

**Analyse av biomarkører i leverprøver fra  
atlanterhavstorsk (*Gadus morhua*) benyttet i et  
burforsøk i Kollevåg, Askøy kommune**

**Masteroppgave i miljøtoksikologi**

**Martine Hem**



**Institutt for biologi  
Universitetet i Bergen**

**Juli 2017**

**30 studiepoeng**



# Takk til

Denne masteroppgaven markerer slutten på fem fantastiske, lærerike og intense år. Jeg kan veldig snart kalle meg lektor, utdannet ved Universitetet i Bergen, og er klar for det de neste årene måtte bringe. Denne oppgaven er skrevet ved miljøtoksikologigruppen ved institutt for biologi, UiB, og er en del av forskningsprosjektet 'dCod v1.0: decoding systems toxicology of cod (*Gadus morhua*) – environmental genomics for ecosystem quality and risk assessment'. Prosjektet er finansiert av Norges forskningsråd og Universitetet i Bergen (prosjektnummer 248840).

Aller først vil jeg benytte muligheten til å takke mine veiledere, som har stått på til siste minutt. En stor takk til Karina Dale som har stått klar for å hjelpe så fort jeg har spurt. Setter utrolig stor pris på all hjelp jeg har fått. Jeg vil også takke Odd André Karlsen som har veiledet, hjulpet og stått for god underholdningen på lab. Jeg vil i tillegg takke Anders Goksøyr for veiledning og hjelp underveis i skriveprosessen. Og en som ikke må glemmes er Roger Lille-Langøy. Takk for at du selv med litt mye mas til tider, alltid har hatt tid til å svare på mine mange spørsmål. Takk for at dere tok imot en lektorstudent, og lot meg bli en del av forskningsgruppen. Jeg må også takke alle jentene på lab'en og spesielt Susann, Mari og Oline. Uten dere hadde ikke semesteret blitt like bra. Og Susann, vi ble ferdige til slutt!!

Til slutt må jeg takke familie og venner som alltid er der for meg. Uten dere hadde jeg ikke vært der jeg er i dag. Takk for all støtte og gode ord på veien. Og til slutt en takk til min flotte lektorklasse. Takk for at jeg ble tatt så godt imot, ett år inn i løpet! #lektorlove

Bergen, juli 2017

Martine Hem

# Innholdsfortegnelse

Takk til .....	3
Sammendrag .....	6
Forkortelser .....	7
1 Introduksjon.....	8
1.1 Bakgrunn .....	8
1.2 Miljøgifter .....	8
1.3 Atlanterhavstorsk.....	10
1.4 dCod 1.0 og Kollevåg-prosjektet.....	11
1.5 Biomarkører.....	16
1.5.1 Cytokrom P450 1A (Cyp1a).....	17
1.5.2 Glutathion S-transferase .....	18
1.5.3 Heat shock protein 70.....	19
1.5.4 Katalase .....	20
1.6 Mål for oppgaven .....	20
2 Materialer .....	22
3 Metode.....	27
3.1 Homogenisering av leverprøver fra atlanterhavstorsk med Precellys® .....	27
3.2 Måling av proteinkonsentrasjon ved bruk av Pierce 660nm Protein Assay .....	27
3.3 Natrium-dodecylsulfat polyacrylamid gel elektroforese (SDS-PAGE) .....	28
3.4 Western blotting .....	29
3.5 Inkubering av membraner med antistoff .....	30
3.6 Catalase Assay Kit.....	31
3.7 Glutathione S-transferase Assay Kit .....	32
4. Resultater.....	33
4.1 Homogenisering og måling av proteinkonsentrasjon .....	33
4.2 SDS-PAGE og Western blotting .....	33
4.2.1 Visualisering av proteinene .....	33
4.2.2 Western blotting .....	34
4.2.3 Kvantitativ utregning av biomarkørene Hsp70 og Gst.....	35
4.3 Måling av enzymaktiviteten for Gst og Cat .....	37
5 Diskusjon.....	40
5.1 Eksponering og prøvemateriale.....	41
5.2 Deteksjon og kvantifisering av biomarkører ved hjelp av Western blotting .....	42
5.4 Enzymaktivitet ved bruk av kit.....	44

5.5 Korrelasjonsanalyse for Gst genuttrykning, enzymaktivitet og relativ proteinmengde .....	46
6 Konklusjon .....	47
6.1 Videre arbeid .....	48
7. Litteraturliste .....	49
Appendix .....	54

## Sammendrag

Kollevåg er et etablert friluftsområde på vestsiden av Askøy i Hordaland. Området har også i tidsperioden 1930-1975 fungert som et avfallsdeponi for usortert avfall for innbyggere i Bergen kommune. Avfallet ble dumpet på sjøbunnen i store deler av Kollevåg, noe som gjorde at miljøgifter fra avfallet spredte seg i området. I tiden etter deponiet ble lagt ned, har det flere ganger blitt iverksatt tildekking for å forhindre lekkasje av miljøgifter. Allikevel har lekkasjer blitt dokumentert og rapportert, og som et resultat av dette har området vært av stor interesse for om lekkasje av skadelige stoffer påvirker organismer og biota i Kollevåg.

Universitetet i Bergen har derfor i samarbeid med Bergen kommune og Fishguard startet prosjektet med å benytte burforsøk med torsk for å undersøke eksponeringen av miljøgifter i Kollevåg før en planlagt ny tildekking av avfallet. Burforsøket er planlagt gjentatt etter utbedringen av Kollevåg for å studere effekten av tildekkingen som er planlagt utført i løpet av 2017/2018. Dette for å se om tildekkingen har gitt en forbedret miljøstatus. Undersøkelsene av Kollevåg er del av forskningsprosjektet dCod1.0 finansiert av Norges Forskningsråd. Arbeidet med prøver fra burforsøket har allerede blitt initiert, ved at det har blitt målt endringer i kondisjonsfaktor, leversomatisk indeks og PAH metabolitter i galle fra torsk plassert i bur i ulike lokaliteter i Kollevåg og en referansestasjon i nærheten av Ertenøyane. Denne masteroppgaven er knyttet til dette prosjektet, og det har blitt gjort undersøkelser av biomarkører i torskelever relatert til oksidativt stress, generelle stress-responser og detoksifiserings-mekanismer (fase I og fase II).

Ved hjelp av Western blotting ble det vist at biomarkørene heat shock protein 70 (Hsp70), katalase (Cat), glutation S-transferase (Gst), men ikke cytokrom P450 1A (Cyp1a), ble uttrykt i vevsprøvene. Kvantitativ westernblotanalyse og enzymaktivitetsmålinger av de uttrykte enzymene (Cat, Gst og Hsp70) ga en indikasjon på påvirkning av miljøgifter i Kollevåg. Resultatene av enzymaktiviteten for Gst og Cat viste en signifikant nedregulering av aktivitet i alle stasjoner i Kollevåg sammenlignet med referansestasjonen. Det er foreløpig ikke kjent hva som forårsaket denne nedreguleringen i aktivitet.

# Forkortelser

**Tabell 1: Liste over forkortelser brukt i oppgaven.**

<b>Forkortelse</b>	<b>Fullstendig navn</b>
A	Absorbans
Akt	Aktin
APS	Ammoniumpersulfat
BFR	Bromerte flammehemmere
BSA	Bovint serum albumin
Cat	Katalase
CBB	Coomassie Brilliant Blue
Cyp1a	Cytokrom P450 1A
CDNB	1-kloro-2,4-dinitrobenzen
EROD	7-etoksyresourfin-O-deetylase
Gst	Glutation S-transferase
HRP	Pepperrot peroksidase
Hsp70	Varmesjokkprotein 70
IgG	Immunoglobulin G
NADPH	B-Nicotinamid adenin dinukleotid fosfat redusert tetranatrium salt
PAH	Polysyklisk aromatisk hydrokarbon
PBS	Fosfatbufret saltvannsløsning
PBS-T	PBS Tween-20
PCB	Polyklorete bifenyler
PVDF	polyvinylidene difluorid
SDS	Natrium dodecyl sulfat
PAGE	Polyakrylamid-gelelektroforese
TBE	Tris/ Borat/ EDTA
TBS	Tris-bufferløsning
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyldiamin
TGS	Tris/ Glysin/ SDS
Tris	Tris-(hydroksymetyl)-aminometan
WB	Western blotting

# 1 Introduksjon

## 1.1 Bakgrunn

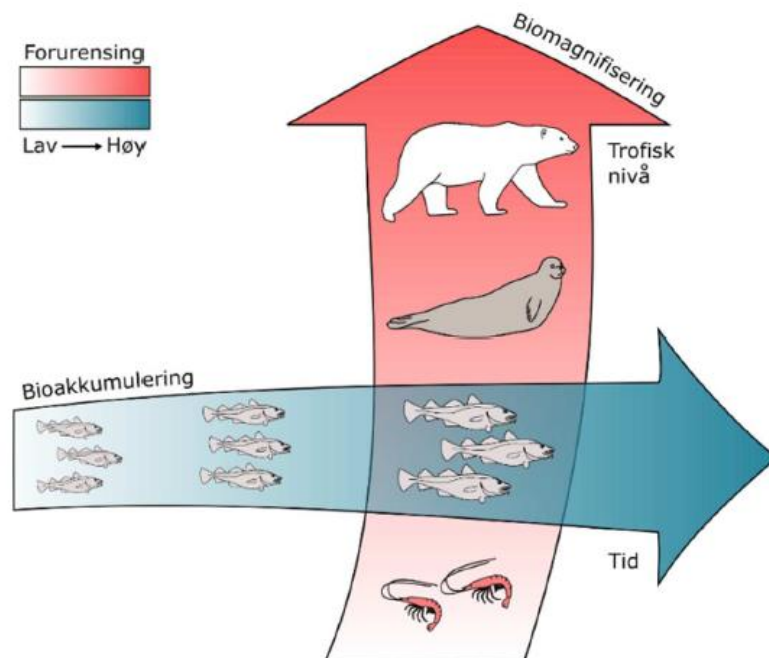
Antropogene kjemikalier finnes overalt i miljøet vårt. De er essensielle komponenter i våre liv, men kan også gi fatale skader på både vår helse og miljøet. Mange av dem vet vi heller ikke fullstendig konsekvensene av, og spesielt ikke eksponering for kombinasjoner av disse kjemikaliene. Noen av de mange stoffene som produseres anses som så nødvendige i produktene vi omgir oss med, at de brukes til tross for de negative konsekvensene disse kan gi. De farligste av de helse- og miljøfarlige kjemikaliene som finnes er det man kaller miljøgifter (Vang, 2015). En verdensomfattende økning av miljøgifter i akvatiske miljøer er et av de største miljøproblemene vi står ovenfor i dag. Til tross for at mange av stoffene kun er tilstede i lave konsentrasjoner, kan de likevel være skadelige ved at de kan ha hormonforstyrrende egenskaper og kan ha negativ innvirkning på organismers utvikling og reproduksjonsevne. I tillegg kan blandinger av ulike stoffer skape forsterkede effekter sammenlignet med effekten enkeltstoffene har alene, såkalt cocktail-effekter (Schwarzenbach et al., 2006). Siden konsekvensene og omfanget av eksponeringer for miljøgifter er til dels ukjent, vet man heller ikke hvordan dette påvirker organismene i akvatiske miljøer (Sundt et al., 2012). Dette kan også ha konsekvenser for atlantehavstorsken (*Gadus morhua*), som er en kjent indikatorart innen marine overvåkningsprogrammer (Sundt et al., 2012).

## 1.2 Miljøgifter

Miljøgifter kan defineres som stoffer som selv i små mengder kan gi skadelige effekter på organismer og miljø. De karakteriseres ved at de er giftige (toksiske), motstandsdyktige mot nedbryting (persistente), og at de kan tas opp og akkumulere i levende organismer. En viktig gruppe av karbonholdige miljøgifter kalles POPs; persistente organiske miljøgifter. Dette er lite nedbrytbare, lipofile stoffer som innehar bioakkumulerende og biomagnifiserende egenskaper. Når en miljøgift bioakkumulerer, innebærer dette en absorpsjon av et stoff hos en organisme der absorpsjonsraten overstiger ekskresjonsraten (Figur 1.1). Forbindelsen vil dermed hope seg opp i organismen (Fiedler, 2002). En bioakkumulering innad i en organisme kan også videre resultere i biomagnifisering av stoffet i næringskjeden (Figur 1.1). Biomagnifisering fører til at de øverste trofiske nivåene, inkludert mennesker, akkumulerer og eksponeres for høye konsentrasjoner av miljøgifter (Sagerup et al., 2010).



Terminologien POPs inkluderer i dag en rekke ulike kjemikalier, og produksjonen og anvendelsen av mange av disse er nøyere regulert. Stockholm-konvensjonen ble etablert for å eliminere produksjon og bruk av 12 svært toksiske POPs, som inkluderer aldrin, chlordan, diklor-difenyl-trikloretan, dieldrin, endrin, heptaklor, mirex, toxafen, hexaklorbenzen, polyklorerte bifenyler, polyklorerte dibenzodioxiner og polyklorerte dibenzofuraner (kjent som "the dirty dozen") (Fiedler, 2002). Senere har andre POPs blitt lagt til denne listen, som f.eks: klordekon, pentaklorobenzen, tetrabromdifenyl eter, heksabromodifenyl (Stockholm Convention Secretariat United Nations Environment, 2017).



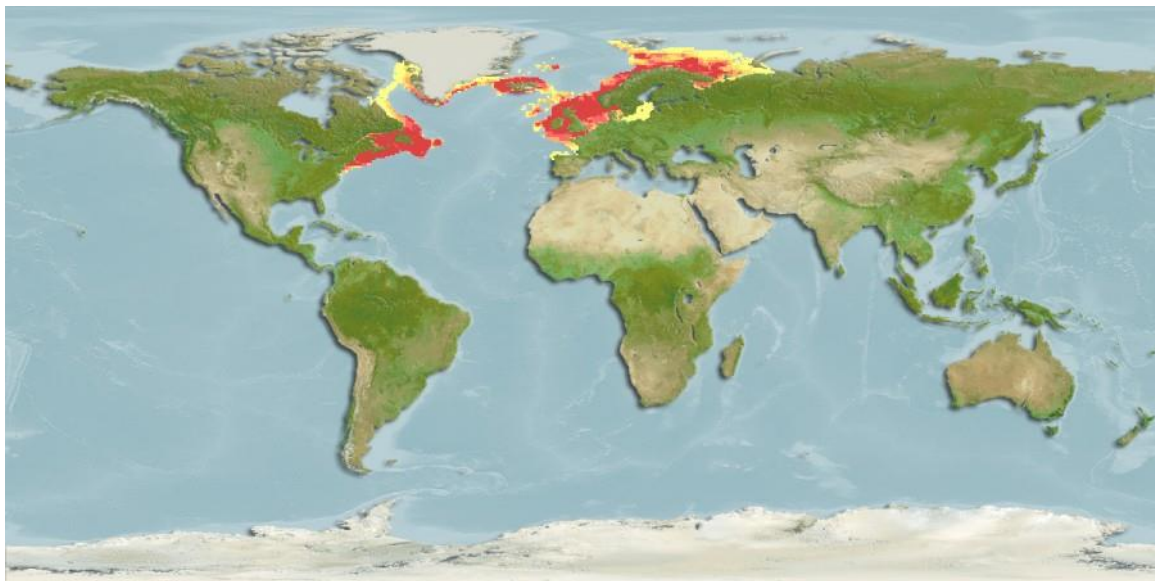
**Figur 1.1: Illustrasjon over opphoping av miljøgifter både innad i organismen (bioakkumulering) og i økning i konsentrasjon av miljøgifter med høyere trofiske nivå i næringskjeden (biomagnifikasjon).** Illustrasjon: Madsen, 2016.

Endestasjonen for miljøgifter i naturen er ofte akvatiske miljøer, enten ved direkte utslipp i vannet, eller indirekte via atmosfærisk transport (Johnson et al., 2013). POPs har derfor blitt funnet i relativt høye konsentrasjoner i vev til akvatiske organismer, inkludert fisk og marine pattedyr. I tillegg til opptak via næringskjeden, har det blitt vist at POPs kan bli absorbert i fisk via gjeller og skinn. Studiene viser også at miljøgiftene blir transportert til vev som inneholder høye konsentrasjoner av lipider. Metabolismen av POPs er krevende i blant annet fisk, på grunn av mindre konsentrasjoner av oksygen som er tilgjengelig.

Det vil være vanskeligere for akvatiske organismer å ta opp oksygen i forhold til landlevende organismer. Siden fase I-metabolisme, via for eksempel cytokrom P450 systemet, baserer seg på oksidasjonsreaksjoner, kan det dermed være vanskelig å detoksifisere POPs i akvatiske organismer, noe som øker lagringstiden i lipofile vev (Bratberg, 2012; Hellum; Seibel & Drazen, 2007). Dersom det kommer perioder med liten tilgang til mat kan lipidlagre bli brukt som energikilde og brytes ned. Kjemikaliene kan da frigjøres til blodet og transporteres til målstedet der den toksiske effekten kan forkomme (Johnson et al., 2013).

### 1.3 Atlanterhavstorsk

Atlanterhavstorsk (*Gadus morhua*) er en teleost i torskefamilien Gadidae, som i hovedsak er utbredt i den nordlige delen av Atlanterhavet og Barentshavet (Figur 1.2). Den er jevnt fordelt i ulike habitat, fra kystlinjen til ca. 600 meters dyp. Størrelsen på atlanterhavstorsk er varierende, der den gjennomsnittlige størrelsen er 80 cm. Atlanterhavstorsk har en levetid på opptil 15 år (Luna S.M. & Torres A.G).



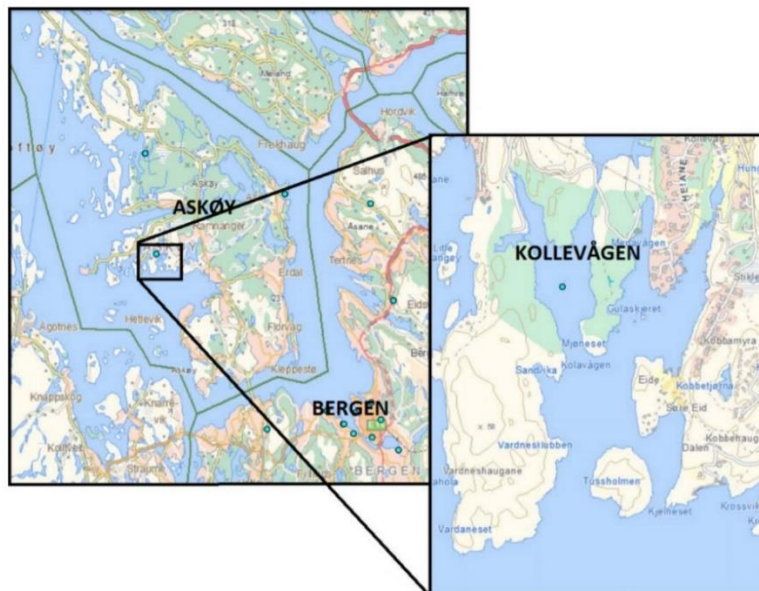
**Figur 1.2: Utbredelsesområde for atlanterhavstorsk.** Her indikerer fargene relativ sannsynlighet for forekomst av arten. Rødt er der arten har blitt observert, oransje viser til stor sannsynlighet for forekomst og gul er mulig forekomst. Hentet fra Fishbase (Luna S.M. & Torres A.G).

Det finnes mange ulike torskepopulasjoner, der hovedinndelingen til de ulike populasjonene av atlanterhavstorsk er skrei og kysttorsk. Kysttorskyngel bunnsår på svært grunt vann (0-20 meter) og vandrer ned på dypere vann når den er 2 år gammel. Kysttorsken er i hovedsak en bunnfisk, men oppholder seg også pelagisk i perioder under beiting og gyting. Skrei er også tilknyttet bunnen, men i Barentshavet kan den i deler av året oppholde seg mye i de frie vannmassene. De viktigste gytefeltene for skrei er Vesterålen/Lofoten, og derfra driver larvene og egg med strømmen inn i Barentshavet. Skrei er den største torskebestanden i verden, og er i forhold til kysttorsken utbredt på et større areal. (Havforskningsinstituttet, 2016). En studie gjort av Karlsen et al. viser ulikhetene i de to artenes genetiske materiale, der genene i tre kromosomer gir ulik atferd og ulik miljøtilpasning (Karlsen et al., 2013). Atlanterhavstorsken er en mager art som inneholder mindre enn 1 % lipid i kjøttet (filet). Majoriteten av lipidlageret i torsk er lagret som store dråper i levercellene (hepatocytene). Det gjør at lipofile stoffer i større grad akkumulerer i dette vevet, og siden leveren er hovedorganet for detoksifisering, vil atlantehavstorskens lever være veldig interessant for studier av miljøgifter (Di Giulio & Hinton, 2008). Funn av miljøgifter generelt i atlantehavstorsk har blitt registrert i en rekke tilfeller (Bratberg et al., 2013; Julshamn et al., 2013; Julshamn et al., 2010; Olsvik et al., 2009; Warner et al., 2014). Et viktig gjennombrudd som gjør at atlantehavstorsken står frem som en modellorganisme innen økotoksikologiske studier er genomsekvensering av arten som ble publisert i 2011 (Star et al., 2011). Kartleggingen av torskens gener har åpnet opp for toksikogenomiske studier der det er mulig å bruke tilnæringsmåter som proteomikk, transkriptomikk, og metabolomikk for å studere effekter av ulike miljøgifter med en holistisk tilnæringsmetode.

## **1.4 dCod 1.0 og Kollevåg-prosjektet**

Denne oppgaven er en del av prosjektet dCod 1.0: *decoding the systems toxicology of Atlantic cod (Gadus morhua)*, et internasjonalt forskningsprosjekt under programmet Digitalt Liv Norge (DLN) som en del av Forskningsrådets satsing på bioteknologisk forskning og innovasjon. Hovedmålet til dCod-prosjektet er å kombinere ulike disipliner innenfor biologi, miljøtoksikologi, bioinformatikk og matematikk for å bedre forstå hvordan atlantehavstorsken reagerer og tilpasser seg endringer i miljøet (Senter for Digital liv Norge, 2015). Denne masteroppgaven er knyttet til arbeidspakke 1 i dCod 1.0-prosjektet og spesifikt til arbeidet med et utsettelsesforsøk med atlantehavstorsk i Kollevåg utenfor Bergen.

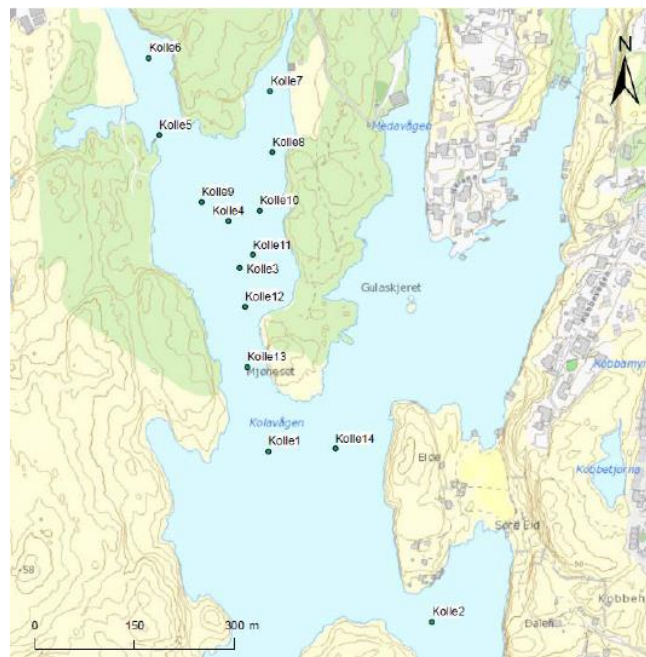
Kollefvåg er et friluftsområde i nordre del av Hauglandsosen på vestsiden av Askøy, Hordaland (Figur 1.3). I tidsperioden 1930-1975 fungerte dette området som et avfallsdeponi for usortert avfall for innbyggere i Bergen kommune. I løpet av disse årene ble det til sammen dumpet rundt 450 000 kubikkmeter med industri- og husholdningsavfall, der 90% av avfallet ble deponert under sjønivå i langgrunne viker (Vassenden, 2009). Avfallsdeponeringen ble avsluttet i 1975, og i ettertid ble mye av det deponerte avfallet observert flytende i vannet. I perioden 1975-1982 ble derfor det flytende avfallet og mye av avfallet på sandbunnen, dratt opp på land. Området ble så mudret, og avfallet plassert tilbake og dekket til med finmasket not og påført skjellsand. Etter tildekking ble Kollevåg friluftsområde åpnet i 1983 (Lone, 2015).



**Figur 1.3: Oversiktsbilde av Kollevåg og geografisk beliggenhet.** Målestokk Askøy 1:2000. Hentet fra Norges Geotekniske institutt (Bjørnen & Hafner, 2014).

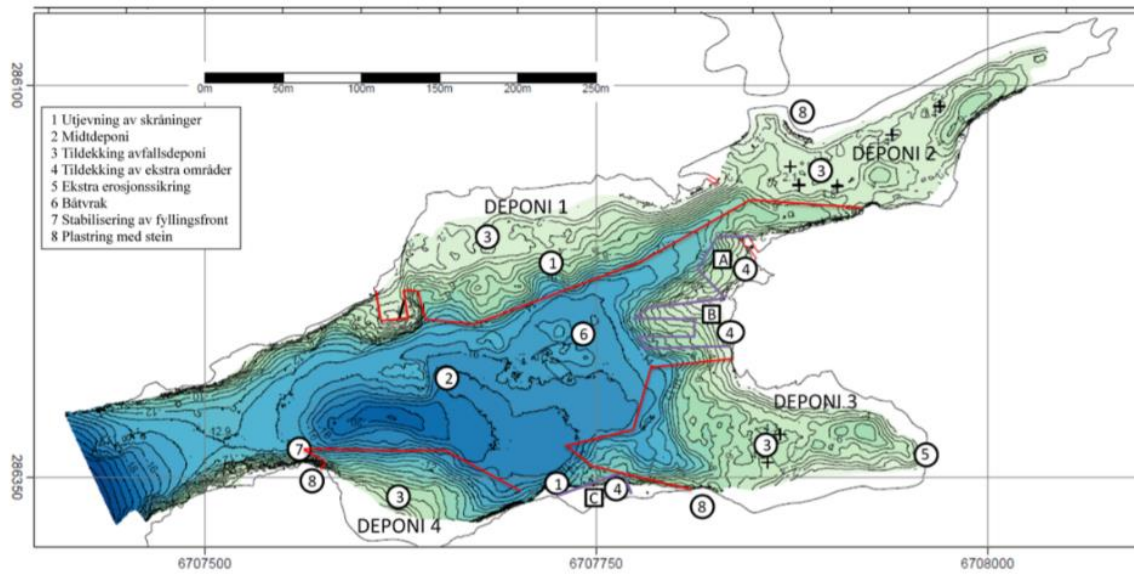
I 2005 kom det et pålegg fra Miljødirektoratet som krevde mer omfattende tiltak enn det som ble gjort i 1975-1982. Grunnen til pålegget var blant annet at sterkt forurenset sigevann fra det gamle avfallsdeponiet spredde tungmetaller og PCB. Tiltakene omfattet en grundigere tildekking slik at tildekkingslaget over avfallet ble minimum 0,5 meter tykt. Det ble også i flere områder lagt til et erosjonssikringslag og fiberduk for å forhindre at tildekkingen ble skylt vekk. Etter nye grundige undersøkelser av området i 2014 ble det allikevel gjort tydelige funn av skader på erosjonssikringen (Bjørnen & Hafner, 2014).

De nyeste undersøkelsene som dokumenterte ødeleggelse i tildekkingen utført i 2005 (Figur 1.5), viste også til store mengder tidligere tildekket husholdningsavfall som hadde blitt avdekket (Figur 1.6). En utvidet prøvetakning viste også høye konsentrasjoner av miljøgifter i spesifikke områder. Her ble det antatt at det skyldtes direkte sedimentering av partikkelbundne miljøgifter fra det tildekkede området (Haave M., 2015). Noen av miljøgiftene som ut ifra Miljødirektoratets tilstandsklasser (Tremoen, 2009) kunne kategoriseres som dårlig eller svært dårlig (Tabell 1.1A) var blant annet polysykliske aromatiske hydrokarboner som; acenaften, fenantren, antracene, fluoranten, pyren, benso(b)antracen, krysen, benso(b)fluoranten, benso(k)fluoranten, benso(a)pyren, benso(ghi)perylene, indeno(123cd)pyren og PAH-16(miks) (Tabell 1.1B). De ulike miljøgiftene ble målt på ulike lokasjoner som vist i figur 1.4. Her varierte tilstandsklassene betraktelig mellom de ulike målestasjonene (Bjørnen & Hafner, 2014). Det er i hovedsak disse resultatene som danner grunnlag for en omfattende undersøkelse av miljøgiftene i Kollevåg.



**Figur 1.4: Prøvepunkter for sedimentprøvetaking.** Hentet fra sluttrapport (Bjørnen & Hafner, 2014).





**Figur 1.5: Oversiktsbilde over arbeid der tildekking i 2005 har blitt gjennomført.** Nummerering er steder der tiltak har blitt utført som indikert i figuren. Hentet fra Norges Geotekniske institutt (Bjørnen & Hafner, 2014).



**Figur 1.6: Søppel observert på bunnen i Kollevåg 19.05.14.** Hentet fra Norges Geotekniske institutt (Bjørnen & Hafner, 2014).

**Tabell 1.1A: Tilstandsklasser for forurenset grunn.** (Tremoen & forurensningstilsyn, 2009).

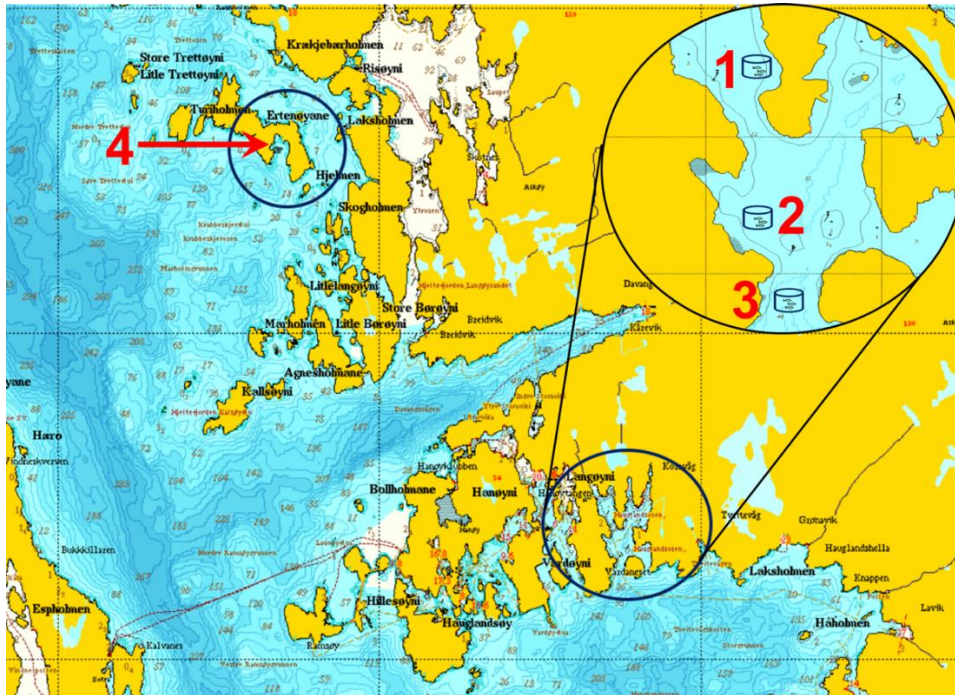
Tilstandsklasse	Beskrivelse av tilstand
I	Meget god
II	God
III	Moderat
IV	Dårlig
V	Svært dårlig

**Tabell 1.1B: Konsentrasjoner av organiske miljøgifter i sedimentene, gitt i mg/kg.** Her indikerer fargene de ulike tilstandsklassene i Tabell 1.1A. De ulike kollene sin lokasjon er tilsvarende kollene i Figur 1.4. i.p.= ikke påvist over rapporteringsgrensa til analysemetoden (Bjørnen & Hafner, 2014).

Kjemikalie	Kolle 1	Kolle 2	Kolle 3	Kolle 4	Kolle 5	Kolle 7	Kolle 8	Kolle 9	Kolle 10	Kolle 11	Kolle 12	Kolle 13	Kolle 14
Naftalen	0,121	0,015	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	0,027
Acenaftylen	0,024	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	0,012
Acenaften	0,643	0,011	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	0,014	0,03
Fluoren	0,447	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	0,016	0,028
Fenantren	5,78	0,107	0,011	0,011	0,034	<0,010	<0,010	0,017	<0,010	0,015	<0,010	0,168	0,31
Antracen	1,42	0,032	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	0,052	0,07
Fluoranten	8,22	0,179	0,022	0,031	0,082	0,011	<0,010	0,051	0,022	0,038	0,02	0,322	0,658
Pyren	6,64	0,159	0,019	0,027	0,089	0,01	<0,010	0,044	0,02	0,034	0,017	0,273	0,536
Benso(a)antracen	3,43	0,068	<0,010	<0,010	0,026	<0,010	<0,010	0,017	<0,010	0,015	<0,010	0,125	0,28
Krysen	3,26	0,068	<0,010	0,011	0,026	<0,010	<0,010	0,017	<0,010	0,016	<0,010	0,102	0,263
Benso(b)fluoranten	3,74	0,099	<0,010	<0,010	0,027	<0,010	<0,010	0,022	<0,010	0,026	<0,010	0,147	0,423
B(k)f	1,22	0,039	<0,010	<0,010	0,01	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	0,01	<0,010	0,063	0,182
B(a)p	2,75	0,086	0,015	0,018	0,039	<0,010	<0,010	0,03	<0,010	0,021	0,012	0,126	0,302
Dibenso(ah)antracen	0,562	0,013	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	0,017	0,043
Benso(ghi)perylene	1,71	0,047	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	0,062	0,211
Indeno(123cd)pyren	2,01	0,052	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	0,028	0,203
Sum PAH-16	42	0,975	0,067	0,098	0,333	0,021	i.p.	0,198	0,042	0,175	0,049	1,52	3,58
Sum PCB-7	0,154	i.p.	i.p.	i.p.	i.p.	i.p.	i.p.	i.p.	i.p.	i.p.	i.p.	i.p.	0,0699

Et av delmålene i dCod-prosjektet er å studere miljøeffekter av forurensningen i Kollevåg, ved bruk av atlantehavstorsk som modellorganisme. Som følge av de siste tilstandsrapportene fra området, har Bergen kommune bestemt at nye tildekkinger av avfallsområdet skal skje i løpet av 2017/2018 (Lone, 2015). Planen er derfor å studere miljøeffektene i Kollevåg både før og etter den nye tildekkingen. «Før»-prosjektet ble utført høsten 2016 gjennom et burforsøk, der 22 juvenile atlantehavstorsk per gruppe ble satt i bur ved tre ulike lokalisasjoner innenfor Kollevåg, i tillegg til en referansestasjon i nærheten av Ertenøyane (Figur 1.7). Snittvekten på fisken var 300 gram ved utsetting og opphavet var

oppdrettstorsk fra Austevoll som var blitt røktet på forsøksdyrvedelingen ved institutt for biologi, UiB. Fisken ble holdt i burene i seks uker uten fôring før prøvetaking ble utført. Det ble i tillegg brukt ROV en gang i løpet av forsøksperioden for tilsyn av torsken.



**Figur 1.7: Oversikt over burplassering i Kolvervåg-forsøket.** Fire stasjoner ble satt opp i ulike lokaliteter i Kolvervåg fra innerst (1), i midten av vågen (2) til ytterst (3), samt en referansestasjon (4) i nærheten av Ertenøyane. Modifisert fra Appendix, Figur A3.

## 1.5 Biomarkører

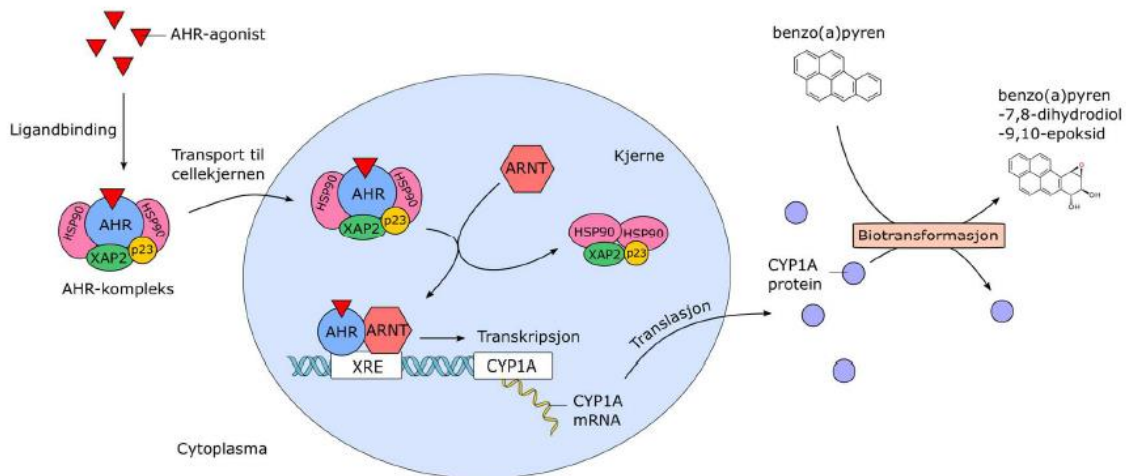
En biomarkør er enhver biologisk respons til blant annet en miljøgift, både på individnivå eller lavere, der avvik fra normalt tilstand finner sted. Det er derfor mulig å bruke biomarkører for å påvise forurensing (Committee on Biological Markers of the National Research Council, 1987; Walker et al., 2012). Biomarkører er målbare indikatorer, som kan deles inn i tre kategorier; eksponering, effekt og sensitivitet. Biomarkører for eksponering indikerer om en organisme er eksponert for en forbindelse ved direkte måling av tilstedeværelse av selve stoffet, eller metabolitter av forbindelsen. Biomarkører for effekt måler negativ effekt på kvantifiserbare biokjemiske endringer i vev eller kroppsvæsker (som endringer i proteinnivåer), mens biomarkører for sensitivitet indikerer den tilegnede muligheten en organisme har til å respondere og bli påvirket av en miljøgift (Committee on Biological Markers of the National Research Council, 1987; van der Oost et al., 2002). Biomarkører for



effekt kan for eksempel være i form av oppregulering eller nedregulering av proteiner eller gener. I denne oppgaven har tilstedeværelsen av cytokrom P450 1A, glutation S-transferase, heat shock protein 70 og katalase i prøvene fra Kollevåg blitt undersøkt ved bruk av antistoff eller enzymaktivitets-målinger. Dette er biomarkører som indikerer eksponering for forbindelser som forårsaker oksidativt stress, induserer detoksifiserings-mekanismer (fase I og fase II), og andre cellulære stress-responser.

### **1.5.1 Cytokrom P450 1A (Cyp1a)**

Cytokrom P450 er en superfamilie av enzymer som er viktig i fase I av biotransformasjonen av fremmedstoffer. Cyp superfamilien består av mange isoenzym som er delt inn i familier og underfamilier basert på likhet i aminosyresekvens. Cyp-enzymene som er involvert i metabolismen av fremmedstoffer kan i hovedsak deles inn i fire genfamilier: Cyp1, Cyp2, Cyp3 og Cyp4 (Uno et al., 2012). Cyp proteiner er heme proteiner som katalyserer oksidasjonen av både endogene og eksogene substrat der Fe i hemegruppen er helt sentralt i reaksjonen. Fe reduseres fra treverdige til toverdige ved hjelp av NADPH fra NADPH-cytokrom P450 reduktase. Dette muliggjør binding av oksygen til hemegruppen. Det er i leveren den høyeste uttrykkningen av Cyp-enzymene er, og Cypomet til torsk ble nylig beskrevet (O. A. Karlsen et al., 2012; Klaassen & Watkins III, 2010). I miljøtoksikologi er Cyp1a blant de mest studerte av alle Cyp isoformer. Uttrykkningen av Cyp1a er i de fleste tilfeller lav, men dersom fisk blir eksponert for ulike planare polyaromatiske hydrokarboner (PAH), dioksiner og dioksinlignende PCB'er vil proteinet aktiveres via AhR mediert uttrykkning (Figur 1.8). Målinger av proteinet, ved hjelp av western blot eller enzymaktivitet (EROD) kan benyttes til å detektere eksponering for og effektene av blant annet dioksiner og PAH (Goksøyr, 1994; Klaassen & Watkins III, 2010; Stegeman & Hahn, 1994). Ut ifra kjemiske analyser av sedimenter fra Kollevåg, er det tydelig at det finnes store mengder PAH i bunnsedimentene i enkelte av Kollene (Tabell 1.2). Cyp1a er derfor en potensielt en gunstig biomarkør å utforske videre i oppgaven.

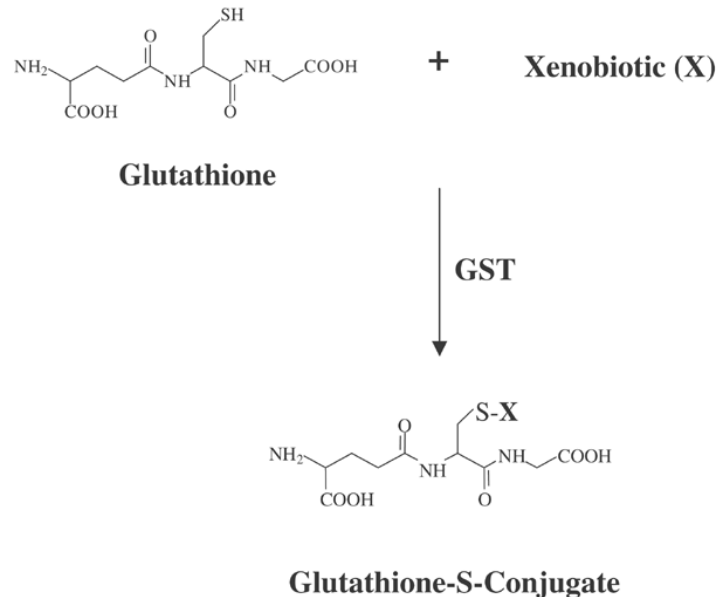


**Figur 1.8: Systematisk oversikt over ligand-indusert AhR-aktivering.** Uten bundet ligand finnes AhR i cytoplasma i et kompleks med Hsp90, Xap2 og p23. Ved binding til ligand, transporteres komplekset inn i cellen. Her frigjøres kofaktorene, og AhR dimeriserer med Arnt. Ahr-Arnt dimeren binder til Xre som er oppstrøms for målgenet Cyp1a og initierer transkripsjon av genen. I biotransformasjon av blant annet benzo(a)pyren til benzo(a)pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoksid er Cyp1a involvert (Murray & Perdew, 2011).

## 1.5.2 Glutation S-transferase

Glutation S-transferaser (Gst) er proteiner i en superfamilie som er involvert i cellulær detoksifisering av xenobiotiske og endobiotiske stoffer. Superfamilien er delt inn i tre subfamilier; cytosolisk Gst, mitokondriell Gst og mikrosomal Gst. Proteinene er klassifisert som fase II detoksifiseringsenzymmer. Enzymene er best kjent for evnen til å katalysere konjugasjonen av glutation (Gsh) til andre elektrophile forbindelser (Figur 1.9) (Allocati et al., 2009). Glutation er et tiolinnholdende tripeptid som finnes i omtrent alle levende celler. Dens reduserte form fungerer som en cellulær antioksidant som forhindrer oksidativ skade påført av blant annet reaktivt oksygen (Ngamchuea et al., 2016). Gst er regulert av en rekke ulike xenobiotiske stoffer, og minst 100 kjemikalier er kjent for å indusere Gst (Hayes & Pulford, 2008). Substratene til Gst kan komme fra fase I metabolismen av fremmedstoffer, men proteinet kan også virke direkte på enkelte stoffer som ikke gjennomgår fase I biotransformasjon. Enzymene spiller også en viktig rolle i cellulær beskyttelse mot oksidativt stress. De reduserer en rekke elektrophile stoffer, inkludert oksiderte lipider, DNA og katekole produkter ( $C_6H_4(OH)_2$ ) produsert av frie radikaler som kan forårsake skade på intracellulære makromolekyler. Mange av Gst-enzymene er uttrykt i leveren til blant annet fisk, noe som er i overensstemmelse med deres oppgave med å detoksifisere fremmedstoffer og beskytte mot oksidativt stress (Hayes & Strange, 2000). Undersøkelser gjort på ulike fiskearter, indikerer

store mengder Gst i blant annet lever (Arinc et al., 2015; Leaver et al., 1997; Liang et al., 2007).



**Figur 1.9: Illustrasjon av Gst-mediert konjugering av glutation (Gsh) under detoksifisering av et fremmedstoff (xenobiotic (X)) (Townsend & Tew, 2017).**

### 1.5.3 Heat shock protein 70

Heat shock protein (Hsp) er en superfamilie med chaperon proteiner som er kjent for å beskytte celler fra stress i miljøet. Hsp sine hovedoppgaver er å vedlikeholde proteinkonformasjonen, re-folde denaturerte proteiner, assistere protein translokasjon, og hjelpe til med overføring av proteiner over intracellulære membraner (Shacoski, 2012). I Hsp supefamilien er det flere subfamilier, deriblant Hsp70. Hsp70 er et protein som bidrar i mange ulike cellulære prosesser. Selve Hsp70-proteinet har som hovedoppgave å binde til og frigjøre hydrofobe segmenter av polypeptider for å hindre intracellulær aggregering av proteiner. Dette foregår i en ATP-drevet syklus. Proteinet er også avhengig av en rekke kofaktorer kalt J-proteiner for at syklusen skal foregå. Mengden J-proteinene i en celle overstiger ofte antall Hsp70, og deres oppgave er i hovedsak å binde målproteinene direkte til Hsp70. En stressrespons vil sette i gang økning i syntesen av en rekke Hsp. Ved oksidativt stress vil Hsp70 hindres i forhindre oksidativ skade på proteiner ved at det er for få av dem, noe som resulterer i økt produksjon av Hsp70. Hsp70 er en ofte brukt biomarkør for stress-respons i

fisk, og er derfor en av de valgte biomarkørene for denne oppgaven (Kampinga & Craig, 2010; Malyshev, 2013; Mayer & Bukau, 2005; Yamashita et al., 2010; Young, 2010).

### **1.5.4 Katalase**

Katalase (Cat) er et enzym som finnes i nesten alle levende organismer eksponert for oksygen. Enzymets oppgaver inkluderer nedbrytning av hydrogenperoksid ( $H_2O_2$ ) til oksygen ( $O_2$ ) og vann ( $H_2O$ ), samt oksidering av H-donorer som f.eks. metanol, etanol og fenol (Aebi, 1984). Cat beskytter på den måten cellene fra oksidative ødeleggelser, og hindrer spesifikt opphoping  $H_2O_2$ , som kan oksidere cellulære makromolekyler (Holley & St. Clair, 2016). Det er enzymets fire porfyrin-hemegrupper som interagerer med  $H_2O_2$ , og nedbrytningen av dette stoffet skjer i hovedsak i to trinn. I første trinn oksideres et  $H_2O_2$  av Fe i hemegruppen til det som kalles «oxyferryl species». I andre trinn blir et annet  $H_2O_2$ -molekyl brukt som en reduktant slik at enzymet kan produsere vann og oksygen (Chelikani et al., 2004; Gaetani et al., 1946). Det har også blitt gjort flere undersøkelser som påviser høyt innhold av Cat i fiskelever (Wdzięczak et al., 1982; Witas et al., 1984). Det er derfor av stor interesse å undersøke katalase som biomarkør for oksidativt stress i denne oppgaven.

## **1.6 Mål for oppgaven**

Hovedmålet med masteroppgaven er å bidra til å undersøke hvilke påvirkninger avfallsdeponiet i Kollevåg kan ha på organismer som befinner seg i området, med å benytte atlantehavstorsk som modell. En påvirkning på torsken i burforsøket, kan dermed gi en indikasjon på hvor mye organismene i dette området kan være påvirket. I Kollevåg vil det også bli gjort en tilsvarende undersøkelse etter tildekking for å undersøke om mengden lekkasjer av miljøgift til området har blitt redusert. Prøvematerialet i denne oppgaven er høstet levervev fra atlantehavstorsk som i et burforsøk har blitt eksponert for vannmassene og sediment i Kollevåg over en periode på seks uker. Potensielle effekter av eksponeringen skal undersøkes ved å studere ulike biomarkører fra levervevet på proteinnivå, og se om det finnes forskjeller mellom ulike lokaliteter i Kollevåg og referansestasjonen. Disse studiene vil involvere opparbeiding av levervevet og måling av proteinkonsentrasjon, før prøvene blir analysert og de ulike biomarkørene kvantifisert gjennom western blot og enzymaktivitetsassays.

Initielle analyser av prøver fra Kollevåg-forsøket viste en signifikant reduksjon i leversomatisk indeks for torsk fra stasjon 1 (Figur 6, Appendix (Figur A3)), som er den innerste stasjonen i Kollevåg. Dette kan antyde en eksponering for stress fra miljøet i høyere grad enn ved de andre stasjonene. Leversomatisk indeks (LSI) er et indirekte mål på fiskens næringstilgang og energistatus. Energi lagres primært i muskelvev, men ved stort næringsinntak vil leveren øke i størrelse og lipidinnhold (Fahraeus-Van Ree & Spurrell, 2003; Tyler & Dunn, 1976) Figur 6 (Appendix, Figur A3) viser også trend i Fultons kondisjonsfaktor. Her lå alle gjennomsnitt for alle stasjonene under 1K, og stasjon 1 var den som var lavest. Fultons kondisjonsfaktor sier noe om fiskens form og kondisjon, der forholdet mellom vekt og lengde beregnes (Rätz & Lloret, 2003). I tillegg har det blitt påvist forhøyede nivåer av PAH-metabolitter i gallesyre til torskene fra alle stasjonene sammenlignet med referansestasjonen (spesielt stasjon 2) (Appendix, Figur A3). Ut ifra disse resultatene (PAH-metabolitter i gallesyre, reduksjon i leversomatisk indeks og Fulton's kondisjonsfaktor) vil det derfor være mulighet for at en eller flere av biomarkørene gir utslag for påvirkning av miljøgifter.

## 2 Materialer

**Tabell 2.1:** Oversikt over kjemikalier og reagenser benyttet i oppgaven sammen med produktnummer og produsent.

<b>Kjemikalie</b>	<b>Produsent/produktnummer</b>
7-ethoxyresorufin	Sigma Aldrich/E3763
Ammonium persulfate (APS)	Bio-Rad/161-0700
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma Aldrich/A4503
Coomassie Brilliant blue R	Sigma Aldrich
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma Aldrich/D8418
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich/D9779
Eddiksyre	Sigma Aldrich/33209
Etylendiamintetraeddiksyre (EDTA)	Merck/1.08418.1000
Etanol	Sigma Aldrich/32221
Glyserol	Sigma Aldrich/ 56-81-5
Glycine	Sigma Aldrich/56-40-6
Kaliumklorid (KCl)	Sigma Aldrich/p9541
Metanol	Sigma Aldrich/34860N
Nikotinamid-adenin-dinukleotid (NADPH)	Sigma Aldrich/ 2646-71-1
Natriumklorid (NaCl)	Sigma Aldrich/ 7647-14-5
Natrium dihydrogenfosfat monohydrat	13472-35-0
Precision Plus Protein, Kaleidoscope	Bio-Rad/1610375
SDS, 20%	VWR/Amresco/M112
Tween 20	Bio-Rad/170-6531
TEMED	Sigma-life/T9281

**Tabell 2.2:** Primære-og sekundære antistoff benyttet.

<b>Antistoff</b>	<b>Produsent/produktnummer</b>	<b>Fortynningsforhold</b>
Primære		
Anti-beta aktin	Abcam	1:1000
Anti-cod Cyp1a	Biosense laboratories	1:800
Anti-catalase	Inbiolabs	1:500
Anti-Heat Shock Protein 70 (Hsp70)	Sigma-Aldrich/H5147	1:5000
Anti-glutathione S-transferase	Inbiolabs	1:1500
Sekundære		
Sheep anti-mouse IgG HRP	Ge Healthcare/NA931V	1:3000
Goat anti-rabbit HRP polyclonal	Dako Denmark/ P0448	1:2000

**Tabell 2.3:** Kit brukt underveis i oppgaven

<b>Kit</b>	<b>Produsent/produktnummer</b>
Catalase assay kit	Cayman Chemical/ 707002
Glutathione-S-transferase assay kit	Cayman Chemical/ 703302
Supersignal® west femto maximum sensitivity substrate	Pierce/ 34095
Supersignal® west pico chemiluminescent substrate	Thermo Scientific/ 34080
Pierce 660nm Protein Assay Kit	Thermo Scientific/ 22662

**Tabell 2.4:** Homogeniseringsbuffer brukt under opparbeiding og homogenisering av leverprøver.

<b>Buffer</b>	<b>Innhold</b>
Homogeniseringsbuffer	13,8 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O 11,2 g KCl 0,372 g EDTA 0,154 g DTT 115 mL 87% glycerol pH justert til 7,4 med 6M NaOH dH <sub>2</sub> O til 1 L

**Tabell 2.5:** *Løsninger og buffere brukt i SDS-PAGE.*

<b>Løsning/buffer</b>	<b>Innhold</b>
10% SDS	1 del 20% SDS 1 del dH <sub>2</sub> O
10% APS	0,1 g APS 1,0 ml dH <sub>2</sub> O
10x Tris/Glysin/SDS buffer (TGS), pH 8.3	30,3 g Tris (250mM) 144 g Glysin (1920 mM) 10 mL SDS (1%) pH justert til pH 8,3 med 6M HCl dH <sub>2</sub> O til 1 L
SDS-PAGE elektroforesebuffer (1xTGS)	100 mL 10x TGS 900 m dH <sub>2</sub> O

**Tabell 2.6:** *Løsninger til støping av SDS-polyacrylamid gel.*

<b>Kjemikalier</b>	<b>Separasjons-gel</b>	<b>Stacking-gel</b>
	<b>12%</b>	<b>4%</b>
30% akrylamid/bis	4,0 Ml	650 µL
dH <sub>2</sub> O	3,345 Ml	2,995 mL
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 Ml	-
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	-	1,25 mL
10% SDS	100 µL	50 µL
10% APS	50 µL	50 µL
TEMED	5 µL	5 µL
Totalt volum	10 Ml	5 mL



**Tabell 2.7:** *Løsninger og buffere brukt til Western blotting og fremkalling av membran.*

<b>Løsning/buffer</b>	<b>Innhold</b>
5x Tris-bufret saltvannsløsning (TBS)	24 g Tris 292,5 g NaCl 1,8 L dH <sub>2</sub> O Justert pH til 7,5 med 6M HCl dH <sub>2</sub> O til 2 L
0,05% TBS-tween	200 mL 5x TBS 800 mL dH <sub>2</sub> O 0,5 mL Tween-20
5 % tørrmelk	6,25 g tørrmelk 125 mL TBS-tween
10x transferbuffer	30,3 g Tris 144 g Glysin dH <sub>2</sub> O til 1 L
1X transferbuffer	100 mL 10x transferbuffer 200 mL metanol dH <sub>2</sub> O til 1 L
Coomassie Brilliant Blue avfargingsløsning	40% etanol 10% eddiksyre 50% dH <sub>2</sub> O
Coomassie Brilliant Blue fargeløsning	2 g Brilliant Blue R 200 mL eddiksyre 800 mL etanol dH <sub>2</sub> O til 2 L

**Tabell 2.8:** *Instrumenter*

<b>Instrumenter</b>	<b>Produsent</b>	<b>Funksjon</b>
Milli-q a10 advantage	Merch Millipore	Deionisering av H <sub>2</sub> O
Nanodrop 1000 spectrophotometer	Thermo Scientific	Kvantifisere og måle renhet av nukleinsyrer
Precellys ®24	Bertin instruments	Homogenisering av vev
Thermomixer Compact	Eppendorf	Miksing og temperaturkontroll
ChemiDoc™XRS+	Bio-Rad	Billedtaking av gel og membran
Enspire® 2300 Multimode Plate Reader	Perkin Elmer	Plateleser for absorban, luminiscens og fluorescens

**Tabell 2.9:** *Programvare benyttet for framstilling og analyse av data*

<b>Program</b>	<b>Leverandør</b>	<b>Funksjon</b>
Excel	Microsoft	Sortering av data
Image Lab™ Software	Bio-Rad	Bildeanalyse av WB-membraner
GraphPad Prism	GraphPad	Visualisering og statistiske analyser

## 3 Metode

### 3.1 Homogenisering av leverprøver fra atlantehavstorsk med

#### Precellys®

Kollevåg-prosjektet baserer seg på 86 fisk plassert i fire ulike bur. Det er fra fiskene plassert på de ulike lokasjonene leverprøvene opprinnelig er hentet fra. Prøvene ble oppbevart på -80°C før homogenisering. Homogeniseringsrør (Precellys®homogeniseringssett/Bertin) ble fylt med 15-20 keramiske kuler (Precellys®Zirconium Oxide Beads (1,4mm)), slik at bunnen av røret ble dekket før 1 mL homogeniseringsbuffer (Tabell 2.4) ble tilsatt. Ca. 250 mg av hver leverprøve ble veid inn og overført til homogeniseringsrøret. Underveis i prosessen ble levervevet oppbevart på tørris for å forhindre tining og eventuell nedbrytning av proteiner grunnet protease aktivitet. Etter innveiing av levervev ble prøvene fraktet på is til en Precellys® 24 mekanisk homogenisator. Homogeniseringen ble utført i fire omganger ved 5000g i 15 sekunder. Etter homogenisering ble prøvene sentrifugert i 20 minutter på 4°C ved 12 000g. Etter sentrifugering hadde det dannet seg et lipidlag i toppen av supernatanten. Lipidlaget ble forsiktig penetrert med en pippettespiss, og så mye som mulig av homogenatet ble pipetert ut samtidig som lipidlaget ble unngått. Homogenatet ble videre alikvotert og lagret på -80°C.

### 3.2 Måling av proteinkonsentrasjon ved bruk av Pierce 660nm

#### Protein Assay

Pierce 660nm Protein Assay ble benyttet for bestemmelse av proteinkonsentrasjon til de homogeniserte leverprøvene. Dette er en rask, kolorimetrisk, kvantitativ metode for å måle den totale proteinmengden i biologiske prøver. Metoden er basert på absorpsjonsendringen der et farge-metallkompleks som inneholder polyhydroxybenzenesulfonephthalein binder seg til proteinene i prøven. Proteinkonsentrasjonen blir så beregnet ut ifra en BSA-standardkurve (Appendix (Figur A2)) med kjente protein konsentrasjoner (Thermo Scientific).

Metoden ble utført i henhold til produsentens protokoll. Syv standardløsninger med bovine serum albumin (BSA) i PBS-buffer ble tillaget (BSA-konsentrasjon 2000 µg/mL, 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, og en blank på 0 µg/mL). Deretter

ble 10  $\mu\text{L}$  av hver standardløsning, homogeniserte prøver og blankprøver pippetert ut i en 96-brønnsplate i triplikater. 150  $\mu\text{L}$  Pierce 660 nm Protein Assay Reagent ble tilslutt tilsatt i hver brønn. 96-brønnsplaten ble så plassert i en plateleser (EnSpire) og platen ble ristet i 60 sekunder før absorbansen ble målt ved 660 nm. Ut ifra standardkurven ble proteinkonsentrasjonen til prøvene beregnet ved hjelp av polynom regresjon.

### **3.3 Natrium-dodecylsulfat polyacrylamid gel elektroforese (SDS-PAGE)**

SDS-PAGE er en metode for å separere proteiner ved hjelp av elektroforese. I denne metoden blir det brukt en polyalkrylamid-gel som medium og SDS som denaturerer proteinene. SDS binder seg langs den ustrakte polypeptid kjeden og gir proteinene en uniform negativ ladning slik at vandringshastigheten bestemmes av proteinets størrelse (Laemmli, 1970).

Protokollen som ble brukt i denne delen av oppgaven er basert på Laemmli (1970). Løsningene som ble brukt i oppgaven står oppført i tabell 2.5. Først ble glassplatene grundig rengjort og deretter skylt med  $\text{dH}_2\text{O}$  og 70% etanol. Utstyret for gelstøping ble så satt sammen, og støpekammerene ble testet for lekkasje ved å fylle  $\text{dH}_2\text{O}$  oppi kammeret mellom glassplatene. Avstanden mellom glassplatene var 0,75 mm. Løsningen til gelene ble laget til (Tabell 2.6) i 15 mL falconrør. I både separasjonsgel og stackinggel ble alt unntatt 10% APS og TEMED blandet sammen, dette fordi det er disse kjemikaliene som gjør at gelen polymeriserer. Vannet i kammerene ble forsiktig helt ut. APS og TEMED ble deretter tilsatt til separasjonsgelen, og løsningen ble forsiktig blandet. Separasjonsgelen ble så pippetert opp i støpingskammeret til den lå omtrent 2 cm fra toppen av glassplaten.  $\text{dH}_2\text{O}$  ble pippetert forsiktig på toppen av gelen, for å hindre uttørking av geloverflaten under polymerisering. Etter at gelen hadde stivnet, ble vannet fjernet og stackinggelen (4%) tillaget (Tabell 2.6). Denne gelen ble pippetert på toppen av separasjonsgelen til løsningen nådde toppen av glassplaten. En kam tilpasset til 15 brønner ble presset ned i 4% gelløsningen. Etter polymerisering ble gelene lagret fuktig i kjøleskapet ( $4^\circ$ ) inntil bruk.

Det ble i hver brønn tilsatt en proteinmengde tilsvarende 7 µg. Prøvene ble varmet i en Thermomixer Compact på 95 °C i 3-4 minutter for fullstendig denaturering av proteinene. Etter oppvarming ble damp som hadde samlet seg under lokket på eppendorf rørene forsiktig spunnet ned med en bordsentrifuge. Utstyret til selve elektroforesen ble satt sammen, og gelen ble satt oppi beholderen. Karet ble fylt med elektroforesebuffer. I første brønn ble det satt på 5 µL med proteinstandard (Precision Plus Protein, Kaleidoscope (Bio-Rad)) mens de resterende brønnene ble tilsatt 15 µL av hver homogenisert leverprøve ved hjelp av en Hamilton-sprøyte. Etter å ha tilsatt alle prøvene ble spenningen satt på 200 V, og gelene kjørt til indikatorfargen (bromfenolblå) nådde bunnen av gelen (ca. 45 minutter).

### 3.4 Western blotting

Western blotting er en metode som brukes til å identifisere spesifikke proteiner som er separert ved hjelp av SDS-PAGE. Etter at SDS-PAGE er utført blir proteinene i gelen overført til en polyvinylidene difluorid-membran (PVDF) ved hjelp av et elektrisk felt (Towbin et al., 1979). Membranen er da plassert mellom gelens overflate og den positive elektroden i en sandwich. Sandwichen inkluderer to svamper og to filterpapir som beskytter gel og membran. Plasseringen gjør at de negativt ladde proteinene migrerer fra gel til membran mot den positivt ladde elektroden i det elektriske feltet (Mahmood T., Yang P-C., 2012).

Når proteinene er overført til membranen, kan antistoffer som binder spesifikt til epitop(er) i proteinene man ønsker å detektere benyttes (Mahmood T., Yang P-C., 2012). Fremgangsmåten for Western blotting skjer som forklart av Nilsen (Nilsen, 1998), som igjen er basert på deler av Towbin et al. sin protokoll (Towbin et al., 1979).

Western blot, ble utført med en mini trans-blot® elektroforese overføringscelle. Buffer og løsninger står beskrevet i Tabell 2.7. Etter SDS-PAGE var utført ble PVDF membranen klippet opp (ca. 9\*6 cm) tilsvarende til gelens størrelse og fuktet i metanol i 20 sekunder. Membranen ble så skylt i dH<sub>2</sub>O og lagt i overføringsbuffer i 10 minutter sammen med gelen som ble forsiktig fjernet fra glassplatene. Filterpapir og svamper ble også vætet i buffer, før sammensetting av blottekassetten. Kassetten ble brukt til å holde gel og membran sammen under overføring. Etter fukting av alle komponenter ble kassetten satt sammen i følgende rekkefølge: svamp, filterpapir, PVDF-membran, gel, filterpapir og svamp. Etter

sammensetting ble kassetten rullet over med en rulle for å fjerne eventuelle luftbobler som var fanget mellom lagene. Kassetten ble deretter lukket og plassert i transfer-cellen. I tanken ble det fylt opp med transferbuffer slik at hele kassetten var dekket. Et kjøleelement ble plassert i tanken for å unngå for høy varmeutvikling i gel og buffer under elektroforesen. Blottingen ble kjørt på konstant 100 V i en time med magnetrøring.

### **3.5 Inkubering av membraner med antistoff**

Etter overføringen ble membranene undersøkt for tilstedeværelse av ulike biomarkører (proteiner) med bruk av antistoff. Inkuberingen av antistoff ble gjort ved at membranen med overførte proteiner ble plassert i en keramikkskål og vasket i 5 minutter i TBS-tween (Tabell 2.7). Videre ble ledige bindingssteder på membranen blokkert i 5% tørrmelkløsning (Tabell 2.7). Membranen ble deretter plassert kjølig (4°C) med konstant risting over natten. Dagen etter ble den igjen vasket med TBS-tween (5 min), etterfulgt av en tilsetning med primært antistoff. Her ble flere ulike primære antistoff brukt (hver for seg), inkludert antistoff mot Cyp1a, Gst, Hsp70, Aktin og Cat (Tabell 2.2). Det primære antistoffet ble fortynt i TBS tilsatt 5% tørrmelk og inkubert i 2 timer i romtemperatur (RT) med konstant risting. Etter inkubering med primært antistoff ble membranen vasket to ganger med TBS-tween (5 min. per vask). Membranen ble så tilsatt sekundært antistoff konjugert med HRP (horseraddish peroxidase) i TBS-tween tilsatt 5% tørrmelk i ønsket forhold (Tabell 2.2) før ny inkubasjon i 1,5 timer i RT med konstant risting. Membranen ble etter inkubering vasket to ganger med TBS-tween (5 min. per vask) og deretter med dH<sub>2</sub>O (5 min). Supersignal West Pico Chemiluminescent substrate og Supersignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate ble så brukt etter leverandørens protokoll for å påvise de ulike proteinene. Det ble tilsatt 250 µL av hvert av kitenes peroksid-løsning og luminol-løsning (substrat for peroksidase). Blandingen ble vortexet og spunnet ned med en bordsentrifuge før det ble pipperert ut over membranen. Etter fem minutter inkubering, ble overflødig væske fjernet og plastfilm lagt forsiktig over membranen. Chemiluminescent signal fra konjugert peroksidase på det sekundære antistoffet ble påvist ved bruk av BioRad's ChemiDoc™ XRS+. Billedtakingen ble gjort i ulike tidsintervaller til ønsket signalstyrke ble oppnådd. Bildene av membranen ble så analysert i Image Lab™ Software.

### 3.6 Catalase Assay Kit

«Catalase assay kit» bruker katalase enzymets funksjon, peroksidering, for å bestemme enzymaktiviteten i prøven (Cayman chemical, 2017). I kitet som har blitt brukt fungerer metanol som en elektrondonor og  $H_2O_2$  som substrat. Formaldehyd dannes i tillegg til vann i reaksjonen og kan måles kolorimetrisk. De to reaksjonene der katalase detoksifiserer hydrogenperoksid vises nedenfor.

Katalytisk aktivitet:  $2H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$

Peroksidase aktivitet:  $H_2O_2 + AH_2 \rightarrow A + 2H_2O$

For peroksidase aktivitet representerer  $AH_2$  elektrondonoren og A den oksiderte elektrondonoren.

I katalase assay kit ble det brukt 96 brønns plate som fulgte med kitet. Det ble først laget til standardløsninger (A-G) etter leverandørens protokoll. I de første brønnene ble det tilsatt duplikater av standardene som bestod av 100  $\mu$ l fortynnet assay-buffer, 30  $\mu$ l metanol og 20  $\mu$ l standard. Etter standarden ble det pipetert 100  $\mu$ l fortynnet assay-buffer, 30  $\mu$ l metanol og 20  $\mu$ l fortynnet katalase i to brønner. Disse tilsvarte den positive kontrollen til kitet. I prøvebrønnene ble det tilsatt 100  $\mu$ l fortynnet assay-buffer, 30  $\mu$ l metanol og 20  $\mu$ l av hver prøve. Her ble det også gjort duplikater av hver prøve. Reaksjonen ble så startet ved å tilsette 20  $\mu$ l fortynnet hydrogenperoksid, etterfulgt av 20 minutter resting i romtemperatur. Deretter ble 30  $\mu$ l kaliumhydroksid pipetert i hver brønn, og brønnene ble videre tilsatt 30  $\mu$ l kromogen. Platen ble så inkubert i romtemperatur i 10 minutter med resting. Til slutt ble det tilsatt 10  $\mu$ l kaliumkatalase periodat i hver brønn. Platen ble dekket til og inkubert 5 minutter ved romtemperatur på en platerister. Absorbansen ble så målt ved 540 nm, ved bruk av plateleser (Enspire® 2300 Multimode, Perkin Elmer).

### **3.7 Glutathione S-transferase Assay Kit**

Gst assay kit måler den totale Gst aktiviteten i prøven ved å kvantifisere konjugasjonen av 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) til 2,4-dinitrofenyl-S-glutation. (Sheehan et al., 2001). I GST assay kit ble det brukt 96 brønns plate som fulgte med kitet. Det ble først tilsatt 170 µl assay-buffer og 20 µl glutation i tre brønner. I de tre neste brønnen ble det kjørt en positiv kontroll bestående av 150 µl assay-buffer, 20 µl glutation, og 20 µl fortynnet Gst (levert med kitet). Resten av brønnene ble tilsatt triplikat av hver prøve. I prøvebrønnene ble det pippetert 15 µl assay-buffer, 20 µl glutation og 20 µl av hver prøve. Reaksjonen ble så startet ved å tilsette 10 µl CDNB i alle brønnene. Platen ble deretter ristet i ti sekunder før absorbans ble lest av hvert minutt på 340 nm. Det ble totalt gjort syv avlesninger.



## 4. Resultater

### 4.1 Homogenisering og måling av proteinkonsentrasjon

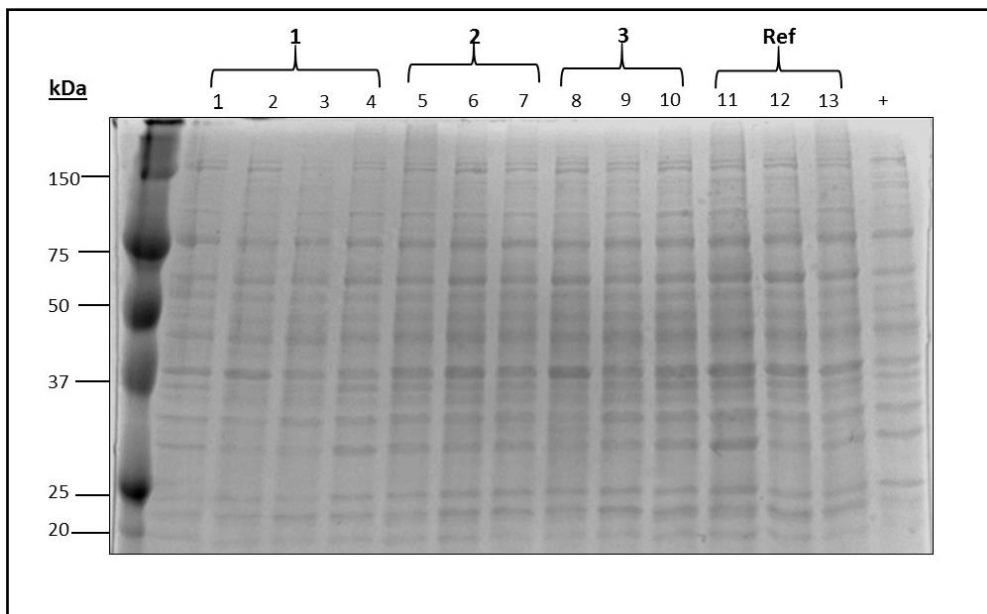
Leverprøver høstet fra atlanterhavstorsk benyttet i Kollevåg-prosjektet ble homogenisert som beskrevet i metode 3.1. Videre ble proteinkonsentrasjonen i prøvene bestemt ved hjelp av Pierce 660 Protein assay (metode 3.2 og Appendix (Figur A1)). Det ble observert noe forskjell mellom prøvenes proteinkonsentrasjoner, hvor laveste proteinkonsentrasjon ble beregnet til 0,7 mg/mL og den høyeste verdien til 21,8 mg/mL.

### 4.2 SDS-PAGE og Western blotting

Ved bruk av SDS-PAGE og western blot ble det i 83 leverhomogenat undersøkt om det kunne detekteres en opp- eller nedregulering av Cyp1a, Gst, Hsp70 og Cat. I alle gelene ble prøver fra de 4 stasjonene i Kollevåg-prosjektet applisert sammen med en positiv kontroll for Cyp1a uttrykning (leverprøve fra torsk eksponert for beta-naftoflavon (BNF) i et tidligere utført in vivo forsøk).

#### 4.2.1 Visualisering av proteinene

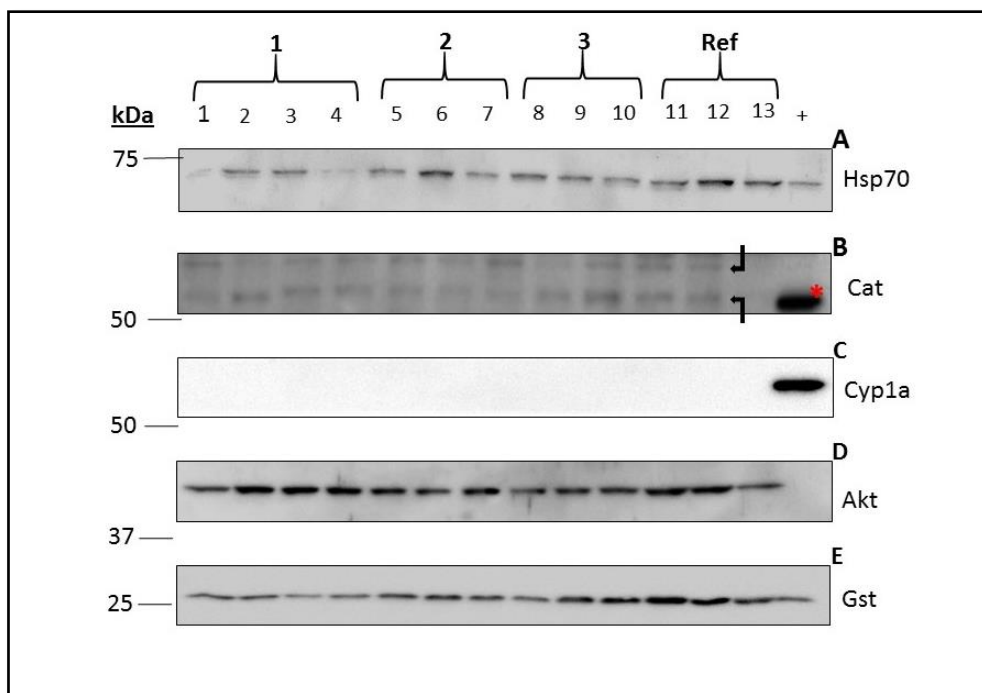
For å undersøke proteinmønsteret og verifisere at proteinmengden var tilsvarende lik i de ulike brønnene ble SDS-PAGE gelen farget med Coomassie Brilliant Blue som beskrevet i metode 3.3. En representativ gel er vist i figur 4.1, og viser at proteiner er tilstede i alle brønnene og at mengden protein tilsatt i hver brønn (7 µg) er relativt lik over hele gelen (Figur 4.1).



**Figur 4.1: Proteiner i leverhomogenat fra torsk fra Kollevåg-prosjektet separert ved SDS-PAGE og farget med Coomassie Brilliant Blue.** Til venstre er proteinstandard indikert i kilodalton (kDa) (Precision Plus Protein, Kaleidoscope (Bio-Rad)), Brønn 1-13 representerer lever-homogenat fra Kollevåg. Klammene over gelen merket fra 1 til 3 og Ref angir hvilken lokasjon i Kollevåg prøvene er fra og (+) indikerer positiv kontroll (BNF eksponert torsk). 7 µg prøve ble applisert i hver brønn. Bilde av gelen ble tatt med BioRad's ChemiDoc™ XRS+.

## 4.2.2 Western blotting

Western blotting ble benyttet for å studere om ulike proteiner involvert i prosesser som detoksifisering og antioksidantmekanismer er uttrykt i Kollevåg-prøvene, og om det er stasjonsforskjeller i denne uttrykkningen. Et utvalg av prøver fra alle stasjonene ble alltid kjørt på samme gel under hver westernblotanalyse. Antistoff for de følgende biomarkørene ble benyttet: anti-Cyp1a, anti-Hsp70, anti-Cat og anti-Gst, i tillegg til aktin (Akt) som ble inkludert som loading-kontroll og benyttet for normalisering av påsatt proteinmengde under kvantifiseringen av proteinuttrykkningen. I tillegg til prøver fra stasjonene ble det på hver membran inkludert en positiv kontroll (torsk eksponert for BNF). Med unntak av Cyp1a, som kun ble detektert i positiv (+) kontroll, ble de fire andre biomarkørene detektert i alle Kollevåg-prøvene i varierende mengder (Figur 4.2).

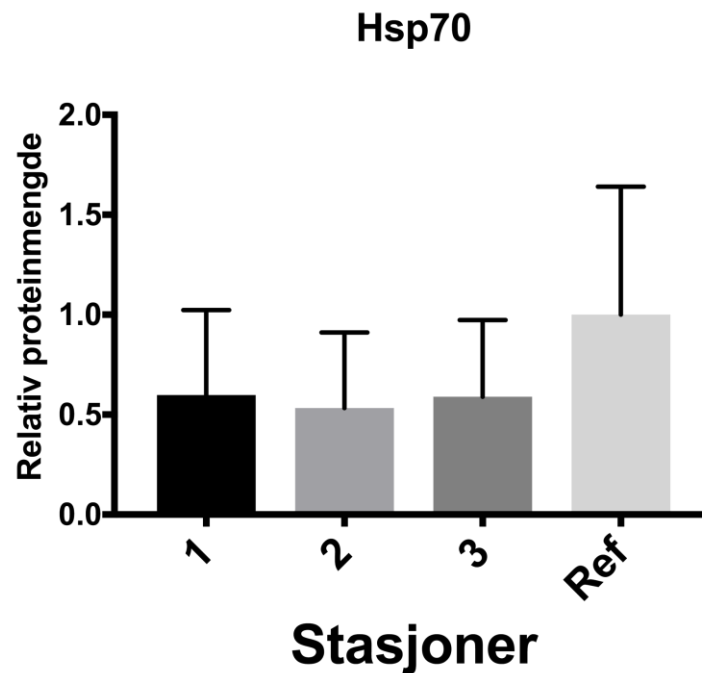


**Figur 4.2: Representativ uttrykking av ulike biomarkører i leverprøver av torsk fra Kollevåg-prosjektet.** Fire ulike biomarkører og aktin (Akt, E) ble detektert ved hjelp av antistoff: Hsp70 (A), Cat (B), Cyp1a (C), og Gst (D). På venstre side av figuren vises de ulike molekylvektene til standarden som ble benyttet i kilodalton (kDa) (Precision Plus Protein Kaleidoscope (Bio-Rad)). Nummer på prøvebrønner (1-13) samt positiv kontroll (+) (BNF eksponert torsk) er indikert i figuren. Klammene over gelen merket fra 1 til 3 og Ref angir hvilken lokasjon i Kollevåg prøvene er fra. Det ble for katalase detektert to bånd, indikert med piler (B). \* indikerer Cyp1a som ble detektert i forkant av Cat på samme membran og dermed vises også her. Bilde av blottet er tatt med BioRad's ChemiDoc™ XRS+ og deretter analysert i Image Lab™ Software. Figuren er representativ utvalg for alle 83 prøvene som har blitt analysert på tilvarende måte (Appendix (Figur A1)).

### 4.2.3 Kvantitativ utregning av biomarkørene Hsp70 og Gst

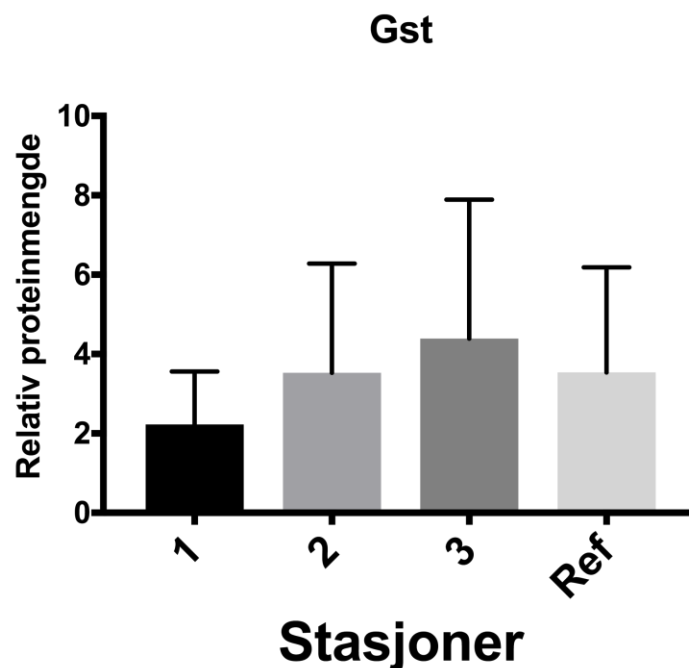
For å kvantifisere uttrykkingen til de ulike biomarkørene ble intensiteten på båndene (Figur 4.2) normalisert mot intensiteten til Akt for justering for variasjon i påsatt proteinmengde mellom brønnene. I alle blotene ble de normaliserte intensitetene for hvert protein sammenlignet på tvers av stasjonene. Siden Cyp1a kun ble detektert i positiv kontroll, lot det seg ikke gjøre å kvantifisere dette proteinet i lever-homogenatene fra Kollevåg-prøvene. Hsp70 og Gst ga tydelige og distinkte bånd på membranen. Siden Cat ble uttrykt med to bånd ble denne utelatt fra kvantifiseringen av WB resultatene. Den kvantitative analysen ble derfor gjort for Hsp70 og Gst (Figur 4.3 og Figur 4.4).

Den relative proteinmengden til Hsp70 fra WB analysen viser en trend der alle tre Kollevåg-stasjonene (1, 2 og 3) har lavere uttrykning av Hsp70 sammenlignet med referansestasjonen (Figur 4.3). Denne trenden var allikevel ikke statistisk signifikant. De tre stasjonene fra Kollevåg hadde relativt like proteinmengder av Hsp70 seg imellom.



**Figur 4.3: Relativ proteinmengde av Hsp70 i homogeniserte leverprøver av torsk fra Kollevågforsøket.** Relativ proteinmengde er beregnet fra western blot og presentert som fold endring mellom de ulike stasjonene i Kollevåg (1-3) relativt til referansestasjonen (Ref). Resultatene er presentert som gjennomsnitt + standardavvik, med  $n = 13, 16, 9$  og  $10$  for hhv stasjon 1, 2, 3 og referansestasjonen (Ref). One-way ANOVA og Tukey HSD *post hoc* test ble brukt til å sammenlikne stasjonene ( $p < 0,05$  ble satt som signifikansnivå).

Den relative proteinmengden til Gst viste heller ingen signifikante forskjeller mellom stasjonene i Kollevåg eller referansestasjonen (Figur 4.4). Forskjellen fra uttrykkningen av Hsp70 (Figur 4.3) er at det er større variasjon mellom Kollevåg-stasjonene. Fra stasjon 1 er det en trend i gradvis økning i mengde Gst i individene i stasjon 2 og videre til individene i stasjon 3.

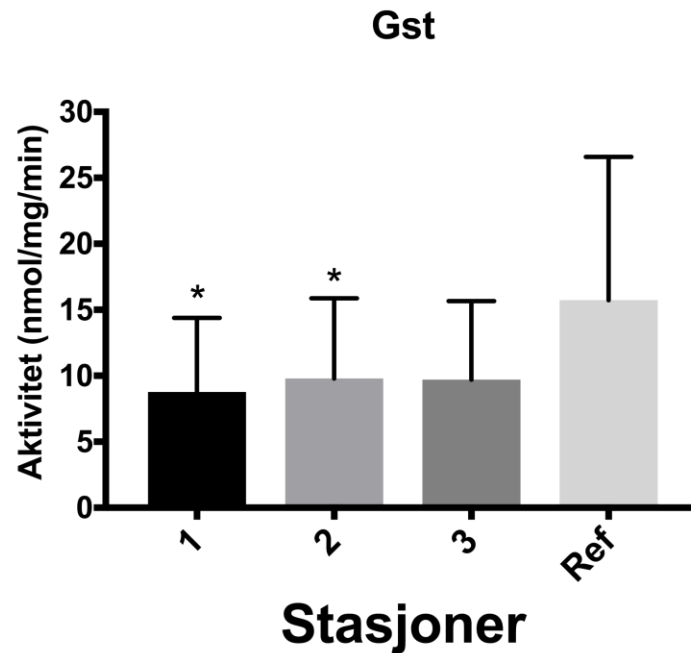


**Figur 4.4: Relativ proteinmengde av Gst i homogeniserte leverprøver av torsk fra Kollevåg-forsøket.** Relativ proteinmengde er beregnet fra western blot ved normalisering i forhold til aktinmengden uttrykt i de ulike prøvene. Resultatene er presentert som gjennomsnitt + standardavvik, med n = 20, 22, 14 og 16 for hhv stasjon 1, 2, 3 og ref. One-way ANOVA og Tukey HSD ble brukt til å sammenlikne stasjonene ( $p < 0,05$  ble satt som signifikansnivå).

### 4.3 Måling av enzymaktiviteten for Gst og Cat

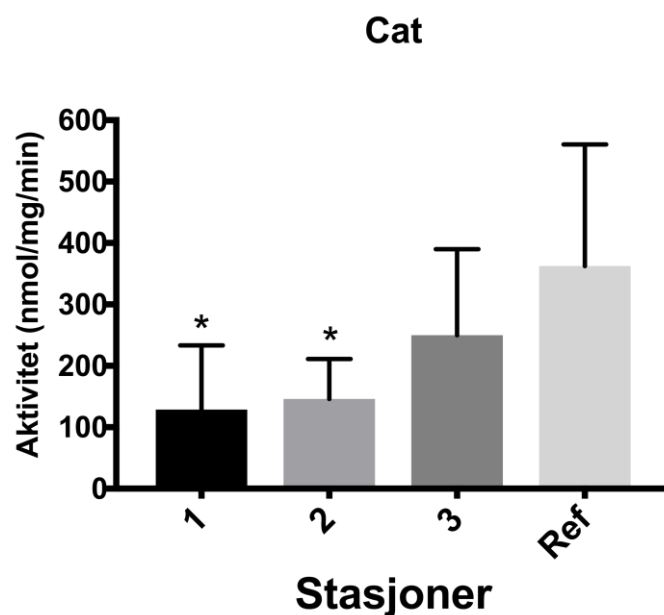
Siden Gst og Cat også er enzymer med målbar aktivitet, ble enzymaktiviteten til disse målt for å kvantifisere deres aktivitet i Kollevåg-prøvene og komplementere resultatene fra WB analysen. På denne måten fikk man også målt Cat som ikke ble kvantifisert i westernblotanalysen.

Aktiviteten til Gst i leverhomogenatene ble målt som beskrevet i metode 3.7. For Gst ble det målt gjennomsnittlig lavere enzymaktivitet for stasjon 1, 2 og 3 sammenlignet med referansestasjonen (Figur 4.5). Enzymaktiviteten til stasjon 1 og 2 var signifikant forskjellig fra referansestasjonen.



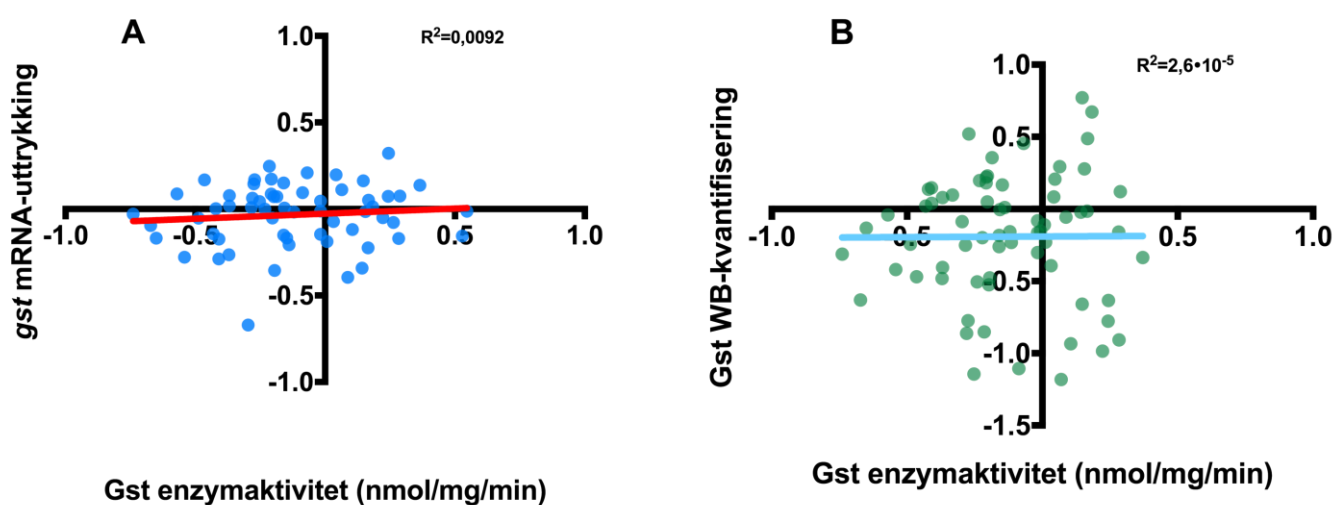
**Figur 4.5: Enzymaktivitet målt for Gst i homogeniserte leverprøver av torsk fra Kollevåg-forsøket.** Enzymaktivitet ble målt ved bruk av Gst Assay Kit (Cayman Chemicals). Aktiviteten ble normalisert mot proteinkonsentrasjonen i prøvene og er presentert som nmol produkt produsert per minutt per milligram protein (nmol/min/mg). Resultatene er presentert som gjennomsnitt + standardavvik, med n = 18, 21, 15 og 20 for hhv stasjon 1, 2, 3 og ref. Regresjonsanalyser ble brukt til å sammenlikne stasjonene, og asterisk (\*) representerer signifikante forskjeller ( $p < 0,05$ ) mellom stasjon 1-3 og referansestasjonen (Ref).

Tilsvarende ble aktiviteten av Cat målt i leverhomogenatene som angitt i metode 3.6 (Figur 4.6). En gradient fra lavere til høyere enzymaktivitet av Cat fra innerste stasjon (stasjon 1) til ytterste stasjon (stasjon 3) i Kollevåg kan observeres. Enzymaktiviteten av Cat var høyest i prøvene fra referansestasjonen, og statistisk signifikant lavere i stasjon 1 og 2 sammenlignet med referansestasjonen (Ref).



**Figur 4.6: Enzymaktivitet målt for Cat i homogeniserte leverprøver av torsk fra Kollevåg-forsøket.** Enzymaktivitet ble målt ved bruk av Catalase Assay Kit (Cayman Chemicals). Aktiviteten ble normalisert mot proteinkonsentrasjon og er presentert som nmol produkt produsert per minutt per milligram protein (nmol/min/mg). Resultatene er presentert som gjennomsnitt + standardavvik, med  $n = 18, 20, 13$  og  $17$  for hhv stasjon 1, 2, 3 og ref. Regresjonsanalyser ble brukt til å sammenlikne stasjonene, og asterisk (\*) representerer signifikante forskjeller ( $p < 0,05$ ) mellom stasjon 1-3 og referansestasjonen (Ref).

Det ble også gjort korrelasjonsanalyser mellom genuttrykk (data gitt fra PhD student Karina Dale), relativ proteinmengde og enzymaktivitet for Gst i individprøvene (Figur 4.7). Resultatene av analysene ga liten korrelasjon for både Gst mRNA-uttrykking og Gst WB-kvantifisering ( $A: 0,0092$ ,  $B: 2,6 \cdot 10^{-5}$ ).



**Figur 4.7: Korrelasjon mellom genuttrykk, relativ proteinmengde og enzymaktivitet for glutation S-transferase i torsk fra Kollevåg-forsøket.** Korrelasjon mellom genuttrykk og enzymaktivitet (A), og proteinmengde og enzymaktivitet (B) er vist ved å plote respektive responser for hvert individ. Korrelasjonskoeffisienter ( $R^2$ ) og trendlinje er indikert i figuren.

## 5 Diskusjon

I denne oppgaven har fokuset vært å undersøke hvilke påvirkninger det tildekkede avfallsdeponiet i Kollevåg kan ha på marine organismer i området ved å bruke atlantehavstorsk som modellorganisme. Prøvematerialet som har blitt benyttet har vært levervev fra individene som var del av burforsøket i Kollevåg. Kjemiske analyser av bunnsedimentene, samt analyser av gallemetabolitter i galleprøver fra Kollevåg-forsøket, indikerer henholdsvis høye verdier av ulike miljøgifter på enkelte lokasjoner i Kollevåg, samt eksponering for disse (Bjørnen & Hafner, 2014; Dale et al., 2016; Haave M., 2015). Dette forsøket vil også fungere som et referanseforsøk i forhold til å sammenligne effekter av en utbedring og ny tildekking av avfallet i Kollevåg planlagt utført i 2017/2018.

Miljøanalyser som blir utført i Kollevåg-prosjektet der biomarkørdata og miljøgifter funnet i organismer blir målt og analysert er omfattende arbeid, men er viktig å utføre. Slike analyser gir kunnskap om miljøstatus og er med på å gi mer informasjon om hvordan miljøgifter kan påvirke organismer som lever i området. Det har blitt gjort en rekke undersøkelser på andre lokaliteter som ligner Kollevågen-prosjektet for å kontrollere hvordan fisk eller andre organismer potensielt blir påvirket av lokal forurensning, deriblant undersøkelser av torsk langs Skagerrak-kysten (Rogalandsforskning, 2001), forurensning av PCB og PCDD/F i musling i Bosporosstredet (Okay et al., 2009) og tilstedeværelse av benzo(a)pyren og PCB i oppdrettsfisk (Grøsvik, 1996). Siden det allerede er gjort undersøkelser som viser at det er miljøgifter tilstede i Kollevåg, er det viktig å se hvordan dette kan påvirke organismene som oppholder seg der, og på hvilken måte. I feltstudier der organismer blir eksponert for miljøgifter blir det ofte tatt prøver fra flere ulike stasjoner i det aktuelle området. Deretter sammenlignes resultatene fra de ulike stasjonene for å bedre kartlegge lokale forurensningskilder. (Löf et al., 2016; Sundt et al., 2012).



Tilstedeværelsen og aktiviteten til biomarkørene Gst, Hsp70, Cat og Cyp1a ble målt i levervev ved bruk av Western blotting eller enzymaktivitetsassay. Cyp1a, som er en indikator for eksponering for PAHer, dioksiner, og dioksin-lignende PCBer, ble ikke funnet uttrykt i noen av Kollevåg-prøvene ved bruk av Western blotting. Hsp70, Cat og Gst ble derimot identifisert, og Hsp70 viste en tydelig trend (ikke signifikant) for lavere proteinmengde i alle Kollevåg stasjonene i forhold til referansestasjonen. Enzymaktiviteten til Cat og Gst ble målt i leverhomogenatene, og det ble vist signifikante forskjeller for begge enzymene i stasjon 1 og 2, i forhold til referansestasjonen. Begge enzymene viste betydelig nedgang i enzymaktivitet i stasjon 1 og 2 sammenlignet med referansestasjonen.

## 5.1 Eksponering og prøvemateriale

Atlanterhavstorsken brukt i Kollevåg-prosjektet ble eksponert i en periode på 6 uker. Ut ifra liknende feltstudier er dette en vanlig eksponeringslengde dersom man skal se på korttidseffekter (Berge et al., 2011; Okay et al., 2009). Man antar at atlanterhavstorsken kan ha blitt eksponert både gjennom fordøyelsessystemet via beiting på bunndyr i sedimentene, men også gjennom en eksponering fra vannsøylen via gjeller og skinn. Foreløpige analyser av Kollevåg-prøvene, og resultater fra denne oppgaven, viser at det i løpet av eksponeringsperioden har foregått en eksponering som både har påvirket energistatus (LSI og kondisjonsfaktor) og forårsaket effekter på protein- og genuttrykning (Appendix (Figur A3)).

Leverprøvene fra Kollevåg ble homogenisert og proteinkonsentrasjon ble målt for hver prøve før videre analyser. Etter utregning av proteinkonsentrasjon var det syv prøver som ble ekskludert fra SDS-PAGE og Western blotting på grunn av for lav proteinkonsentrasjon i homogenatene. Siden alle de syv prøvene var fra referansestasjonen ble det derfor betydelig færre individer fra denne stasjonen med i de videre analysene. Med mer tid tilgjengelig, kunne disse prøvene blitt forsøkt konsentrert til høyere proteinkonsentrasjon, eller at nytt levervev fra disse individene hadde blitt opparbeidet på nytt. Dette gjaldt kun for WB analyse. Under måling av enzymaktiviteten ble alle prøvene fra alle stasjonene inkludert.

Proteiner fra Kollevåg-prøvene ble separert ved bruk av SDS-PAGE og farget med Coomassie Brilliant Blue (Figur 4.1). Her ser det ut som separasjonen av proteinene har vært vellykket, og både proteinmønsteret og mengden protein ser ut til å være tilsvarende lik i de ulike prøvene. Den estimerte proteinmengden basert på Pierce 660 ble derfor brukt videre under utregning av proteinmengder for andre assays.

## 5.2 Deteksjon og kvantifisering av biomarkører ved hjelp av Western blotting

For å undersøke om ulike biomarkører involvert i prosesser som detoksifisering, stress-responser og antioksidantmekanismer kunne detekteres og kvantifiseres i Kollevåg-prøvene, ble det gjort Western blotting med spesifikke antistoff for henholdsvis Gst, Cat, Hsp70 og Cyp1a. Det har blitt gjort liknende undersøkelser av biomarkører i blant annet; flyndre (*Platichthys flesus*), ålekvabber (*Zoarces viviparus*) og abbor (*Perca fluviatilis*) med blant annet acetylkolinesterase (AChE) og metallotionein (cystein-rike proteiner) i Østersjøen (Barsiene et al., 2006; Vuorinen et al., 2006), og gullfisk (*Carassius auratus*) i innsjøen Tai Hu der biomarkørene CYP1A, Gst, superoksid dismutase (Sod) og acetylkolinesterase (AChE) ble undersøkt (Lu et al., 2011).

Alle de undersøkte proteinene blir uttrykt i de ulike Kollevåg-prøvene, utenom Cyp1a som kun ble detektert i positiv kontroll. Som nevnt har både tidligere og nylige undersøkelser av sediment i Kollevåg vist at miljøgifter som PAHer, dioksiner og PCB-like dioksiner er tilstede, da spesielt i stasjon 2 (tilsvarende område ”kolle 1”, Tabell 1.1B) (Bjørnen & Hafner, 2014). Siden disse stoffene er kjent for å være agonister for arylhydrokarbon resptoren (AhR) som regulerer uttrykkningen av Cyp1a (Billiard et al., 2006) var det derfor en forventning om at dette proteinet ville bli detektert ved bruk av Western blotting. Det er her viktig å påpeke at ikke alle PAHer er sterke agonister for AhR, men hovedsakelig PAHer som har en struktur bestående 4 eller flere aromatiske ringer (Barron et al., 2004; Denison & Nagy, 2003). En viktig observasjon med dette studie er at det har blitt funnet høye verdier av PAHene fenantren og pyren ved Kollevåg stasjonen 1 og 2 i forhold til referansestasjonen (Appendix (Figur A3)). Fenantren består av tre aromatiske ringer, og eksponeringsstudier av blant annet killifisk for fenantren har vist at EROD-aktiviteten ikke blir påvirket, som betyr at produksjonen av Cyp1a ikke er induert (Brown et al., 2016). Dette er også i samsvar med in vitro ligandaktiverings analyser gjort med AhR2 fra torsk, som viste ingen aktivering av reseptoren av fenantren (Madsen, 2016). Det er allikevel interessant er det påvises forhøyede nivåer av PAH metabolitter i galleprøver fra Kollevåg (hydroksy-pyren, hydroksy-fenantren og hydroksy-benso(a)pyren), noe som indikerer tilstedeværelse av enzymer med hydroxylase-aktivitet, som Cyp1a, i lever. En mulig forklaring på dette kan være at andre Cyp enzymer, som for eksempel Cyp3a kan være ansvarlig for denne aktiviteten. I motsetning til Cyp1a, antas Cyp3a å være hovedformen av Cyp som er konstitutivt uttrykt i lever i både fisk og mammalske arter, inkludert torsk (Di Giulio & Hinton, 2008).

Man kan imidlertid ikke utelukke at mengden Cyp1a i leverhomogenatene fra Kollevåg er under deteksjonsgrensen for westernblotanalysen. Det var derfor et ønske om å forsøke å benytte EROD-assayet som er en alternativ og mer sensitiv målemetode for å påvise og kvantifisere enzymaktiviteten til Cyp1a. EROD er et assay der substratet etoxyresorufin konverteres til det fluoriserende produktet resorufin ved hjelp av etoxyresorufin-O-deetylase (EROD) aktivitet som medieres av Cyp1a (Gagnon & Rawson, 2017). Denne metoden brukes rutinemessig til måling av Cyp1a induksjon som biomarkør i fisk (Whyte et al., 2000). Dessverre oppsto det problemer i gjennomføringen av EROD assayet da denne metoden ikke var etablert i laboratoriet og en egnet referanseprøve ikke var tilgjengelig. Siden dette ble forsøkt i slutten av masteroppgaven ble det på grunn av tidsbegrensninger vanskelig å gjennomføre.

Hsp70 er et stressprotein (chaperon) som naturlig finnes i celler og beskytter cellene fra stress i miljøet. Når det skjer uønskede miljøforandringer kan det skje en respons referert til som heat-shock eller stress-respons. Ved en slik respons vil det settes i gang en rask økning i syntesen av stressproteiner. Oksidativt stress ødelegger vanligvis proteiner ved å hindre korrekt folding av proteinene, det er derfor viktig med rask syntese av Hsp70 som har en oppgave å beskytte proteinene ved å hindre denaturering og aggregering (Yamashita et al., 2010). For Kollevåg-prøvene ble det observert uttrykkning av Hsp70 i alle prøvene (Figur 4.2A), og Western blotting ble benyttet for å kvantifisere og undersøke forskjellene mellom de ulike stasjonene (Hori et al., 2010). Det var ingen statistisk signifikant forskjell i mengden Hsp70 mellom stasjonene i Kollevåg og referansestasjonen, men det ble observert en trend der alle Kollevågen-stasjonene (1-3) har lavere proteinmengde av Hsp70 sammenlignet med referansestasjonen (Figur 4.3). Dersom prøvene i stasjon 1-3 har blitt påvirket av miljøgifter (stressfaktorer) vil det være nærliggende å tro at den relative proteinmengden ville vært høyere for de påvirkede stasjonene. Siden resultatene viser tilsynelatende lavere verdier enn referansestasjonen, kan det likevel ikke konkluderes med at fisken i Kollevåg ikke har blitt påvirket av miljøgifter. Det har tidligere blitt vist at blant annet metaller (Cu og Hg) kan inhibere syntesen av Hsp70 (Nadeau et al., 2001). Det har blitt målt høye konsentrasjoner av spesielt Cu, Hg og Pb ved flere av målestasjonene i Kollevåg (Bjørnen & Hafner, 2014). En studie gjort på Hsp70 i asiatisk musling (*Potamocorbula amurensis*) indikerer også at nedregulering kan være et tegn på stress-respons. I denne studien ble muslinger fra to lokasjoner i nærheten av hverandre sammenlignet, og for den ene stasjonen ble det observert

nedregulering av Hsp70, mens det i den andre stasjonen ble det observert en oppregulering. Denne forskjellen i Hsp70 uttrykning ble tilskrevet tilstedeværelsen av tungmetaller, som indikerer at de høye konsentrasjonene av tungmetaller i sedimentene i Kollevåg kan ha påvirket uttrykkningen av Hsp70. Det eksisterer også andre arbeid som viser til at en nedregulering av Hsp70 kan være en indikator for tilstedeværelse av stress/miljøgifter (David & Hinton, 1999).

Gst og Cat er to enzymer som begge er involvert i den cellulære beskyttelsen mot oksidativt stress og som også er vanlige biomarkører benyttet i studier som involverer miljøgifter (Batista et al., 2014; Dautremepuits et al., 2003; Leaver et al., 1997). Både Cat og Gst ble detektert ved Western blotting (hhv Figur 4.2B og 4.2E), og begge proteinene ble uttrykt i alle Kollevåg-prøvene, også i referansestasjonen. Ulike studier har knyttet økte mengder av Cat og Gst oppimot en økning i oksidativt stress skapt av ytre faktorer (Georgieva, 2005; Giacomoni et al., 2000; Kumar et al., 2016). For å undersøke om det fantes stasjonsforskjeller i uttrykkningen av disse proteinene, ble det utført kvantifisering av båndene fra blottet. Siden Cat ble uttrykt med et dobbeltbånd (Figur 4.2B), kompliserte dette kvantifiseringen, og Cat ble derfor utelatt i den videre westernblotanalysen. For å undersøke påvirkning på katalase ble det i stedet gjort enzymaktivitetsassay. Ingen statistisk signifikante forskjeller mellom Kollevåg stasjonene og referansestasjonen ble observert for tilstedeværelsen av Gst i westernblotanalysene. Det var heller ikke observert noen tydelig trend mellom de ulike stasjonene.

## **5.4 Enzymaktivitet ved bruk av kit**

Siden Gst og Cat ble detektert med Western blotting, ble det bestemt å måle enzymaktiviteten til de to proteinene i leverhomogenatene. Enzymaktivitetsassay er ofte en mer sensitiv måling sammenlignet med deteksjon av de tilsvarende proteinene med Western blotting.

For Gst var det signifikante forskjeller i enzymaktivitet mellom stasjon 1 og 2 i forhold til referansestasjonen. For stasjon 1-3 var også enzymaktiviteten tilnærmet lik for alle stasjonene. En nedregulering i forhold til referansestasjonen kan forklares ved miljøgifter som inhiberer enzymaktiviteten. Nedregulering har blitt dokumentert i flere ulike økotoksikologiske studier. Blant annet har det blitt vist en signifikant reduksjon i Gst i forhold til referansestasjonen i

både gjeller og lever til afrikansk ålemalle (*Clarias gariepinus*) ved eksponering av benso(a)pyren, benzen, toluen og xylen. Dette indikerte at noen av konjugeringsproduktet katalysert av Gst muligens hemmer aktiviteten eller syntesen av proteinet. Produkter med oksidative egenskaper kan derfor redusere Gst sin konjugasjons aktivitet (Otitoloju & Olagoke, 2011). Lignende resultater er funnet i nilmunnruget (*Oreochromis niloticus*). I dette studiet ble det antatt at nedreguleringen av Gst aktivitet var relatert til senkede nivåer av glutatation (Gsh) tilgjengelig for konjugering av Gst (Carvalho Cdos et al., 2012). Det hadde derfor vært interessant og korrelert våre resultater angående redusert Gst aktivitet i Kollevåg prøvene med fritt Gsh tilgjengelig i leverhomogenatene.

Katalase er et enzym med antioksiderende effekt, der nedbryting av hydrogenperoksid er en av de endogene hovedoppgavene. Enzymet beskytter i tillegg organismen mot frie radikaler (Aebi, 1984). Det har blitt gjort flere undersøkelser på katalase i fisk der det har blitt påvist at enzymet spiller en stor rolle på håndtering av oksidativ stress i organismen. Naturlige eller menneskeskapt endringer i miljøet kan føre til oksidativt stress som resulterer i ubalanse i cellen ved å øke produksjon av frie radikaler (Batista et al., 2014).

For Cat viste resultatene av enzymaktiviteten lignende resultater som for Gst. Her var det også en nedregulering av enzymaktivitet. I figuren er det også signifikante forskjeller mellom stasjon 1 og 2, i forhold til referansestasjonen. Cat spiller en viktig rolle mot beskyttelse av oksidativt stress. Faktorer som temperaturendring, saltnivåendringer, frie radikaler og toksiske stoffer som kan gi oksidativt stress vil derfor muligens påvirke begge enzymene (Nahrgang et al., 2013). Her kan også nedregulering av enzymaktivitet forklares ved inhibering av enzymaktivitet forårsaket av miljøgifter.

Dette er imidlertid ikke den eneste forklaringen på nedregulering. Annen forskning viser til redusert enzymaktivitet i blant annet katalase, heat shock 70, superoksid dismutase og glutatation peroksidase ved eksponering av eprinomecin (Alak et al., 2017). En årsak for observert nedregulering i Cat enzymaktivitet blir i artikkelen assosiert med økt DNA skade, i tillegg til en økt konsentrasjon frie radikaler fra fremmedstoffer (Alak et al., 2017). Resultatet av forskningen viser derfor at ikke alle xenobiotiske stoffer er oppregulerende på enzymaktiviteten. Siden det i Kollevåg er registrert høye konsentrasjoner av mange ulike stoffer, så kan dette være en av årsakene til nedregulerende enzymaktivitet for begge enzymene som ble målt.

## 5.5 Korrelasjonsanalyse for Gst genuttrykning, enzymaktivitet og relativ proteinmengde

Korrelasjonsanalyse som ble gjort for Gst mRNA-uttrykking mot Gst enzymaktivitet (A), og Gst WB-kvantifisering mot Gst enzymaktivitet (B) i individprøver viser liten korrelasjon for begge analysene (Figur 4.7). For Gst enzymaktivitet og WB (B) har det tidligere (Figur 4.4 og 4.5) blitt målt gjennomsnitt av alle individene innad i en stasjon. For korrelasjonsanalysen blir data for hvert enkelt individ satt opp mot hverandre. Stor biologisk varians mellom individ er derfor en god forklaring på liten korrelasjon. Hadde korrelasjonsanalysen tatt for seg gjennomsnittet mellom stasjonene ville individforskjellene maskeres, og korrelasjonen ville blitt større. For Gst mRNA-uttrykking og Gst enzymaktivitet, observeres også stor varians mellom individene. Her er korrelasjonskoeffisienten noe høyere, men likevel langt ifra 1. Lignende resultater har også forekommet i andre studier. En studie som undersøker korrelasjonen mellom aktiviteten av Cyp1a i leveren til karpe (*Cyprinus carpio*) og antioksidierende enzymer, viser at uttrykkingen til genene og aktiviteten til deres respektive enzymer ikke har noe signifikant korrelasjon. Den manglende korrelasjonen forklares ved at ulike transkripsjonshemmere har blitt påvirket under eksponering (Karaca et al., 2014). Genuttrykk og katalytiske aktiviteter måles ofte som alternative biomarkører ved overvåking av biologiske effekter. Her er motstridende resultater mellom biokjemiske og molekylære responser relativt vanlige, som også er observert i denne oppgaven. Koblingene mellom effekter på intracellulære nivåer, kan maskeres av ikke-genomiske prosesser som påvirker mRNA stabilitet og proteinomsetning. Dette gjelder spesielt for kjemiske blandinger. Manglende korrelasjon for både mRNA og protein er derfor ikke uvanlig, og forklares med å oppstå av samme årsak (Regoli & Giuliani, 2014).

## 6 Konklusjon

I denne oppgaven har påvirkninger det tildekkede avfallsdeponiet i Kollevåg kan ha på organismer som befinner seg i området blitt studert. Dette ble gjort ved å studere endringer i biomarkører som kan påvirkes av en rekke ulike miljøgifter og ytre stressfaktorer. Det ble vist signifikant nedgang for enzymaktiviteten i torskelever etter et burforsøk for både Gst og Cat for stasjon 1 og 2 i forhold til referansestasjon. Nedregulering kan være et tegn på miljøgifter som inhiberer enzymaktiviteten på disse stasjonene. Flere studier bekrefter lignende situasjoner, som styrker konklusjonen om at fisken plassert ved Kollevåg har vært påvirket av miljøgifter.

Tidligere kjemiske analyser av bunnsediment (2014) indikerer høye verdier av PCB-7 (7 ulike) (Tabell 1.1B) i området for det som i vårt tilfelle er stasjon 2. Den kjemiske analysen viser derimot lave verdier av PCB-7 for området som i dette prosjektet var stasjon 1. Disse analysene viker fra målte verdier av PCB i Kollevågtorskens lever (Appendix (Figur A4)). Dette kan indikere en endring av PCB-eksponering over tid, eller store lokale forskjeller i kilde til forurensing mellom små avstander (hot spots).

Det ble også undersøkt uttrykning av Cat, Gst, Hsp70 og Cyp1a ved Western blotting, der alle proteinene unntatt Cyp1a ble funnet uttrykt i prøvene. Den manglende uttrykningen til Cyp1a kan forklares ved at andre Cyp enzymer er ansvarlig dannelsen av PAH metabolittene målt i galleprøver fra Kollevåg forsøket.

Sammenholdt med endringene i kondisjonsfaktor og leversomatisk indeks, samt påvisning av PAH metabolitter i galleprøver, støtter dataene fra denne oppgaven opp under en eksponering av torsk i burforsøket. Det er imidlertid foreløpig vanskelig peke direkte på hvilke miljøgift(er) som er ansvarlige for responsene som er beskrevet så langt.

## 6.1 Videre arbeid

Siden tidligere undersøkelser av sedimentene i Kollevåg indikerer høye verdier av blant annet PAH og PCB, som potensielt aktiverer Cyp1a, kunne det vært interessant å utføre EROD for å studere om dette enzymet er induisert, men i lave mengder (Whyte et al., 2000). Ut ifra Western blotting gjort i denne oppgaven ble det ikke detektert noen bånd for Cyp1a i noen av prøvene. EROD derimot er mer sensitiv for Cyp1a aktivitet, og kan derfor gi utslag for induksjon av enzymet. I tillegg til EROD har det blitt igangsatt RNA sekvensering for en fullstendig analyse av endret genekspressjon mellom stasjonene. Dette kan gi en dypere forståelse av hvilke cellulære og fysiologiske prosesser som kan ha blitt påvirket av miljøgiftene i Kollevåg. Ved bruk av for eksempel proteomikk, kan man samtidig utføre mer omfattende analyser av biomarkører, samt komplementere og verifisere data som kan komme frem fra RNA sekvenseringen.

Det vil være av stor interesse å følge opp med et tilsvarende feltforsøk etter at tildekking av Kollevåg er utført. En tildekking vil ikke på kort sikt gi store endringer i miljøgiftene som finnes i organismene der. Dette på grunn av de bioakkumulernde og biomagnifiserende egenskapene miljøgiftene har, men på lang sikt har en reduksjon av miljøgiftene mye å si. Siden Kollevåg er et friluftsområde er det også viktig at mengden miljøgifter blir redusert.

Et vesentlig spørsmål å stille i denne prosessen er derfor om en ny tildekking vil forhindre mulig miljøgift-utslipp på lang sikt, eller om det hadde lønnet seg å rehabilitere Kollevåg ved å fjerne alt avfall. Det har blitt gjort flere undersøkelser siden avfallsdeponiet opphørte, og i de fleste undersøkelser har det blitt påvist moderate til høye verdier av ulike miljøgifter. Om en ny tildekking vil forhindre dette er uvisst. En totalreovering vil være kostbart, men kan lønne seg i et lengre perspektiv.



## 7. Litteraturliste

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro *Isolation, purification, characterization, and assay of antioxygenic enzymes* (Vol. 105, pp. 121-126): *Methods in enzymology*.
- Alak, G., Yeltekin, A. C., Tas, I. H., Ucar, A., Parlak, V., Topal, A., . . . Atamanalp, M. (2017). Investigation of 8-OHdG, CYP1A, HSP70 and transcriptional analyses of antioxidant defence system in liver tissues of rainbow trout exposed to eprinomectin. *Fish Shellfish Immunol*, *65*, 136-144. doi: 10.1016/j.fsi.2017.04.004
- Allocati, N., Federici, L., Masulli, M., & Di Ilio, C. (2009). Glutathione transferases in bacteria. *The Febs Journal*, *276*, 58-75.
- Arinc, E., Yilmaz, D., & Bozcaarmutlu, A. (2015). Mechanism of inhibition of CYP1A1 and glutathione S-transferase activities in fish liver by quercetin, resveratrol, naringenin, hesperidin, and rutin. *Nutr Cancer*, *67*(1), 137-144. doi: 10.1080/01635581.2015.965335
- Barron, M. G., Heintz, R., & Rice, S. D. (2004). Relative potency of PAHs and heterocycles as aryl hydrocarbon receptor agonists in fish. *Mar Environ Res*, *58*(2-5), 95-100. doi: 10.1016/j.marenvres.2004.03.001
- Barsiene, J., Lehtonen, K. K., Koehler, A., Broeg, K., Vuorinen, P. J., Lang, T., . . . Kopecka, J. (2006). Biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus*) and mussel (*Mytilus edulis*) in the Klaipeda-Butinge area (Baltic Sea). *Mar Pollut Bull*, *53*(8-9), 422-436. doi: 10.1016/j.marpolbul.2006.03.009
- Batista, M. T. O., Rodrigues Jr, E., Feijó-Oliveira, M., Ribeiro, A. C., Rodrigues, E., Suda, C. N. K., & Vani, G. S. (2014). Tissue levels of the antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase in fish *Astyanax bimaculatus* from the Una River Basin. *Ambiente & Água*. doi: 10.4136/1980-993X
- 10.4136/ambi-agua.1473
- Berge, J. A., Hylland, K., Schlabach, M., & Ruus, A. (2011). Accumulation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and furans in Atlantic cod (*Gadus morhua*)--cage experiments in a Norwegian Fjord. *J Toxicol Environ Health A*, *74*(7-9), 455-465. doi: 10.1080/15287394.2011.550556
- 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*(2), 526-536. doi: 10.1093/toxsci/kfl011
- Bjørnen, L., & Hafner, F. (2014). Utarbeiding av tiltaksplan for Kollevågen nedlagte avfallsdeponi.
- Bratberg, M. (2012). *Effects of oil compounds and persistent organic pollutants (POPs) on phospholipid composition in liver and brain of Atlantic cod (Gadus morhua)*. (PhD), Bergen.
- Bratberg, M., Olsvik, P. A., Edvardsen, R. B., Brekken, H. K., Vadla, R., & Meier, S. (2013). Effects of oil pollution and persistent organic pollutants (POPs) on glycerophospholipids in liver and brain of male Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Chemosphere*, *90*(7), 2157-2171. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.11.026
- Brown, D. R., Clark, B. W., Garner, L. V., & Di Giulio, R. T. (2016). Embryonic cardiotoxicity of weak aryl hydrocarbon receptor agonists and CYP1A inhibitor fluoranthene in the Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, *188*, 45-51. doi: 10.1016/j.cbpc.2016.05.005
- Carvalho Cdos, S., Bernusso, V. A., de Araujo, H. S., Espindola, E. L., & Fernandes, M. N. (2012). Biomarker responses as indication of contaminant effects in *Oreochromis niloticus*. *Chemosphere*, *89*(1), 60-69. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.04.013
- Cayman chemical. (2017). Catalase Assay Kit.
- Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci*, *61*(2), 192-208. doi: 10.1007/s00018-003-3206-5

- Committee on Biological Markers of the National Research Council. (1987). Biological Markers in Environmental Health Research. *Environmental Health Perspectives*, 74.
- Dale, K., Karlsen, O. A., Yadetie, F., Eide, M., Goksøy, S. Ø., Aranguren, L., & Lille-Langøy, R. (2016). *Ecotoxicological responses in Atlantic cod (Gadus morhua) following caging near a previously capped waste disposal site in Kollevågen, Askøy, Norway (Poster)*.
- Dautremepuits, C., Betoulle, S., & Vernet, G. (2003). Stimulation of antioxidant enzymes levels in carp (*Cyprinus carpio* L.) infected by *Ptychobothrium* sp. (Cestoda). *Fish & Shellfish Immunology*, 15(5), 467-471. doi: 10.1016/s1050-4648(03)00007-x
- David, I. W., & Hinton, E. (1999). Field validation of hsp70 stress proteins as biomarkers in Asian clam (*Potamocorbula amurensis*): is downregulation an indicator of stress? *Biomarkers*, 4(6), 473-484. doi: 10.1080/135475099230633
- 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, 309-334. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.135828
- Di Giulio, R. T., & Hinton, D. E. (2008). *The Toxicology of Fishes*: CRC Press.
- Fahraeus-Van Ree, G. E., & Spurrell, D. R. (2003). Structure of and energy reserves in the liver of wild and cultured yellowtail flounder, *Limanda ferruginea*. *Marine biology*, 143(2), 257-265.
- Fiedler, H. (2002). Persistent Organic Pollutants. *Springer*, 30(The Handbook of Environmental Chemistry).
- Gaetani, G. F., Ferraris, A. M., Rolfo, M., Mangerini, R., Arena, S., & Kirkman, H. N. (1946). Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Highwire press American society of hematology*.
- Gagnon, M. M., & Rawson, C. A. (2017). Bioindicator species for EROD activity measurements: A review with Australian fish as a case study. *Ecological Indicators*, 73, 166-180. doi: 10.1016/j.ecolind.2016.09.015
- Georgieva, N. V. (2005). Oxidative stress as a factor of disrupted ecological oxidative balance in biological systems. *Bulgarian journal of veterinary medicine*, 8(1), 1-11.
- Giacomini, P. U., Declercq, L., Hellems, L., & Maes, D. (2000). Aging of human skin: review of a mechanistic model and first experimental data. *IUBMB Life*, 49(4), 259-263.
- Goksøy, A. (1994). Use of Cytochrome P450 1A (CYP1A) in Fish as a Biomarker of Aquatic Pollution. *Toxicology letters*, 74(1), 29-30.
- Grøsvik, B. E. (1996). *Biomarker protein expression in fish: a study of cellular responses to environmental pollutants*
- Haave M., H. K., Johansen P-O, . . (2015). Miljøundersøkelse Kollevågen 2014. *SAM e-Rapport*, 5, 60.
- Havforskningsinstituttet. (2016). Havforskningsrapporten 2016. Ressurser, miljø og akvakultur på kysten og i havet. In I. E. Bakketeig, M. Hauge, C. Kvamme, B. H. Sunnset & K. Ø. Toft (Eds.), (Vol. 1, pp. 188-191).
- Hayes, J. D., & Pulford, D. J. (2008). The Glutathione S-transferase supergene family: regulation of Gst and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance part II. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 30(6).
- Hayes, J. D., & Strange, R. C. (2000). Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology*, 61, 154-166.
- Hellum, B. Metabolisme av xenobiotika og toksiske leverskader. Retrieved 8. Juni
- Holley, A. K., & St. Clair, D. K. (2016). Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice. 13-14.
- Hori, T. S., Gamperl, A. K., Afonso, L. O., Johnson, S. C., Hubert, S., Kimball, J., . . . Rise, M. L. (2010). Heat-shock responsive genes identified and validated in Atlantic cod (*Gadus morhua*) liver, head kidney and skeletal muscle using genomic techniques. *BMC Genomics*, 11, 72.

- Johnson, L. L., Anulacion, B. F., Arkoosh, M. R., Burrows, D. G., da Silva, D. A. M., Dietrich, J. P., . . . Ylitalo, G. M. (2013). Effects of Legacy Persistent Organic Pollutants (POPs) in Fish—Current and Future Challenges. *Fish Physiology : Organic Chemical Toxicology of Fishes*, *33*, 53-140. doi: 10.1016/b978-0-12-398254-4.00002-9
- Julshamn, K., Duinker, A., Nilsen, B. M., Nedreaas, K., & Maage, A. (2013). A baseline study of metals in cod (*Gadus morhua*) from the North Sea and coastal Norwegian waters, with focus on mercury, arsenic, cadmium and lead. *Marine Pollution Bulletin*, *72*(1), 264-273. doi: 10.1016/j.marpolbul.2013.04.018
- Julshamn, K., Frantzen, S., & Valdernes, S. (2010). Fremmedstoffer i villfisk med vekt på uorganisk arsen, metylkvikksølv, bromerte flammehemmere og perfluorerte alkylstoffer. *Årsrapport mattilsynet, NIFES*.
- Kampinga, H. H., & Craig, E. A. (2010). The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nature reviews molecular cell biology*, *11*, 579-592.
- Karaca, M., Varisli, L., Korkmaz, K., Ozaydin, O., Percin, F., & Orhan, H. (2014). Organochlorine pesticides and antioxidant enzymes are inversely correlated with liver enzyme gene expression in *Cyprinus carpio*. *Toxicol Lett*, *230*(2), 198-207. doi: 10.1016/j.toxlet.2014.02.013
- Karlsen, Klingan, K., Emblem, A., Jorgensen, T. E., Jueterbock, A., Furmanek, T., . . . Moum, T. (2013). Genomic divergence between the migratory and stationary ecotypes of Atlantic cod. *Mol Ecol*, *22*(20), 5098-5111. doi: 10.1111/mec.12454
- 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. doi: 10.1016/j.aquatox.2011.08.018
- Klaassen, C. D., & Watkins III, J. B. (2010). *Essentials of toxicology* (2 ed.): Mc Graw Hill.
- Kumar, A. D., Bevara, G. B., Kaja, L. K., Badana, A. K., & Malla, R. R. (2016). Protective effect of 3-O-methyl quercetin and kaempferol from *Semecarpus anacardium* against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced cytotoxicity in lung and liver cells. *BMC Complement Altern Med*, *16*(1), 376. doi: 10.1186/s12906-016-1354-z
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, *227*, 680-685.
- Leaver, M. J., Wright, J., & George, S. G. (1997). Structure and expression of a cluster of glutathione S-transferase genes from a marine fish, the plaice (*Pleuronectes platessa*). *Biochem*, *321*, 405-412.
- Liang, X.-F., Li, G.-G., He, S., & Huang, Y. (2007). Transcriptional responses of alpha- and rho-class glutathione S-transferase genes in the liver of three freshwater fishes intraperitoneally injected with microcystin-LR: Relationship of inducible expression and tolerance. *Biochemical and molecular toxicology*, *21*(5), 289-298.
- Lone, S. (2015). Kollevågen avfallsdeponi, Askøy. 110.
- Lu, G. H., Qi, P. D., Qin, J., & Wang, C. (2011). Biomarker responses in fish exposed to sediments from northern Taihu Lake. *Bull Environ Contam Toxicol*, *87*(5), 499-505. doi: 10.1007/s00128-011-0398-5
- Luna S.M. & Torres A.G. *Gadus morhua* Linnaeus, 1758 Atlantic cod.
- Löf, M., Sundelin, B., Liewenborg, B., Bandh, C., Broeg, K., Schatz, S., & Gorokhova, E. (2016). Biomarker-enhanced assessment of reproductive disorders in *Monoporeia affinis* exposed to contaminated sediment in the Baltic Sea. *Ecological Indicators*, *63*, 187-195. doi: 10.1016/j.ecolind.2015.11.024
- Madsen, A. K. (2016). *Kloning, karakterisering og ligandaktivering av aryl hydrokarbonreseptor 2 (AHR2) fra atlantehavstorsk*. (Master ), Universitetet i Bergen.
- Malyshev, I. (2013). A General Description of HSPs, The Molecular Structure of HSP70 and The HSP70 Cycle. 6, 1-13. doi: 10.1007/978-94-007-5943-5\_1

- Mayer, M. P., & Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci*, 62(6), 670-684. doi: 10.1007/s00018-004-4464-6
- Murray, I. A., & Perdew, G. H. (2011). *Role of chaperone proteins in Ahr function*. .
- Nadeau, D., Corneau, S., Plante, I., Morrow, G., & Tanguay, R. M. (2001). Evaluation for Hsp70 as a Biomarker of Effect of Pollutants on the Earthworm *Lumbricus terrestris*. *Cell stress & chaperones*, 6(2), 153-163.
- Nahrgang, J., Brooks, S. J., Evenset, A., Camus, L., Jonsson, M., Smith, T. J., . . . Renaud, P. E. (2013). Seasonal variation in biomarkers in blue mussel (*Mytilus edulis*), Icelandic scallop (*Chlamys islandica*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*): implications for environmental monitoring in the Barents Sea. *Aquat Toxicol*, 127, 21-35. doi: 10.1016/j.aquatox.2012.01.009
- Ngamchuea, K., Batchelor-McAuley, C., & Compton, R. G. (2016). The Copper(II)-Catalyzed Oxidation of Glutathione. *Chemistry*, 22(44), 15937-15944. doi: 10.1002/chem.201603366
- Nilsen, B. M., Berg, K. & Goksøyr, A., . (1998). Induction of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish. A biomarker for environmental pollution. . *Methods in Molecular Biology™* 107, 423-438.
- Okay, O. S., Karacik, B., Başak, S., Henkelmann, B., Bernhöft, S., & Schramm, K.-W. (2009). PCB and PCDD/F in sediments and mussels of the Istanbul strait (Turkey). *Chemosphere*, 76(2), 159-166.
- Olsvik, P. A., Lie, K. K., Sturve, J., Hasselberg, L., & Andersen, O. K. (2009). Transcriptional effects of nonylphenol, bisphenol A and PBDE-47 in liver of juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Chemosphere*, 75(3), 360-367. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.12.039
- Otitolaju, A., & Olagoke, O. (2011). Lipid peroxidation and antioxidant defense enzymes in *Clarias gariepinus* as useful biomarkers for monitoring exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Monitoring and Assessment*, 182(1-4), 205-213. doi: 10.1007/s10661-010-1870-0
- Regoli, F., & Giuliani, M. E. (2014). Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Mar Environ Res*, 93, 106-117. doi: 10.1016/j.marenvres.2013.07.006
- Rogalandsforskning. (2001). Torsk fra Skagerrak kysten: biomarkør analyser.
- Rätz, H.-J., & Lloret, J. (2003). Variation in fish condition between Atlantic cod (*Gadus morhua*) stocks, the effect on their productivity and management implications. *Fisheries research*, 60(2), 369-380.
- Sagerup, K., Herzke, D., Harju, M., Evenset, A., Christensen, G. N., Routti, H., . . . Gabrielsen, G. W. (2010). *New brominated flame retardants in Arctic biota*. Statlig program for forurensningsovervåking.
- Schwarzenbach, R. P., Escher, B. I., Fenner, K., Hofstetter, T. B., Johnson, A., Gunten, & Wehrli, B. (2006). The Challenge of Micropollutants in Aquatic Systems. *Science*, 313(5790).
- Seibel, B. A., & Drazen, J. C. (2007). The rate of metabolism in marine animals: environmental constraints, ecological demands and energetic opportunities. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 362(1487), 2061-2078. doi: 10.1098/rstb.2007.2101
- Senter for Digital liv Norge. (2015). dCod 1.0. from <https://digitallifenorway.org/prosjekter/dcod-1-0>
- Shacoski, J. C. (2012). Heat Shock Proteins as Markers for Cellular Stress in Mammalian Sperm.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M., & Dowd, C. A. (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases:  
implications for classification of non-mammalian members  
of an ancient enzyme superfamily.
- Star, B., Nederbragt, A. J., Jentoft, S., Grimholt, U., Malmstrom, M., Gregers, T. F., . . . Jakobsen, K. S. (2011). The genome sequence of Atlantic cod reveals a unique immune system. *Nature*, 477(7363), 207-210. doi: 10.1038/nature10342
- Stegeman, J. J., & Hahn, M. E. (1994). *Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: Current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic*

- species. Aquatic toxicology: molecular, biochemical and cellular perspectives*: Lewis publishers.
- Stockholm Convention Secretariat United Nations Environment. (2017). The 16 new POP's.
- Sundt, R. C., Ruus, A., Jonsson, H., Skarphéðinsdóttir, H., Meier, S., Grung, M., . . . Pampanin, D. M. (2012). Biomarker responses in Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to produced water from a North Sea oil field: Laboratory and field assessments. *Marine Pollution Bulletin*, *64*, 144-152.
- Thermo Scientific. *Pierce™ 660nm Protein Assay*
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.
- Townsend, D. M., & Tew, K. D. (2017). The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance.
- Tremoen, S. (2009). Helsebaserte tilstandsklasser for forurenset grunn
- Tremoen, S., & forurensningstilsyn, S. (2009). Helsebaserte tilstandsklasser for forurenset grunn. *TA*, 2553.
- Tyler, A. V., & Dunn, R. S. (1976). Ration, growth, and measures of somatic and organ condition in relation to meal frequency in winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, with hypotheses regarding population homeostasis. *Journal of the fisheries board of Canada*, *33*(1), 63-75.
- Uno, T., Ishizuka, M., & Itakura, T. (2012). Cytochrome P450 (CYP) in fish. *Environ Toxicol Pharmacol*, *34*(1), 1-13. doi: 10.1016/j.etap.2012.02.004
- van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. E. (2002). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *13*, 57-149.
- Vang, S. (2015). *Miljøgifter og helse- og miljøfarlige kjemikalier*. Retrieved from <https://www.regjeringen.no/no/tema/klima-og-miljo/forurensning/innsiktsartikler-forurensning/miljogifter-og-helse--og-miljofarlige-kjemikalier/id2394217/>.
- Vassenden, G. (2009). Marinbiologiske undersøkelser i Kollevågen i 2006-2016. *SAM e-Rapport*, *16*.
- Vuorinen, P. J., Keinänen, M., Vuontisjärvi, H., Barsiene, J., Broeg, K., Forlin, L., . . . Schiedek, D. (2006). Use of biliary PAH metabolites as a biomarker of pollution in fish from the Baltic Sea. *Mar Pollut Bull*, *53*(8-9), 479-487. doi: 10.1016/j.marpolbul.2005.11.020
- Walker, C. H., Sibly, R. M., Hopkin, S. P., & Peakall, D. B. (2012). *Principles of Ecotoxicology* (4. ed.): CRC Press
- Warner, N. A., Nøst, T. H., Andrade, H., & Christensen, G. (2014). Allometric relationships to liver tissue concentrations of cyclic volatile methyl siloxanes in Atlantic cod. *Environmental Pollution*, *190*, 109-114. doi: 10.1016/j.envpol.2014.03.031
- Wdzięczak, J., Zaleśna, G., Wujec, E., & Pérès, G. (1982). Comparative studies on superoxide dismutase, catalase and peroxidase levels in erythrocytes and livers of different freshwater and marine fish species. *Comparative biochemistry and physiology*, *73*(2), 361-365.
- Whyte, J. J., Jung, R. E., Schmitt, C. J., & Tillitt, D. E. (2000). Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Critical reviews in toxicology*, *30*(4), 347-570.
- Witas, H., Gabryelak, T., & Matkovics, B. (1984). Comparative studies on superoxide dismutase and catalase activities in livers of fish and other antarctic vertebrates. *Comparative biochemistry and physiology*, *77*(2), 409-411.
- Yamashita, M., Yabu, T., & Ojima, N. (2010). Stress Protein HSP70 in Fish. *Aqua-BioScience Monographs*, *3*(4), 111-141. doi: 10.5047/absm.2010.00304.0111
- Young, J. C. (2010). Mechanisms of the Hsp70 chaperone system. *Biochem Cell Biol*, *88*(2), 291-300. doi: 10.1139/o09-175

# Appendix

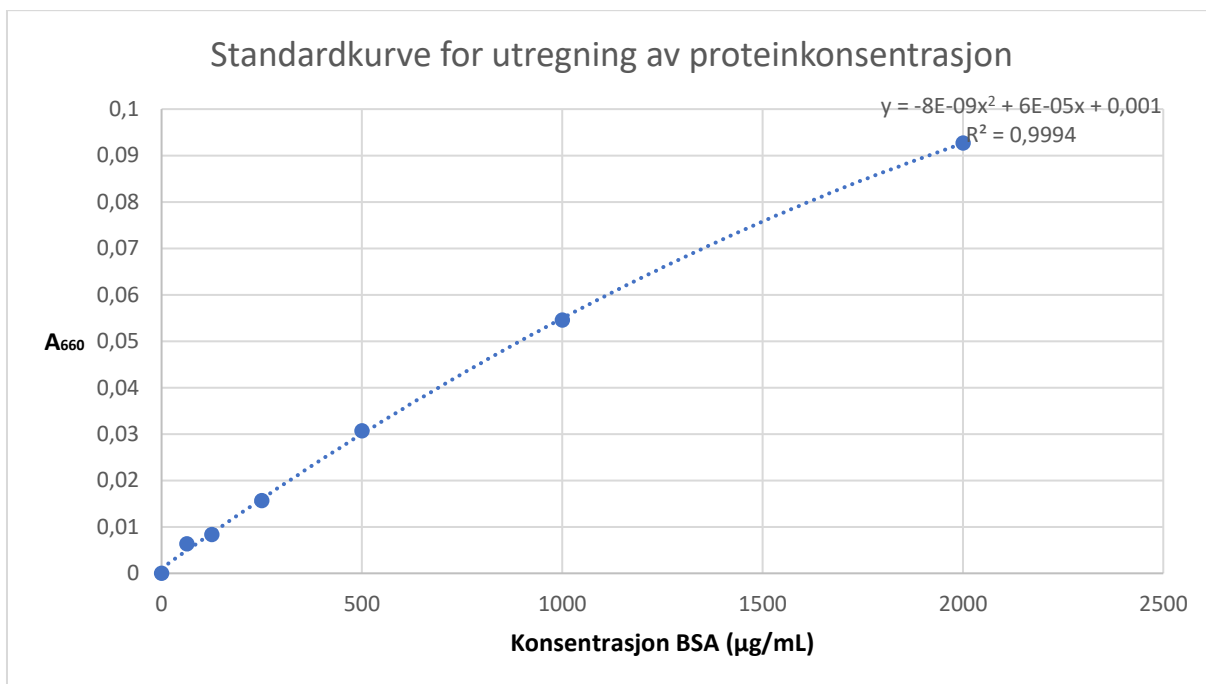
Figur A1: Målt proteinkonsentrasjon fra Kollevåg-stasjoner (1-3) og referansestasjon (4).

Fisk nr	Stasjon	Protein mg/mL
1	1	8,4
2	1	21,8
3	1	19,6
4	1	6,7
5	1	22,7
6	1	9,0
7	1	12,2
8	1	11,7
9	1	33,9
10	1	11,8
11	1	11,2
12	1	4,4
13	1	6,2
14	1	4,1
15	1	5,6
16	1	5,3
17	1	13,3
18	1	10,9
19	1	8,0
20	1	5,8
21	1	11,4
23	2	7,9
24	2	7,7
25	2	11,8
26	2	8,2
27	2	3,0
28	2	12,0
29	2	9,5
30	2	8,8
31	2	9,5
32	2	8,5
33	2	13,5
34	2	6,4
35	2	9,9
36	2	5,5
37	2	6,2
38	2	10,4
39	2	13,8
40	2	6,9
41	2	9,2
42	2	3,0
43	2	5,5
44	2	3,9
45	3	0,7
46	3	9,5
47	3	12,3
48	3	4,4

49	3	5,1
50	3	1,5
51	3	7,4
52	3	4,2
53	3	4,2
54	3	5,8
55	3	1,9
56	3	6,6
57	3	7,8
58	3	12,7
59	3	4,0
60	3	6,2
62	3	6,0
67	4	4,7
68	4	3,2
69	4	6,7
70	4	6,0
71	4	4,9
72	4	4,9
73	4	10,0
74	4	5,8
75	4	2,8
76	4	2,0
77	4	1,8
78	4	1,3
79	4	1,1
80	4	7,5
81	4	1,9
82	4	4,2
83	4	2,8
84	4	5,6
85	4	4,5
86	4	3,1
87	4	7,0
88	4	2,2
89	4	0,7


---

**Figur A2: Standardkurve for utregning av proteinkonsentrasjon, utført ved hjelp av polynom regresjon.**





**Figur A3: Poster, Ecotoxicological responses in Atlantic cod (*Gadus morhua*) following caging near a previously capped waste disposal site in Kollevågen, Askøy, Norway.** Dale, K., Karlsen, O. A., Yadetie, F., Eide, M., Goksøyr, S. Ø., Aranguren, L., & Lille-Langøy, R. (2016).




**CENTRE FOR DIGITAL LIFE NORWAY**

## Ecotoxicological responses in Atlantic cod (*Gadus morhua*) following caging near a previously capped waste disposal site in Kollevågen, Askøy, Norway

Karina Dale<sup>1</sup>, Odd André Karlsen<sup>1</sup>, Fekadu Yadetie<sup>1</sup>, Marta Eide<sup>1</sup>, Siri Øfsthus Goksøyr<sup>1</sup>, Libe Aranguren<sup>1</sup>, Roger Lille-Langøy<sup>1</sup>, Jan Ludvig Lyche<sup>1</sup>, Mette Bjørge Müller<sup>2</sup>, Ketil Hylland<sup>3</sup>, Zhanna Tairova<sup>3</sup>, Merete Grung<sup>4,5</sup> & Anders Goksøyr<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, University of Bergen, Bergen, Norway.  
<sup>2</sup>Department of Food Safety and Infection Biology, Norwegian University of Life Sciences, Oslo, Norway  
<sup>3</sup>Department of Biosciences, University of Oslo, Oslo, Norway  
<sup>4</sup>Norwegian Institute for Water Research, Oslo, Norway  
[Karina.Dale@uib.no](mailto:Karina.Dale@uib.no)



**dCod 1.0**  
decoding the systems toxicology of atlantic cod

---

### Introduction

Kollevågen, a bay situated in Askøy outside of Bergen, was utilized as a waste disposal from 1930 to 1975. After terminating the disposal, the garbage was capped by sand and stone and a recreational area was opened in 1983. However, in 2005, sediment pollution was discovered in the Kollevågen area due to disturbance of the capping. Actions to repair the capping are being prepared.

Atlantic cod (*Gadus morhua*) is commonly used as an indicator species in marine environmental monitoring programs, including the water column monitoring of offshore petroleum activities in Norwegian waters (5) and has been used in toxicological studies for decades (1,2,6,7).

As part of the dCod 1.0 project, we wanted to investigate the environmental effects of the pollution on Atlantic cod prior to and after improvements performed in Kollevågen. We aimed to study if environmental pollutants such as PCBs, PAHs, EDCs and other compounds would be present and if so, could affect the fish in any way, by performing a caging study.

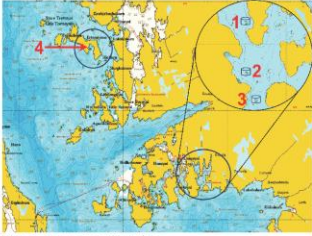


Figure 1 – Cage locations in Kollevågen.

### Methods

#### Caging and sampling of fish

Prior to the experiment, the fish were kept at the aquaria facilities of UIB (BIO/LAB) under flow-through seawater with control of temperature, salinity and light. In the study, groups of 22 farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*) were caged at different locations in Kollevågen and at reference stations (4 stations in total) for six weeks before sampling. The length and the weight of the fish were measured and in total, more than 1000 samples were collected from 82 fish. Condition factor and liver somatic index (LSI) were calculated based on the length/weight and the liver weight/total body weight relationship, respectively.

#### Biochemical analyses

To investigate the presence of endocrine disrupting compounds (EDCs), vitellogenin concentrations were analyzed in mucus and blood plasma using a VTG-specific ELISA method (4). High-performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC/F) was utilized to analyze amounts of the hydroxy-PAH metabolites of phenanthrene, pyrene and benzo[a]pyrene (BaP) in bile (3).




Figure 2 – Collecting fish cages. Photo: Tor Havn, Bergen Tidende.


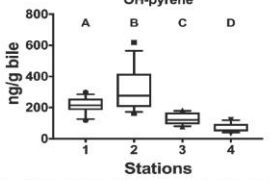


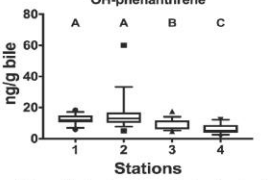
Figure 3 – Sampling fish in Kollevågen. Photo: Anders Goksøyr.

---

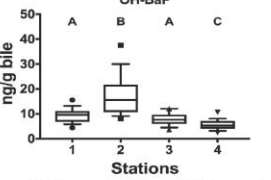
### Results



**OH-pyrene**

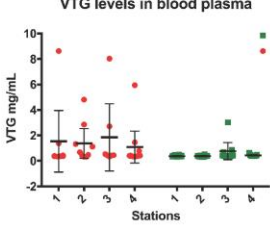


**OH-phenanthrene**

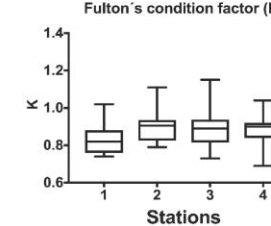


**OH-BaP**

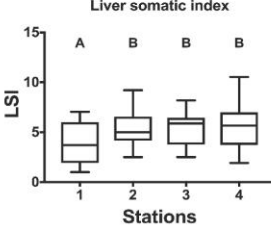
Figure 4 – PAH metabolites in bile. The amounts of the PAH metabolites: hydroxypyrene (OH-pyrene), hydroxyphenanthrene (OH-phenanthrene) and hydroxybenzo-a-pyrene (OH-BaP) were analyzed in bile using HPLC and are presented as ng compound per g bile for the different stations (1-4) of the Kollevågen study. Results are shown as mean  $\pm$  10-90 percentile. Differences between the groups were analyzed using one-way ANOVA, followed by the Holm-Sidak method. n=17,18,17,19 (station 1,2,3,4) and letters (A-D) indicate significant differences in means between stations.



**VTG levels in blood plasma**



**Fulton's condition factor (K)**



**Liver somatic index**

Figure 5 – VTG concentrations in blood plasma of Kollevågen fish. Results are shown as mean  $\pm$  95% CI. VTG concentrations are displayed in mg/mL and the fish are divided into their respective stations in the field experiment (1-4). n=8,9,7,10 for females and n=12,12,9,11 for males (stations 1,2,3,4). No statistical differences were observed between the gender or stations.

Figure 6 – Condition factor and liver somatic index of Kollevågen fish. The figure shows the mean, the minimum and the maximum values (bars) of Fulton's condition factor (K) and liver somatic index (LSI) for fish in the different stations (1-4) of the Kollevågen study. Differences between stations were analyzed using one-way ANOVA, followed by the Holm-Sidak method. n=20,22,16,23 (station 1,2,3,4) and letters (A-B) indicate significant differences in means between stations.

### Summary

- A significant decrease in LSI was observed for Atlantic cod caged at station 1, the innermost station in Kollevågen, compared to the other stations, suggesting that fish at this station have been exposed to environmental stress to a higher degree compared to the other stations.
- No significant differences were found regarding vitellogenin concentrations in blood plasma. As male fish did not have elevated levels of VTG, it is likely that the presence/impact of EDCs are minimal.
- Levels of PAH metabolites were significantly different in bile of fish caged at different stations, with bile of fish from station 2 showing the highest levels.
- The levels of PAH metabolites were measurable in all fish, and the levels of all of three metabolites were higher at stations 1-3 compared to the control station.


### Future work

Samples will be further analyzed for chemical contaminants (liver, muscle, sediment), EROD/CYP1A activity (liver), qPCR of biomarker genes (liver, gonads), RNA seq (liver), metabolomics (liver), and proteomics (liver).

#### References


- Goksøyr, A. (1985). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 840(3), 409–417. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(85\)90222-3](https://doi.org/10.1016/0304-4165(85)90222-3)
- Goksøyr, A., Solbakken, J. E., & Klungsoyr, J. (1986). *Chemo-Biological*
- Kammann et al. (2013). *Journal of aoc International* Vol. 96, no. 3, 635
- Scott, AP, Kristiansen SI, Katsiadaki I, Thain J, Tollefsen KE, Goksøyr A, Barry J (2006). In: Hylland K, Lang T, Vethaak D (eds). *Biological effects of contaminants in marine pelagic ecosystems*. SETAC Press, Pensacola, FL, pp329-340.
- Sundt, R. C., Ruus, A., Jonsson, H., Skarphéðinsdóttir, H., Meier, S., Grung, M., ... Pamparin, D. M. (2012). *Marine Pollution Bulletin*, 64(1), 144–152. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.10.005>
- Tollefsen, K. E., Sundt, R. C., Beyer, J., Meier, S., & Hylland, K. (2011). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 74(7–9), 529–542. <https://doi.org/10.1080/15376359.2011.595652>
- Yadetie, F., Karlsen, O. A., Eide, M., Hogstrand, C., & Goksøyr, A. (2014). *BMC Genomics*, 15(1), 481. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-481>

---



#### Acknowledgements

The Kollevågen study is part of dCod 1.0 (Project no. 248840), a large project initiated through Center of Digital Life Norway (DLN), a national center for biotechnology research and innovation financed by the Research Council of Norway (NFR). The field work in Kollevågen was also financed by Bergen Kommune.



**Figur A4: PCB-målinger gjort fra lever i Kollevåg (7 ulike stoff). Regresjonsanalyser (\*) viser at stasjon 1 er signifikant forskjellig ( $p < 0,05$ ) fra referansestasjon. (Dale, K. (2017))**

