM</sup>) for måling av  $\beta$ -galaktosidaseaktivitet med absorbans (420 nm).

Brønner på plate for måling av  $\beta$ -galaktosidaseaktivitet ble tilsatt ONPG (Tabell 2.9) og inkubert i romtemperatur i 15 min. Absorbans ble deretter målt ved 420 nm med en EnSpire 2300 Multilabel Reader (PerkinElmer). Hvit luminescens plate (Nunc<sup>TM</sup>) med lysat ble tilsatt D-luciferin (Tabell 2.10), og luminescens ble målt direkte etter tilsetting med EnSpire 2300 Multilabel Reader (PerkinElmer).

Luciferaseaktivitet ble normalisert ut fra målt  $\beta$ -galaktosidaseaktivitet, for å utjevne eventuelle forskjeller i transfektert plasmidmengde mellom ulike replikater. Resultater oppgis som fold endring i målt luminescens mellom eksponerte celler og kontrollceller eksponert for kun løsemiddel.

### 3.5.5 Optimalisering av luciferase genreportersystemet

Inkubasjonstid og temperatur under ligandeksponering ble variert i et forsøk på å optimalisere luciferase genreportersystemet.

### 3.5.5.1 Effekt av temperatur på luciferase genreporter-respons

For å studere hvorvidt senket temperatur under ligandeksponering kunne forbedre sensitiviteten til luciferase genreportersystemet ble inkubasjonstemperaturen endret fra 37 °C til 33 °C. Valg av inkubasjonstemperatur på 33 °C baseres på tidligere studier (Zhao et al., 2010). Foruten endret temperatur under ligandeksponering ble luciferase genreporterforsøkene gjennomført som beskrevet i Metode 3.5.1-3.5.4.

### 3.5.5.2 Effekt av eksponeringstid på luciferase ligandaktiveringssystemet

I masteroppgaven ble også aktivering av gmAhR2/ssAhR2 $\beta$  for et utvalg ligander studert ved ulike eksponeringstider. Basert på tidligere resultater ble cellene eksponert for en gitt konsentrasjon av ligandene BNF, FICZ, B(a)P og TCDD (Tabell 3.5). For å studere hvordan aktiveringen av AhR varierte med eksponeringstid ble luciferaseaktivitet målt etter 2t, 4t, 6t, 12t og 24t. Luciferase genreporterforsøkene ble ellers gjennomført som beskrevet i Metode 3.5.1-3.5.4.

Tabell 3.5: Ligander benyttet for å studere aktivering av AhR etter ulike eksponeringstider.

Ligand	Konsentrasjon
BNF	0,6 $\mu$ M
FICZ	0,0027 $\mu$ M
B(a)P	10 $\mu$ M
TCDD	0,1 $\mu$ M

## 3.6 Celleviabilitet

For å kontrollere om ligandeksponeringen påvirket celleviabilitet ble to endepunkter som måler membran-integritet og metabolsk aktivitet studert (Tabell 2.11) (Schreer et al., 2005).

Transfektete celler (AhR2 fra torsk) ble inkubert med de ulike ligandene (tre høyeste konsentrasjoner) (Tabell 3.4), løsemiddel, vekstmedium (negativ kontroll) og 1% Triton X-100 i vekstmediet (positiv kontroll for celledød). Etter 24 timers eksponering (33 °C eller 37 °C) ble 100  $\mu$ L av resazurin/CFDA-AM løsningen applisert til hver brønn og inkubert i 1 time på 33 °C / 37 °C med 5 % CO<sub>2</sub>. Fluorescenssignaler ble målt for resazurin (eksitasjon 530 nm, emisjon 590 nm) og CFDA-AM (eksitasjon 485 nm, emisjon 530 nm) med EnSpire 2300 Multilabel Reader (Perkin Elmer). Celleviabilitet ble beregnet som prosent av transfektete celler inkubert i normalt vekstmedium (DMEM 10 % ssFBS) som ble satt til 100%.

### **3.7 Statistiske beregninger**

Statistiske beregninger ble utført ved bruk av Excel 2016 (Microsoft®) og Prism 7 (Graphpad). Kruskal-Wallis en-veis ANOVA med Dunn's post hoc test ble benyttet for å beregne signifikante forskjeller mellom ueksponerte og eksponerte celler i ligandaktiveringsforsøkene. For å beregne signifikante forskjeller i celleviabilitet mellom ueksponerte og eksponerte COS-7 celler ble en-veis t-test benyttet. Signifikansnivå  $p < 0,05$  ble brukt for begge modeller.

## 4 Resultater

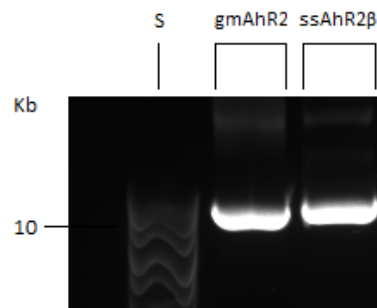
### 4.1 Kontroll av DNA-plasmider benyttet i LGS

De ulike plasmidene som ble benyttet i luciferase genreportersystemet ble i første omgang kontrollert for renhet og plasmidkonfigurasjon. Konsentrasjon og renhet for de ulike plasmidene ble målt spektrofotometrisk ved bruk av NanoDrop-1000 (Thermo Scientific). Det ble beregnet en  $A_{280/260}$ -ratio fra 1,85 til 1,91 (Tabell 4.1) for de ulike DNA-

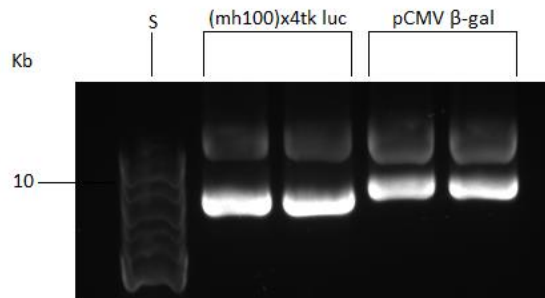
Tabell 4.1:  $A_{280/260}$ -ratio for de ulike plasmidene benyttet i masteroppgaven

Plasmid	$A_{280/260}$
mh(100)x4tk luciferase	1,91
pCMV $\beta$ -galaktosidase	1,85
pCMX GAL4-AHR2	1,86
pCMX GAL4-AHR2 $\beta$	1,90

plasmidene, noe som tyder på lite eller ingen kontaminering av proteiner. Videre ble agarose gelelektroforese gjennomført for å kontrollere konformasjonen til de ulike plasmidene. De amplifiserte og rensede plasmidene pCMV  $\beta$ -galaktosidase og (mh100)4xtk luciferase, samt reseptorplasmidene (pCMX GAL4-AHR2 og pCMX GAL4-AHR2 $\beta$ ) som allerede var amplifisert og rensert av Madsen (2016), ble separert ved AGE som beskrevet i Metode 3.3. Hovedandelen av plasmidene var i supertvunnet konfigurasjon (Figur 4.1 og Figur 4.2), som er ønskelig for en optimal transfeksjon inn i COS-7 cellene.



Figur 4.1: Kontroll av plasmidkonformasjon til reseptorplasmider med AGE. Som indikert over gelen, ble reseptorplasmidene pCMX GAL4-AHR2 (gmAHR2) og pCMX GAL4-AHR2 $\beta$  (ssAhR2 $\beta$ ) (200 ng) separert ved AGE i en 0,7 % agarosegel. S = 2 Log DNA Ladder (0,1-10,0 kb).

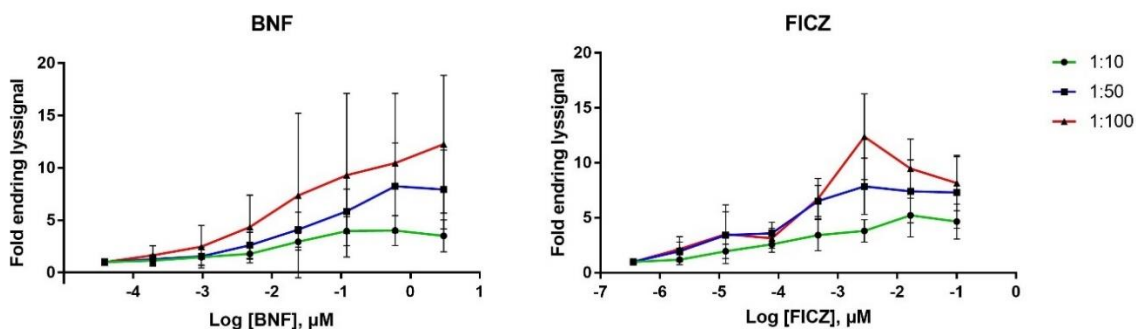


Figur 4.2: *Kontroll av konformasjonen til reporter- og kontrollplasmider med AGE. 200 ng av plasmidene (mh100)x4tk luciferase og pCMV β-galaktosidase (indikert over gelen) ble separert med AGE i en 0,7 % agarosegel. S = 2 Log DNA Ladder (0,1-10,0 kb).*

## 4.2 Bestemmelse av optimalt masseforhold mellom reseptor- og reporterplasmid for ligandaktiveringsstudier

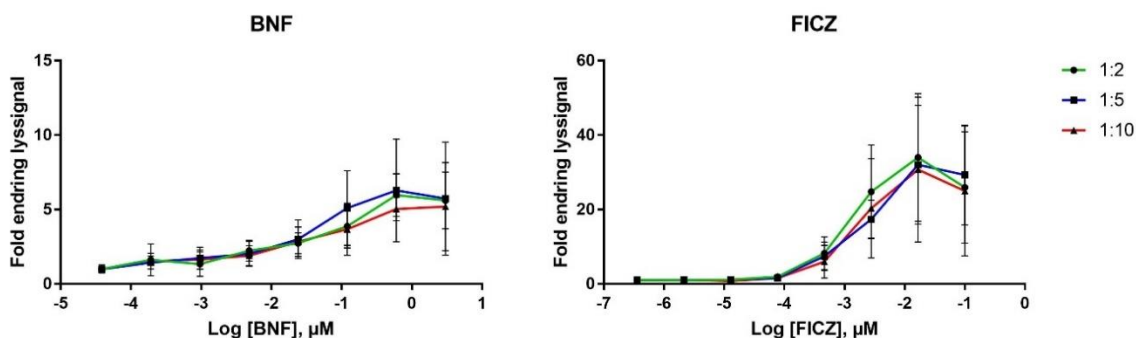
For å bestemme optimalt masseforhold mellom reseptor- og reporterplasmid ble ulike masseforhold prøvd ut før eksponeringsforsøkene startet, og ble gjennomført som beskrevet i Metode 3.5.1-3.5.4.

Tre ulike masseforhold mellom reseptor- og reporterplasmid (1:10, 1:50, 1:100 (Tabell 3.2)) ble forsøkt ved eksponering av COS-7 celler transfektert med plasmidet pCMX GAL4-AHR2 for AhR-agonistene BNF og FICZ (Figur 4.3). Det ble målt økende aktiveringseffekt med synkende masseforhold mellom reseptor- og reporterplasmid. Plasmidforholdet 1:100 gav høyest gjennomsnittlig aktivering av de tre masseforholdene som ble testet, men med relativt store standardavvik sammenlignet med 1:50 og 1:10. I videre ligandaktiveringsforsøk ble derfor masseforhold 1:50 for gmAhR2 valgt.



Figur 4.3: Bestemmelse av masseforhold mellom reseptor- og reporterplasmid for pCMX GAL4-AHR2. Tre masseforhold (1:10, 1:50 og 1:100) ble testet ved eksponering av transfekterte COS-7 celler for BNF og FICZ. Fold aktivering ble beregnet som målt luciferaseaktivitet i eksponerte celler over kontrollceller. Resultater gitt som gjennomsnittlig fold aktivering  $\pm$  standardavvik.  $n \geq 9$ .

For bestemmelse av optimalt masseforhold mellom reseptor- og reporterplasmid for pCMX GAL4-AHR2 $\beta$ , ble masseforholdene 1:2, 1:5 og 1:10 forsøkt ved eksponering av transfekterte COS-7 celler for BNF og FICZ. Det ble ikke observert tydelige forskjeller i maksimal aktivering, men for masseforholdet 1:2 ble det funnet lavere standardavvik sammenlignet med 1:5 og 1:10 (Figur 4.4). Masseforhold 1:2 ble derfor benyttet i videre ligandaktiveringsforsøk med ssAhR2 $\beta$ .



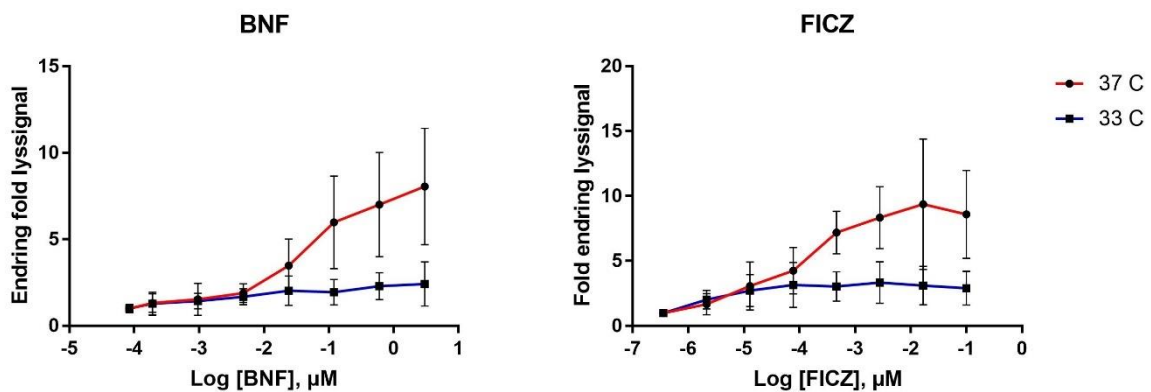
Figur 4.4: Bestemmelse av masseforhold mellom reseptor- og reporterplasmid for pCMX GAL4-AHR2 $\beta$ . Masseforhold 1:2, 1:5 og 1:10 ble forsøkt ved eksponering av transfekterte COS-7 celler for AhR agonistene BNF og FICZ. Resultater er fremstilt som gjennomsnittlig fold aktivering  $\pm$  standardavvik.  $n \geq 9$ .

### 4.3 Optimalisering av luciferase genreportersystemet

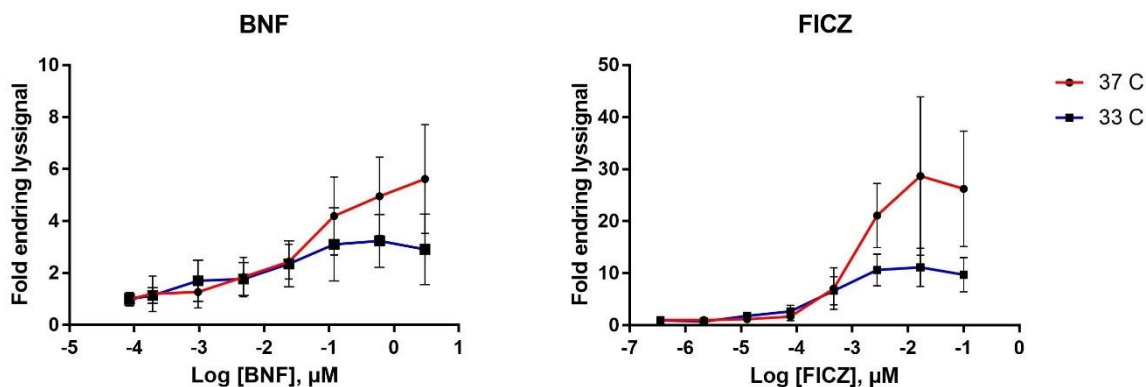
Foruten å studere ligandaktivering av gmAhR2 og ssAhR2 $\beta$  ble både inkubasjonstemperatur og eksponeringstiden variert for å vurdere mulige optimaliseringer av luciferase genreportersystemet benyttet i oppgaven. Optimaliseringsforsøkene ble utført som beskrevet i Metode 3.5.5.

#### 4.3.1 Effekt av inkubasjonstemperatur under eksponering

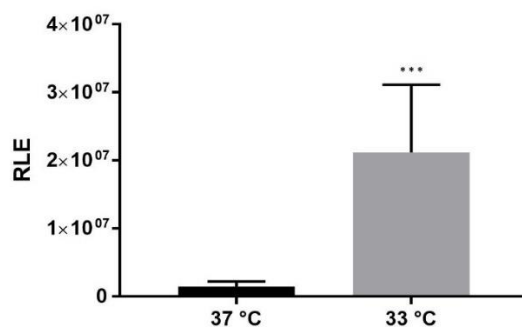
COS-7 celler transfektert med gmAhR2 eller ssAhR2 $\beta$  ble eksponert for BNF og FICZ og inkubert ved 33 °C eller 37 °C i 24 timer før luciferase- og  $\beta$ -galaktosidaseaktivitet ble målt. Resultater er beregnet som fold økning i luciferaseaktivitet mellom kontroll- (DMSO 0,1%) og eksponerte celler. For celler eksponert for BNF og FICZ ble det målt signifikant lavere aktivering ved 33 °C sammenlignet med 37 °C for gmAhR2 (Figur 4.5). For ssAhR2 $\beta$  inkubert ved 33 °C ble det målt lavere, men ikke signifikant forskjell i gjennomsnittlig aktivering sammenlignet med inkubasjon ved 37 °C (Figur 4.6). Videre ble det ved inkubering i 24 timer på 33 °C observert signifikant høyere bakgrunnsaktivitet ( $p < 0,0001$ ) i ueksponerte celler sammenlignet med inkubering på 37 °C (Figur 4.7)



Figur 4.5: Effekt av endret inkubasjonstemperatur på luciferase genreportersystemet ved ligandaktivering av gmAhR2. Under ligandeksponering av COS-7 celler ble inkubasjonstemperatur endret fra 37 °C til 33 °C. Aktivering av gmAhR2 ble målt etter 24t. Resultater er fremstilt som gjennomsnittlig fold aktivering  $\pm$  SD.



Figur 4.6: Effekt av endret inkubasjonstemperatur på luciferase genreportersystemet ved ligandaktivering av *ssAhR2β*. Under ligandeksponering av COS-7 celler ble inkubasjonstemperatur endret fra 37 °C til 33 °C. Aktivering av *ssAhR2β* ble målt etter 24t. Resultater er fremstilt som gjennomsnittlig fold aktivering  $\pm$  SD.

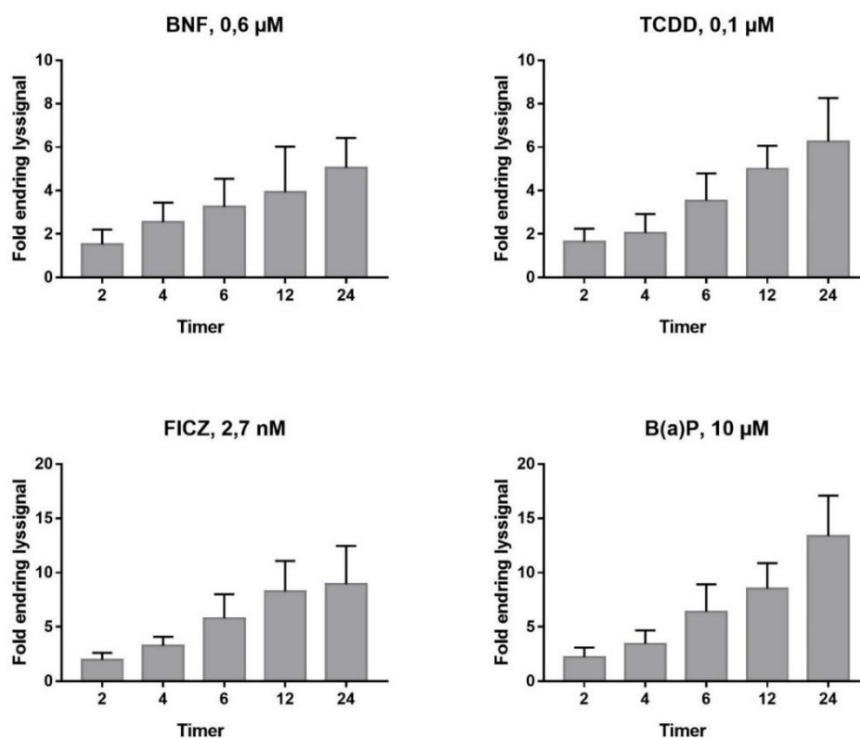


Figur 4.7: Forskjell i målt bakgrunnsaktivitet for COS-7 celler inkubert ved 33 °C og 37 °C. Bakgrunnsaktivitet gitt som detektert relativ luminicens enhet (RLE) for ueksponerte COS-7 celler transfektert med luciferase reporterplasmid.  $p < 0,0001 = ***$ ,  $n \geq 30$ .

#### 4.3.2 Aktivering av AhR2 og AhR2β ved ulike eksponeringstider

Det har tidligere blitt vist at eksponeringstid benyttet i genreportersystem kan påvirke maksimalt luciferasesignal (Pieterse et al., 2013). Med bakgrunn i dette ble eksponeringstiden med ulike ligander forsøkt variert. Luciferaseaktivitet ble målt ved eksponering av gmAhR2 ved 2t, 4t, 6t, 12t og 24t for et utvalg av ligander. Det ble valgt ut 4 ligander basert på tidligere aktiveringsforsøk (Resultat 4.4). Foruten endret eksponeringstid ble forsøkene gjennomført som beskrevet i Metode 3.5.1-3.5.4. Det ble målt økende aktivering av AhR2 de 24 første timene for alle ligander (Figur 4.8).





Figur 4.8: **Ligandaktivering av gmAhR2 etter ulike eksponeringstider.** COS-7 celler transfektert med pCMX GAL4-AHR2 ble i et luciferase genreportersystem eksponert for en gitt konsentrasjon av kjente AhR-ligander for å studere aktivering i tiden etter eksponering. Fold aktivering er beregnet som målt luciferaseaktivitet i eksponerte celler over kontrollceller eksponert for løsemiddel. Gjennomført i minst tre uavhengige forsøk med tre replikater i hvert individuelle forsøk.

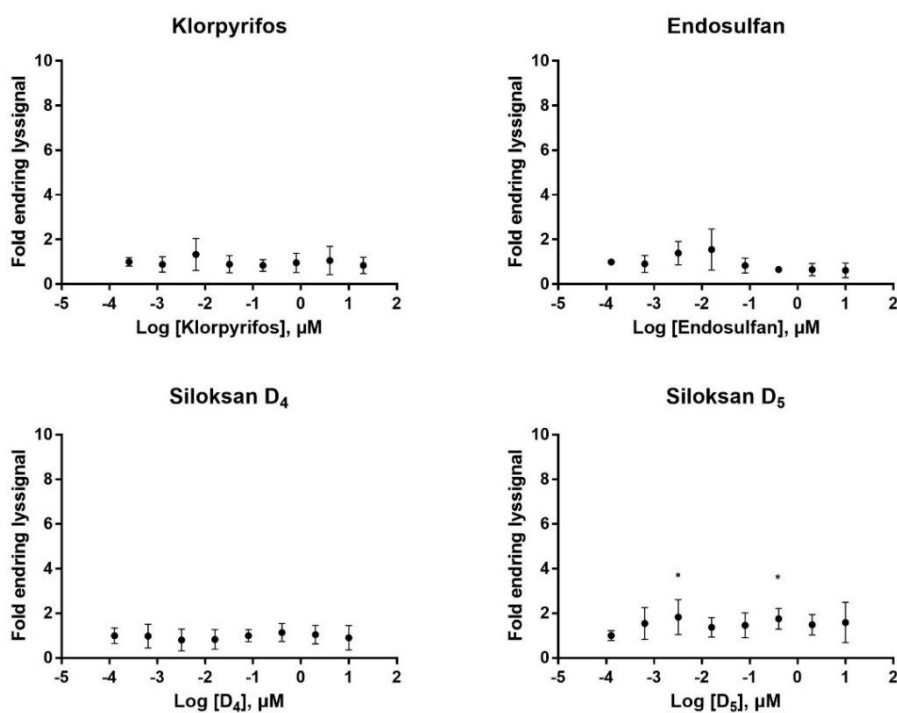
#### 4.4 Ligandaktivering av gmAhR2 og ssAhR2β

Resultater fra ligandaktiveringsforsøkene vil bli presentert i to deler: ligander som betegnes som «nye» miljøgifter, og kjente AhR-ligander. Forsøkene i å optimalisere genreportersystemet førte ikke til økt sensitivitet eller aktiveringsrespons, og ligandaktivering av gmAhR2 og ssAhR2β ble utført med den opprinnelige prosedyren (Metode 3.5.1-3.5.4).

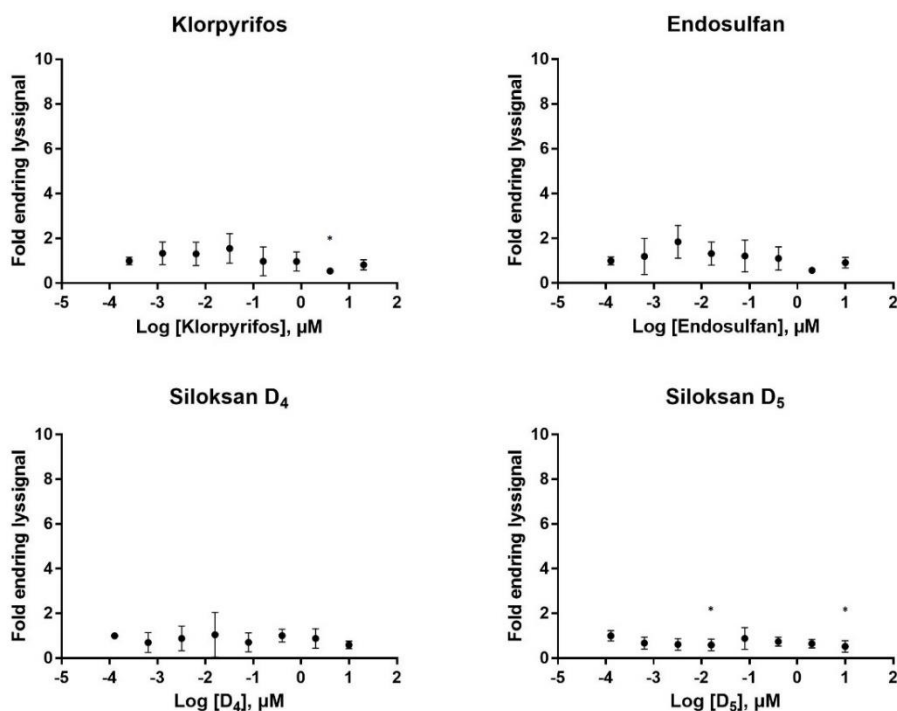
##### 4.4.1 Ligandaktivering etter eksponering for pesticider og siloksaner

Pesticidene endosulfan og klorpyrifos, samt siloksanene D<sub>4</sub> og D<sub>5</sub> ble i dette forsøket testet for potensiell agonistisk evne overfor gmAhR2 og ssAhR2β (Figur 4.9 og Figur 4.10). Det ble ikke observert en dose-respons aktivering av AhR for noen av kjemikaliene ved de konsentrasjoner som ble benyttet i forsøkene, og det ser tilsynelatende ut til at de ikke utøver noen agonistisk effekt på gmAhR2 og ssAhR2β (Figur 4.9 og Figur 4.10). ssAhR2β eksponert for D<sub>5</sub> antyder en svak nedgang i aktivering fremfor økning (Figur 4.10), og ved 10 μM og 16 nM ble det

funnet signifikant lavere uttrykking. Konsentrasjoner for maksimal aktivering og laveste signifikante aktivering for gmAhR2 og ssAhR2 $\beta$  er listet i Tabell 4.2 og Tabell 4.3.



Figur 4.9: *Ligandaktivering av gmAhR2 ved eksponering for utvalgte pesticider og siloksaner. Ligandaktivering uttrykkes som fold økning av luciferaseaktivitet i eksponerte celler over kontrollceller eksponert for kun løsemiddel. Resultater gitt som gjennomsnittlig fold aktivering  $\pm$  standardavvik,  $n = 9$ .  $p < 0,05 = *$ .*

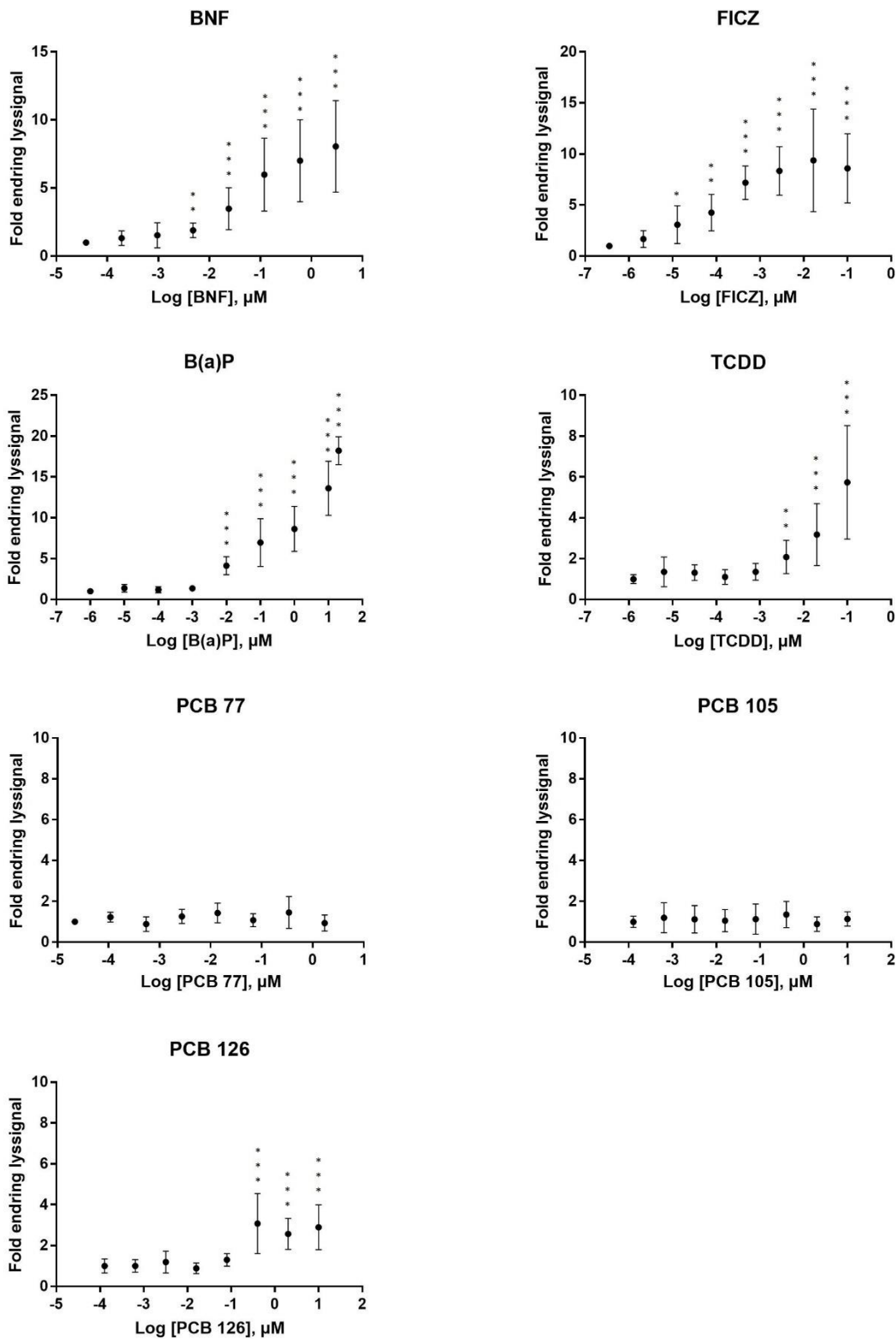


Figur 4.10: *Ligandaktivering av ssAhR2 ved eksponering for utvalgte pesticider og siloksaner. Ligandaktivering uttrykkes som fold økning av luciferaseaktivitet i eksponerte celler over kontrollceller eksponert for kun løsemiddel. Resultater gitt som gjennomsnittlig fold aktivering  $\pm$  standardavvik,  $n = 9$ .  $p < 0,05 = *$ .*

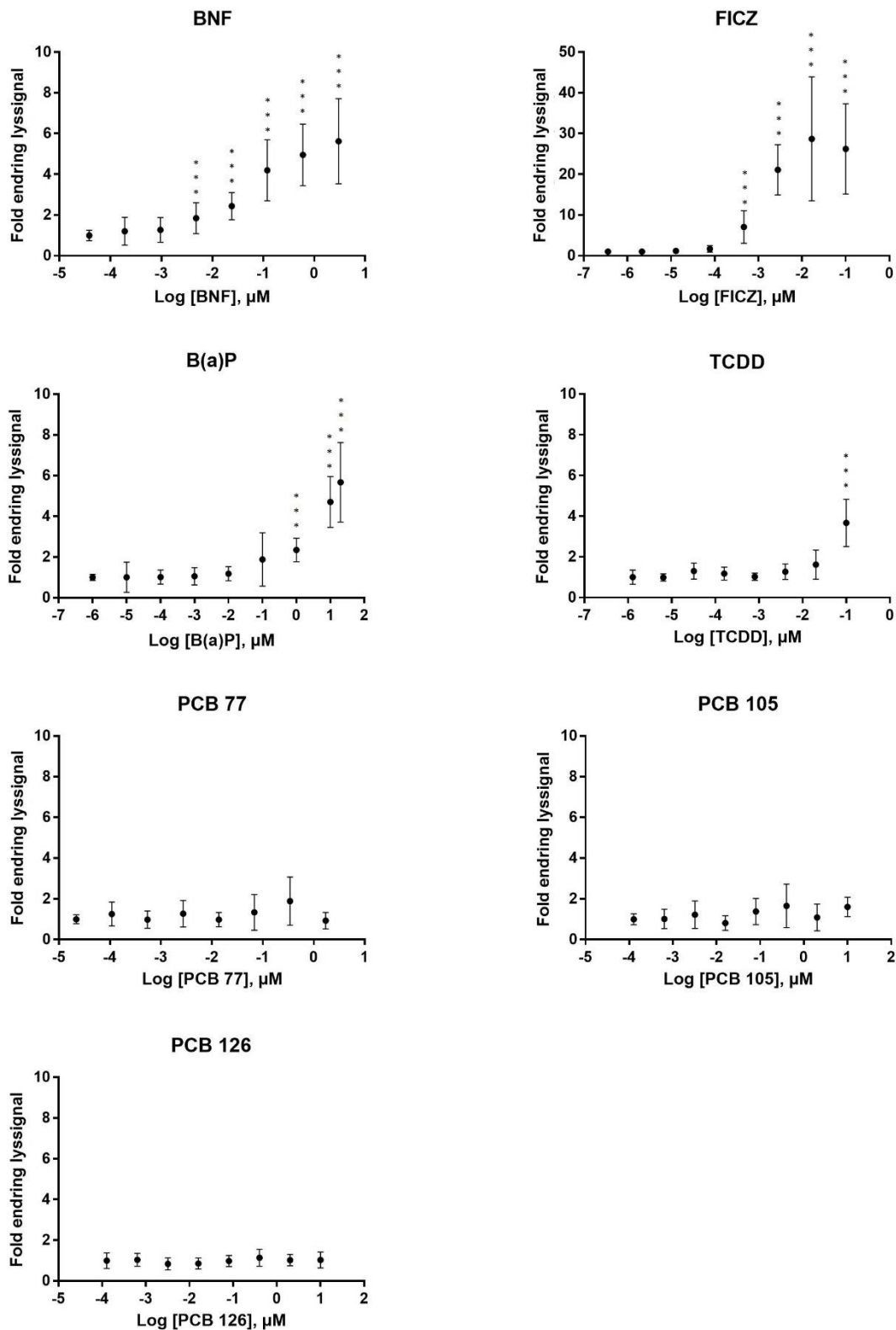
#### 4.4.2 Aktivering av gmAhR2 og ssAhR2 $\beta$ ved eksponering for kjente AhR-ligander

Sju ulike kjente AhR-ligander (Tabell 3.5) ble benyttet for studere aktivering av gmAhR2 og ssAhR2 $\beta$ . gmAhR2 ble aktivert ved eksponering for BNF, FICZ, B(a)P, TCDD og PCB 126 (Figur 4.11). FICZ førte til signifikant økning i aktivering ved henholdsvis 12,7 pM ( $3,1 \pm 1,9$  fold), og aktiverte gmAhR2 ved lavest konsentrasjon av de kjemikaliene som ble benyttet. Høyest aktivering ( $18,2 \pm 1,7$ ) ble målt for B(a)P ved 20  $\mu$ M. PCB 77 og 105 viste ingen dose-respons aktivering av gmAhR2 ved konsentrasjonene som ble benyttet i disse eksponeringsforsøkene (Figur 4.11). For de syv kjemikaliene ble et platå i dose-responskurven nådd for PCB 126 og FICZ (Figur 4.11).

Tilsvarende ble det observert en dose-respons aktivering av ssAhR2 $\beta$  ved eksponering for BNF, FICZ, TCDD og B(a)P. For utenom FICZ ( $28,7 \pm 15,2$  fold ved 16,6 nM) var maksimal aktivering for disse stoffene lavere for ssAhR2 $\beta$  sammenlignet med gmAhR2 (Tabell 4.2 og Tabell 4.3). FICZ aktiverte ssAhR2 $\beta$  ved lave konsentrasjoner, hvor minste signifikante aktivering var  $7,1 \pm 4,0$  ved 0,46 nM og var eneste ligand hvor det ble oppnådd et dose-respons platå.



Figur 4.11: Ligandaktivering av gmAhR2 etter eksponering for kjente AhR-ligander. Fold aktivering ble beregnet som målt luciferaseaktivitet i eksponerte celler over kontrollceller som kun ble eksponert for løsemiddel, og oppgitt som gjennomsnittsverdier  $\pm$  SD. Signifikante forskjell mellom eksponerte- og ueksponerte celler er merket ved  $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,01 = **$  og  $p < 0,001 = ***$ ,  $n \geq 9$ .



Figur 4.12: Ligandaktivering av *ssAhR2β* etter eksponering for kjente *AhR*-ligander. Fold aktivering ble beregnet som målt luciferaseaktivitet i eksponerte COS-7 celler over kontrollceller eksponert for kun løsemiddel. Signifikante forskjeller mellom eksponerte- og ueksponerte celler er merket ved  $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,01 = **$  og  $p < 0,001 = ***$ ,  $n \geq 9$ .

### 4.4.3 Maksimal- og laveste signifikante aktivering av gmAhR2 og ssAhR2β

Ut fra målt luciferase- og β-galaktosidaseaktivitet ble fold aktivering for gmAhR2 og ssAhR2β beregnet. Konsentrasjonene for maksimal- og laveste signifikante aktivering, samt fold aktivering av gmAhR2 og ssAhR2β for 11 ulike ligander er vist i (Tabell 4.2 og Tabell 4.3).

Tabell 4.2: *Konsentrasjoner for maksimal- og lavest signifikante aktivering av gmAhR2. Signifikant endring i aktivering mellom eksponerte celler og kontrollceller (inkubert i løsemiddel) ble beregnet ved bruk av Kruskal-Wallis en-veis ANOVA med Dunn's post hoc test,  $p < 0,05$ .*

Ligand	Maksimal aktivering			Laveste signifikante aktivering		
	Fold ± SD	Kons. (μM)	p-verdi	Fold ± SD	Kons. (μM)	p-verdi
BNF	8,1 ± 3,4	3,00	<0,0001	1,9 ± 0,5	4,80·10 <sup>-3</sup>	0,0016
FICZ	9,4 ± 5,0	1,66·10 <sup>-2</sup>	<0,0001	3,1 ± 1,9	1,27·10 <sup>-5</sup>	0,044
TCDD	5,2 ± 2,8	0,10	<0,0001	1,9 ± 0,8	4,00·10 <sup>-3</sup>	0,007
B(a)P	18,2 ± 1,7	20,00	<0,0001	4,1 ± 1,1	1,00·10 <sup>-2</sup>	0,0005
PCB 77	1,5 ± 0,8	0,34	-	-	-	-
PCB 105	0,9 ± 1,4	10,00	-	-	-	-
PCB 126	3,1 ± 1,5	0,40	<0,0001	3,1 ± 1,5	0,40	<0,0001
Endosulfan	1,6 ± 0,9	1,60·10 <sup>-2</sup>	-	-	-	-
Klorpyrifos	1,3 ± 0,7	6,4·10 <sup>-3</sup>	-	-	-	-
D <sub>4</sub>	1,1 ± 0,4	0,40	-	-	-	-
D <sub>5</sub>	1,8 ± 0,8	3,20·10 <sup>-2</sup>	0,046	1,8 ± 0,8	3,20·10 <sup>-3</sup>	<0,0001

1: Fold aktivering beregnet som målt luciferaseaktivitet i eksponerte celler over kontrollceller (inkubert med løsemiddel).

2: SD = Standardavvik,  $n \geq 9$

Tabell 4.3: *Konsentrasjoner for maksimal- og lavest signifikante aktivering ssAhR2β. Signifikant endring i aktivering mellom eksponerte celler og kontrollceller (inkubert i løsemiddel) ble beregnet ved bruk av Kruskal-Wallis en-veis ANOVA med Dunn's post hoc test,  $p < 0,05$ .*

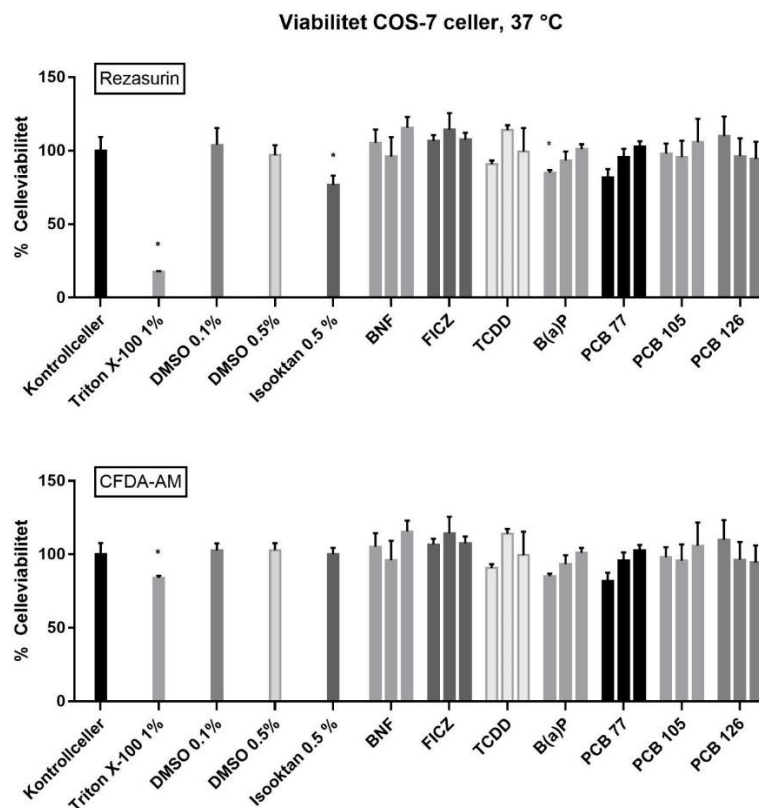
Ligand	Maksimal aktivering			Laveste signifikante aktivering		
	Fold ± SD	Kons. (μM)	p-verdi	Fold ± SD	Kons. (μM)	p-verdi
BNF	5,6 ± 2,1	3,00	<0,0001	1,9 ± 0,8	4,80·10 <sup>-3</sup>	0,0016
FICZ	28,7 ± 15,2	1,66·10 <sup>-2</sup>	<0,0001	7,1 ± 4,0	4,63·10 <sup>-4</sup>	0,044
TCDD	3,2 ± 1,3	0,10	<0,0001	3,2 ± 1,3	0,10	0,007
B(a)P	5,7 ± 2,0	20,00	<0,0001	1,9 ± 1,3	0,10	0,0005
PCB 77	1,9 ± 1,9	6,85·10 <sup>-2</sup>	-	-	-	-
PCB 105	1,7 ± 1,1	2,00	-	-	-	-
PCB 126	1,1 ± 0,4	0,40	-	-	-	-
Endosulfan	1,9 ± 0,7	3,20·10 <sup>-3</sup>	-	-	-	-
Klorpyrifos	1,6 ± 0,7	3,20·10 <sup>-4</sup>	-	0,6 ± 0,1	4,00	0,014
D <sub>4</sub>	1,1 ± 1,0	1,60·10 <sup>-2</sup>	-	-	-	-
D <sub>5</sub>	0,9 ± 0,5	0,08	-	0,6 ± 0,3	3,20·10 <sup>-3</sup>	0,046

1: Fold beregnet som målt luciferaseaktivitet eksponerte celler over kontrollceller (inkubert med løsemiddel).

2: SD = Standardavvik,  $n \geq 9$

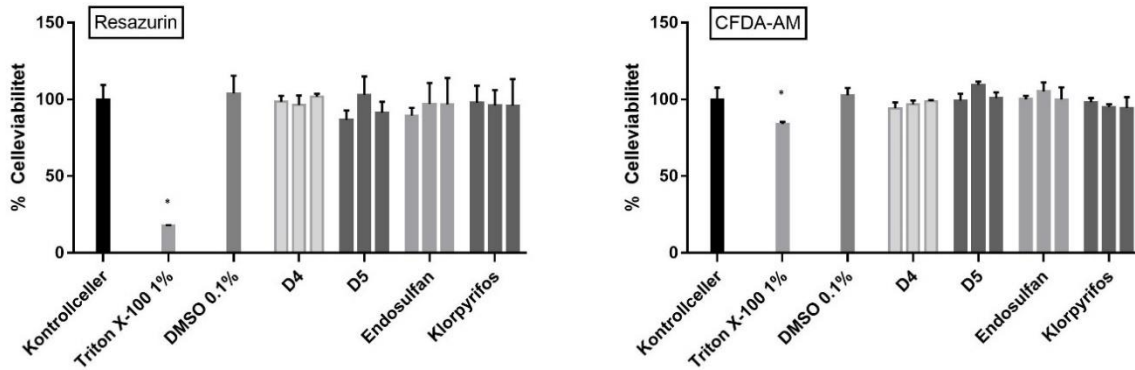
## 4.5 Celleviabilitet

For å kontrollere celleviabilitet etter ligandeksponering ble eksponerte celler inkubert med en resazurin/CFDA-AM løsning (Metode 3.6). Både resazurin og CFDA-AM omdannes til fluorescerende forbindelser av levende celler og kan detekteres fluorimetrisk som et mål for henholdsvis metabolsk aktivitet og membran-integritet. Celleviabilitet ble målt for celler inkubert både på 33 °C og 37 °C. Det ble observert nedsatt metabolisme for celler inkubert med løsemiddelet isoktan (0,5 %) og PCB 77 løst i isoktan (0,5%) (Figur 4.13). Det ble videre ikke observert nedsatt celleviabilitet under ligandeksponering med de betingelser benyttet i oppgaven (Figur 4.13, Figur 4.14 og Figur 4.15). Det ble detektert signifikant lavere fluorescens ( $p < 0,0001$ ) for celler inkubert med resazurin på 33 °C sammenlignet med inkubasjon på 37 °C (Figur 4.16).



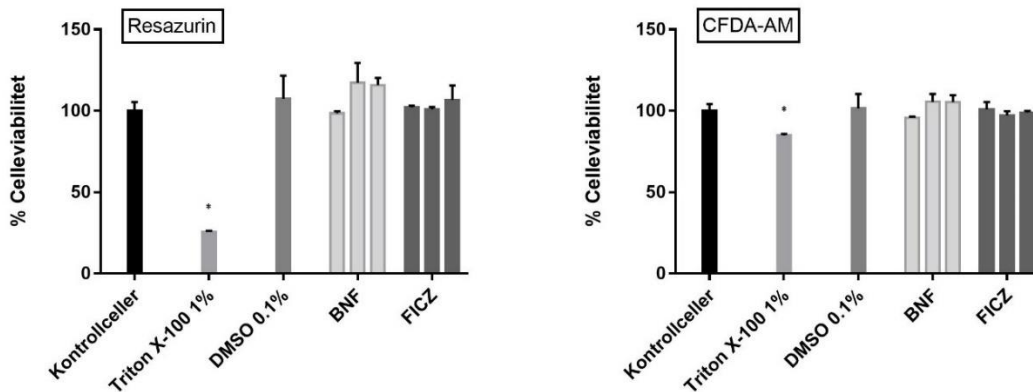
*Figur 4.13: Celleviabilitet for COS-7 celler eksponert for kjente AhR-ligander. Celleviabilitet ble målt ved tilsetning av resazurin/CFDA-AM løsning som mål for metabolsk aktivitet og membran-integritet. For ligandene brukt i oppgaven ble de tre høyeste konsentrasjonene benyttet (lav-høy) i celleviabilitetsforsøket. Celleviabilitet er gitt som prosent av ueksponerte celler (100%) ± SD. Signifikant nedgang celleviabilitet ble beregnet ved t-test,  $n = 3$ ,  $p < 0,05 = *$ .*

### Viabilitet COS-7 celler, 37 °C



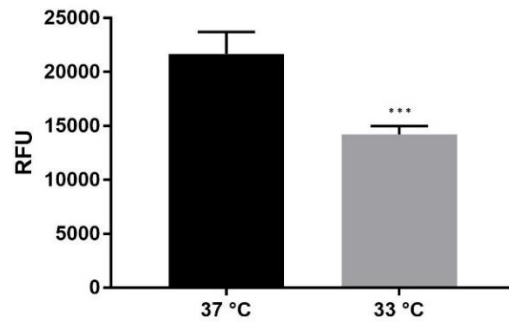
Figur 4.14: Celleviabilitet for COS-7 celler etter eksponering for utvalgte pesticider og siloksaner. Celleviabilitet ble målt ved tilsetning av resazurin/CFDA-AM løsning som mål for metabolsk aktivitet og membran-integritet. For ligandene brukt i oppgaven ble de tre høyeste konsentrasjonene benyttet (lav-høy) i celleviabilitetsforsøket. Celleviabilitet er gitt som prosent av ueksponerte celler (100%)  $\pm$  SD. Signifikant nedgang celleviabilitet ble beregnet ved t-test,  $n = 3$ ,  $p < 0,05 = *$

### Viabilitet COS-7 celler, 33 °C



Figur 4.15: Celleviabilitet for COS-7 celler inkubert på 33 °C under ligandeksponering. En resazurin/CFDA-AM løsning ble tilsatt COS-7 celler for å vurdere celleviabilitet mellom ueksponerte- og eksponerte celler. For ligandene brukt i oppgaven ble de tre høyeste konsentrasjonene benyttet (lav-høy) i celleviabilitetsforsøket. Resultater er oppgitt som prosent av ueksponerte celler der viabiliteten ble satt til 100%. Signifikante forskjeller ble beregnet ved t-test,  $n = 3$ ,  $p < 0,05 = *$





*Figur 4.16: Metabolsk aktivitet i ueksponerte COS-7 celler inkubert ved 33 °C og 37 °C. Som et mål for metabolsk aktivitet ble celler tilsatt rezasurin og fluorescens detektert, RFE – relativ fluorescens enhet. Signifikant forskjell beregnet ved t-test,  $p < 0,0001 = ***$ ,  $n \geq 6$ .*

## 5 Diskusjon

I denne oppgaven har ligandaktivering av AhR2 fra atlantehavstorsk (gmAhR2) ved eksponering for både kjente AhR-ligander og «nye» miljøgifter blitt studert. Det har blitt vist at gmAhR2 aktiveres av blant annet TCDD, men de såkalte «nye» miljøgiftene viste ikke aktiveringspotensial for gmAhR2 ved de konsentrasjoner som ble benyttet i oppgaven. Ulike optimaliseringer av genreportersystemet ble prøvd ut og det ble vist at inkubasjonstemperatur og -tid under ligandeksponering ikke førte til økt sensitivitet og aktiveringsrespons for UAS/GAL4-systemet. Resultater vil videre bli diskutert i forhold til aktuell litteratur.

### 5.1 Optimalisering av luciferase genreportersystem

I oppgaven ble det benyttet et UAS/GAL4 luciferase genreportersystem for å studere ligandaktivering av gmAhR2 og ssAhR2 $\beta$ . Det finnes flere ulike typer genreportersystem som har blitt benyttet for å studere AhR, hvor CALUX-systemet er spesielt utbredt (Murk et al., 1996). Genreportersystem har vist seg å være effektive og sensitive metoder for å kartlegge mulige AhR-ligander (Takeuchi et al., 2008, Nagy et al., 2002). Det er allikevel et ønske om å optimalisere UAS/GAL4-systemet, spesielt med tanke på økt sensitivitet og aktiveringsrespons, da dette vil kunne føre til forbedring i studier på svake agonister og eksponering ved svært lave konsentrasjoner (He et al., 2011). Videre er det et ønske om økt kunnskap om artsforskjeller i AhR-aktiveringsprofiler, noe som kan oppnås ved bruk av genreportersystem med AhR-ortologer fra ulike arter.

Det har tidligere blitt vist at senket inkubasjonstemperatur under ligandeksponering kan øke både sensitivitet og aktiveringsresponsen i CALUX-systemet (Zhao et al., 2010, He et al., 2011, Chao et al., 2012). Zhao et al. (2010) fant i sin studie at senket inkubasjonstemperatur til 33 °C fra 37 °C førte til 5-15 folds økning i luciferaseaktivitet, og resulterte i lavere deteksjonsgrense for TCDD. Samme tendens er observert i et tilsvarende CALUX-system for ER, og optimaliseringen knyttet til luciferase reporterplasmid og ikke til aktiveringsmekanismen til AhR (Zhao et al., 2010). En mulig årsak til økt sensitivitet er at luciferase-enzymet sin optimale temperatur trolig er lavere enn 37 °C grunnet dens temperatur i fysiologiske betingelser (Zhao et al., 2010). I denne oppgaven ble det derimot funnet lavere aktivering av gmAhR2 og ssAhR2 $\beta$  ved senket inkubasjonstemperatur til 33 °C sammenlignet med eksponering ved 37 °C. Til tross for lavere aktivering ved 33 °C, ble det detektert signifikant høyere bakgrunnssignal hos ueksponerte celler inkubert ved 33 °C sammenlignet med inkubasjon ved 37 °C. Målt metabolsk aktivitet i ueksponerte celler var samtidig signifikant lavere hos celler

inkubert på 33 °C enn ved 37 °C, og kan derfor ha påvirket COS-7 cellenes respons til ligandeksponeringen og produksjonen av mengde luciferase-enzym. Det kan tenkes at forskjeller mellom UAS/GAL4-systemet og CALUX-systemet, samt forskjell mellom cellelinjer (både art og vev), er årsaken til at det i oppgaven ikke ble observert samme tendensen som vist i tidligere studier.

Kjemikaliers evne til å bli metabolisert har tidligere blitt påpekt som en faktor i aktiveringsstudier (Hoogenboom et al., 2006, Windal et al., 2005). Høyere aktivering av B(a)P er funnet etter 6 timer eksponering sammenlignet med 24 timer eksponering i et CALUX-system (Pieterse et al., 2013). B(a)P kan gjennom ligandaktivering av AhR indusere transkripsjon av CYP-enzym og med dette stimulere sin egen metabolisme (Casarett et al., 2010). I motsetning til B(a)P er TCDD mer persistent og brytes ikke ned i celler, og det har blitt vist stigende aktivering med økende eksponeringstid i CALUX studier (Takeuchi et al., 2008, Pieterse et al., 2013). I oppgaven ble det observert en stigende aktivering med økt eksponeringstid for gmAhR2 ved eksponering for TCDD, BNF, FICZ og B(a)P. Hoogenboom et al. (1999) viste i sin studie forskjeller i aktivering i et CALUX-system ved fire timer versus 20 timer ved lave og høye konsentrasjoner av B(a)P. Konsentrasjoner lavere enn 0,1 µM var ikke mulig å detektere ved eksponering i 20 timer i dette systemet (Hoogenboom et al., 1999). Videre var det for høye konsentrasjoner sterkere aktivering ved 20 timer sammenlignet med 4 timer eksponering. I oppgaven ble det studert kun en konsentrasjon av B(a)P, som var svært høy (10 µM). Basert på Hoogenboom et al. (1999) sine funn kan det tenkes at økende aktivering funnet i oppgaven skyldes at mengden B(a)P var for høy til at cellene rakk å metabolisere stoffet før eksponeringstiden var over. Også i Pieterse et al. (2013) sin studie ble effekten av temperatur studert ved lave konsentrasjoner (10 nM). En annen årsak til at det i oppgaven ble observert høyere aktivering ved økt eksponeringstid sammenlignet med tidligere studier kan være forskjell i cellelinjer. I de to overnevnte studiene ble det benyttet stabilt transfekterte cellelinjer fra rottelever, og leverceller har spesielt høy metabolisme og tilstedeværelse av biotransformasjonsenzym (Casarett et al., 2010). Ut fra funnene i oppgaven og basert på tidligere studier kan det tyde på at kortere eksponeringstid er spesielt viktig ved lave konsentrasjoner, hvor inkubering i 24 timer kan føre til feilberegning av laveste aktiveringskonsentrasjon og EC<sub>50</sub>.

## **5.2 Utvalgte pesticider og siloksaner som mulige agonister for AhR2**

I torskens leveområdet blir det i dag funnet økte nivåer av såkalte «nye» miljøgifter (Vorkamp and Riget, 2014). Man vet i dag lite om distribusjon og mulige toksiske konsekvenser av disse

«nye» miljøgiftene (Bao et al., 2015). I oppgaven ble det derfor valgt å studere mulig aktivering av gmAhR2 ved eksponering for pesticidene endosulfan og klorpyrifos, samt siloksanene D<sub>4</sub> og D<sub>5</sub>.

Man finner spesielt økende konsentrasjoner av siloksanet D<sub>5</sub> i miljøet, da dette kjemikaliet er mer persistent sammenlignet med D<sub>4</sub> og D<sub>6</sub> (Gobas et al., 2015). *In vivo* studier på storhodet ørekyte (*Pimephales promelas*) og regnbueørret viser at D<sub>5</sub> akkumulerer i fisk (Parrott et al., 2013, Woodburn et al., 2013). Nivåer av D<sub>4</sub>, D<sub>5</sub> og D<sub>6</sub> ble også funnet i lever hos Atlanterhavstorsk utenfor Tromsø, hvor mengden D<sub>5</sub> dominerte (Warner et al., 2014). Effekten av økt konsentrasjon siloksaner i akvatiske miljø er ikke fullstendig kartlagt, men mye tyder på at fisk ikke er en utsatt gruppe basert på toksisitet, eksponering og bioakkumulering i organismer (Fairbrother et al., 2015, Parrott et al., 2013). Det ble ikke funnet aktivering av gmAhR2 eller ssAhR2 for de konsentrasjonene som ble benyttet i oppgaven. Eventuell toksisitet forårsaket av siloksaner ser ikke ut til å virke gjennom binding til gmAhR2 og ssAhR2 $\beta$  basert på funnene i denne oppgaven.

Endosulfan har vist seg å være toksisk for fiskearter som regnbueørret og zebrafisk (Wan et al., 2005). CYP1A er en utbredt biomarkør for eksponering av miljøgifter som utøver toksisitet gjennom AhR, og kan kvantifiseres ved blant annet kvantitativ polymerase kjedereaksjon, enzym-tilknyttede immunosorbent analyse (ELISA), western blott og 7-etoksyresourfin-O-deetylase (EROD) (enzymatisk aktivitet). *In vivo* og *in vitro* studier viser motsigende resultater ved kvantifisering av CYP1A induksjon i fisk etter eksponering for endosulfan, men enkelte studier antyder at denne forbindelsen evner å aktivere AhR (Krøvel et al., 2010, Søfteland et al., 2014, Coimbra et al., 2007, Glover et al., 2007). Ved *in vitro* eksponering for klorpyrifos (10  $\mu$ M) er det blitt påvist økte mRNA nivåer av CYP1A i hepatocytter fra laks (Søfteland et al., 2014), men i en *in vivo* studie på karpe ble det derimot ikke funnet økte nivåer av CYP1A transkript (Fu et al., 2013). Aktivering av AhR fra pattedyr ved eksponering for klorpyrifos er vist ved bruk av ulike CALUX-system (Takeuchi et al., 2008, Long et al., 2003, Medjakovic et al., 2014). I denne oppgaven ble det ikke observert agonistisk dose-respons aktivering av gmAhR2 og ssAhR2 $\beta$  ved eksponering for verken endosulfan og klorpyrifos. Grunnet varierende funn i tidligere studier kan allikevel ikke aktivering ved høyere konsentrasjoner og aktivering av andre AhR-varianter hos laks og torsk utelukkes. I oppgaven ble det vist at noen få enkeltkonsentrasjoner av klorpyrifos og siloksan D<sub>5</sub> var signifikant ulike i forhold til kontrollceller, men grunnet variasjoner i systemet og høy p-verdi representerer dette antakelig ikke reelle aktiveringer av gmAhR2 og ssAhR2 $\beta$ .

### 5.3 Ligandaktivering av gmAhR2 ved eksponering for kjente ligander

Dioksiner og dioksinlike PCBer er kjente AhR-ligander, og TCDD er en vanlig modellforbindelse i studier av AhR. Det har tidligere blitt vist at TCDD kan binde ulike AhR-varianter hos fisk, inkludert ssAhR2 $\beta$  benyttet i denne oppgaven (Abnet et al., 1999b, Hansson and Hahn, 2008, Bak et al., 2013, Karchner et al., 2005). Videre er det gjennom knock-out studier på zebrafisk bekreftet at TCDD toksisitet er mediert via zfAhR2 (Prasch et al., 2003). TCDD har tidligere ikke blitt benyttet for å studere aktivering av gmAhR2 *in vitro*, og i oppgaven ble det vist at TCDD kan aktivere gmAhR2. Signifikant aktivering ble nådd ved eksponering for 4 nM ( $1,9 \pm 0,5$ ), og aktiverer med dette gmAhR2 ved den laveste konsentrasjon av de antropogene stoffene benyttet i oppgaven. Aktivering av AhR ved eksponering for TCDD har vist seg å variere med art, metode og AhR-variant. EC<sub>50</sub> er i disse studiene funnet å være fra 0,036-5,9 nM for ulike AhR-varianter og arter (Abnet et al., 1999a, Karchner et al., 2005, Bak et al., 2013, Hansson and Hahn, 2008, Doering et al., 2015). I oppgaven ble det funnet at ssAhR2 $\beta$  er mindre sensitiv enn gmAhR (ble aktivert ved 100 nM TCDD), og det er tidligere vist at ssAh2 $\beta$  ikke er en sensitiv AhR2-variant hos laks (Hansson and Hahn, 2008). EC<sub>50</sub> for ssAhR2 $\beta$  er i en tidligere studie beregnet til  $0,4 \text{ nM} \pm 0,1$ , som er lavere enn funnene i denne oppgaven. Forskjellen kan skyldes ulikheter mellom de to aktiveringssystemene, hvor systemet Hansson and Hahn (2008) benyttet inneholdt bindingspartneren ARNT i motsetning til UAS/GAL4-systemet. Sammenlignet med tidligere aktivering av AhR fra fisk, blant annet ssAhR $\beta$ , og funnene i oppgaven kan det tyde på at luciferase genreportersystemet benyttet i oppgaven er mindre sensitivt.

Hos fisk er det i motsetning til pattedyr observert en forskjell i sensitivitet for mono-orto- og non-orto PCBer, hvor fisk er lite sensitive til mono-orto PCBer (Hestermann et al., 2000, Abnet et al., 1999b). I oppgaven ble to non-orto PCBer benyttet som AhR-ligander: PCB 77 og PCB 126. PCB 77 viste ikke agonistisk effekt for gmAhR2 eller ssAhR2 $\beta$  ved konsentrasjonene benyttet i oppgaven, og stemmer overens med tidligere genreporterstudier med AhR-varianter fra fiskearter som regnbueørret og zebrafisk (Abnet et al., 1999b). Ved *in vivo* studier er det funnet induksjon av CYP1A som følge av PCB 77 eksponering, hvor blant annet økt oppregulering av CYP1A er vist i laks gjennom ELISA og EROD (Arukwe et al., 2001, Yuan et al., 2006). I denne oppgaven ble det benyttet PCB 77 løst i isooktan med høyeste eksponeringskonsentrasjon  $0,34 \mu\text{M}$ . Celleviabilitetsforsøk og visualisering av celler i mikroskop antydte at løsemiddelet isooktan (0,5 %) påvirket COS-7 cellene negativt. Størst effekt ble målt for celler inkubert i isooktan (0,5 %) med en nedgang fra 100 % til 76 %

metabolsk aktivitet sammenlignet med kontrollceller. Sett i sammenheng med motstridene resultater kan en mulig aktivering forekomme ved høyere eksponeringskonsentrasjon, eller ved å benytte PCB 77 i et annet løsemiddel. Ut fra resultatene i denne oppgaven tyder det allikevel på at gmAhR2 og ssAhR2 $\beta$  ikke er særlig sensitive for PCB 77. Det har tidligere blitt vist at PCB 126 aktiverer gmAhR2, men ikke ssAhR2 (Madsen, 2016), noe som stemmer overens med funnene i denne oppgaven. Det ble for PCB 126 benyttet høyere konsentrasjon enn i tidligere ligandaktiveringsforsøk, og platå for dose-responskurven ble nådd ved eksponering for 0,4  $\mu$ M for gmAhR2.

PCB 105 er en mono-orto dioksinlik PCB benyttet i ligandaktiveringsforsøkene. Det ble ikke observert agonistisk effekt for verken gmAhR2 eller ssAhR2 $\beta$ , noe som ikke var uventet da fisk generelt er lite sensitive for mono-orto PCBer. Funnene i oppgaven stemmer overens med tidligere aktiveringsstudier med AhR fra regnbueørret og laks (Abnet et al., 1999b). Videre er det funnet at PCB 105 utøver antagonistisk effekt for AhR ved koeksponering *in vivo* hos tomcod (*Microgadus tomcod*) og *in vitro* i PLHC1-fiskeceller (Yuan et al., 2006, Hestermann et al., 2000).

### 5.3.1 Kjente gmAhR2 ligander

Madsen (2016) viste i sin masteroppgave aktivering av gmAhR2 ved eksponering for BNF, B(a)P og FICZ. Basert på funnene til Madsen (2016) ble det i denne oppgaven studert aktivering av gmAhR2 ved lavere og høyere konsentrasjoner for henholdsvis FICZ og B(a)P enn tidligere benyttet. Det ble observert stigende dose-respons aktivering for gmAhR2 ved eksponering for B(a)P, og ingen tegn til at dose-respons kurven skulle nå platå ved høyeste konsentrasjon (20  $\mu$ M) benyttet under ligandaktiveringen. Tryptophan-derivaten FICZ er blitt diskutert som mulig endogen ligand (Denison and Nagy, 2003), og aktiverer AhR fra torsk (gmAhR2), zebrafisk (zfAhR1b og zfAhR2) og laks ved svært lave konsentrasjoner (Jonsson et al., 2009, Madsen, 2016, Bemanian, 2003). Sammenlignet med tidligere aktiveringsforsøk av gmAhR2 og ssAhR2 $\beta$  med BNF, B(a)P og FICZ ble det funnet høyere aktiveringskonsentrasjon og maksimal aktivering i denne oppgaven. De ulike funnene kan være et resultat av forskjeller som følge av ulikt masseforhold mellom reseptor- og reporterplasmid benyttet i luciferase genreportersystemet, hvor lavere masseforhold førte til høyere maksimal aktivering. Dette ble observert av Madsen (2016) i hans masteroppgave og i denne oppgaven.

## 5.4 Kommentarer til luciferase genreportersystemet benyttet

Ved ligandaktivering av gmAhR2 og ssAhR2 $\beta$  ble det målt svært varierende økning i aktivering for de ulike konsentrasjonene, noe som resulterte i store standardavvik. Variansen ble hovedsakelig observert mellom ulike forsøk, og ikke mellom replikater innad i de individuelle forsøkene. For gmAhR2 ble det observert høyere standardavvik ved synkende masseforhold mellom reporter- og reseptorplasmid, og kunne muligens vært unngått ved valg høyere plasmidforhold. Det ble forsøkt å kartlegge eventuelle metodiske årsaker til forskjellene uten å lykkes, men man kan ikke se bort ifra at systemet er sensitivt for metodiske forskjeller i tidsrommet (fire dager) et forsøk tar. Forskjeller i aktivering ble forsøkt lokalisert ved å sammenligne resultater fra forsøk med ulikt passasje nr. av COS-7 celler, målt  $\beta$ -galaktosidase aktivitet, og forsøk hvor nye tillagde løsninger var benyttet (eks. D-luciferin og plasmidmix).

Det finnes mange ulike luciferase genreportersystem, blant annet CALUX, UAS/GAL4 baserte system og system med transient kotransfeksjon av både AhR, ARNT og et XRE-kontrollert reporterplasmid. Selv om de ulike metodene har flere fellestrekk er det distinkte forskjeller, og sammenligning på tvers av studier kan kun gjøres til en viss grad. Videre finnes det flere varianter av de ulike systemene, som blant annet variasjoner i antall XRE, antall UAS og ulike cellelinjer (både vev og art). Long et al. (2003) fant også forskjeller i TCDD aktiveringsrespons ved bruk av cellelinjer fra rotte og menneske (*Homo sapiens*) i CALUX-systemet, og variasjoner mellom lever-cellelinjer fra rotte og menneske er også vist ved bruk av UAS/GAL4-systemet (Backlund and Ingelman-Sundberg, 2004). Videre skjer ikke ligandaktiveringen av gmAhR2 i dens fysiologiske omgivelser. Valg av cellelinje, og med det arts- og vevsforskjeller i kofaktorer kan også påvirke optimal funksjon og dermed aktiveringsrespons. Det kan ikke utelukkes at GAL4-DBD domenet som er fusjonert til gmAhR2 kan påvirke AhR2 sin konformasjon og ligandbindende egenskaper. UAS/GAL4-systemet er ikke avhengig av bindingspartneren ARNT (Backlund and Ingelman-Sundberg, 2004), og manglende interaksjoner mellom de to PAS-proteinene kan også ha påvirket resultatene i oppgaven. Videre er gmAhR2 er en transkripsjonsfaktor fra fisk og det kan tenkes at dens optimale temperatur er lavere enn 33 °C og 37 °C som benyttes under forsøkene, noe som kan innvirke på ligandaktiveringen.

## 6 Konklusjon

I denne oppgaven har ligandaktivering av AhR2 fra torsk blitt studert ved eksponering for både kjente AhR-ligander og såkalte «nye» miljøgifter. Det ble vist at TCDD fører til en dose-avhengig aktivering av gmAhR2, men transkripsjonsfaktoren ble ikke aktivert av de dioksinlike PCB 77 og PCB 105. Fire «nye» miljøgifter; siloksanene D<sub>4</sub> og D<sub>5</sub>, pesticidene endosulfan og klorpyrifos, viste heller ikke agonistisk effekt i form av aktivering av gmAhR2 og heller ikke av ssAhR2 $\beta$ .

Det ble også testet ut optimaliseringer av luciferase genreportersystemet benyttet i oppgaven ved å senke inkubasjonstemperatur under ligandeksponering til 33 °C. Temperaturendringen førte ikke til forbedret sensitivitet og resulterte i en lavere aktivering sammenlignet med eksponering på 37 °C. Aktivering etter ulike eksponeringstider ble også studert de 24 første timene. Ut fra resultatene i denne oppgaven ble det ikke funnet høyere aktivering ved kortere eksponeringstider enn 24 timer. Basert på funnene i oppgaven førte ikke endringene i cellekultur betingelser som endret inkubasjonstid og -temperatur til optimalisering av UAS/GAL4 luciferase genreportersystemet benyttet.

### 6.1 Videre arbeid

Tidligere studier på ulike AhR-varianter fra fisk viser forskjellig evne til å binde ligander (Abnet et al., 1999b, Hansson and Hahn, 2008, Karchner et al., 2005). Torsk har to gener for AhR, AhR1b og AhR2, og selv om AhR2 knyttes til toksisitet forårsaket av miljøgifter, har det hos noen fiskearter vist seg at AhR1 kan binde TCDD, blant annet hos zebrafisk og rød brosme (Karchner et al., 2005, Bak et al., 2013). Karakterisering, kloning og etablering av ligandaktiveringssystem for AhR1 er for tiden under arbeid ved miljøtoksikologigruppen, UIB. Dette muliggjør for sammenligningsstudier i fremtiden og vil kunne bidra til et mer helhetlig bilde av atlantehavstorskens respons til miljøgifter. Videre vil kartlegging av vevspesifikk uttrykking av AhR1b og AhR2 kunne bedre forståelsen av de to variantene sin rolle som xenobiotisk sensor og deres fysiologiske roller.

Det har tidligere blitt vist at PCB 105 har antagonistisk effekt ved koeksponering hos ulike fiskearter (Hestermann et al., 2000, Yuan et al., 2006), og det kan også være et tilfelle hos torsk. For stoffene man i denne oppgaven ikke observerte dose-respons aktivering, blant annet de «nye» miljøgiftene benyttet, kan man ikke utelukke at de allikevel kan binde AhR og utøve en antagonistisk effekt på gmAhR2. Videre eksponeres atlantehavstorsken for en blanding av kjemikalier i dens habitat og et mer reelt bilde vil være å studere effekten ved eksponering for



blandinger. Mulige interaksjoner mellom kjemikalier kan påvirke aktiveringen av gmAhR2 og resultere i synergiske-, additive- eller antagonistiske responser (Casarett et al., 2010).

Ved å studere andre endepunkter for gmAhR2 aktivering på protein- og gennivå vil man kunne få en bedre helhetsforståelse og bekrefte funnene i oppgaven. *In vitro* eksponeringsstudier med leverskiver fra torsk med de samme stoffene benyttet i denne oppgaven er for tiden under arbeid ved miljøtoksikologigruppen, UIB. Resultatene fra leverskive-studiene kan bidra til å bekrefte funnene i oppgaven.

Som tidligere nevnt er det vist forskjeller i aktivering i genreportersystem med ulike cellelinjer, både CALUX- og UAS/GAL4-systemer (Long et al., 2003, Backlund and Ingelman-Sundberg, 2004). I flere genreportersystem benyttes leverceller, noe som er naturlig da leveren er hovedorgan for detoksifisering og har høy tilstedeværelse av biostransformasjonsenzymmer (Casarett et al., 2010). Et skifte til leverceller kan muligens øke sensitiviteten og aktiveringsresponsen til systemet benyttet i oppgaven. Videre kan bruk av fiskeceller kunne bidra til et mer reelt bilde for gmAhR2 sitt fysiologiske miljø. Dette med tanke på temperatur og kofaktorer fra fisk som kan være viktige i forhold til å mediere aktivering. For å videreføre arbeidet med valg av optimal eksponeringstid for ulike kjemikalier det tenke seg at en serie konsentrasjoner for de ulike kjemikaliene burde blitt benyttet, hvor eksponeringstid for lave konsentrasjoner kan studeres.

## 7 Litteraturliste

- ABEL, J. & HAARMANN-STEMMANN, T. 2010. An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology. *Biol. Chem.*
- ABNET, C. C., TANGUAY, R. L., HAHN, M. E., HEIDEMAN, W. & PETERSON, R. E. 1999a. Two forms of aryl hydrocarbon receptor type 2 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Evidence for differential expression and enhancer specificity. *J Biol Chem*, 274, 15159-66.
- ABNET, C. C., TANGUAY, R. L., HEIDEMAN, W. & PETERSON, R. E. 1999b. Transactivation activity of human, zebrafish, and rainbow trout aryl hydrocarbon receptors expressed in COS-7 cells: greater insight into species differences in toxic potency of polychlorinated dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran, and biphenyl congeners. *Toxicol Appl Pharmacol*, 159, 41-51.
- ANDREASEN, E. A., HAHN, M. E., HEIDEMAN, W., PETERSON, R. E. & TANGUAY, R. L. 2002. The zebrafish (*Danio rerio*) aryl hydrocarbon receptor type 1 is a novel vertebrate receptor. *Mol Pharmacol*, 62, 234-49.
- ARNOT, J. A. & GOBAS, F. A. P. C. 2003. A Generic QSAR for Assessing the Bioaccumulation Potential of Organic Chemicals in Aquatic Food Webs. Weinheim.
- ARUKWE, A., YADETIE, F., MALE, R. & GOKSOYR, A. 2001. In vivo modulation of nonylphenol-induced zonation and vitellogenesis by the antiestrogen, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (PCB-77) in juvenile fish. *Environ Toxicol Pharmacol*, 10, 5-15.
- BACKLUND, M. & INGELMAN-SUNDBERG, M. 2004. Different structural requirements of the ligand binding domain of the aryl hydrocarbon receptor for high- and low-affinity ligand binding and receptor activation. *Mol Pharmacol*, 65, 416-25.
- BAIRD, C. & CANN, M. C. 2012. *Environmental chemistry*, New York, W.H. Freeman and Co.
- BAK, S. M., IIDA, M., HIRANO, M., IWATA, H. & KIM, E. Y. 2013. Potencies of red seabream AHR1- and AHR2-mediated transactivation by dioxins: implication of both AHRs in dioxin toxicity. *Environ Sci Technol*, 47, 2877-85.
- BAO, L. J., WEI, Y. L., YAO, Y., RUAN, Q. Q. & ZENG, E. Y. 2015. Global trends of research on emerging contaminants in the environment and humans: a literature assimilation. *Environ Sci Pollut Res Int*, 22, 1635-43.
- BAROUKI, R., AGGERBECK, M., AGGERBECK, L. & COUMOUL, X. 2012. The aryl hydrocarbon receptor system. *Drug Metabol Drug Interact*, 27, 3-8.
- BAROUKI, R., COUMOUL, X. & FERNANDEZ - SALGUERO, P. M. 2007. The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Letters*, 581, 3608-3615.
- BEISCHLAG, T. V., LUIS MORALES, J., HOLLINGSHEAD, B. D. & PERDEW, G. H. 2008. The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 18, 207-50.
- BEMANIAN, V. L., M. ; RANNAUG, A. ; GOKSØYR, A. ; MALE, R. 2003. Modulation of cytochrom P450 1A and vitellogenin gene expression in the fish liver by suggested natural ligands of the aryl hydrocarbon receptor. *Organohalogen Compounds*, Volumes 60-65.
- BILLIARD, S. M., TIMME-LARAGY, A. R., WASSENBERG, D. M., COCKMAN, C. & DI GIULIO, R. T. 2006. The role of the aryl hydrocarbon receptor pathway in mediating synergistic developmental toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to zebrafish. *Toxicol Sci*, 92, 526-36.
- BLUMBERG, B., SABBAGH, W., JUGUILON, H., BOLADO, J., VAN METER, C. M., ONG, E. S. & EVANS, R. M. 1998. SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor. *Genes & development*, 12, 3195.
- BRANCHINI, B. R., SOUTHWORTH, T. L., FONTAINE, D. M., KOHRT, D., TALUKDER, M., MICHELINI, E., CEVENINI, L., RODA, A. & GROSSEL, M. J. 2015. An enhanced chimeric firefly luciferase-inspired enzyme for ATP detection and bioluminescence reporter and imaging applications. *Anal Biochem*, 484, 148-53.

- BRENNAN, J. C., HE, G., TSUTSUMI, T., ZHAO, J., WIRTH, E., FULTON, M. H. & DENISON, M. S. 2015. Development of Species-Specific Ah Receptor-Responsive Third Generation CALUX Cell Lines with Enhanced Responsiveness and Improved Detection Limits. *Environ Sci Technol*, 49, 11903-12.
- CARLS, M. G., RICE, S. D. & HOSE, J. E. 1999. Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part I. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval pacific herring ( *Clupea pallasii*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, 481-493.
- CARSON, R. 1962. *Silent spring*, Greenwich, Conn.
- CASARETT, L. J., KLAASSEN, C. D., DOULL, J. & WATKINS, J. B. 2010. *Casarett & Doull's essentials of toxicology*, New York, McGraw-Hill.
- CESPEDES, M. A., GALINDO, M. I. & COUSO, J. P. 2010. Dioxin toxicity in vivo results from an increase in the dioxin-independent transcriptional activity of the aryl hydrocarbon receptor. *PLoS One*, 5, e15382.
- CHAO, H.-R., WANG, Y.-F., WANG, Y.-N., LIN, D.-Y., GOU, Y.-Y., CHEN, C.-Y., CHEN, K.-C., WU, W.-K., CHIANG, B.-A., HUANG, Y.-T., HSIEH, L.-T., YEH, K.-J. & TSOU, T.-C. 2012. An Improved AhR Reporter Gene Assay for Analyzing Dioxins in Soil, Sediment and Fish. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 89, 739-743.
- CLARK, B. W., MATSON, C. W., JUNG, D. & DI GIULIO, R. T. 2010. AHR2 mediates cardiac teratogenesis of polycyclic aromatic hydrocarbons and PCB-126 in Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Aquat Toxicol*, 99, 232-40.
- COIMBRA, A. M., FIGUEIREDO-FERNANDES, A. & REIS-HENRIQUES, M. A. 2007. Nile tilapia ( *Oreochromis niloticus*), liver morphology, CYP1A activity and thyroid hormones after Endosulfan dietary exposure. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 89, 230-236.
- DENISON, M. S. & NAGY, S. R. 2003. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 43, 309-34.
- DENISON, M. S., SOSHILOV, A. A., HE, G., DEGROOT, D. E. & ZHAO, B. 2011. Exactly the same but different: promiscuity and diversity in the molecular mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor. *Toxicol Sci*, 124, 1-22.
- DOERING, J. A., FARMAHIN, R., WISEMAN, S., BEITEL, S. C., KENNEDY, S. W., GIESY, J. P. & HECKER, M. 2015. Differences in activation of aryl hydrocarbon receptors of white sturgeon relative to lake sturgeon are predicted by identities of key amino acids in the ligand binding domain. *Environ Sci Technol*, 49, 4681-9.
- DOERING, J. A., GIESY, J. P., WISEMAN, S. & HECKER, M. 2013. Predicting the sensitivity of fishes to dioxin-like compounds: possible role of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) ligand binding domain. *Environ Sci Pollut Res Int*, 20, 1219-24.
- EIDE, M. 2016. *Experimental systems for studying toxicological responses in teleost species*. PhD Universitetet i Bergen.
- EIDE, M., KARLSEN, O. A., KRYVI, H., OLSVIK, P. A. & GOKSOYR, A. 2014. Precision-cut liver slices of Atlantic cod (*Gadus morhua*): an in vitro system for studying the effects of environmental contaminants. *Aquat Toxicol*, 153, 110-5.
- FAIRBROTHER, A., BURTON, G. A., KLAINE, S. J., POWELL, D. E., STAPLES, C. A., MIHAICH, E. M., WOODBURN, K. B. & GOBAS, F. A. 2015. Characterization of ecological risks from environmental releases of decamethylcyclopentasiloxane (D5). *Environ Toxicol Chem*, 34, 2715-22.
- FAO. 2016. *Aquatic Species Distribution Map Viewer* [Online]. Available: <http://www.fao.org/figis/geoserver/factsheets/species.html?species=COD-m&prj=4326> [Accessed 15. mars 2016].
- FERNANDEZ-SALGUERO, P., PINEAU, T., HILBERT, D. M., MCPHAIL, T., LEE, S. S., KIMURA, S., NEBERT, D. W., RUDIKOFF, S., WARD, J. M. & GONZALEZ, F. J. 1995. Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science*, 268, 722-6.

- FORMAN, B. M., UMESONO, K., CHEN, J. & EVANS, R. M. 1995. Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors. *Cell*, 81, 541.
- FU, Y., LI, M., LIU, C., QU, J. P., ZHU, W. J., XING, H. J., XU, S. W. & LI, S. 2013. Effect of atrazine and chlorpyrifos exposure on cytochrome P450 contents and enzyme activities in common carp gills. *Ecotoxicol Environ Saf*, 94, 28-36.
- FUKUNAGA, B. N., PROBST, M. R., REISZ-PORSZASZ, S. & HANKINSON, O. 1995. Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem*, 270, 29270-8.
- GLOVER, C. N., PETRI, D., TOLLEFSEN, K. E., JORUM, N., HANDY, R. D. & BERNTSEN, M. H. 2007. Assessing the sensitivity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) to dietary endosulfan exposure using tissue biochemistry and histology. *Aquat Toxicol*, 84, 346-55.
- GLUZMAN, Y. 1981. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*, 23, 175-182.
- GOBAS, F. A., POWELL, D. E., WOODBURN, K. B., SPRINGER, T. & HUGGETT, D. B. 2015. Bioaccumulation of decamethylpentacyclosiloxane (D5): A review. *Environ Toxicol Chem*, 34, 2703-14.
- GOKSØYR, A. 1985. Purification of hepatic microsomal cytochromes P-450 from  $\beta$ -naphthoflavone-treated Atlantic cod (*Gadus morhua*), a marine teleost fish. *BBA - General Subjects*, 840, 409-417.
- GOKSØYR, A. 1987. *Characterization of the cytochrome P-450 mono-oxygenase system in fish liver : metabolism and effects of organic xenobiotics*. Department of Biochemistry, University of Bergen.
- 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., SOLBAKKEN, J. E. & 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, 247-263.
- GU, Y. Z., HOGENESCH, J. B. & BRADFIELD, C. A. 2000. The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 40, 519.
- HAHN, M. E. 2001. Dioxin toxicology and the aryl hydrocarbon receptor: insights from fish and other non-traditional models. *Mar Biotechnol (NY)*, 3, S224-38.
- HAHN, M. E. 2002. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem Biol Interact*, 141, 131-60.
- HANKINSON, O. 1995. The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 35, 307-40.
- HANSSON, M. C. & HAHN, M. E. 2008. Functional properties of the four Atlantic salmon (*Salmo salar*) aryl hydrocarbon receptor type 2 (AHR2) isoforms. *Aquat Toxicol*, 86, 121-30.
- HAO, N. & WHITELAW, M. L. 2013. The emerging roles of AhR in physiology and immunity. *Biochem Pharmacol*, 86, 561-70.
- HASSELBERG, L., MEIER, S., SVARDAL, A., HEGELUND, T. & CELANDER, M. C. 2004. Effects of alkylphenols on CYP1A and CYP3A expression in first spawning Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquat Toxicol*, 67, 303-13.
- HE, G., TSUTSUMI, T., ZHAO, B., BASTON, D. S., ZHAO, J., HEATH-PAGLIUSO, S. & DENISON, M. S. 2011. Third-Generation Ah Receptor-Responsive Luciferase Reporter Plasmids: Amplification of Dioxin-Responsive Elements Dramatically Increases CALUX Bioassay Sensitivity and Responsiveness. *Toxicological Sciences*, 123, 511-522.
- HENRY, T. R., SPITSBERGEN, J. M., HORNING, M. W., ABNET, C. C. & PETERSON, R. E. 1997. Early life stage toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol Appl Pharmacol*, 142, 56-68.
- HERZKE, D., KAASA, H. & HARJU, M. 2013. *Perfluorinated alkylated substances, brominated flame retardants and chlorinated paraffins in the Norwegian environment : screening 2013*, Kjeller, Norwegian Institute for Air Research.

- HESTERMANN, E. V., STEGEMAN, J. J. & HAHN, M. E. 2000. Relative contributions of affinity and intrinsic efficacy to aryl hydrocarbon receptor ligand potency. *Toxicol Appl Pharmacol*, 168, 160-72.
- HOOGENBOOM, L., TRAAG, W., BOVEE, T., GOEYENS, L., CARBONNELLE, S., VAN LOCO, J., BEERNAERT, H., JACOBS, G., SCHOETERS, G. & BAEYENS, W. 2006. The CALUX bioassay: Current status of its application to screening food and feed. *Trends in Analytical Chemistry*, 25, 410-420.
- HOOGENBOOM, L. A., HAMERS, A. R. & BOVEE, T. F. 1999. Bioassays for the detection of growth-promoting agents, veterinary drugs and environmental contaminants in food. *Analyst*, 124, 79-85.
- INCARDONA, J. P., COLLIER, T. K. & SCHOLZ, N. L. 2004. Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol Appl Pharmacol*, 196, 191-205.
- JONSSON, M. E., FRANKS, D. G., WOODIN, B. R., JENNY, M. J., GARRICK, R. A., BEHRENDT, L., HAHN, M. E. & STEGEMAN, J. J. 2009. The tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) binds multiple AHRs and induces multiple CYP1 genes via AHR2 in zebrafish. *Chem Biol Interact*, 181, 447-54.
- JULSHAMN, K., DUINKER, A., BERNTSSEN, M., NILSEN, B. M., FRANTZEN, S., NEDREAAS, K. & MAAGE, A. 2013a. A baseline study on levels of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, non-ortho and mono-ortho PCBs, non-dioxin-like PCBs and polybrominated diphenyl ethers in Northeast Arctic cod (*Gadus morhua*) from different parts of the Barents Sea. *Mar Pollut Bull*, 75, 250-8.
- JULSHAMN, K., DUINKER, A., NILSEN, B. M., FRANTZEN, S., MAAGE, A., VALDERSNES, S. & NEDREAAS, K. 2013b. A baseline study of levels of mercury, arsenic, cadmium and lead in Northeast Arctic cod (*Gadus morhua*) from different parts of the Barents Sea. *Mar Pollut Bull*, 67, 187-95.
- JULSHAMN, K., DUINKER, A., NILSEN, B. M., NEDREAAS, K. & MAAGE, A. 2013c. A baseline study of metals in cod (*Gadus morhua*) from the North Sea and coastal Norwegian waters, with focus on mercury, arsenic, cadmium and lead. *Mar Pollut Bull*, 72, 264-73.
- KARCHNER, S. I., FRANKS, D. G. & HAHN, M. E. 2005. AHR1B, a new functional aryl hydrocarbon receptor in zebrafish: tandem arrangement of *ahr1b* and *ahr2* genes. *The Biochemical journal*, 392, 153.
- KARCHNER, S. I., POWELL, W. H. & HAHN, M. E. 1999. Identification and functional characterization of two highly divergent aryl hydrocarbon receptors (AHR1 and AHR2) in the teleost *Fundulus heteroclitus*. Evidence for a novel subfamily of ligand-binding basic helix loop helix-Per-ARNT-Sim (bHLH-PAS) factors. *J Biol Chem*, 274, 33814-24.
- KARL, H., KAMMANN, U., AUST, M. O., MANTHEY-KARL, M., LUTH, A. & KANISCH, G. 2016. Large scale distribution of dioxins, PCBs, heavy metals, PAH-metabolites and radionuclides in cod (*Gadus morhua*) from the North Atlantic and its adjacent seas. *Chemosphere*, 149, 294-303.
- KARLSEN, O. A., BJØRNEKLETT, S., BERG, K., BRATTÅS, M., BOHNE-KJERSEM, A., GRØSVIK, B. E. & GOKSØYR, A. 2011. Integrative Environmental Genomics of Cod (*Gadus morhua*): The Proteomics Approach. *Current Issues*, 74, 494-507.
- KARLSEN, O. A., PUNTERVOLL, P. & GOKSOYR, A. 2012. Mass spectrometric analyses of microsomal cytochrome P450 isozymes isolated from beta-naphthoflavone-treated Atlantic cod (*Gadus morhua*) liver reveal insights into the cod CYPome. *Aquat Toxicol*, 108, 2-10.
- KAZLAUSKAS, A., POELLINGER, L. & PONGRATZ, I. 1999. Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Aryl hydrocarbon) receptor. *J Biol Chem*, 274, 13519-24.
- KAZLAUSKAS, A., POELLINGER, L. & PONGRATZ, I. 2000. The immunophilin-like protein XAP2 regulates ubiquitination and subcellular localization of the dioxin receptor. *J Biol Chem*, 275, 41317-24.

- KAZLAUSKAS, A., SUNDSTROM, S., POELLINGER, L. & PONGRATZ, I. 2001. The hsp90 chaperone complex regulates intracellular localization of the dioxin receptor. *Mol Cell Biol*, 21, 2594-607.
- KRØVEL, A. V., SØFTELAND, L., TORSTENSEN, B. E. & OLSVIK, P. A. 2010. Endosulfan in vitro toxicity in Atlantic salmon hepatocytes obtained from fish fed either fish oil or vegetable oil. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 151, 175-186.
- LILLE-LANGOY, R., GOLDSTONE, J. V., RUSTEN, M., MILNES, M. R., MALE, R., STEGEMAN, J. J., BLUMBERG, B. & GOKSOYR, A. 2015. Environmental contaminants activate human and polar bear (*Ursus maritimus*) pregnane X receptors (PXR, NR112) differently. *Toxicol Appl Pharmacol*, 284, 54-64.
- LOHMANN, R., BREIVIK, K., DACHS, J. & MUIR, D. 2007. Global fate of POPs: Current and future research directions. *Environmental Pollution*, 150, 150-165.
- LONG, M., LAIER, P., VINGGAARD, A. M., ANDERSEN, H. R., LYNGGAARD, J. & BONEFELD-JORGENSEN, E. C. 2003. Effects of currently used pesticides in the AhR-CALUX assay: comparison between the human TV101L and the rat H4IIE cell line. *Toxicology*, 194, 77-93.
- MACKAY, D. 1993. Global Fractionation and Cold Condensation of Low Volatility Organochlorine Compounds in Polar Regions. *Ambio*, 22, 10-18.
- MADSEN, A. K. 2016. *Kloning, karakterisering og ligandaktivering av aryl hydrokarbonreseptor 2 (AHR2) fra Atlanterhavstorsk (Gadus morhua)*. Masteroppgave i miljøtoksikologi, Universitetet i Bergen.
- MEDJAKOVIC, S., ZOECHLING, A., GERSTER, P., IVANOVA, M. M., TENG, Y., KLINGE, C. M., SCHILDBERGER, B., GARTNER, M. & JUNGBAUER, A. 2014. Effect of nonpersistent pesticides on estrogen receptor, androgen receptor, and aryl hydrocarbon receptor. *Environ Toxicol*, 29, 1201-16.
- MIMURA, J., EMA, M., SOGAWA, K. & FUJII-KURIYAMA, Y. 1999. Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev*, 13, 20-5.
- MOYER, B. J., ROJAS, I. Y., KERLEY-HAMILTON, J. S., HAZLETT, H. F., NEMANI, K. V., TRASK, H. W., WEST, R. J., LUPIEN, L. E., COLLINS, A. J., RINGELBERG, C. S., GIMI, B., KINLAW, W. B., 3RD & TOMLINSON, C. R. 2016. Inhibition of the aryl hydrocarbon receptor prevents Western diet-induced obesity. Model for AHR activation by kynurenine via oxidized-LDL, TLR2/4, TGFbeta, and IDO1. *Toxicol Appl Pharmacol*, 300, 13-24.
- MURK, A. J., LEGLER, J., DENISON, M. S., GIESY, J. P., VAN DE GUCHTE, C. & BROUWER, A. 1996. Chemical-activated luciferase gene expression (CALUX): a novel in vitro bioassay for Ah receptor active compounds in sediments and pore water. *Fundam Appl Toxicol*, 33, 149-60.
- MURRAY, I. A., PATTERSON, A. D. & PERDEW, G. H. 2014. Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. *Nat Rev Cancer*, 14, 801-14.
- NAGY, S. R., LIU, G., LAM, K. S. & DENISON, M. S. 2002. Identification of novel Ah receptor agonists using a high-throughput green fluorescent protein-based recombinant cell bioassay. *Biochemistry*, 41, 861-8.
- NGUYEN, L. P. & BRADFIELD, C. A. 2008. The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. *Chem Res Toxicol*, 21, 102-16.
- OHTAKE, F., BABA, A., TAKADA, I., OKADA, M., IWASAKI, K., MIKI, H., TAKAHASHI, S., KOUZMENKO, A., NOHARA, K., CHIBA, T., FUJII-KURIYAMA, Y. & KATO, S. 2007. Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature*, 446, 562-6.
- OKEY, A. B. 2007. An aryl hydrocarbon receptor odyssey to the shores of toxicology: the Deichmann Lecture, International Congress of Toxicology-XI. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 98, 5.
- OLENICK, L. 2013. *The cautionary tale of DDT - Biomagnification, Bioaccumulation, and Research Motivation* [Online]. Available: <http://sustainable-nano.com/2013/12/17/the-cautionary-tale-of-ddt-biomagnification-bioaccumulation-and-research-motivation/> [Accessed 10. juni 2016].
- OSPAR 2009. Assessment of impacts of offshore oil and gas activities in the North-East Atlantic.

- PAGUIO, A., STECHA, P., WOOD, K. V. & FAN, F. 2010. Improved Dual-Luciferase Reporter Assays for Nuclear Receptors. *Current Chemical Genomics*, 4, 43-49.
- PARROTT, J. L., ALAEE, M., WANG, D. & SVERKO, E. 2013. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) embryo to adult exposure to decamethylcyclopentasiloxane (D5). *Chemosphere*, 93, 813-8.
- PIETERSE, B., FELZEL, E., WINTER, R., VAN DER BURG, B. & BROUWER, A. 2013. PAH-CALUX, an optimized bioassay for AhR-mediated hazard identification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) as individual compounds and in complex mixtures. *Environ Sci Technol*, 47, 11651-9.
- POLAND, A., GLOVER, E. & KENDE, A. S. 1976. Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *The Journal of biological chemistry*, 251, 4936.
- POLLENZ, R. S. 2002. The mechanism of AH receptor protein down-regulation (degradation) and its impact on AH receptor-mediated gene regulation. *Chem Biol Interact*, 141, 41-61.
- PONGRATZ, I., MASON, G. G. & POELLINGER, L. 1992. Dual roles of the 90-kDa heat shock protein hsp90 in modulating functional activities of the dioxin receptor. Evidence that the dioxin receptor functionally belongs to a subclass of nuclear receptors which require hsp90 both for ligand binding activity and repression of intrinsic DNA binding activity. *J Biol Chem*, 267, 13728-34.
- PRASCH, A. L., TERAOKA, H., CARNEY, S. A., DONG, W., HIRAGA, T., STEGEMAN, J. J., HEIDEMAN, W. & PETERSON, R. E. 2003. Aryl hydrocarbon receptor 2 mediates 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin developmental toxicity in zebrafish. *Toxicol Sci*, 76, 138-50.
- REGJERINGEN.NO. 2016. *Plantevernmiddelrester fo. (EU) 2016/60, endrer vedlegg II og III* [Online]. Available: <https://www.regjeringen.no/no/sub/eos-notatbasen/notatene/2016/jan/plantevernmiddelrester-fo.-eu-201660-endrer-vedlegg-ii-og-iii/id2477551/> [Accessed].
- REISZ-PORSZASZ, S., PROBST, M. R., FUKUNAGA, B. N. & HANKINSON, O. 1994. Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein (ARNT). *Mol Cell Biol*, 14, 6075-86.
- SAFE, S. 1990. Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *Crit Rev Toxicol*, 21, 51-88.
- SAFE, S., WANG, F., PORTER, W., DUAN, R. & MCDUGAL, A. 1998. Ah receptor agonists as endocrine disruptors: antiestrogenic activity and mechanisms. *Toxicol Lett*, 102-103, 343-7.
- SCHMIDT, J. V., SU, G. H., REDDY, J. K., SIMON, M. C. & BRADFIELD, C. A. 1996. Characterization of a murine AhR null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 6731-6.
- SCHREER, A., TINSON, C., SHERRY, J. P. & SCHIRMER, K. 2005. Application of Alamar blue/5-carboxyfluorescein diacetate acetoxyethyl ester as a noninvasive cell viability assay in primary hepatocytes from rainbow trout. *Analytical Biochemistry*, 344, 76-85.
- STAR, B., NEDERBRAGT, A. J., JENTOFT, S., GRIMHOLT, U., MALMSTRØM, M., GREGERS, T. F., ROUNGE, T. B., PAULSEN, J., SOLBAKKEN, M. H., SHARMA, A., WETTEN, O. F., LANZÉN, A., WINER, R., KNIGHT, J., VOGEL, J. H., AKEN, B., ANDERSEN, Ø., LAGESEN, K., TOOMING - KLUNDERUD, A., EDVARSEN, R. B., KIRUBAKARAN, G. T., ESPELUND, M., NEPAL, C., PREVITI, A. C., KARLSEN, B. O., MOUM, T., SKAGE, M., BERG, P. R., GJØEN, T., KUHL, H., THORSEN, J., MALDE, K., REINHARDT, R., DU, L., JOHANSEN, S. D., SEARLE, S., LIEN, S., NILSEN, F., JONASSEN, I., OMHOLT, S. W., STENSETH, N. C. & JAKOBSEN, K. S. 2011. The genome sequence of Atlantic cod reveals a unique immune system.
- STEINNES, E. S., M 2010. Moseundersøkelse i Norge 2010 - Nivåer av organiske miljøgifter på 20 lokaliteter.
- STOCKHOLM CONVENTION. 2008a. *The 12 initial POPs under the Stockholm Convention* [Online]. Available:

- <http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/The12InitialPOPs/tabid/296/Default.aspx>  
[Accessed 17 2016].
- STOCKHOLM CONVENTION. 2008b. *The new POPs under the Stockholm Convention* [Online]. Available:  
<http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/TheNewPOPs/tabid/2511/Default.aspx>  
[Accessed 25. mai 2016].
- SØFTELAND, L., KIRWAN, J. A., HORI, T. S. F., STØRSETH, T. R., SOMMER, U., BERNTSSEN, M. H. G., VIANT, M. R., RISE, M. L., WAAGBØ, R., TORSTENSEN, B. E., BOOMAN, M. & OLSVIK, P. A. 2014. Toxicological effect of single contaminants and contaminant mixtures associated with plant ingredients in novel salmon feeds. *Food and Chemical Toxicology*, 73, 157-174.
- TAKEUCHI, S., IIDA, M., YABUSHITA, H., MATSUDA, T. & KOJIMA, H. 2008. In vitro screening for aryl hydrocarbon receptor agonistic activity in 200 pesticides using a highly sensitive reporter cell line, DR-EcoScreen cells, and in vivo mouse liver cytochrome P450-1A induction by propanil, diuron and linuron. *Chemosphere*, 74, 155-65.
- TANGUAY, R. L., ABNET, C. C., HEIDEMAN, W. & PETERSON, R. E. 1999. Cloning and characterization of the zebrafish (*Danio rerio*) aryl hydrocarbon receptor. *Biochim Biophys Acta*, 1444, 35-48.
- THACKABERRY, E. A., GABALDON, D. M., WALKER, M. K. & SMITH, S. M. 2002. Aryl hydrocarbon receptor null mice develop cardiac hypertrophy and increased hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in the absence of cardiac hypoxia. *Cardiovasc Toxicol*, 2, 263-74.
- UELAND, E. 2013. *Karakterisering av vitamin D reseptorer i atlantehavstorsk (*Gadus morhua*) : kloning, ligandaktivering og vevsuttrykning*. Universitetet i Bergen.
- VAN DEN BERG, M., BIRNBAUM, L. S., DENISON, M., DE VITO, M., FARLAND, W., FEELEY, M., FIEDLER, H., HAKANSSON, H., HANBERG, A., HAWS, L., ROSE, M., SAFE, S., SCHRENK, D., TOHYAMA, C., TRITSCHER, A., TUOMISTO, J., TYSKLIND, M., WALKER, N. & PETERSON, R. E. 2006. The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol Sci*, 93, 223-41.
- VORKAMP, K. & RIGET, F. F. 2014. A review of new and current-use contaminants in the Arctic environment: evidence of long-range transport and indications of bioaccumulation. *Chemosphere*, 111, 379-95.
- WALKER, C. H. 2012. *Principles of ecotoxicology*, Boca Raton, Fla, CRC Press.
- WALKER, M. & PETERSON, R. 1991. Potencies of polychlorinated dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran, and biphenyl congeners, relative to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, for producing early life stage mortality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).
- WAN, M. T., KUO, J. N., BUDAY, C., SCHROEDER, G., VAN AGGELEN, G. & PASTERNAK, J. 2005. Toxicity of alpha-, beta-, (alpha + beta)-endosulfan and their formulated and degradation products to *Daphnia magna*, *Hyalella azteca*, *Oncorhynchus mykiss*, *Oncorhynchus kisutch*, and biological implications in streams. *Environ Toxicol Chem*, 24, 1146-54.
- WANG, G. L., JIANG, B. H., RUE, E. A. & SEMENZA, G. L. 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 5510-4.
- WARNER, N. A., NOST, T. H., ANDRADE, H. & CHRISTENSEN, G. 2014. Allometric relationships to liver tissue concentrations of cyclic volatile methyl siloxanes in Atlantic cod. *Environ Pollut*, 190, 109-14.
- WHITELAW, M. L., MCGUIRE, J., PICARD, D., GUSTAFSSON, J. A. & POELLINGER, L. 1995. Heat shock protein hsp90 regulates dioxin receptor function in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 4437-41.
- WHITLOCK, J. P. 1999. INDUCTION OF CYTOCHROME P4501A1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*
- WILSON, M. P. & SCHWARZMAN, M. R. 2009. Toward a new U.S. chemicals policy: rebuilding the foundation to advance new science, green chemistry, and environmental health. *Environ Health Perspect*, 117, 1202-9.
- WINDAL, I., DENISON, M. S., BIRNBAUM, L. S., VAN WOUWE, N., BAEYENS, W. & GOEYENS, L. 2005. Chemically activated luciferase gene expression (CALUX) cell bioassay analysis for the



- estimation of dioxin-like activity: critical parameters of the CALUX procedure that impact assay results. *Environ Sci Technol*, 39, 7357-64.
- WOODBURN, K., DROTTAR, K., DOMORADZKI, J., DURHAM, J., MCNETT, D. & JEZOWSKI, R. 2013. Determination of the dietary biomagnification of octamethylcyclotetrasiloxane and decamethylcyclopentasiloxane with the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Chemosphere*, 93, 779-88.
- YAMAUCHI, M., KIM, E. Y., IWATA, H., SHIMA, Y. & TANABE, S. 2006. Toxic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in developing red seabream (*Pagrus major*) embryo: an association of morphological deformities with AHR1, AHR2 and CYP1A expressions. *Aquat Toxicol*, 80, 166-79.
- YUAN, Z., COURTENAY, S. & WIRGIN, I. 2006. Comparison of hepatic and extra hepatic induction of cytochrome P4501A by graded doses of aryl hydrocarbon receptor agonists in Atlantic tomcod from two populations. *Aquat Toxicol*, 76, 306-20.
- ZHAO, B., BASTON, D., KHAN, E., SORRENTINO, C. & DENISON, M. 2010. Enhancing the response of CALUX and CAFLUX cell bioassays for quantitative detection of dioxin-like compounds. *Science China Chemistry*, 53, 1010-1016.
- ZHU, C., XIE, Q. & ZHAO, B. 2014. The role of AhR in autoimmune regulation and its potential as a therapeutic target against CD4 T cell mediated inflammatory disorder. *Int J Mol Sci*, 15, 10116-35.