

Aktivering av aryl hydrokarbonreseptor (Ahr)-
signalveien og lokalisering av *ahr* genuttrykning i
tidlige livsstadier til Atlanterhavstorsk (*Gadus morhua*)
etter eksponering for råolje



Institutt for biovitenskap

Masteroppgave i miljøtoksikologi

September, 2019

Lars Eirik Myklatun

Innhold

Forord	4
Sammendrag	5
Forkortelsesliste	6
1. Bakgrunn	8
1.1 Fisk og olje i Lofoten, Vesterålen og Senja	8
1.2 Torsk, leveområde og livsfase.....	9
1.2.1 Torsk i miljøovervåkning	10
1.3 Olje og dens egenskaper	11
1.3.1 Potensiell interaksjon mellom olje og egg av NØA torsk	12
1.3.2 Polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH)	13
1.4 Aryl hydrokarbon reseptor (AHR)	15
1.5 Biomarkører	18
1.5.1 Cytokrom P450 1A	18
1.6 Mål	19
2. Materialer	21
2.1 Kjemikalier.....	21
2.2 Løsninger	22
2.3 Diverse kit og enzymer	22
2.4 Plasmid	23
2.5 Instrument	23
2.6 Programvare.....	23
3. Metoder	24
3.1 Dyrehold	24
3.2 Råolje- og UV-eksponering	24
3.2.1 Karakterisering av eksponeringsmediet	26
3.3 Helkropp <i>in situ</i> hybridisering (ISH)	26
3.3.1 Polymerasekjedereaksjon (PCR) av probetemplat	27
<i>gmahr1a</i>	29
<i>gmahr2a</i>	29
<i>cyp1a</i>	29
3.3.2 Rensing av PCR-produkt fra agarosegel	29
3.3.3 Probesyntese	29
3.3.4 Forhåndsbehandling av egg og larve.....	31

3.3.5 Hybridisering	32
3.3.6 Immunohistokjemisk deteksjon	33
3.3.7 Billedtagning og behandling	35
3.4 Kvantitativ sanntids-PCR (qPCR).....	35
3.4.1 RNA isolering	35
3.4.2 cDNA Syntese	37
3.4.3 Kvantitativ-PCR (qPCR)	37
3.5 Deformitetsanalyse av larver 3 dph	39
3.6 RNA-sekvensering av torskeegg 4,5 dpf	40
3.6.1 Nettverksanalyse av differensielt uttrykkede gener	40
4. Resultat.....	41
4.1 Karakterisering av eksponeringsmediet	41
4.2 Dødelighet etter 72 timer eksponering	42
4.3 Kvantitativ endring i genuttrykk	43
4.3.1 Endring i genuttrykk.....	44
4.4 Lokalisering av genuttrykk med helkropp ISH.....	49
4.4.1 RNA probesyntese	49
4.4.2 Visualisering av genuttrykk av <i>gmahr1a</i> , <i>gmahr2a</i> og <i>cyp1a</i> i embryo og larve	49
<i>cyp1a</i>	50
<i>gmahr2a</i>	53
<i>gmahr1a</i>	56
4.5 Deformitetsanalyse av larver 3 dph.....	58
4.6 Nettverksanalyse av differensielt uttrykkede gener i råoljeeksponerte torskeembryo 4,5 dpf	60
5. Diskusjon.....	62
5.1 Biomarkøren <i>cyp1a</i> ble tidlig og sterkt induert i torskeegg eksponert for lave råoljekonsentrasjoner	62
5.2 UV-belyst råolje gav forhøyet <i>cyp1a</i> -induksjon i eksponerte torskeegg	64
5.3 <i>Cyp1a</i> -oppregulering visualisert med helkropp ISH	65
5.4 <i>Ahr</i> har et isoformspesifikt vevsuttrykk i tidlige livsstadier til torsk.....	66
5.5 <i>Ahr2a</i> -uttrykk overlapper med <i>cyp1a</i> i torskeembryo og larve	68
5.6 Torskeembryo eksponert for lave råoljekonsentrasjoner med og uten UV-lys førte til deformiteter på larvestadiet (3 dph).....	70
5.7 Nettverksanalysen viste signifikant anrikelse av reaksjonsveier knyttet til muskelsammentrekning, hjertesvikt og AHR-aktivering	72
6. Oppsummering og Konklusjon	74
7. Videre arbeid	75
8. Appendiks.....	76

Forord

Arbeidet med denne masteroppgaven ble utført i forskningsgruppen miljøtoksikologi ved institutt for biovitenskap, Universitetet i Bergen. Denne oppgaven er en del av forskningsprosjektet 'dCod 1.0: decoding the systems toxicology of atlantic cod' (prosjektnummer 248840) og 'EGGTOX'-prosjektet (prosjektnummer 267820) som begge er finansiert av Norges forskningsråd.

Jeg vil gjerne takke veilederne mine Odd André Karlsen, Libe Abadia Aranguren, Elin Sørhus, Sonnich Meier og Anders Goksøyr som har vært til god hjelp. Spesielt vil jeg takke Odd André for tett oppfølging og for å være lett tilgjengelig for veiledning, i tillegg til Libe for utmerket hjelp og støtte på laboratoriet.

Jeg ønsker også å takke medstudentene på lesesalen og resten av de ansatte i miljøtoksikologigruppen som har bidratt til et hyggelig studentmiljø og flere gode minner det siste året. Aller sist en stor takk til Fanny som har støttet meg utenfor studiene, og gitt meg avbrekk i perioder med mye arbeid.

Bergen, september 2019

Lars Eirik Myklatun

Sammendrag

Egg og larver av nordøstarktisk (NØA) torsk kan bli truet av eksponering for oljesøl dersom planene om å starte oljeutvinning i dens gyteområder utenfor kysten til Lofoten, Vesterålen og Senja (LoVeSe) realiseres. Råolje inneholder polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH) som er kjent for å være toksiske for marine organismer, der den mest kjente virkemåten for toksisitet er igjennom ligand-aktivering av transkripsjonsfaktoren aryl hydrokarbonreseptor (AHR). I denne oppgaven ble aktiveringen av AHR-signalveien studert i tidlige livsstadier av torsk etter eksponering for råolje med og uten koeksponering med UV-bestråling. UV-bestrålingen simulerer sollyset om våren utenfor LoVeSe og kan innvirke på toksisiteten til råoljen. Uttrykningen av genene *cyp1a*, *gmahr1a* og *gmahr2a* ble målt kvantitativt med sanntids kvantitativ PCR (qPCR) fra ulike tidspunkter i eksponeringsperioden, og kvalitativt med helkropp *in situ* hybridisering (ISH) ved slutten- (4,5 dager etter befruktning (dpf)) samt ni dager etter eksponeringen ble avsluttet (3 dager etter klekking (dph)). Deformiteter som følge av eksponering ble målt i larver 3 dph. I tillegg ble det gjort analyse av endringer transkriptomet i form av RNA-sekvensering til torskeegg 4,5 dpf, etter 72 timers eksponering. Aktivering av AHR ble bekreftet ved at ekspresjonen av *cyp1a* økte med økende doser av råolje, og induksjonen av *cyp1a* ble opprettholdt i larver 3 dph. Koeksponering med UV-lys hadde en stimulerende effekt på oppreguleringen av *cyp1a*. Uttrykket av *gmahr1a* og *gmahr2a* hadde et isoformspesifikt vevsuttrykk, hvor *gmahr2a* var uttrykt i flest vev og viste en samlokalisering med uttrykket av *cyp1a*, mens *gmahr1a*-uttrykket var avgrenset til øyet i både embryo (4,5 dpf) og larve (3 dph), og overlappet ikke med *cyp1a* transkriptet. Funnene underbygger at en isoformspesifikk funksjon av Ahr-subtypene har evolvert i torsk, hvor *gmahr2a* tilsynelatende har en rolle som en xenobiotisk sensor og regulator av fremmedstoffrespons, og at *gmahr1a* kan ha en fysiologisk rolle som er viktig i utviklingen av syn og øye i tidlige livsstadier. Deformiteter hos larver 3 dph ble betydelig redusert av den høyeste dosen råolje (600 µg/l), men var nærmest fraværende i larver eksponert for lav dose (200 µg/l). UV-belyst råolje gav et særegent deformitetssyndrom som var forskjellig fra larvene eksponert for råolje under normal belysning. Nettverksanalyse av differensielt uttrykkede gener i råoljeeksponert torskeembryo 4,5 dpf viste anrikelse av reaksjonsveier blant annet knyttet til AHR-aktivering, muskelfunksjon og hjertesvikt. Resultatene fra denne oppgaven viser at eggstadiet til torsk er sensitiv for eksponering av lave råoljekonsentrasjoner med miljømessig relevant UV-bestråling. Dette kan resultere i toksiske utfall som inkluderer økt dødelighet og deformiteter hos torsk i tidlige livsstadier, samt sterk aktivering av AHR-signalveien.

Forkortelsesliste

Forkortelse	Betydning
2,3,7,8-TCDD	2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin
AHR	Aryl hydrokarbon reseptor
ARNT	Aryl hydrokarbonreseptor kjernetranslokator
BNF	B-Naftoflavon
BA	Benz[a]antracen
B[a]P	Benzo[a]pyren
BCIP	5-bromo-4-kloro-3-indolyfosfat
bHLH	Basisk heliks loop heliks
cDNA	Komplementært DNA
CYP	Cytokrom P-450
DIG	Digoxigenin
dNTP	Deoksyribonukleotid trifosfat
dpf	Dager etter befruktning
dph	Dager etter klekking
dre	<i>Danio reiro</i>

EDTA	Etylendiamintetradietansyre
<i>fh</i>	<i>Fundulus heteroclitus</i>
FICZ	6-formylindolo [3,2-b] carbazol
<i>gm</i>	<i>Gadus morhua</i>
hpf	Timer etter befruktning
ISH	<i>In situ</i> hybridisering
LoVeSe	Lofoten, Vesterålen og Senja
MBT	Midtre blastulatransisjon
NBT	Nitro-blå-tetrazolium
NØA	Nord-Øst Arktisk
PAS	Per-arnt-sim
PAH	Polysykliske aromatiske hydrokarbon
PCB	Polyklorert bifenyl
PCR	Polymerasekjedereaksjon
<i>pm</i>	<i>Pagrus major</i>
ROS	Reaktiv oksygenforbindelse
TBE	Tris borat EDTA
DRE	Dioksin responselement
YSL	Plommesekkens syncytiale lag

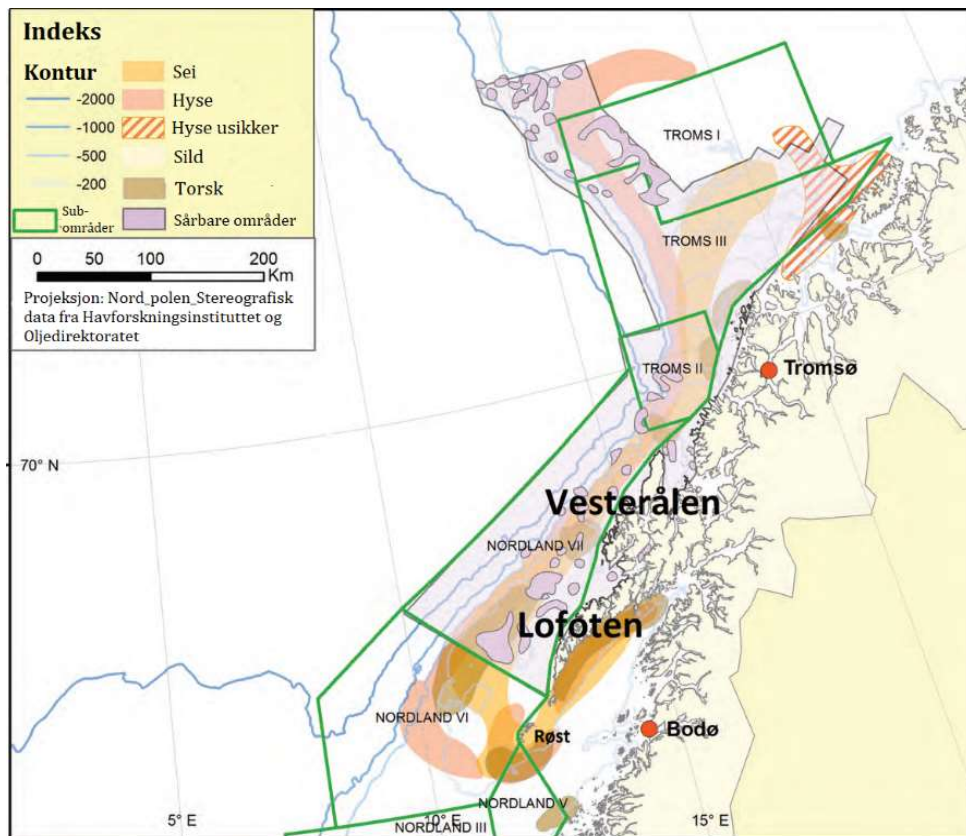
I denne oppgaven bruker jeg store bokstaver når jeg skriver om protein (AHR), og normal tekst i kursiv når jeg skriver om gen (*ahr*)

1. Bakgrunn

1.1 Fisk og olje i Lofoten, Vesterålen og Senja

En betydelig andel urørte oljereserver ligger begravet nord for polarsirkelen. Økt temperatur og issmelting frigjør tilkomsten til disse ressursene og gjør at flere land retter oppmerksomheten mot dette området for ekstraksjon av olje (Hjermann *et al.*, 2007; Cohen, 2019). Her i Norge vurderes det å åpne for oljeboring i kystområdene utenfor Lofoten, Vesterålen og Senja (LoVeSe). I følge seismiske studier finnes olje og gass her med en verdi på omlag 26-56 milliarder kroner, en mengde som er estimert å generere 400-1100 nye arbeidsplasser regionalt, og 800-2300 nye arbeidsplasser nasjonalt (Misund og Olsen, 2013). Men for mange er boring etter olje i LoVeSe kontroversielt, hovedsakelig fordi områdene overlapper med gytefeltet til flere kommersielt og økologisk viktige fiskearter, deriblant nordøstarktisk (NØA) Atlanterhavstorsk, også kalt skrei (fig. 1.1). Lofotfisket har en lang og tradisjonsrik historie som strekker seg 1000 år tilbake i tid, og utgjør i dag i tillegg en betydelig mat- og næringsressurs med en årlig fangst på om lag 1-3,5 millioner tonn. Om fisket forvaltes rett vil det være en fornybar kilde og økosystemtjeneste som potensielt kan utnyttes evig (Føyn, Quilfeldt and Olsen, 2002).

I følge Naturmangfoldsloven § 8-12 er regjeringen pålagt å tilegne seg tilstrekkelig med kunnskap om konsekvensene for natur og miljø før man åpner for større inngrep i naturen som oljeboring innebærer (Lovdata.no, 2018). Ulykker hos erfarne aktører i oljesektoren har tidligere ført til omfattende oljeutslipp og miljøskader, blant annet Exxon Valdez-ulykken i 1989 og Deepwater Horizon i 2010. Utenfor LoVeSe vil et oljeutslipp i gytesesongen kunne eksponere NØA torsk i sin mest sårbare del av livssyklusen. Ringvirkningene det kan få for bestanden blir studert med datamodeller som tar hensyn til flere abiotiske og biotiske faktorer som havstrømmer, interaksjonen med andre arter og interaksjonen mellom olje og fiskeegg (Vikebø, 2014; Carroll *et al.*, 2017). Gitt at tidlige livsstadier av fisk er spesielt følsomme for ekstern påvirkning er det viktig å etablere nøyaktige terskelverdier for toksisk effekt av råoljeeksponering som kan forbedre datagrunnlaget for modellene og gi en bedre risikoanalyse (Hodson, 2017). Torsk er i tillegg blitt bruk som en indikatorart i overvåkingen av marin forurensning (Hylland *et al.*, 2008), og undersøkelsen av de molekylære mekanismene som ligger bak olje-indusert toksisitet er viktig for å videreutvikle arten til dette formålet.



Figur 1.1: Gyteområdene til sei, hyse, sild og torsk langs kysten ved Lofoten-Vesterålen. Aktuelle boreområder (innrammet i grønt) overlapper med gyteområdene til sei, hyse, sild og torsk og andre områder med sårbar bunnfauna (lilla områder). Figuren er basert på figur 1. fra Misund and Olsen, 2013.

1.2 Torsk, leveområde og livsfase

Atlanterhavstorsk (*Gadus morhua*) er en teleost i torskefamilien (*Gadidae*) med en viktig økologisk og kommersiell rolle. Arten er utbredt fra Biscayabukten i sørøst, til Svalbard i Barentshavet i nord, og ned til kysten av Nord-Carolina (USA) i vest (Cohen *et al.*, 1990). Som voksen kan den bli opptil 200 cm lang, men ligger normalt mellom 31-74 cm. Fargen varierer fra brunlig til grønn/grålig dorsalt og lys/hvit ventralt. Individuer kan leve opptil 20 år, men blir sjelden eldre enn 15 år. Den gjenkjennes av sitt karakteristiske «skjegg» på undersiden av munnen, som egentlig er en tilbakedannet finne (fig. 1.2). Den trives i forskjellige habitat fra kystlinjen ned til kontinentalhyllen. På yngelstadiet holder den seg til grunnere områder på om lag 10-30 m som består av vegetasjon og steinformasjoner som gir beskyttelse fra predatorer. Voksenfisk oppholder seg ofte i dypere, kaldere miljøer, spredt over flere forskjellige habitat, ned til 500 m dybde.

Torsk er blant fiskene med høyest fekunditet. Gytingen foregår utaskjærs ved eller nær bunnen i en dybde på 50-200 m, med en foretrukket vanntemperatur på 0-6°C. Den er en porsjonsgyter som betyr at hunnfisken frigjør eggene fordelt over porsjoner i løpet av en gytesesong, hvor totalt antall frigjorte egg spenner mellom 2,5 millioner egg fra en 5 kg hunnfisk, til en

rekordmåling på 9 millioner egg fra et individ på 34 kg (Cohen *et al.*, 1990). Man skiller mellom stedbunden torsk (kysttorsk) og skrei (vandrende torsk). Stedbundet torsk lever tettere sammen og nærmere kysten, mens skrei foretar store migrasjoner mellom beite- og gyteområdet, og lever spredt (Cohen *et al.*, 1990).



Figur 1,2: Utseende til voksen Atlanterhavstorsk. Den gjenkjennes raskt av sitt karakteristiske skjegg på undersiden av munnen. Bildet er hentet fra (Hommedal, 2018).

Med Lofoten-Barentshavet som habitat

lever NØA torsk nær sin klimatiske grense. Her er den en del av et polart økosystem og opplever dermed korte somre og begrenset næringstilgang som tvinger den til å ha små, intensive gyteperioder med faste, lokaliserte gyteområder. Gytesesongen starter i overgangen fra vinter til vår (februar – april), hvor fisken går sammen i stimer og vandrer til gyteområdet i kystområdet utenfor Lofoten, Vesterålen og Senja. Eggene til NØA torsk er pelagiske og flyter nær toppen av vannsøylen under utviklingen av embryo (Olsen *et al.*, 2010). Der driver de nordover med den norske kyststrømmen og når Barentshavet som yngel om sommeren. Naturlig vil andelen torsk som overlever til yngelstadiet kun være en liten fraksjon av den totale andelen egg som gytes. NØA torsk bruker Barentshavet som beiteområde livet ut. Den kjønnsmodnes etter 6-8 år og starter da å migrere til gyteområdene i gytesesongen. Etter 3 års levetid rekrutteres den til den fiskbare populasjonen som høstes av fiskere (Cohen *et al.*, 1990; Olsen *et al.*, 2010).

1.2.1 Torsk i miljøovervåkning

Torsken har tilpasset seg et temperert/polart økosystem, som gjør den til en god representant for artene som lever i vårt nord-liggende marine miljø. Torsk har derfor i en årrekke blitt brukt som en indikatorart i marine miljøovervåkningsprogrammer, som i OSPAR konvensjonen og i overvåkning av vannsøylen i forbindelse med off-shore petroleumsindustri i Norge. Videre sekvensering av torskegenomet har lagt til rette for å benytte arten som modellorganisme i toksikologiske studier (Star *et al.*, 2011; Tørresen *et al.*, 2017). Ved å identifisere gener, og måle hvordan uttrykkningen av disse forandres etter eksponering for kontaminanter, kan man få innblikk i de molekylære mekanismene som ligger bak effektene av giftstoffer. Videre kan bruken av transkriptomikk og proteomikk, i kombinasjon med nettverksanalyser og funksjonelle databaser, gi et mer detaljert innblikk i hvordan celler påvirkes av miljøgifter, og hvilke konsekvenser det har for torsken som helhet (Burcham, 2014). Et *in vitro* (eller *ex vivo*) system hvor leverskiver fra torsk eksponeres for giftstoffer ble nylig tatt i bruk for å studere endringer i

genuttrykk i lever etter eksponering for stoffer som benzo[a]pyrene og 17 α -etynylestradiol (Eide *et al.*, 2014; Yadetie *et al.*, 2018).

Sebrafisk (*Danio reiro*) er en mye brukt modellorganisme innen toksikologi. Sammenlignet med torsk er sebrafisk tilpasset et tropisk ferskvannsmiljø, som kan gi opphav til en respons på fremmedstoffer som ikke samsvarer med reaksjonen til marine arter her i nord. I tillegg har omfattende avling av sebrafisk nylig vist å føre til dannelse av stammer som viser ulik aktivering av transkripsjonsfaktorer som er viktig i håndtering av fremmedstoffer (Lille-Langøy *et al.*, 2019). Til sammen støtter dette videreutviklingen av torsk som en modellorganisme og indikatorart.

1.3 Olje og dens egenskaper

Råolje er hydrokarbonblandinger dannet fra bakteriell nedbrytning av plante- og dyreplankton som levde for mer enn hundre millioner år siden. Underjordiske deponier av råolje tømmes i dag av mennesker som utnytter energien lagret i hydrokarbonene til å drive alt fra industri, transport, eller som byggesteiner til fremstillingen av nye kjemikalier. Råolje sin kjemiske komposisjon varierer mellom forskjellige geologiske deponier, men i hovedsak består den av alkanforbindelser hvor omtrent 0,1-3% er polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH) (Wang *et al.*, 2003).

Olje i vann vil konsentrere seg ved havoverflaten nær utslippspunktet siden oljen ($0,79 \cdot 10^3 \text{ kg m}^{-3}$) har lavere tetthet enn sjøvann ($1,03 \cdot 10^3 \text{ kg m}^{-3}$). Lette komponenter i råoljen, som benzen og toluen, fordampes raskt og vil ikke bli spredt langt fra utslippspunktet. Små PAH (2/3 ringer) har relativ høy vannløselighet og vil løses i sjøvannet, mens de tyngre komponentene som chrysen og pyren vil kunne spres i vannsøylen via dispergering av mikrooljedråper (Wang *et al.*, 2003). Ved et oljeutslipp så vil bølgekraft og virveldannelse dispergere og blande oljen i vannsøylen i form av mikrodråper (Nordtug, *et al.*, 2011). Oljedråper mindre enn 50 μm kan holde seg dispergert i vannsøylen i lang tid og vil medvirke til spredning av oljen.

Fiskeegg som flyter i vannsøylen vil komme i kontakt med to forskjellige fraksjoner av oljen: den vannløselige fraksjonen (WSF) og dispergert olje i form av mikrodråper. Det har blitt diskutert hvilken av fraksjonene som bidrar mest til de toksiske effektene observert i tidlige livsstadier til fisk (Brannon *et al.*, 2006; Carls and Meador, 2009). Oppklaring av dette er avgjørende blant annet for bruken av dispergeringsmiddel, som brukes under opprydningen av et oljeutslipp. Middelet fungerer som en såpe som dispergerer oljen ned i vannsøylen som mikrodråper og det fører til at oljen forvitres raskere. Samtidig løses råoljen lettere opp i vannsøylen slik at giftige komponenter i oljen blir mer biotilgjengelig for opptak av organismer.

I noen studier hvor effektene av WSF-råolje har blitt sammenlignet med dispergert råolje er det indikert at den toksiske effekten på fiskeegg er uavhengig av dråpedannelse (Carls *et al.*, 2008; Nordtug, *et al.*, 2011; Olsvik *et al.*, 2011). Hyse (*Melanogrammus aeglefinus*), som tilhører torskefamilien, har derimot vist en stor grad av oljedråpeakkumulering på korion etter eksponering for lave konsentrasjoner dispergert råolje. Dette medførte økt akkumulering av PAH-er i embryo, og økt dødelighet og deformitetsdannelse ved senere utviklingsstadium (Sørhus *et al.*, 2015, 2016; Sørensen *et al.*, 2017). Torsk som ble eksponert i den samme studien viste ikke en tilsvarende akkumulering av råolje på utsiden av korion, samtidig som en lavere forekomst av toksiske utfall. Sensitiviteten til torskkeegg ovenfor eksponering for den vannløselige fraksjonen av råolje sammenlignet med mikrodråper er fortsatt uklar.

1.3.1 Potensiell interaksjon mellom olje og egg av NØA torsk

Utenfor LoVeSe frakter den norske kyststrømmen vannmassene nordover og ut i Barentshavet. Modellering av oljeutslipp fra utvalgte punkt utenfor LoVeSe har vist at oljen fraktes med kyststrømmen nordover der den sammenfaller med vandreruten til egg- og larvestadiet til NØA torsk (Carroll *et al.*, 2017). Bølgekraft og virveldannelse vil øke innblandingen av råolje i vannsøylen, hvor egg og larver som flyter i vannsøylen vil være en del av blandingen og dermed øke kontakten med råoljen. Den vertikale distribusjonen til pelagiske egg bestemmes i stor grad av vind-indusert blanding av de øverste vannlagene (Sundby, 1991). Flere faktorer gjør at NØA torsk ved dette stadiet er mer sårbar for en potensiell råolje-eksponering: 1) I motsetning til ung- eller voksen torsk har egg eller larve ikke mulighet for å svømme bort fra et kontaminert område, og eksponeres derfor for det den møter i vannsøylen. 2) I egg- og larvestadiet skjer det flere kritiske prosesser over kort tid som spesifisering av aksene til embryo og dannelsen av organer. Om disse prosessene forstyrres kan det ha en alvorlig konsekvens for videre utvikling av organismen. 3) Ved egg- og larvestadiet er lipidinnholdet pr. kg kroppsvekt høyere enn i voksen alder, og vil dermed lettere akkumulere lipofile miljøgifter (Petersen and Kristensen, 1998). 4) Som egg har fisk høyere overflate/volum-ratio, og vil derfor raskere kunne absorbere kontaminanter fra utsiden. 5) Giftige forbindelser har på dette stadiet også kortere vei til målorgan og mål molekyl. Tidligere studier har vist at torskeembryo kontinuerlig eksponert for 600 µg/l råolje fra 1 dpf til 12 dpf opplevde ~70% av individene senskader i form av kjevedeformasjoner på larvestadiet, og det ble målt signifikant induksjon av biotransformasjonsenzymmer relatert til toksiske effekter (Sørensen *et al.*, 2017).

Sollys og termodynamiske krefter forvitrer råoljeproduktene over tid, men i det polare klimaet utenfor LoVeSe vil nedbrytningsraten være lavere enn lengre sør, og råoljen vil oppholde seg i det marine miljøet over lengre tid. Dette fører til større påvirkning på miljøet og artene som lever i det (Hjermann *et al.*, 2007).

1.3.2 Polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH)

PAHer er upolare, hydrofobe forbindelser som består av to eller flere hydrokarbonringer og finnes naturlig i råolje, sot og i produkter av ufullstendig forbrent organisk materiale. Selv om de forekommer naturlig, så har menneskelig aktivitet ført til en kraftig økning av PAHer i miljøet. I Norge er de to største kildene smelteverkindustri (pyrogenisk PAH) og oljevirksomhet (petrogenisk PAH). Pyrogeniske PAHer er som regel forbundet med sotpartikler og er derfor mindre biotilgjengelige. Petrogeniske PAHer er derimot mer tilgjengelig for opptak i marine organismer, hvor de er påvist å ha skadelige virkninger (Hylland, 2006; Pampanin og Sydnes, 2013).

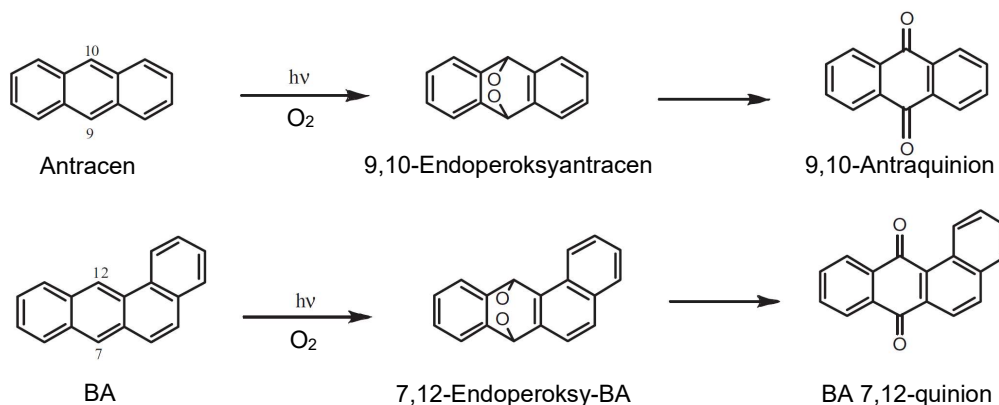
I råolje består PAHer av omtrent 50-60% naftalener, 40-50% trisykliske PAHer og <4% større forbindelser som chrysen (Wang *et al.*, 2003). Stoffgruppen har en høy strukturell diversitet, som betyr at toksisiteten og virkemåten til individuelle PAH-molekyler varierer (Burcham, 2014). En viktig faktor i akkumuleringen av PAHer i akvatiske organismer er hvert enkelt molekyl sin oktanol/vann partisjonskoeffisient (K_{ow}) (Petersen and Kristensen, 1998). Mindre PAHer (<4 ringer) som naftalen har lav K_{ow} , er mer vannløselige og er derfor mer biotilgjengelige, men disse forbindelsene har derimot ikke tendens til å bioakkumulere. Toksisiteten til slike PAHer er mindre studert, men har blitt relatert til effekter som oksidativt stress, immunotoksisitet og forstyrrelse av endokrine funksjoner (Hylland, 2006). Større PAHer (>4 ringer) som chrysen eller pyren, har høy K_{ow} og vil derfor lettere akkumulere i fettvev. Men i motsetning til persistente miljøgifter som halogenerte aromatiske hydrokarboner (HAH), vil ikke PAHer biomagnifiseres i næringskjeden, ettersom de fleste akvatiske vertebrater har biotransformasjonsystemer som gradvis omdanner og skiller ut PAHer (Hylland, 2006). En sentral del av biotransformasjonen starter ved at aryl hydrokarbonreseptor (AHR) ligand-aktiveres av PAHer som har diffundert inn i cellen. Bindingen til AHR resulterer i transkripsjon av et batteri av enzymer, som cytokrom P450 1A (CYP1A), som omdanner og skiller ut forbindelsene. Men i tillegg til å være en beskyttende mekanisme, kan biotransformasjonen også føre til dannelsen av reaktive metabolitter som kan ha en genotoksisk virkning (AHR og biotransformasjonen er beskrevet i mer detalj i 1.4 og 1.5.1) (Burcham, 2014). Metabolittene kan danne DNA addukter ved å binde kovalent til NH_2 -grupper på nukleinsyrene guanin (G) og adenin (A) som under DNA replikasjon kan føre til basepar-substitusjoner (G→tyrosin (T) og A→T). Feil i DNA replikasjon kan også oppstå som følge av at DNA polymerasen hopper over området på DNA med PAH-addukter. Slike mutasjoner kan føre til nedstrøms tap/svekkelse av genets funksjon, f. eks. ved at genet ikke blir uttrykt, eller en forandring av aminosyresekvensen som gjør at proteinet folder seg feil og mister sin funksjon. Dette kan gi flere varianter av uønskede utfall for organismen (Burcham, 2014). Eksponering for lave konsentrasjoner av PAH har tidligere vist å gi toksiske effekter i embryo hos tidlige livsstadier

av teleoster (Incardona *et al.*, 2004; Incardona *et al.*, 2015; Hodson, 2017). Videre har sensitiviteten til teleoster for PAH-indusert toksisitet vist å være avhengig av tilstedeværelsen av AHR (Garner, *et al.*, 2013; Jayasundara *et al.*, 2015)

PAHer har også vist å kunne gi en AHR-uavhengig toksisk effekt på embryostadiet til fisk, og har blitt særskilt knyttet til trisykliske PAHer sin effekt på teleosthjertet (Incardona, 2017). Eksponering for fenantren har vist å forstyrre Ca^{2+} - og K^{+} -balansen i kardiomyocytter fra stillehavsmakrell og tunfisk (*Thunnus orientalis*) som førte til redusert slagstyrke og –rytme (Brette *et al.*, 2017). Vedvarende hjertefeil er også påvist i sild eksponert for lave konsentrasjoner råolje (Incardona *et al.*, 2015). Tap av hjertets funksjon tidlig i utviklingen påvirker sirkulasjonen i embryo, dette har vist å være assosiert med dannelsen av kranie- og kroppsaksedeformiteter ved senere utviklingsstadier (Sørhus *et al.*, 2016; Incardona, 2017).

Fototoksisitet

PAHer i miljøet er ofte eksponert for sollys. På grunn av strukturen på PAH molekylerne evner de å absorbere UV-lys fra solskinnet. Lyset bryter ned PAHer over tid, men det kan også gi strukturendringer som kan gjøre forbindelsene mer toksiske (Hylland, 2006).. Absorpsjonen fører til en kort økning i energinivå som gjør de tilbøyelig til å danne kovalente bånd til andre molekyler. I nærvær av oksygen kan de bli aktivert til reaktive oksygenforbindelser (ROS) og frie radikaler. Dette er svært reaktive molekyler som skader vevet ved å blant annet øke lipidperoksidering og DNA-skade i cellene (Rau *et al.*, 2005; Fu *et al.*, 2012). Quinoner er en type oksygenforbindelse som dannes igjennom fotooksidasjon av PAHer (fig. 1.5). Dette er elektrofile forbindelser som kan binde kovalent til nukleofile atom på proteiner og nukleinsyrer i cellen og forstyrre funksjonen til disse komponentene på en måte som kan føre til celledød eller kreft. Quinonene kan også danne reaktive semiquinon-radikaler eller andre ROS som forårsaker oksidativt stress (Fu *et al.*, 2012). En struktur-aktivitetssammenligning av ulike



Figur 1.5: Fotooksidasjon av to PAH forbindelser, antracene og benz(a)antracene (BA) til quinonforbindelser Reaksjonen starter ved at PAH forbindelsen absorberer UV-stråling fra sollys og blir eksitert. Det eksiterte molekylet reagerer med oksygen i luft og danner et ustabil peroksyintermediat som omdannes spontant til en quinonforbindelse. Figuren er hentet fra Sun *et al.*, 2012. BA=Benz[a]antracene, hv=lys.

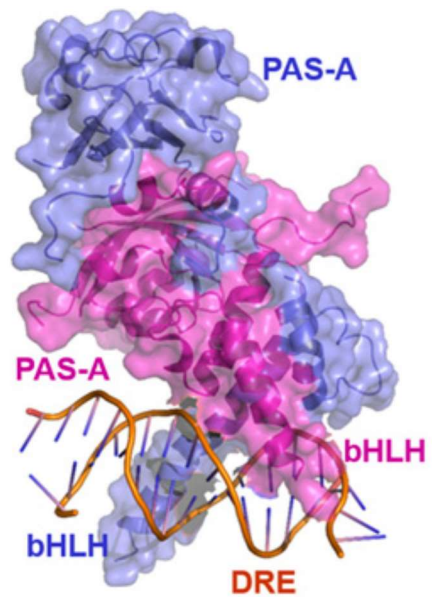
oksygenererte PAHer (OPAH) sin evne til å gi deformiteter, mitokondriesvikt og genuttrykk relatert til toksisitet i tidlige livsstadier av sebrafisk fant at flere av forbindelsene økte forekomsten av disse utfallene. 6-karbons OPAHer med nærliggende dioner, og flere-rings OPAHer med motsatte dioner (som BA-7,12-quinion) viste seg å gi høyest toksisk effekt (Knecht *et al.*, 2013).

I de tidlige fasene av livet er fisk ofte upigmentert og gjennomsiktige, som gjør de ekstra sårbare for UV-stråling. På dette stadiet kan fototoksitet fra UV-eksponerte PAHer oppstå igjennom to mekanismer. Den ene er fotosensitisering (UV-lys aktiverer PAHer som har akkumulert i vevet), og den andre er fotomodifikasjon (UV-lys fotooksiderer PAHer i vannsøylen til reaktive forbindelser). I Barron *et al.*, 2003 ble larver av stillehavssild (*Clupea pallasii*) eksponert for «Alaska North Slope» (ANS)-råolje med og uten UV-bestråling. Larvene opplevde 1,5-48-folds økning i dødelighet ved eksponering for råolje med UV-lys sammenlignet med eksponering for råolje i normalt lys. Videre økte den toksiske effekten etter at komponenter i råoljen ble gjort mer biotilgjengelige ved behandling med spredningsmiddel. Dette indikerer at UV-lys har en forsterkende effekt på toksisiteten til råolje i tidlige livsstadier til fisk, og at noe av den fototoksiske effekten kan tilskrives fotoaktivering av PAHer i vevet (fotosensitisering).

1.4 Aryl hydrokarbon reseptor (AHR)

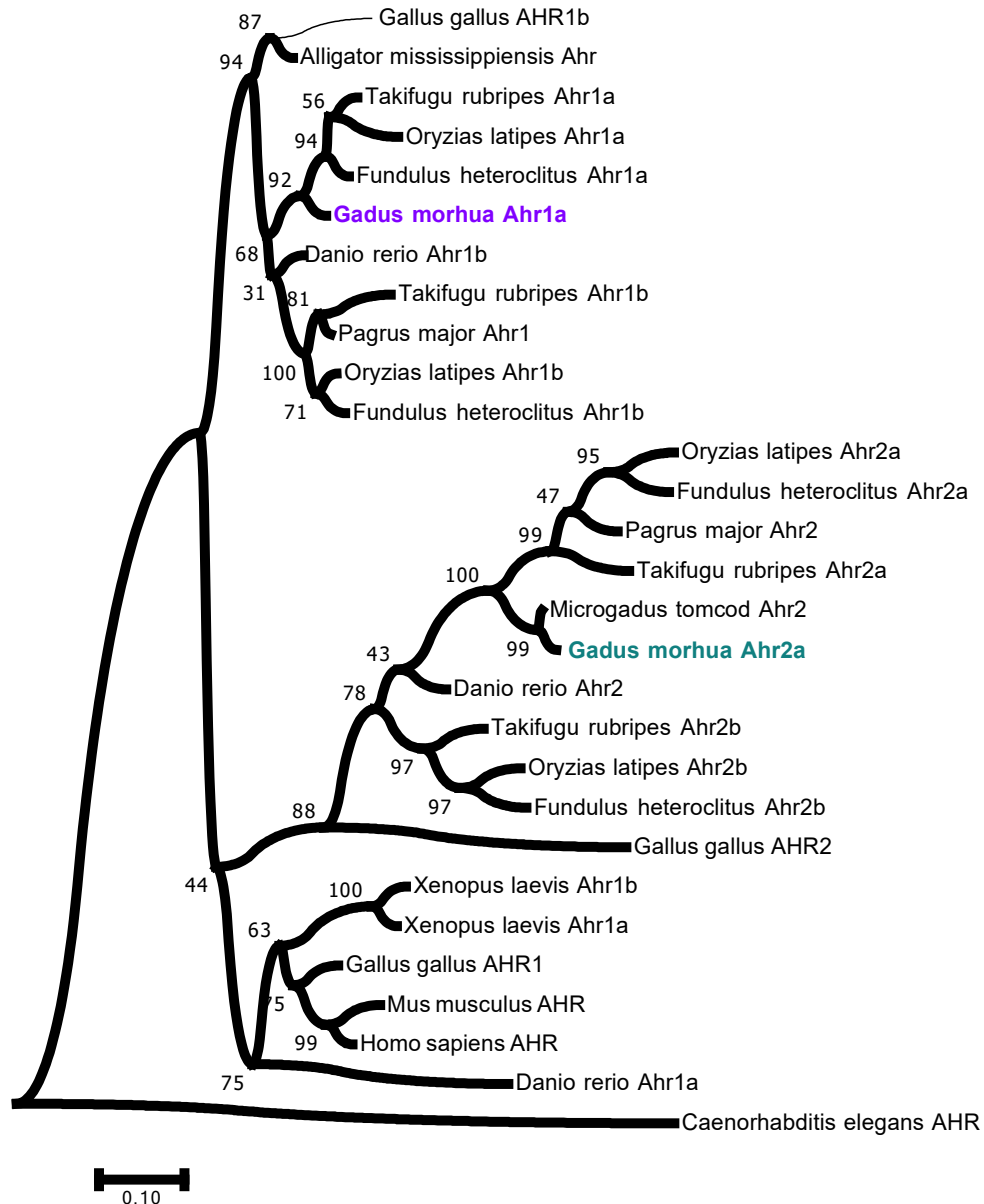
AHR er en transkripsjonsfaktor i basic-Heliks-Loop-Heliks (bHLH) og per-arnt-sim (PAS) - familien som regulerer uttrykket av flere ulike gener relatert til håndteringen av fremmedstoffer. Den har blitt betegnet som en fremmedstoffsensitiv da den ligand-aktiveres av ulike klasser eksogene kjemikalier med både naturlig og syntetisk opphav. Interaksjonen med den persistente miljøgiften 2,3,7,8- tetraklorodibenzodioksin (2,3,7,8- TCDD) er spesielt godt karakterisert, og var sentral i utledningen av funksjonen til AHR (Poland *et al.*, 1976; Okey, 2007). Andre ligander som binder til AHR er HAHer, som polyklorinerte bifenyler (PCB), i tillegg til PAHer og β -naftoflavon (BNF). AHR har også i senere tid blitt funnet å binde endogene stoffer, som tryptofan-metabolitten 6-formylindolo [3,2-b] carbazol (FICZ) (Rannug and Rannug, 2018). Strukturelle studier av ligandbindingssetet til AHR reseptoren i gnagere indikerer at den aktiveres av planare ligander med maksimale dimensjoner tilsvarende 14x12x5 Ångstrøm. Ligandbindingen er også avhengig av termodynamiske og polare/hydrofobe egenskaper til liganden (Fujii-Kuriyama and Mimura, 2005). I inaktiv tilstand finnes AHR i cytosol bundet til ulike ko-chaperoner (varmesjokkprotein 90 (Hsp90), X-assosiert

protein-2 (XAP2) og p23). Ved ligandbinding transporteres ligand-reseptorkomplekset inn i cellekjernen, hvor ko-chaperonene frigjøres. I kjernen dimeriserer komplekset med aryl hydrokarbon nukleær translokator (ARNT), og ligand-Ahr-ARNT-komplekset binder til dioksin respons elementer (DRE) i promotorregionen til målgener på DNA. Ved binding til DRE induseres transkripsjonen av et batteri av gener som koder for enzymer som er operative i fase I og fase II i detoksifiseringen av fremmedstoffer, deriblant monooksygenaseenzymer i cytokrom P450 familien (Denison *et al.*, 2002). Andre enzym med et genuttrykk som reguleres av AHR er NADPH quinon dehydrogenase 1 (NQO1), aldehyd dehydrogenase 3 A1 (ALDH3A1), UDP-glukuronosyltransferase 1 A2 (UGT1A2) og glutation S-transferase A1 (GSTA1) (Nebert *et al.*, 2000).



Figur 1.6: Krystallstruktur av AHR (fiolett)-ARNT(blå) heterodimerkompleks i binding til DRE. AHR og ARNT folder seg rundt hverandre imens basiske aminosyrer ved N-terminal ende fasiliterer DNA-binding. Strukturen er hentet fra Seok *et al.*, 2017.

I motsetning til pattedyr har fisk flere *Ahr*-varianter. Tidlig i vertebrateevolusjonen, før bruskfisk og benfisk utviklet seg i separate slektslinjer, gikk et opphavelig *Ahr*-gen igjennom en gen-duplikasjon som dannet paralogene *ahr1* og *ahr2* (Karchner *et al.*, 2002; Hahn *et al.*, 2017). Ved videre utvikling av teleoster skjedde det en hel-genom-duplikasjon som gav denne vertebratgruppen dobbelt kromosomtall (Petit *et al.*, 2004; Glasauer og Neuhauss, 2014). Dette førte til at ytterligere to varianter av *Ahr* oppsto; *ahr1a* og *ahr1b*, samt *ahr2a* og *ahr2b* (Hahn, *et al.*, 2017). Videre evolusjon og spredning av nye fiskearter har tillatt *Ahr* å utvikle seg i flere forskjellige miljø. Hos noen arter har dette ment tap av en eller flere av *Ahr*-paralogene. Det er i dag svært varierende blant fisker hvor mange av paralogene som er bevart (Hahn *et al.*, 2017). I sebrafisk har tre varianter av *Ahr* blitt identifisert: *drahr1a*, *drahr1b* og *drahr2* (Tanguay *et al.*, 1999). I atlantehavslaks (*Salmo salar*) har *Ahr* gjennomgått en ytterligere gen-duplikasjon, og det er nå funnet seks *Ahr*-varianter, to av typen *ssahr1* (α og β) og fire *ssahr2* (α , β , γ og δ) (Hansson and Hahn, 2008). I tannkarpfen (*Fundulus heteroclitus*) har *fhahr1* og *fhahr2* blitt identifisert (Karchner, *et al.*, 2002), og to versjoner av *ahr2* (α og β) er funnet i regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) (Abnet *et al.*, 2002). I torsk er det funnet to *Ahr*-kodende gener som er fylogenetisk plassert i underfamiliene *Ahr1a* (*gmahr1a*) og *Ahr2a* (*gmahr2a*) (Aranguren-Adabia *et al.*, *in prep*) (fig. 1.7).



Figur 1.7: Fylogenetisk tre med Ahr paralogene fra Atlanterhavstorsk i relasjon til AHR-protein fra andre vertebrater. Treet er rotet med AHR fra evertabraten *C. elegans*. *gmAHR1a* og *gmAHR2a* i torsk grupperer seg i isoformspesifikke grupper i henholdsvis Ahr1a og Ahr2a kladene blant teleoster. (Figuren er hentet fra Aranguren-Adabia- Abadia et al. in prep).

Rollen som en fremmedstoffsensoren ble trolig tilegnet AHR først etter utviklingen av vertebrater (Hahn, et al., 2017). I de nålevende evertabratenene, *Caenorhabditis elegans* og *Drosophila melanogaster*, har AHR blitt vist å være involvert i utviklingen av det sensoriske nervesystemet, og i tillegg binder ikke evertabrater-AHR typiske ligander som TCDD eller BNF. Dette kan indikere funksjonen til en «proto-AHR» som eksisterte tidlig i evolusjonen (Qin and Powell-Coffman, 2004; Hahn, et al., 2017). Nyere studier har avdekket en rekke tilleggsfunksjoner til AHR, også i vertebrater, som ikke er relatert til responsen på fremmedstoffer. Deriblant har AHR vist å være involvert i blant annet immunsystemet, stamcelledannelse og i organfysiologi (Gasiewicz, et al., 2014; Stockinger et al., 2014; Esser and Rannug, 2015; Nebert, 2017). I fisk

har studier antydnet at de mange rollene til AHR er ulikt fordelt på paralogene som har oppstått gjennom gen-duplikasjoner, og at denne oppdelingen av funksjoner gjenspeiles blant annet i et isoformspesifikt vevsuttrykk (Andreasen *et al.*, 2002; Goodale *et al.*, 2012; Sugden *et al.*, 2017; Aranguren-Abadia *et al.*, in prep.). Siden AHR sin evne til å binde fremmedstoffer og indukere genuttrykkningen av biotransformasjonsenzymmer er en viktig signalvei for toksiske responser fisk, vil kartlegging av vevsuttrykket og aktiveringen av de ulike AHR-isoformene være viktig for å forstå teleoster sin sensitivitet for marin forurensing.

1.5 Biomarkører

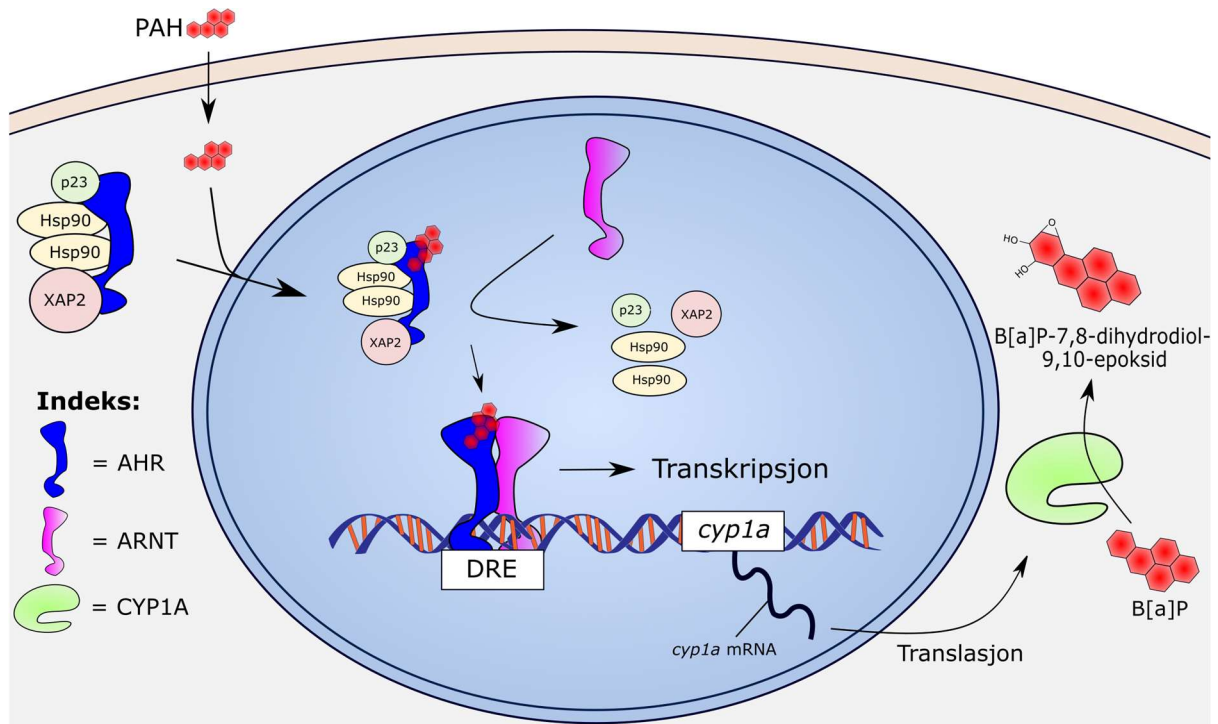
Biomarkører anvendes i flere forskjellige vitenskapelige felt som medisin, farmakologi og toksikologi, og kan bredt defineres som en målbar respons som indikerer tilstanden til et biologisk system. Innen økotoksikologi defineres en biomarkør som en målbar biologisk respons på ett eller flere kjemikalier som indikerer eksponeringsgrad eller toksisk effekt (Peakall, 1994). For å ta i bruk en biomarkør som et virkemiddel til å diagnostisere eller predikere utfall er en avhengig av god mekanistisk kunnskap om forløpet til dannelsen av biomarkøren, og eventuelle faktorer som påvirker dens tilstedeværelse. Biomarkører er svært viktige i miljøovervåkning da de kan gi spesifikk informasjon om hvilke stressorer organismen er utsatt for. Kjennskapen til blant annet induksjon, regulering og lokaliteten til CYP1A i forskjellige fiskearter gjør den til en presis biomarkør for eksponering av planare aromatiske hydrokarboner i fisk (Goksøyr, 1994).

1.5.1 Cytokrom P450 1A

Cytokrom P450 (CYP) er en superfamilie av hem-holdige proteiner som hovedsakelig katalyserer monooksygenering av både endogene og eksogene stoffer. Proteinene finnes i et svært bredt spekter av organismer, fra virus til vertebrater, og deltar i en rekke ulike reaksjonsveier (Lamb *et al.*, 2019). CYP-enzymmer blir navngitt ved bruk av tall som representerer familie, deretter en bokstav som representerer underfamilie, og til slutt et tall som identifiserer medlemmet i underfamilien (f. eks. CYP1A1, CYP2E1 eller CYP5A1). Det er hovedsakelig CYP1-4 som deltar i biotransformasjonen av fremmedstoffer (Burcham, 2014).

Enzymet CYP1A blir sterkest oppregulert ved ligand-aktivering av AHR, og det katalyserer fase I reaksjonen i biotransformasjonen av planare aromatiske hydrokarboner som PAH (fig. 1.8). Proteinets blir syntetisert i endoplasmatisk retikulum (ER) og forankrer seg hovedsakelig til glatt ER-membran. Et annet enzym kalt cytokrom P450 reduktase er assosiert til CYP1A og forsyner enzymet med elektroner fra NADPH, som er en nødvendig kofaktor i oksidasjonen av CYP1A-substrater. Ved proteinets C-terminale ende ligger hem-gruppen, som er kjernen i det aktive setet til enzymet. Ved binding til en PAH som benzo[a]pyren (B[a]P) reduserer Fe^{2+} et dioksygen molekyl til O^- som deretter overføres til karbonatomer på en av benzenringene til

substratet hvor det dannes en epoksidgruppe. Epoksidet blir videre redusert av enzymet epoksid hydrolase til en mer stabil metabolitt med en –OH gruppe, som kan videre bli konjugert med endogene molekyler av fase II enzymer og til slutt transportert ut av cellen i fase III (Burcham, 2014). En løsrivelse av epoksidet mellom fase I og fase II i biotransformasjonen der produktet ikke blir konjugert betyr at CYP1A-substratinteraksjonen har aktivert substratet til en elektrofil forbindelse som virker toksisk for cellen ved å binde til proteiner eller DNA (fig. 1.8) (Burcham, 2014).



Figur 1.8: Skjematisk fremstilling av ligand-aktivering av AHR. PAHer er lipofile forbindelser og diffunderer igjennom celledommen. Inne i cytosol ligandaktiverer de AHR, som i inaktiv tilstand er bundet til flere ko-chaperoner som Hsp90, XAP2 og p23. Deretter diffunderer AHR-ligandkomplekset inn i cellekjernen der ko-chaperonene disassosierer fra AHR. Videre dimeriserer AHR-ligandkomplekset med ARNT som sammen binder til DRE i promotorområdet oppstrøms for målgener, som igjen aktiverer transkripsjonen av flere enzymer involvert i fremmedstoffrespons, deriblant *cyp1a*. Etter translasjon vil CYP1A være operativ i fase I av biotransformasjonen av PAH forbindelser, som for eksempel B[a]P.

1.6 Mål

I denne oppgaven blir aktivering av AHR-reaksjonsveien, og lokaliteten til *Ahr*-genuttrykket, studert i tidlige livsstadier til torsk eksponert for lave konsentrasjoner råolje med og uten koeksponering for miljømessig relevant UV-bestråling. Målsetningene er som følger:

- 1) Å undersøke kvantitativt uttrykket av biomarkøren *cyp1a* i torskkegg under og etter eksponering, og videre lokalisere uttrykket på embryo- og larvestadiet. Uttrykket blir sammenlignet med UV-belyst embryo og larve for å undersøke effekten av UV-bestråling på induksjonen av *cyp1a*, samt den generelle toksisiteten.

- 2) Måle kvantitativt uttrykket av *gmahr1a* og *gmahr2a* i torskkeegg under og etter eksponering for råolje, og råolje med UV-bestråling. Videre lokalisere uttrykket av *gmahr1a* og *gmahr2a* i embryo 4,5 dpf og larve 3 dph.
- 3) Undersøke en potensiell overlapp mellom lokaliteten av uttrykket til *gmahr* paralogene med uttrykket til *cyp1a*, både i embryo 4,5 dpf og larve 3 dph.
- 4) Undersøke dannelsen av deformiteter i larver 3 dph etter eksponering for råolje, og effekten av koeksponering for UV-lys på deformitetsdannelsen.
- 5) Undersøke endringer i transkriptomet til torskkeembryo (4,5 dpf) som følge av eksponering for råolje med normal belysning, og videre koble endringene i genuttrykning til reaksjonsveier ved bruk av nettverks- og funksjonsdatabaser.

2. Materialer

2.1 Kjemikalier

Navn	Kjemisk formel	Leverandør
Agarose		Sigma-Aldrich
Diklometan GC Suprasov®	CH ₂ Cl ₂	Merck
Dimetylsulfoksid (DMSO)DMSO	C ₂ H ₆ OS	Sigma-Aldrich
Etanol	C ₂ H ₆	Sigma-Aldrich
Etidiumbromid	C ₂₁ H ₂₀ BrN ₃	Sigma-Aldrich
Etylendiamintetraeddiksyre (EDTA)	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ x 2H ₂ O	Merck
Formamid	HCONH ₂	Sigma
GelRed		Biotium
Glyserol	C ₃ H ₈ O ₃	Sigma-Aldrich
Hydrogenklorid	HCl	Sigma-Aldrich
Hydrogenperoksid	H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich
Isopropanol	C ₃ H ₈ O	Kemetyl
Kaliumhydrat	KOH	Sigma-Aldrich
Kloroform	CHCl ₃	Sigma-Aldrich
Litiumklorid	LiCl	Roche
Metanol	CH ₄ O	Sigma-Aldrich
Natriumklorid	NaCl	Sigma-Aldrich
Nitrogen (I)	N ₂	Sigma-Aldrich
Nitrotetrazolium blå kloride	C ₄₀ H ₃₀ N ₁₀ O ₆ · 2Cl	Roche
Polysorbat 20 (Tween 20)	C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆	Sigma-Aldrich
RNAsein		Sintef
Svovelsyre	H ₂ SO ₄	
TriReagent		Sigma
Triton X-100	Oct-C ₆ H ₄ -(OCH ₂ CH ₂) ₁₀ OH	Sigma-Aldrich

2.2 Løsninger

Navn	Komponent	Mengde
5X Tris-Bor-EDTA (TBE) buffer, pH 8,3	Tris	27 g
	Borsyre	13,7 g
	EDTA (0,5 M)	10 ml
	dH ₂ O	<500 ml
Totalt		500 ml
5X Tris-acetat-EDTA (TAE) buffer, pH 8,3	Tris	24,2 ml
	Eddiksyre	5,7 ml
	EDTA (0,5 M)	2 ml
	dH ₂ O	<2 l
Totalt		2 l
5X Fosfatbuffret-saltvann (PBS) buffer, pH 7,4	NaCl	40,0 g
	KCl	1,0 g
	Na ₂ HPO ₄	7,2 g
	dH ₂ O	<1000 ml
Totalt		1000 ml
20X Saltvanns-natrium-sitrat (SSC) buffer, pH 7,0	Natriumklorid	175,3 g
	Natrium sitrat	88,2 g
	dH ₂ O	<800 ml
Totalt		800 ml
Trollolje		SINTEF

2.3 Diverse kit og enzymer

Navn	Produsent	Katalog nr.
Clontech Advantage 2 Polymerase (50x)	AH Diagnostics	639201-CLO
DIG RNA Labelling Mix, 10x conc.	Roche	11277073910
DreamTaq Green PCR Mastermix (2X)	Thermo Fisher Scientific	K1081
iScript™ cDNA Syntese kit	Bio-Rad	170-8891
LightCycler (r) 480 SYBR Green 1 Master	Roche	04 707 516 001
Phusion DNA polymerase	New England Biolabs	M053S
Proteinase K	Sigma-Aldrich	03115887001

RNase	Sigma-Aldrich	R4875
T3 RNA Polymerase	Roche	11031163001
T7 RNA polymerase	Roche	10881767001

2.4 Plasmid

Navn	Produsent
pcDNA3.1/Zeo(+)	Thermo Fisher

2.5 Instrument

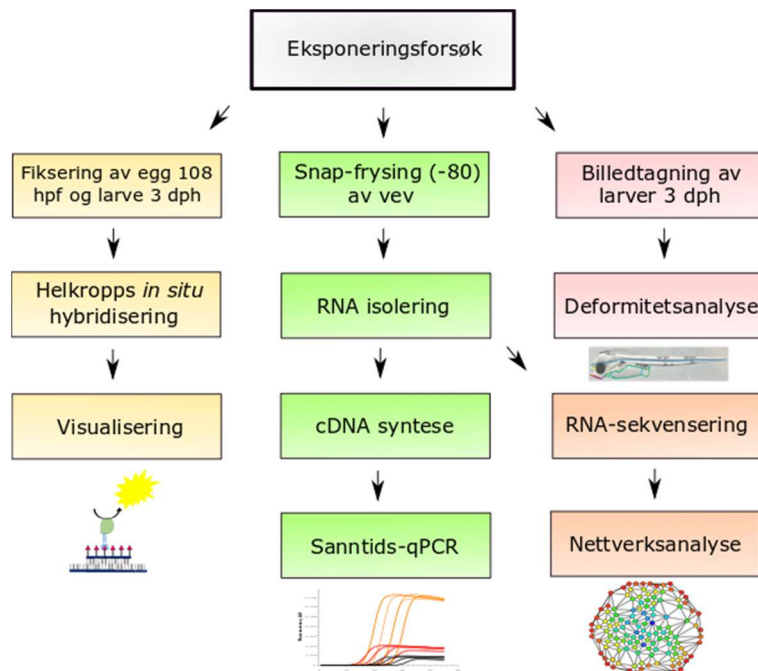
Navn	Produsent
Chromato-VUE Transilluminator Model TM-20	UVP _{inc}
DOPPIO Thermal Cycler with dual 48 well blocks	VWR
GD100 Varmebad	Grant
Gel Doc™ EZ Imager	Bio-Rad
Heraeus Multifuge X3R Centrifuge	Thermo Fisher Scientific
Leica DMBL	Leica Microsystems
Leica M420	Leica Microsystems
LKB 2150 HPLC pumpe	Pharmacia
Lumenera Infinity 3	Teledyne Lumenera
Milli-Q A10 Advantage	Merch Millipore
Mixer Mini Vortex 230V	VWR
NanoDrop One Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific
PowerPac™ HC High-Current Power Supply	Bio-Rad

2.6 Programvare

Navn	Brukt til	Produsent
BeeStep	Regulere råoljetilførsel	Maxi-Bee
Ensembl	Finne ortologer til uttrykte torskegen	Cunningham <i>et al.</i> , 2017
Excel 2013	Behandle data fra qPCR og deformitetsanalyse	Microsoft
Image-Pro Premier 9.1	Billedtagning av embryo og larve	Adobe
Inkscape 0.92.4	Lage figurer	www.inkscape.org
Photoshop 6	Lage figurer	Adobe
Powerpoint 2013	Lage figurer	Microsoft
Prism 7	Lage grafer og utføre statistiske analyser	GraphPad
Serial Cloner 2.6.1	Identifisere primere	Franck Perez ©

3. Metoder

I denne delen blir oppsettet til eksponeringsforsøket og de påfølgende analysene beskrevet i detalj (fig. 3.1). Rekkefølgen på beskrivelsen er dyrehold og eksponering (svart), helkropp *in situ* hybridisering (gul), kvantitativ-PCR (grønn), deformitetsanalyse (rød) og til slutt nettverksanalyse (oransje).



Figur 3.1: Flyttdiagram over metodene brukt i denne oppgaven, fra eksponeringsforsøket til endelige analyser.

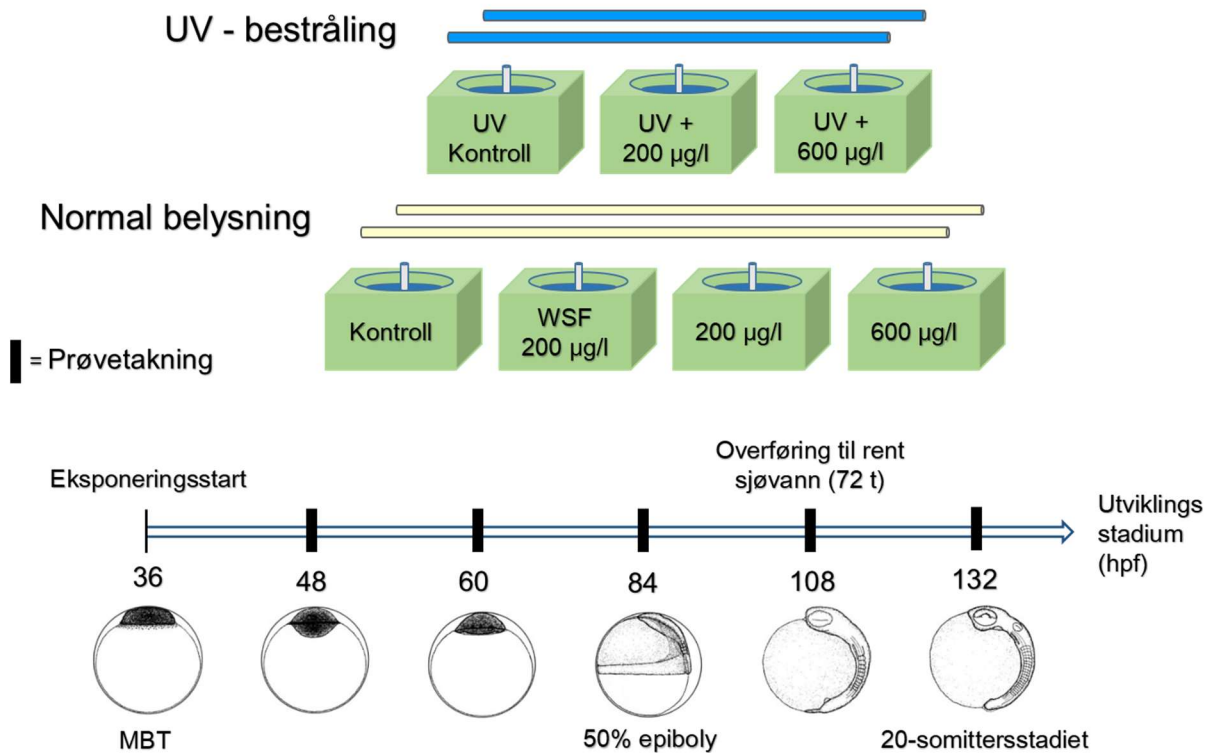
3.1 Dyrehold

Atlanterhavstorsken benyttet i dette eksponeringsforsøket har sin opprinnelse fra stamfisk røktet ved Havforskningsinstituttet sin forskningsstasjon på Austevoll. Det ble brukt egg fra tre hunnfisk som ble blandet og deretter befruktet med melke fra én hannfisk. Hunnfisk ble strøket for å høste egg som samlet ble befruktet med melke i litermål for å minimere forskjeller i utviklingsstadium ved eksponeringsstart. Eggene ble videre overført til innendørs inkubatorer med en vanntemperatur på $7 \pm 1^\circ\text{C}$, fram til overføring til eksponeringskar.

3.2 Råolje- og UV-eksponering

Overføring til eksponeringskar ble gjort 1,5 dpf da eggene er i midtre-blastula transisjon (MBT, fig. 3,2) i embryoutviklingen. På dette tidspunktet er det maternale mRNA i egget ferdig transkribert og embryoene starter å uttrykke sitt eget arvemateriale. Eksponeringskarene var sirkulære med et volum på 50 liter og laget av grønn polyetylenplast. Sjøvanngjennomstrømningen var 32 L/t og vanntemperaturen ble holdt til $7 \pm 1^\circ\text{C}$. En gruppe kar ble bestrålt med UV-lys mens en tilsvarende gruppe parallelt ble holdt under normalt lys

igjennom hele eksponeringsperioden. Lysregime til karene var 12 timer med lys:12 timer mørke, med en dimmende, jevn overgang. UV-lampene var typen bredspektrert med 2x36W Osram Biolux 965 (Munchen, Tyskland, <http://www.osram.com>), og leverte UV-stråling med intensitet tilnærmet det som kommer fra sollyset ved LoVeSe om våren (fig. 8.2, appendiks).



Figur 3.2: Skjematisk oversikt over oppsettet til eksponeringsforsøket med tidslinje som viser prøvetakingstidspunkt og tilsvarende utviklingsstadium til torskeeggene. Torskeeggene ble eksponert for 600 og 200 µg/l råolje med UV-bestråling, i tillegg til 600, 200 og filtret 200 µg/l råolje (WSF) under normal belysning. MBT=midtreblastula-transisjon. Illustrasjon av torskeembryo er hentet fra Hall et al., 2004.

Råoljen ble levert av SINTEF Materials and Chemistry (Trondheim, Norge), og har sin opprinnelse fra Trollfeltet i Nordsjøen. Før eksponering ble råoljen varmebehandlet ved 200°C for å fjerne lettere, flyktige stoffer fra råoljen, tilsvarende det som ville fordampet etter 2-7 dager fra sjøoverflaten ved omtrent 10°C lufttemperatur. Råoljen ble pumpet inn i eksponeringskarene av en HPLC pumpe (Pharmacia, LKB2150). Pumpen dirigerte råolje og sjøvann sammen i en slange som resulterte i sjøvann med en oljedråpekonsentrasjon på 46 mg råolje/ml. En magnetisk ventil med tre åpninger førte denne slangen sammen med en parallell slange som inneholdt rent sjøvann, ventilen tillot å hente vann fra begge slangene. Den endelige oljekonsentrasjonen i karene ble bestemt ved at en datakontrollert enhet (MiniBee card og BeeStep programvare) styrte den relative strømmingen fra slangen med olje og slangen med rent sjøvann.

Eggene ble eksponert for to forskjellige oljekonsentrasjoner: 600 µg/l og 200 µg/l, med og uten UV-bestråling (UV-B: 280-320 nm og UV-A: 315-400 nm). Det ble satt opp kontrollkar for både

råoljeeksponering og råolje + UV-bestråling. I ett kar med endelig råoljekonsentrasjon på 200 µg/l ble råoljen filtrert med filter (0,7 µm porestørrelse) som danner den vannløselige fraksjonen til råoljen (WSF), og motvirker oljedråpedannelse på korion. Denne gruppen (WSF 200 µg/l) ble holdt under normal belysning gjennom hele eksponeringen. Filteret ble byttet en gang hvert døgn eksponeringen pågikk.

Eksponeringen varte i totalt 72 timer, og deretter ble eggene overført til rent sjøvann for klekking. Prøvetaking ble utført ved 2, 2,5, 3,5, 4,5 og 5,5 dpf, samt at det ble tatt bilder av larvene 3 dph (beskrevet nærmere i metode 3.5). Eggene ble samlet fra karene med 200 ml begerglass, talt opp under mikroskop og overført til prøverør som ble snap-fryst på flytende nitrogen og deretter lagret på -80°C.

3.2.1 Karakterisering av eksponeringsmediet

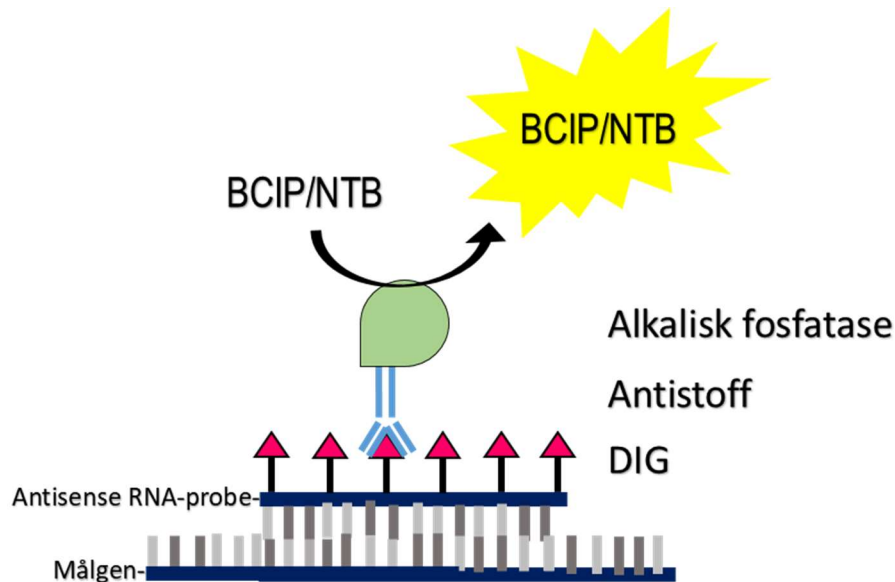
Ved starten og ved slutten av eksponeringen ble det tatt vannprøver fra alle eksponeringskarene. Det ble gjort kjemisk analyse av vannprøvene for å bestemme konsentrasjonen til PAH forbindelser og andre hydrokarboner i eksponeringsmediet, og om den har endret seg fra start til slutt av eksponeringen. Eksponeringsmediet ble ekstrahert med begerglass fra midten av vannsøylen (1 liter). Videre ble mediet behandlet med svovelsyre (H₂SO₄, pH<2) og diklormetan (30 ml) for å felle ut komponentene i mediet, deretter lagret ved 4°C til videre prosessering. Deionisert vann ble inkludert for hver ekstraksjon som kontroll. Prøvene ble analysert ved Havforskningsinstituttet. En Agilent 7890 gasskromatograf, paret med en Agilent 7010 trippel quadruple masse spektrometer utstyrt med en elektropray ioniserings (EI) kilde og en kollisjonscelle ble brukt (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Analysen ble kjørt slik som beskrevet i Sørensen *et al.*, 2017.

3.3 Helkroppss *in situ* hybridisering (ISH)

Ved bruk av helkroppss ISH kan den spatiale og temporale uttrykningen av gener visualiseres i fikserte vev. I denne oppgaven ble uttrykkningen av genene *cyp1a*, *gmahr1a* og *gmahr2a* visualisert i embryo (4,5 dpf) og larver (3 dph) av Atlanterhavstorsk eksponert for råolje og UV bestråling. De undersøkte embryoene og larvene ble fiksert 4,5 dpf og 3 dph i 4% paraformaldehyd (PFA), før de deretter ble lagret i en metanolløsning ved -20°C. Prosedyren ble gjennomført som beskrevet i Thisse and Thisse, 2008 med modifikasjoner som i Eilertsen *et al.*, 2014.

Først fremstilles et PCR-amplifisert templat av målgenet, som videre blir omgjort til antisense- og sense-RNA probe, merket med dioxigenin (DIG). Vevet som undersøkes blir gjort permeabelt for proben, slik at den får lettere tilgang til stedet der genet er uttrykt. Etter at proben har hybridisert til målgenet, blir overflødig probe vasket vekk. Videre blir vevet behandlet med RNase, som fjerner probe som ikke har hybridisert, deretter blir vevet klargjort

til visualisering. Visualiseringen skjer ved immunohistokjemisk behandling. Vevet blir behandlet med et antistoff med spesifikk binding til DIG (anti-DIG), og er konjugert med enzymet alkalisk fosfatase. Dette enzymet fosforylerer substratene nitro blå tetrazolium klorid (NBT) og 5-bromo-4-kloro-3-indolylfosfat (BCIP) som ved tilsats til vevet vil avgi en lilla farge der proben har hybridisert (fig. 3.3).



Figur 3.3: Visualisering av antisense RNA-probe etter hybridisering til målgenet. DIG-merket antisense RNA-probe hybridiserer til sense-mRNA transkript av målgenet som videre behandles med antistoff koblet til alkalisk fosfatase enzym. Innmerkningen av proben skjer når vevet behandles med kromogent substrat (BCIP/NTB) som alkalisk fosfatase omgjør til et synlig lilla presipitat.

Prosedyren består av flere steg der en rehydrerer, inkuberer og vasker vevet i ulike løsninger i en 24 brønners NUNC-plate. Dette optimaliserer gradvis vevet for en spesifikk hybridisering av proben. Vevet blir gjennom hele prosedyren (med unntak av hybridiseringssteget) oppbevart i et 1,5 ml eppendorfrør der bunnen har blitt kuttet av på tvers og erstattet med et filter. Filteret holder egg og larver inne i røret, men slipper behandlingsløsningene gjennom. Løsningene vevet blir eksponert for blir tilsatt en 24 brønners NUNC-plate i kronologisk rekkefølge, slik at når en eksponering er ferdig flytter man filterrøret med vevet ned i brønnraden nedenfor i NUNC-platen, som inneholder neste eksponeringsløsning. Helkroppss ISH kan deles inn i tre steg: forhåndsbehandling av vev, hybridisering- og visualisering av probe.

3.3.1 Polymerasekjedereaksjon (PCR) av probetemplat

Sekvenser av genene *gmahr1a*, *gmahr2a* og *cyp1a* var på forhånd innsatt i pcDNA3.1/Zeo(+) (Thermo Fisher)-plasmid, som i dette forsøket ble amplifisert med PCR og videre brukt som templat til probesyntese. Sekvensen og primerene brukt i amplifikasjonen av probetemplatet ble henholdsvis funnet og designet av Aranguren-Adabia et al., *in prep*. Probesyntesen ble gjennomført som beskrevet i Thisse and Thisse, 2008.

PCR er en metode som brukes til å lage mange kopier av et spesifikt område på DNA. Ved bruk av temperatursykluser i PCR kan man kontrollere reaksjoner som er temperaturavhengige til å operere i rekkefølge. I starten av en PCR syklus heves temperaturen til 95-98°C for å «smelte» det dobbeltrådige DNA til to enkeltråder, som da vil fungere som templat i neste steg. Videre senkes temperaturen til 55-60°C slik at primere (små, syntetiske enkeltråd-fragment spesifikke til området på DNA hvor kopieringen starter) hybridiserer til enkeltrådene. Deretter økes temperaturen til det som er optimalt for DNA polymerasen, ofte 72°C, som vil starte å lage kopier av enkeltråden fra der primeren på forhånd har hybridisert. De nye trådene blir syntetisert av DNA polymerasen fra enkelt nukleotider tilsatt reaksjonsmiksen, og vil igjen fungere som templat når syklusen starter på nytt fra begynnelsen. Dobblingen av templat etter hver syklus fører til en eksponentiell vekst av amplikonet (den amplifiserte sekvensen), og antall kopier generert er avhengig av antall sykluser i programmet. Etter siste syklus blir det lagt til en forlenget elongering der temperaturen heves til 72°C og holdes i 5-15 min for å sørge for at alle kopier av enkeltrådene blir fullført. Størrelsen man gir proben i helkropp ISH avhenger av hvor sterkt man forventer at målgenet er uttrykt. En lang probe har flere DIG-molekyler festet på seg og vil bli synlig ved fremkalling selv om genet er lavt uttrykt.

Primerene ble laget med promotorsekvenser til T7 og T3 RNA polymerase festet til henholdsvis antisense- og sense-primerene, som resulterte i at promotorsekvensen ble inkorporert i PCR produktet (tabell 3,2). Til PCR reaksjonen ble det benyttet Advantage® 2 polymerase, en type «proof reading»-polymerase enzym som er mer presist på den måten at det sjeldent setter inn feil base og i tillegg gir høyt utbytte (tabell 3.1).

Tabell 3.1: PCR program (a) og reaksjonsmiks (b) til amplifikasjon av probetemplat.

Temp.	Varighet	Komponent	Volum (µl)
95°C	3 min	Advantage 2 buffer (10x)	5,0
95°C	30 sek	dNTP (10 mM)	1,0
55°C	x35 30 sek	Fremover primer (T3) (10 uM)	1,5
68°C	1 min	Revers primer (T7) (10 uM)	1,5
68°C	10 min	Plasmid templat (10 ng/ul)	2
4°C	∞	Advantage 2 Polymerase (50x)	1
		Nukleasefritt H ₂ O	38
		Totalt	50

PCR produktet (50 ul) av *gmahr2a* (1026 bp), *gmahr1a* (770 bp) og *cyp1a* (841 bp) ble kjørt på 0,8-1% agarose gel i 0,5xTBE buffer for å undersøke størrelsen på fragmentet.

Tabell 3.2: Primersekvenser til PCR av probetemplat. Promotorsekvensene til T7- og T3-polymerasene er markert med fet skrift på henholdsvis antisense- og sense-tråden. Fr=Fremover, Re=Revers.

Gen	Tråd		Primersekvens (5'-3')
<i>gmahr1a</i>	Sense	Fr (T3)	CATTAACCCTCACTAAAGGGAAC AGTCCAACCACCCCATTCTGGATT
	Antisense	Re (T7)	TAATACGACTCACTATAGGGG GCTGAGATGCTGCTGCATCTGCT
<i>gmahr2a</i>	Sense	Fr (T3)	CATTAACCCTCACTAAAGGGAAT TGGACCAGGTGTTTCATGGAGAGC
	Antisense	Re (T7)	TAATACGACTCACTATAGGGC ATCTGGTTGGAGAGCATCTGGTTGGA
<i>cyp1a</i>	Sense	Fr (T3)	CATTAACCCTCACTAAAGGGA AATCACCGTGTGTCTGATCTA
	Antisense	Re (T7)	TAATACGACTCACTATAGGG GCTGGATGTTGGAGTTCTCATC

3.3.2 Rensing av PCR-produkt fra agarosegel

PCR-produktet til *gmahr1a*, *gmahr2a* og *cyp1a* ble isolert fra agarosegel ved å rense det med NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit fra Macherey-Nagel. Produktet ble kuttet ut av gelen ved bruk av skalpell mens gelen ble UV-belyst på en Chromato-VUE Transilluminator Modell TM-20 som viste plasseringen av DNA fragmentet i gelen. Gel-biten ble overført til eppendorfrør og veid. Det ble videre tilsatt NTI buffer til eppendorfrøret med forholdet 200 µl NTI buffer pr. 100 µg gelbit. Rørene ble så lagt i 50°C vannbad i 10 min og ristet hvert 3 min for å løse opp gel-biten fullstendig. Løsningen med PCR-produktet ble deretter overført til NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column og sentrifugert på 11000g i 30 sek for å filtrere PCR produktet ut av løsningen. Filteret ble videre vasket ved å tilsette 700 µl NT3 buffer og sentrifugere på nytt ved 11000g i 30 sek. Denne vaskeprosedyren ble gjennomført to ganger. Filterrørene ble sentrifugert på nytt ved 11000g i 1 min, og inkubert i 5 min ved 65°C for å fjerne gjenværende etanolrester. Deretter ble filterrørene satt ned i nye eppendorfrør, tilsatt 20 µl NE buffer og inkubert ved RT i 1 min, og videre sentrifugert ved 11000g i 1 min. Det siste steget ble gjentatt for å øke produktkonsentrasjonen. Kvaliteten på det rensede produktet ble kontrollert spektrofotometrisk med NanoDrop og agarose gelelektroforese.

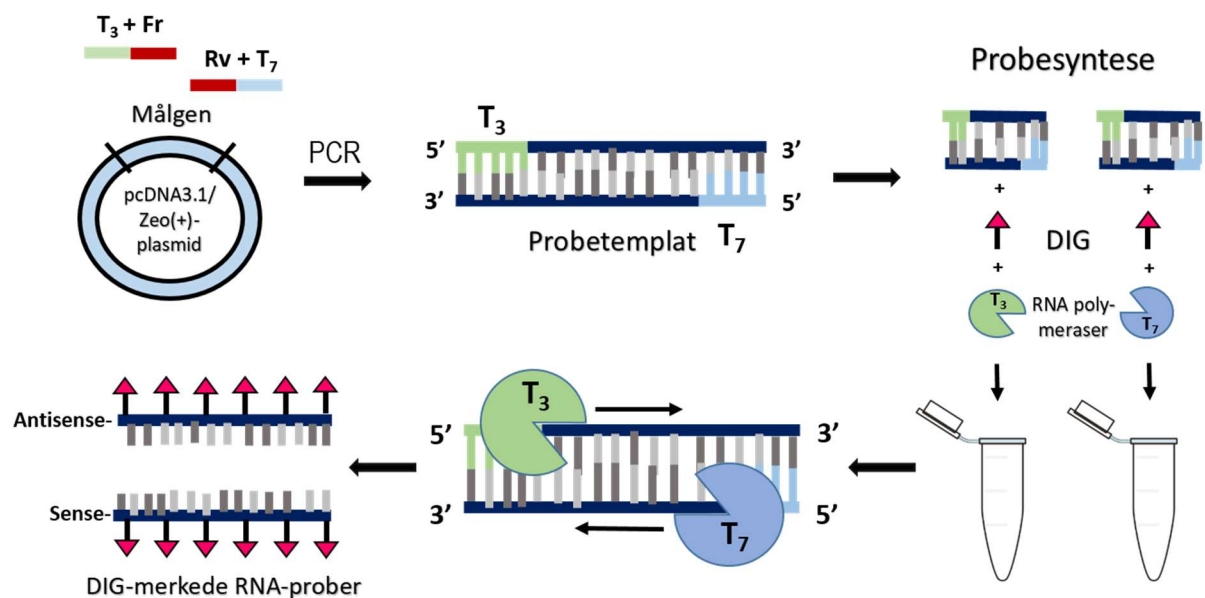
3.3.3 Probesyntese

Det ble brukt 100 ng PCR produkt fra genene *gmahr1a*, *gmahr2a* og *cyp1a*. For hvert gen ble det laget en antisense-probe med T7 RNA polymerase og en sense-probe med T3 RNA polymerase.

Tabell 3.3: Reaksjonsmiks til probesyntese.

Komponent	Volum (µl)
100 ng templat i H ₂ O	3
10x Transkripsjonsbuffer	0,5
DTT (0,1 M)	0,5
DIG – RNA labelling mix (10x)	0,5
RNAsein Plus RNase Inhibitor(40 U/ul)	0,25
T3(sense)/T7(antisense) polymerase	0,25
Totalt	5

Det ble laget en mastermiks bestående av transkripsjonsbuffer, DTT og DIG-RNA merkingsmiks. RNAsein, templat og T3 polymerase eller T7 polymerase ble tilsatt PCR rør med mastermiksen. T7-polymerase ble tilsatt rør med antisense-templat, og T3-polymerase til rør med sense-templat. Med alle probene utgjorde det til slutt 6 reaksjoner/rør (tabell 3.3) (fig. 3.3). RNA probesyntesen ble kjørt i 3-4 timer ved 37°C. Reaksjonen ble stoppet ved å tilsette 0,5 µl sterilt 0,5 M EDTA blandet med 4,5 µl nukleasefritt H₂O.



Figur 3.3: Skjematisk beskrivelse av probesyntese og DIG-merking av prober. DIG-merkede RNA-prober ble produsert av PCR-amplifisert templat fra målgenet som på forhånd var innsatt i pcDNA3.1/Zeo(+)-plasmid. Til å amplifisere templatsekvensen fra plasmidet ble det benyttet fremover (Fr) og revers (Rv)-primere med henholdsvis T₇- og T₃-promotorsekvenser lagt til i 5'ende. Promotorene blir innsatt i probetemplatet etter PCR, hvor T₇ inkorporeres på antisensetråden og T₃ på sensetråden. Videre tilsettes templat, DIG, RNA polymeraser (og andre komponenter ikke vist i figuren, se tabell 3,3) til reaksjonen. Det blir laget to reaksjonsmikser for hvert målgen, en miks med T₇-RNA polymerase, og en med T₃-RNA polymerase. I reaksjonen blir probetemplatet transkribert og en RNA-tråd produseres hvor DIG-molekyler fester seg til fosfatryggraden på produktet. Blandingen inkuberes ved 37°C i 3-4 timer, deretter oppbevares den på -80°C klart til bruk.

Proben ble undersøkt med gelelektroforese med bruk av RNase-fri 1% agarose gel laget med 0,5xTBE buffer. 1 ul probe ble tilsatt 9 ul nukleasefritt H₂O og 2 ul 10x loading buffer, inkubert i 5 min ved 65°C, og deretter ble blandingen tilsatt agarosegelen og kjørt med 90 V i 45 min.

tRNA presipitering

tRNA presipitering blir brukt til å fjerne komponenter fra probemiksen slik at det som kun gjenstår er probe. tRNA er her en inert forbindelse som blir brukt som ko-presipitator for å øke utbytte av proben etter presipiteringen. For tRNA-presipitering av probemiksen ble følgende komponenter tilsatt i rekkefølgen oppgitt i tabell 3.4

Tabell 2.4: tRNA presipitering.

Komponent	Volum (µl)
1. LiCl (4 M)	0,95
2. tRNA (1 µg/µl)	2,57
3. EtOH (100%)	28,5

Etter tilsetning reaksjonsmiksen blandet med en vortekser før inkubering i -80°C over natten. Videre ble blandingen sentrifugert på 13200g i 20 min ved 4°C. Pelleten som blir dannet ble vasket i 200 µl 70% EtOH, lufttørket ved RT og deretter løst i 20 µl nukleasefritt H₂O. Probene ble lagret på -80°C.

3.3.4 Forhåndsbehandling av egg og larve

Alle behandlinger i dette steget blir utført mens 24-brønns NUNC-platen ble ristet på en Mini-Shaker fra BioSan (fire graders styrke). I tillegg, for å hindre nedbrytning av RNA av RNAase, ble alt utstyr på forhånd behandlet med RNAzap.

Eggene og larvene ble overført med en glasspipette fra metanolløsning til eppendorfrør med filter i bunnen som ble plassert øverst i en 24 brønns NUNC-plate. Den første behandlingen er re-hydrering i gradvis lavere konsentrasjoner av metanol blandet i DEPC H₂O: 70%, 50% og 30%, 5 min nedsenket i hver metanolløsning. Deretter vask 2x5 min i PBS før fiksering i 4% paraformaldehyd (4% PFA) i 20 min.

Dekorionering

Etter fikseringen dekorioneres eggene, dvs. at eggeskallet fjernes slik at alle videre behandlinger vil være i direkte kontakt med embryo. Eggene legges i PBS buffer i en petriskål og korion fjernes fra eggene ved hjelp av to sprøytespisser mens man observerer eggene igjennom et mikroskop.

Videre blir embryo behandlet med blekemiddel (tabell 3.5) for å fjerne pigmenter som kan maskere fremkallingen av proben. Behandlingen varte 10 min for eggene og 45 min for larvene. Bleking av torskeembryo og larve ble gjennomført som beskrevet i Valen *et al.*, 2014.

Tabell 3.5: Blekemiddel

Komponent	Volum
KOH (0,5%) i DEPC H ₂ O	5 ml
H ₂ O ₂ (3%) i DEPC H ₂ O	5 ml
Totalt	10 ml

Embryo ble videre vasket i 1x 5min i PBS og 4x 5 min i PBStw, og deretter behandlet med Proteinase K (Kat. Nr. P2308, Sigma Aldrich) (tabell 3.6).

Tabell 3.6: Proteinase K behandling

Komponent	Volum
Proteinase K Buffer (0.1 M Tris pH 8.0 and 0.05 M EDTA pH 8.0)	10 ml
Proteinase K (10 ug/ml)	50 ul
Totalt	10 ml

Embryoene ble vasket kort i PBStw før fiksering i 4% PFA i 20 min. Til slutt blir embryoene vasket 4x 5 min i PBStw.

3.3.5 Hybridisering

Embryoene ble overført til 2,0 ml eppendorfrør og inkubert i 1 time ved 65°C i pre-hybridiseringsbuffer (Hyb-) (som i tabell 3.7, men uten probe). Deretter ble Hyb- erstattet med hybridiseringsbuffer inkludert probe (Hyb+), og embryoene ble inkubert over natten ved 65°C. Alle påfølgende steg er identisk for antisense- og sense-RNA probe.

Tabell 3.7: Hybridiseringsbuffer (Hyb+)

Komponent	Volum
TEN buffer	36 µl
Formamid (100%)	250 µl
50% dextran sulfat	100 µl
Tween 20	1 µl
Blocking solution (10%)	50 µl
DEPC H ₂ O	62 µl
Probe	1 µl
Total	500 µl

Etter hybridisering ble embryoene overført tilbake til halve eppendorfrør med filter i bunnen og plassert i 2xSSCTw løsning. Overføring av egg fra Hyb- til Hyb+, og fra Hyb+ til 2SSCTw ble gjort med en spatel, mens larvene ble overført ved bruk av glasspipette. Videre ble embryoene vasket i 50% formamid i 2x SSCTw i 2x15 min, deretter 1x30 min, 2x15 min i 2xSSCTw uten formamid, og til slutt 2x15 min i 0,2x SSCTw. Alle vaskestegene post-hybridisering ble utført ved 65°C.

RNase behandling

Embryoene ble videre behandlet med RNase for å fjerne RNA som ikke har hybridisert spesifikt med proben. Behandlingen varte i 30 min med 0,02 mg/RNase A (Kat. Nr. R4875, Sigma) i RNase buffer (tabell 3,8) ved 37°C. Etter behandling ble embryoene overført til RNase buffer uten enzym og inkubert ved 65°C i 30 min.

Tabell 3.8: RNasebuffer

Komponent	Volum
RNase A buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.5 M NaCl)	10 ml
RNase A (0,02 mg/ml)	50 µl
Total	10 ml

3.3.6 Immunohistokjemisk deteksjon

For å forberede til antistoffbehandling ble embryoene vasket i 2 timer i 2xSSC, 0,05% Triton X-100 og 2% blokkeringsløsning. Deretter 2x5 min i 2xSSC før embryoene ble inkubert over natten i Anti-DIG løsning bestående av anti-digoxigenin-alkalisk fosfatase FAB (anti-DIG FAB)-

fragment (1:2000) løst i 2xSSC, 1% blokkeringsløsning og 0,3% Triton X-100 (tabell 3.9) ved romtemperatur.

Tabell 3.9: Anti-DIG løsning

Komponent	Volum
20xSSC	100 µl
Blocking reagent (1%)	100 µl
Triton X-100 (0,3%)	30 µl
FAB-fragment DIG alkalisk-phosphate	5 µl
ddH ₂ O	9,8 ml
Total	10 ml

Etter inkubering med Anti-DIG ble embryoene vasket i 4x20 min i 1xPBSTw, deretter 2x10 min i visualiseringsbuffer uten kromogent substrat (NBT/BCIP) (tabell 3.10). Embryoene ble så tilsatt visualiseringsbuffer med nylaget NBT/BCIP og plassert i en pappeske dekket med aluminiumsfolie for å beskytte reagensene mot lys. Innfarging ble kontrollert hvert 5 min under mikroskop.

Tabell 3.10: Visualiseringsbuffer (a) og miks av kromogent substrat (b).

a)		b)	
Komponent	Volum	Komponent	Volum
Visualiseringsbuffer (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl ₂)	10 mL	NTB	45 ul
		BCIP	35 ul
Total	10 mL		80 ul

Når innfargingen var sterk nok ble reaksjonen stoppet ved å overføre embryoene til stoppbuffer (tabell 3.11) i 3x 30 min.

Tabell 3.11: Stoppbuffer

Komponent	Volum
Stoppbuffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl)	10 ml
Total	10 ml

Embryoene ble lagret i kjøleskap ved 4°C i 70% glycerol i 1xPBS.

3.3.7 Billedtagning og behandling

Embryo og larvene ble montert til bildetaging ved å flytte de til en petriskål i en dråpe 70% glycerol. De ble holdt på plass av petriskållokket som var snudd opp ned slik at oversiden var vendt mot embryo/larven. En hul papirsirkel omkranset embryo/larven og fungerte som støtte til petriskållokket. Dette tillot å vende på embryo/larven uten å ødelegge det. Alle oversiktsbildene ble fotografert igjennom mikroskopet Leica DMBL, og alle nærbilder ble fotografert igjennom mikroskopet Leica M430, med kameraet Lumenera Infinity 3.

Bildene ble redigert, og figurene laget med programvaren Adobe Photoshop 2019 (versjon 20.0.4). Følgende justeringer ble gjort: heving av lysstyrke og kontrast, fjerning av flekker/korionbiter utenfor embryo/larve og fjerning av korion på embryo.

3.4 Kvantitativ sanntids-PCR (qPCR)

Relativ fold-uttrykk av *cyp1a*, *gmahr1a* og *gmahr2a* i torskeegg eksponert for råolje og råolje med UV-bestråling ble målt med kvantitativ sanntids-polymerasekjedereaksjon (qPCR). *Elongeringsfaktor 1 alfa (ef1a)* ble brukt som referansegen (tabell 2.13). Prøveuttaket til qPCR-analyser ble gjort i intervaller igjennom kontinuerlig eksponering av eggene i 72 timer, og ved 96 timer (5,5 dpf) (24 timer etter overføring til rent sjøvann). Hver biologiske replikat var en samling av 10 egg eller larver.

3.4.1 RNA isolering

RNA fra torskeeggene ble isolert ved bruk av Trizol reagens (Thermo Fisher). Eggene var lagret ved -80°C fram til isolering.

Mens de ble holdt på tørris, ble hvert rør tilsatt 500 µl Trizol reagens, som hindrer nedbrytning av RNA. Rørene ble videre fjernet fra tørris, og eggene sammen med Trizol reagens ble overført til homogeniseringsrør. Homogeniseringsrørene ble på forhånd tilsatt tre stk 2,8 mm Zirconium oksid kuler hver, og homogenisert med en Precellys 24 vevshomogenisator fra Bertin Instruments. Deretter ble 100 µl kloroform tilsatt og prøvene ble sentrifugert med Himac CT1 15RE VMR® ved 12000g i 15 min. Dette separerer innholdet i tre faser med protein nederst, DNA i midten og en vannfase med RNA øverst. Vannfasen med RNA ble ekstrahert ut med en pipette og overført til et eppendorfrør på is. Eppendorfrørene ble så tilsatt 200 µl isopropanol (Thermo Fisher), og blandet med en mini vortekser fra VWR og satt på romtemperatur i 10 min for å presipitere RNA. Prøvene ble videre sentrifugert med 12000g i 10 min, dette gjør at RNA danner en pellet på bunnen av eppendorfrøret. Etter sentrifugering ble supernatanten fjernet uten å forstyrre pelleten, deretter ble 500 µl 75% etanol tilsatt og prøven blandet før ny sentrifugering med 7500g i 5 min. Etter sentrifugering ble supernatanten

fjernet og samme prosedyre gjentatt. Etter siste sentrifugering ble så mye som mulig av væsken fjernet og prøvene ble satt til lufting i 10 min før pelletene ble blandet med 20 µl nukleasefritt H₂O. For å sørge for god oppløsning av pellet ble det pipettert opp og ned gjentatte ganger, før prøvene ble satt til inkubering på 60°C i 5 min. Deretter ble de fraktet på is til lagring ved -80°C.

Kontroll av RNA kvantitet og kvalitet

Konsentrasjon og renhet til RNA ble bestemt spektrofotometrisk ved bruk av NanoDrop One (Thermo Fischer). Ved å måle lysabsorpsjonsspekteret til prøven kalkuleres RNA konsentrasjonen og renheten. Ulike molekyler som DNA, RNA, proteiner og salter absorberer lys ved forskjellig bølgelengde. Utfra lysabsorpsjonen til RNA ved 260 nm kalkuleres konsentrasjonen av RNA i prøven. Ved å måle lysabsorpsjonsratioer til RNA mot DNA (260 nm/280 nm) og RNA mot protein (260 nm/230 nm) kan renheten beregnes. En optimal 260/280 nm ratio for RNA er ~1,8-2,0, mens en optimal 260/230 nm ratio er ~2,0-2,2, og indikerer at prøvene er fri for kontaminering av henholdsvis protein og fenol. RNA prøvene ble holdt på is under analysen. Til målingen ble det brukt 1 µl av hver prøve.

DNase behandling

Etter RNA isolering ble prøvene behandlet med DNase for å forhindre feilhybridiseringer i nedstrøms analyser. Til behandlingen ble Invitrogen™ TURBO DNA-free™ kit fra Thermo Fisher benyttet. Etersom noe av prøvematerialet går tapt under behandlingen ble prøvene med RNA konsentrasjon <200 ng/µl utelatt fra behandlingen.

Prøvene ble hentet fra -80°C på is. Hver prøve ble tilsatt 1.8 µl TURBO DNA-free™ buffer, deretter 1 µl TURBO DNase (FN) enzym. Videre ble prøvene inkubert og ristet ved 37°C i 30 min. før de ble tilsatt 2 µl TURBO DNase Inactivation Reagent hver, og oppbevart i RT i 5 min. Samtidig ble miksingene av prøven og reagensen effektivisert ved å knipse lett på rørene. Deretter ble prøvene sentrifugert ved 10000g i 1,5 min. Supernatanten som ble dannet ble overført til nye eppendorfrør og satt på is. For å måle endringer i konsentrasjon og renhet i prøvene etter behandlingen ble det gjort nye NanoDrop-analyser.

Kontroll av RNA integritet

Integriteten til RNA ble bestemt ved agarose gelelektroforese. I denne metoden blir et elektrisk felt lagt over en semipermeabel gel som separerer negativt ladet RNA basert på størrelse. Gelen ble laget med Agarose low fra Sigma-Aldrich® blandet med 0,5xTBE buffer i et 1:100 forhold. Løsningen ble oppvarmet i mikrobølgeovn til agarosen var fullstendig løst i bufferen. Gelen ble videre tilsatt 1 µl GelRed 10 000x for visualisering av RNA og deretter tilsatt elektroforesekaret og latt stå i 20 min for polymerisering. 1 µl RNA ble blandet med en løsning

av formamid og 10x loading buffer (9:1) og inkubert ved 65°C i 5 min, deretter nedkjølt på is. Blandingen ble tilsatt brønnene i gelen og elektroforesen ble kjørt på 100 Volt i 40 min.

3.4.2 cDNA Syntese

Revers transkripsjon av mRNA til cDNA ble utført med iScript cDNA syntese-kit fra Bio-Rad (tabell 3,12). Til hver reaksjon ble det brukt 500 ng RNA isolert fra torskeeggene. Blandingen ble inkubert ved 65°C i 5 min for å ødelegge sekundærstruktur og linearisere RNA, deretter ble enzymet revers transkriptase tilsatt. Reaksjonen ble kjørt i en Bio-Rad T1000 ThermoCycler med følgende program: 25°C i 5 min, 46°C i 30 min, 95°C i 1 min.

Tabell 3.12: Reaksjonsmiks til cDNA syntese.

Komponenter	Volum
Nukleasefritt H ₂ O	2,5 µl
RNA (500 ng)	5 µl
5x iScript Reaksjonsmiks	2 µl
iScript Revers transkriptase	0,5 µl
Totalt:	10 µl

3.4.3 Kvantitativ-PCR (qPCR)

Til forskjell fra vanlig PCR, kan man i qPCR overvåke økningen i kopier av gentranskriptet på slutten av hver syklus. Et fluorescerende substrat som binder dobbeltrådig DNA er tilsatt reaksjonsmiksen og vil avgi lys som registreres av sensorer i en Thermocycler. En økning i lysintensitet vil på den måten bety en tilsvarende økning i gentranskript. Når lysintensiteten øker forbi det som er bakgrunnsstøy har veksten av gentranskriptet gått inn i den eksponentielle fasen. Antall sykluser som kreves for at veksten når det stadiet kalles for terskelverdien (C_q), og er inverst korrelert med den opprinnelige konsentrasjonen til templatet.

Tabell 3.13: Primersekvenser benyttet til qPCR.

Gen	F-Primer 5'-3'	R-Primer 5'-3'	Produsent
cyp1a	GCAGGAAGGAGGAGTGACGCAA	CACCAGGAGATCAAGGACAAG	Sigma
ahr1a	CAAGGGCGTCTCAAGTTCTACAT	CAGCACTATCTCCCCTTTGCATCAC	
ahr2a	ACAAACTGTCCGTGCTCCGACTTA	TCCATTGGGCCATTGTGCTTCT	Aldrich
ef1a	CATCAACATCGTGGTCATT	ATGGTTCTCTTGCAATGC	

Tilsetting og blanding av løsninger ble utført med en Sartorius Proline seriepipette fra Biohit. Fortynnet cDNA (1:20) fra torskeeggene ble tilsatt 96-brønners Hard-Shell® PCR Plates fra

Bio-Rad i triplikater, 5 µl til hver brønn. Deretter ble 5 µl av en 1 µM miks av forward og revers primer tilsatt hver brønn. Til slutt ble 10 µl av LightCycler® 480 SYBR® Green Master tilsatt til alle brønnene. Platen ble så dekket med Microseal® 'B' Seal fra Bio-Rad og sentrifugert ved 500 g i 2 min ved 4°C. Platen ble kjørt i CFX96™ Real-Time System C1000™ Thermal Cycler fra Bio-Rad med følgende program: 95°C i 5 min for å aktivere DNA polymerasen, så 95°C i 10 sek, 55°C i 15 sek, 72°C i 20 sek i 39 sykluser, deretter 95°C i 10 sek, etterfulgt av en 0,5°C/5 sek stigning fra 65°C til 95°C for å generere smeltekurve av PCR produktet (tabell 3.14).

Tabell 3.14: Programinstilling til qPCR.

Temperatur	Varighet	Komponent	Volum
95°C	5 min	cDNA templat (25 ng/ul)	5 µl
95°C	10 sek	Fremover + Revers primer (1 uM)	5 µl
55°C	15 sek	LightCycler® 480 Master 1	10 µl
72°C	20 sek		
95°C	10 sek		
65°C → 95°C	0,5°C/5 sek	Totalt	20 µl

Standardkurve

Til standardkurveanalysene ble cDNA fra 2 dpf-gruppen brukt som templat i PCR reaksjonene der hvert av genene ble amplifisert. Etter amplifisering ble PCR produktet separert med gelelektroforese i en 3% agarosegel og 0,5xTBE buffer. Produktet ble rensert fra gelen med NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit fra Macherey-Nagel som beskrevet i metode 3.3.2. Det rensede PCR produktet ble fortynt 1:1000 000 og videre seriefortynnet i PCR strips med en fortynningsfaktor på 1:5. Videre ble fortyningen brukt som templat i qPCR reaksjon for å generere standardkurve for hvert primerpar brukt i denne oppgaven.

Analyse av qPCR målinger

Relativ økning i uttrykket av *cyp1a*, *gmahr1a* og *gmahr2a* og ble beregnet ut fra terskelverdiene (Cq), og *ef1a* ble brukt som referansegen. Ettersom primerene brukt i dette forsøket har tidligere vist å ha en >90% effektivitet ble beregningen gjennomført ved bruk av $2^{-\Delta\Delta Cq}$ -metoden (Scmittgen og Livak, *et al.*, 2008). Utrekningen ble gjennomført i Excel 2013 (versjon 15.0.5127.1000).

Smeltekurveanalyse

For å undersøke at det ikke har blitt dannet uspesifikke produkter eller støy fra «primer-dimers» ble det gjort en smeltekurveanalyse. Etter amplifikasjonen i temperatursyklussene ble

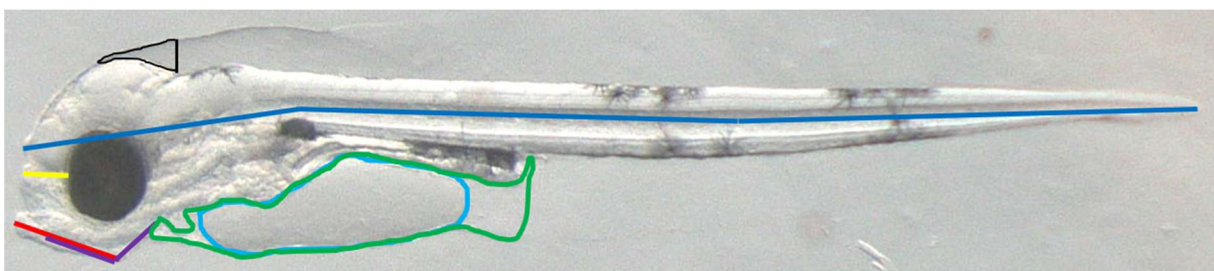
produktet gradvis oppvarmet fra 65°C til 95°C med en rate på 0,5°C/5 sek. Dette medfører at DNA fragmentene i reaksjonsmiksen vil denatureres langsomt med den stigende temperaturen. Samtidig måles fluorescensen fra reaksjonsmiksen som plottes som mengde fluorescens på y-aksen og temperatur på x-aksen. Har kurven som dannes kun én topp betyr det at det har blitt amplifisert ett produkt, som indikerer at primerene har amplifisert et spesifikt produkt. Har kurven flere toppe betyr det at det har blitt dannet uspesifikke produkter, eller produkter fra «primer-dimers» i reaksjonen.

Statistikk

Statistiske analyser ble utført i programmet Prism 7 (GraphPad). Genuttrykk fra en samling av 10 egg pr. biologisk replikat fra hvert utviklingsstadium ble analysert. Den relative endringen i uttrykk mellom kontrollgruppe og eksponert gruppe ble testet med enveis ANOVA med påfølgende post hoc Dunnet's test (endringer med p-verdi < 0,05 ble regnet som signifikant). Alle data ble log₂-transformert og kontrollert for uteliggere før analysen. For gruppen 2 dpf gikk en biologisk replikat tapt for hver behandling, og dermed kunne ikke denne gruppen analyseres som følge av for få gjenværende replikater (2 pr. gruppe).

3.5 Deformitetsanalyse av larver 3 dph

Det ble tatt bilder av levende larver 3 dph igjennom stereomikroskopet Olympus SZX-10 med et 5 megapiksel Infinity 2-5c kamera fra Lumenera. Larvene ble bedøvd i en glasspetriskål fylt med 3% methylcellulose. Bildene ble videre analysert med programmet ImageJ. Det ble målt areal av plommesekk, plommesekk med ødem, og kranial finnelapp. Lengde av hele larven, kjeven (dentale) og øye-nese-avstanden (ethmoid-platen) ble målt, i tillegg til kjevevinkel (vinkelen mellom dentale og articulare/quadrata) (fig. 2.4). Ødemarealet ble regnet ut ved å trekke fra arealet til plommesekk + ødem mot kun plommesekkarealet, for deretter å dele differansen på arealet til plommesekk + ødem.



Figur 3.4: Markeringer på torskelarve 3 dph som representerer de målte trekkene i deformitetsanalysen. Følgende målinger ble gjort med programmet ImageJ: ethmoidplate (gul), kjevelengde (rød), kjevevinkel (lilla), lengde (mørk blå), plommesekk (lys blå), plommesekkødem (grønn) og kranial finnelapp (svart).

Forekomsten av skoliose hos larver 3 dph ble estimert ved visuell vurdering av krumningen til ryggspylen. Larven ble diagnostisert med skoliose dersom krumningen ble vurdert som større enn det som ble funnet i kontroll gruppen.

Statistikk

Analysen av data fra ImageJ ble behandlet i Excel 2013 (versjon 15.0.5127.1000). Gjennomsnitt og standardavvik ble funnet for hver gruppe. Videre ble hver eksponerte gruppe sammenlignet med sin respektive kontrollgruppe ved bruk av enveis ANOVA med Dunnett post hoc-test. Alle data ble log₂-transformert og kontrollert for uteliggere før enveis ANOVA analyse. UV kontroll ble sammenlignet med kontroll. Statistiske analyser ble gjennomført i programmet Prism 7 (GraphPad).

3.6 RNA-sekvensering av torskkegg 4,5 dpf

For å undersøke nærmere hvilke reaksjonsveier som ble påvirket av råoljeeksponeringen med normal belysning ble RNA fra torskkegg 4,5 dpf sekvensert og analysert med bioinformatiske verktøy.

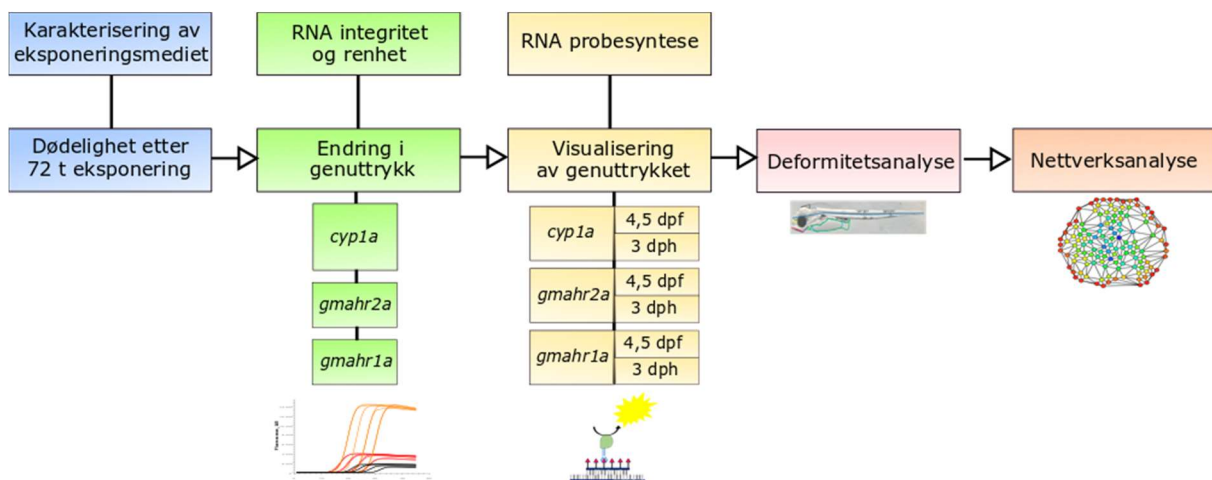
RNA ble ekstrahert fra torskkegg og DNA kontaminering ble fjernet med DNase behandling som beskrevet i metode 3.4.1. RNA-renhet og –integritet ble henholdsvis undersøkt spektrofotometrisk med NanoDrop 1000, og med agarose gelelektroforese som beskrevet i metode 3.4.1. RNA fra torskkegg eksponert for høy (600 µg/l) og lav (200 µg/l) dose råolje med normal belysning, inkludert tilhørende kontrollgrupper, ble sendt til Kjernefasilitet for genomikk-avdelingen ved UiB for sekvensering (totalt 9 prøver hvor hver prøve bestod av RNA fra en samling av 10 egg). Hver prøve inneholdt 0,5 µg RNA.

3.6.1 Nettverksanalyse av differensielt uttrykkede gener

Behandling av RNA-sekvenseringsdata ble utført som beskrevet i Yadetie *et al.*, 2018. Analyse av differensielt uttrykkede gen i eksponert gruppe sammenlignet med kontroll ble utført ved bruk av edgeR v3.18.1. Differensielt uttrykkede gener ble definert som p-verdi < 0,05, etter justering ved bruk av Benjamini-Hochberg multipl test-korreksjon (presentert som «falsk oppdagelsesrate» (FDR)). Det ble funnet humane (*Homo sapiens*) -ortologer til de sekvenserte genene fra torsk ved bruk av BioMart verktøyet i Ensembl (<https://www.ensembl.org>). Ortologene ble benyttet i nettverks- og anrikelsesanalyse utført med STRING (<https://www.string-db.org>). Kun de 1000 genene med lavest FDR-verdi ble benyttet i den endelige STRING-analysen (FDR < 0,0003). I nettverksanalysen med STRING ble anrikede reaksjonsveier med en FDR-verdi < 0,05 sett på som signifikant anrikning.

4. Resultat

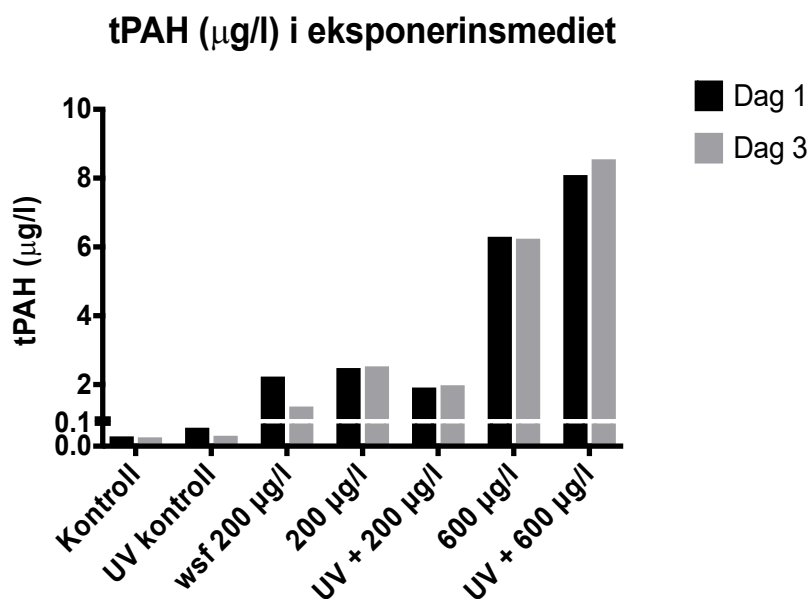
Uttrykket til *cyp1a* og transkripsjonsfaktorene *gmahr2a* og *gmahr1a* ble undersøkt kvantitativt med qPCR og kvalitativt med helkroppss ISH i tidlige livsstadier av torsk etter eksponering for råolje og råolje med UV-bestråling. Videre ble deformiteter i larver målt 3 dph, og anrikede reaksjonsveier i embryo 4,5 dpf undersøkt med nettverksanalyse. Eksponeringen varte i 72 timer fra 1,5 dpf til 4,5 dpf, og deretter ble eggene overført til rent sjøvann. Resultatene er organisert i rekkefølgen skissert i fig. 4.1.



Figur 4.1: Resultatene blir presentert i rekkefølgen vist i flytdiagrammet.

4.1 Karakterisering av eksponeringsmediet

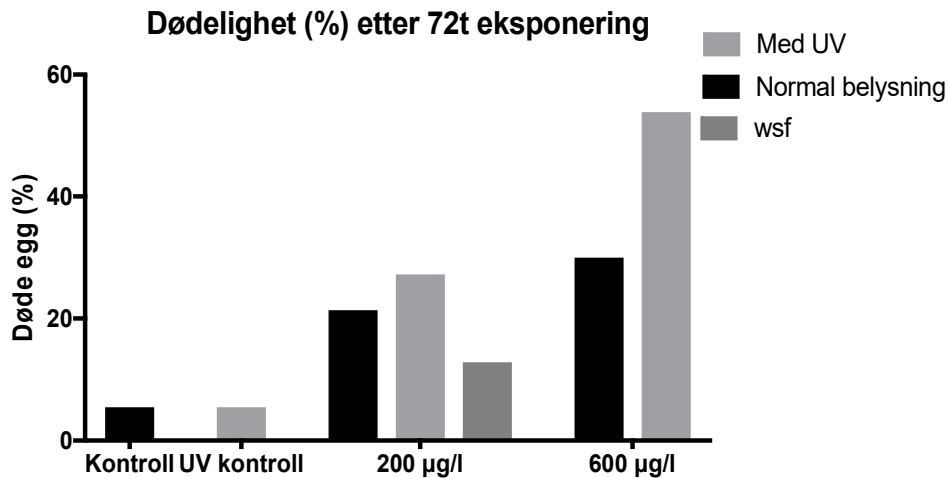
Innholdet av PAH-forbindelser i eksponeringsmediet ble bestemt med kjemiske analyser av vannprøver tatt ved start og ved slutten av eksponeringsforsøket (metode 3.2.1). Det totale innholdet av PAH-forbindelser (tPAH) i eksponeringsmediet til de ulike gruppene var i all hovedsak stabilt fra start til slutt av eksponeringen, med unntak av WSF 200 µg/l-gruppen der tPAH-innholdet ble noe redusert (fig. 4.2). I eksponeringen UV + 600 µg/l råolje er tPAH konsentrasjonen ~2 µg/l over tPAH konsentrasjonen i karet med normalt lys, både ved starten og slutten av eksponeringen. Fig. 1.1 i appendiks viser konsentrasjonen av utvalgte individuelle PAHer i eksponeringsmediet med normal- og UV-belyst 600 µg/l råolje. Denne målingen indikerer at den høye konsentrasjonen av PAH i karet med UV-belyst 600 µg/l råolje sammenlignet med normalbelyst 600 µg/l råolje kan i stor grad attribueres til forskjeller i konsentrasjoner av PAHer med lav molekylvekt, som naftalen, men forskjellen er også bevart mellom tyngre komponenter.



Figur 4.2: Summen av PAH-forbindelser (tPAH ($\mu\text{g/l}$)) i eksponeringsmedium ved starten (dag 1) og slutten (dag 3) av eksponeringen.

4.2 Dødelighet etter 72 timer eksponering

Dødeligheten økte blant torskeeggene med økende eksponeringsdose. UV-bestrålt råolje førte samtidig til en høyere dødelighet blant eksponerte egg i forhold til ubestrålt råolje, med en betydelig forskjell blant egg eksponert for den høyeste dosen råolje (fig. 4.3). I kontroll og UV-kontroll gruppen var dødeligheten lik etter 72 timer eksponering (~5%). I gruppene eksponert for 200 $\mu\text{g/l}$ råolje hadde eggene forskjellig dødelighet basert på belysning og tilstedeværelse av oljefilter: UV-belyst gruppe hadde høyest dødelighet (~28%), deretter ufiltrert råolje i normal belysning (~22%), og lavest dødelighet ble observert i gruppen med egg eksponert for 200 $\mu\text{g/l}$ filtrert råolje (~12%). I den høyeste råolje-dosen var forskjellen mellom UV-belyste egg og egg eksponert for normalt lys stor, med ~55% dødelighet blant egg eksponert for UV + 600 $\mu\text{g/l}$ sammenlignet med ~30% dødelighet blant egg eksponert for 600 $\mu\text{g/l}$ råolje i normal belysning.



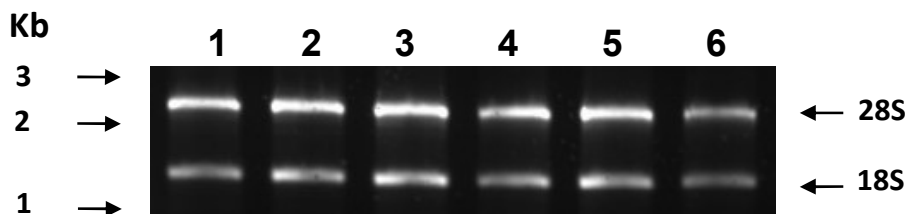
Figur 4.3: Dødelighet blant torskeeggene etter 72 timers eksponering for råolje med og uten UV-bestråling.

4.3 Kvantitativ endring i genuttrykk

qPCR ble benyttet for å undersøke hvordan eksponeringsregimene påvirket det kvantitative genuttrykket av *cyp1a*, *gmahr2a* og *gmahr1a*. Endringen i uttrykk hos de eksponerte gruppene presenteres som foldendringer kalibrert mot sine respektive kontrollgrupper (råoljeeksponert mot kontroll (egg holdt i rent sjøvann) og råolje med UV-bestråling mot UV kontroll (egg holdt i UV-bestrålt rent sjøvann)). Eksponeringen av eggene startet 1,5 dpf og avsluttet (overført til rent sjøvann) ved 4,5 dpf, og det ble gjort prøvetakninger ved 2, 2,5, 3,5, 4,5 og 5,5 dpf.

RNA-integritet og -renhet

RNA fra torskeeggene ble isolert med Trizol reagens som beskrevet i metode 3.4.1. Integriteten av RNA prøvene ble vurdert med bruk av agarose gelelektroforese (fig. 4.4).



Figur 4.4: Vurdering av RNA kvalitet med bruk av agarose gelelektroforese. Figuren viser resultatet fra et representativt utvalg av torskeegg. Pilene 28S og 18S indikerer ansamlinger av 28S og 18S subenhetene til ribosomalt RNA. RNA i figuren er fra egg som tilhører følgende eksponeringer i 2 dpf-gruppen, 1: UV kontroll, 2: 600 µg/l, 3: WSF, 4: 200 µg/l, 5: 600 µg/l, 6: UV kontroll. Kb = kilobaser.

Båndene i gelen viser distinkte bånd som korresponderer til 18S rRNA (nederst) og 28S rRNA (øverst) som indikerer lite nedbrytning i prøvene.

Kvantitet og renhet til RNA ble videre analysert ved bruk av NanoDrop ND 1000 (Thermo Fischer) som beskrevet i metode 3.4.1. Resultatet fra NanoDrop analyser av RNA fra et representativt utvalg torskkegg fra ulike eksponeringsgrupper er vist i tabell 4.1.

Tabell 4.1: RNA konsentrasjon (ng/μg) og renhet (A260/280, A260/A230) til et utvalg torskkegg fra ulike eksponeringsgrupper etter RNA isolering.

Eksponeringsgr.	ng/μl	A260/A280	A260/A230
12t – UV kontroll	252	1,92	2,01
24t – UV+600 μg/l	261	1,91	1,99
48t – UV+200 μg/l	284	1,94	1,91
48t – WSF 200 μg/l	376	1,93	2,27
72t – 200 μg/l	351	1,93	2,07
96t – 600 μg/l	424	1,94	1,63

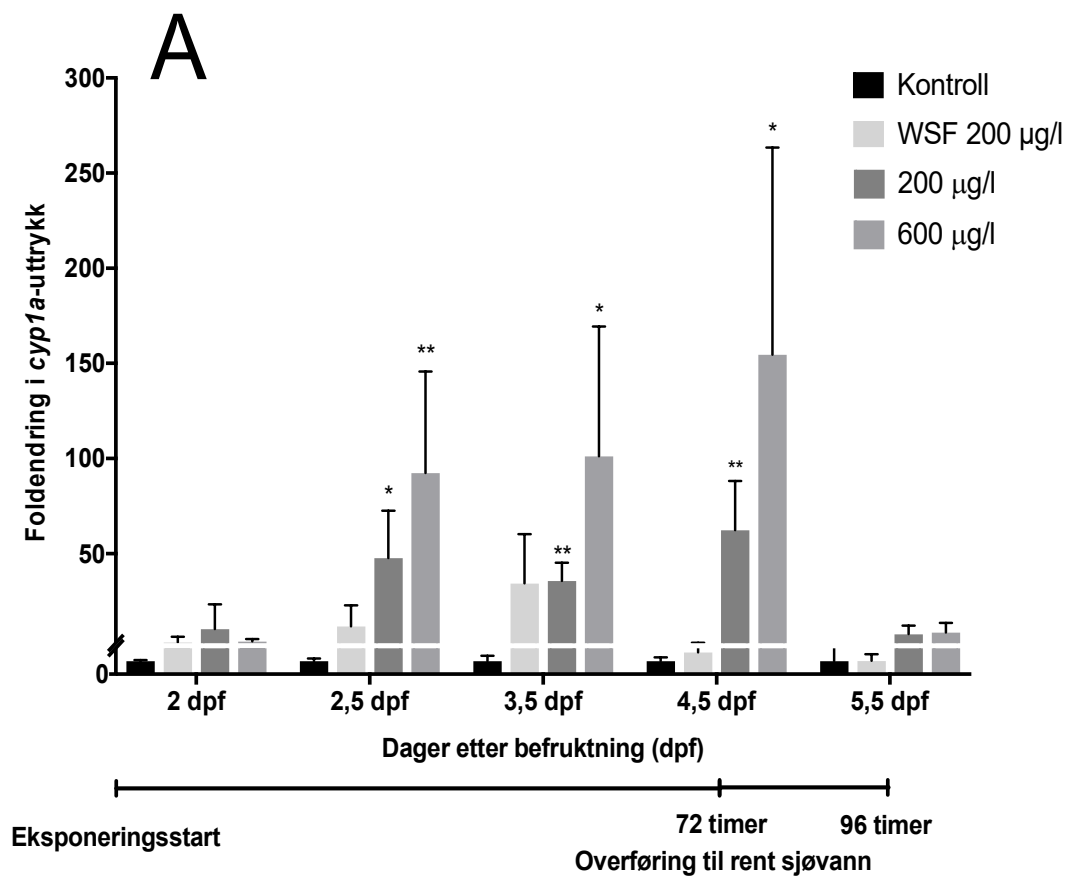
Prøvene vist i tabell 4,1 har høy, men noe varierende konsentrasjon av RNA. Samtlige A260/A280-ratioene ligger mellom 1,90-1,95, som er nær den ideelle ratioen på 2,00, og indikerer høy RNA-renhet og lav tilstedeværelse av kontaminanter som absorberer lys ved 280 nm (f. eks. proteiner). A260/A230-ratioene er jevnt over høyere enn A260/A280-ratioene, og indikerer lav tilstedeværelse av kontaminanter som absorberer lys ved 230 nm (f. eks. karbohydrater eller fenol). 96t – 600 μg/l-prøven skilte seg ut med en lavere A260/A230-ratio på 1,63.

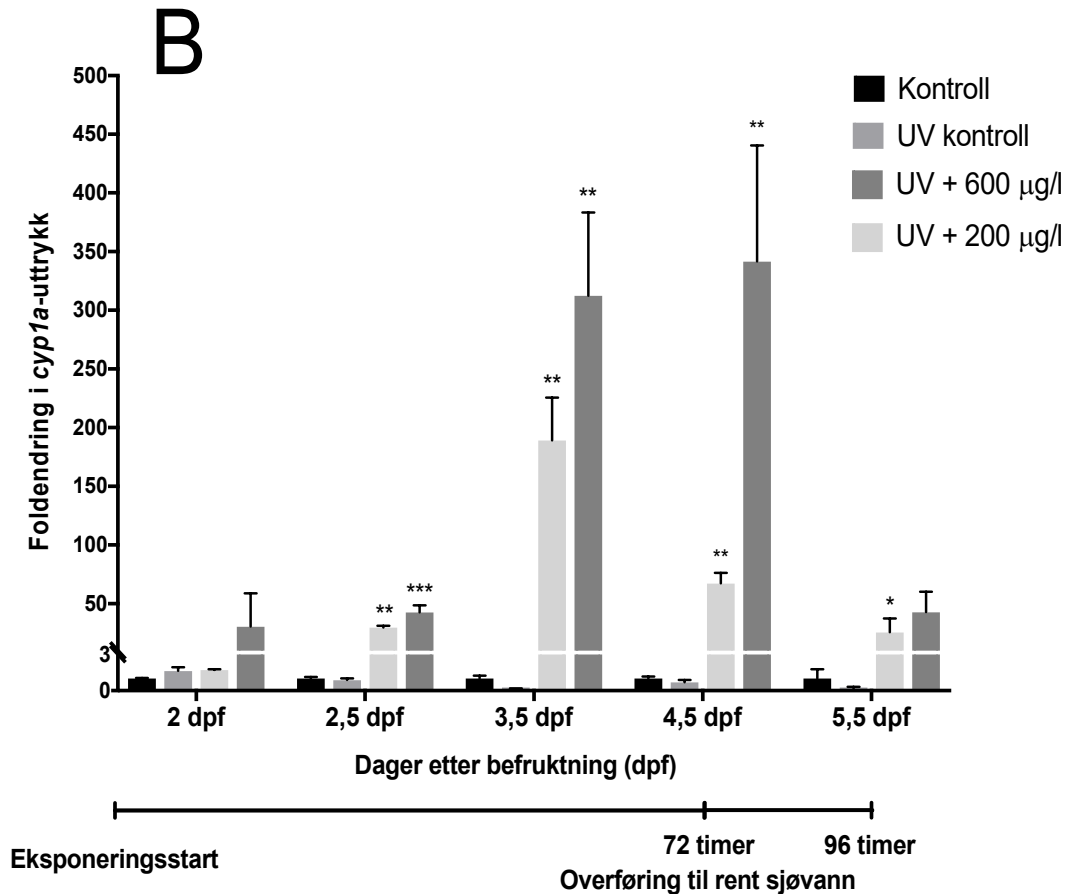
4.3 1 Endring i genuttrykk

Det relative uttrykket av genene *cyp1a*, *gmahr2a* og *gmahr1a* etter eksponering for råolje og råolje med UV-bestråling ble målt ved bruk av qPCR.

cyp1a

Eksponering for lave konsentrasjoner av råolje i normalt lys og under UV-bestråling førte til en signifikant, dose-avhengig oppregulering av *cyp1a* i torskkegg (fig. 4.5). I egg eksponert for normalt lys ser man allerede ved 2 dpf en foldøkning i *cyp1a*-uttrykk hos alle grupper (fig. 4.5 A). Tolv timer senere, ved 2,5 dpf, induseres *cyp1a* i 600 μg/l- og 200 μg/l-gruppene kraftig, med høyest induksjon i eggene eksponert for 600 μg/l. I disse gruppene holdes uttrykket jevnt 24 timer senere, ved 3,5 dpf, og får en svak økning etter 4,5 dpf. Etter eggene er fjernet fra eksponeringsmediet synker uttrykket til kontrollverdier 5,5 dpf. I eggene eksponert for filtrert 200 μg/l råolje (WSF) kommer fold-økningen senere enn i sin tilsvarende ufiltrerte gruppe, men etter 48 timer eksponering (3,5 dpf) er uttrykket kommet på nivå med den ufiltrerte råolje eksponeringen.





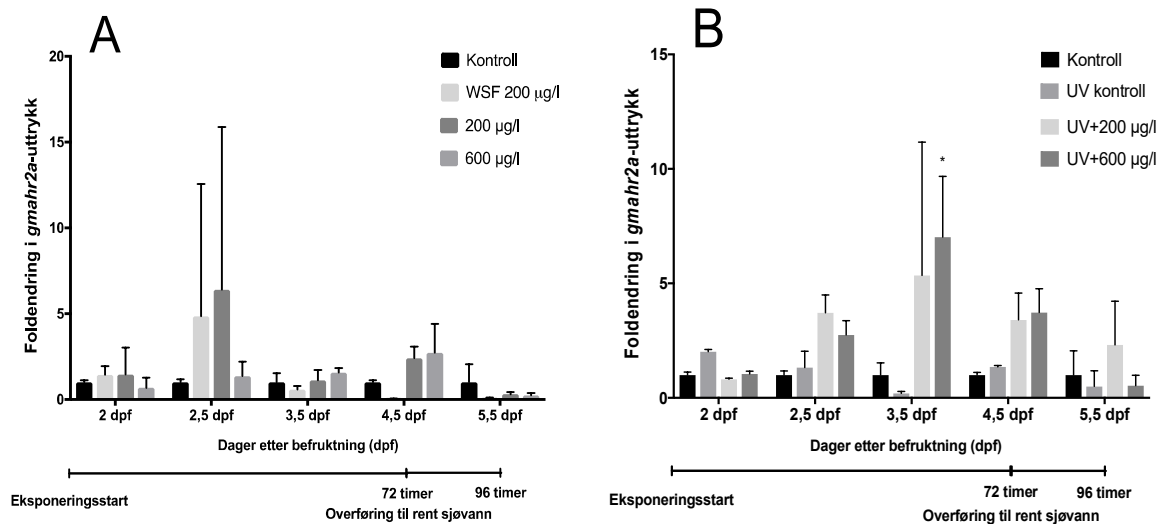
Figur 4.5: Endring i *cyp1a*-uttrykk som følge av eksponering for råolje (A) og råolje med UV-bestråling (B) ved fem tidspunkt etter befruktning: 2, 2,5, 3,5, 4,5 og 5,5 dpf. Eggene ble eksponert for to konsentrasjoner råolje, 600 og 200 µg/l (A og B), i tillegg ble en gruppe eksponert for filtrert 200 µg/l råolje (WSF) (A). Foldendringene ved 2 dpf er et gjennomsnitt av to biologiske replikater (A og B). Statistisk signifikante endringer er markert med stjerner (p -verdi < 0,05), variasjonen er oppgitt som standardavvik (SD).

I eggene behandlet med råolje + UV-bestråling finner man en kraftig økning i *cyp1a*-uttrykk etter 48 timers eksponering (3,5 dpf), både i den høyeste (600 µg/l) og nest høyeste (200 µg/l) råoljekonsentrasjonen, med sterkest økning i 600 µg/l-gruppen (fig 4.5 B). I denne gruppen holdes uttrykket høyt også ved 4,5 dpf, mens i 200 µg/l gruppen halveres uttrykket. Ved 5,5 dpf, 24 timer etter eggene er tatt ut av eksponeringsmediet har *cyp1a*-uttrykket sunket i begge eksponeringsgruppene, med en sterk nedgang i egg fra den høyeste råoljekonsentrasjonen.

Ved sammenligning av *cyp1a*-uttrykning i torskeegg holdt under normalt lys og egg holdt under UV-lys ser man en mer enn dobbelt så kraftig *cyp1a*-induksjon i egg holdt under UV etter 48 timers eksponering (3,5 dpf), både hos egg eksponert for 600 µg/l og 200 µg/l råolje. I den nest høyeste eksponeringen faller uttrykket av *cyp1a* i UV-bestrålte egg ved 4,5 dpf, mens i normalt lys er uttrykket stabilt. Etter 96 timer (5,5 dpf) er uttrykket høyere i UV bestrålte egg enn i egg holdt under normalt lys.

gmahr2a

I egg eksponert for den høyeste konsentrasjonen (600 µg/l) råolje under normalt lys er *gmahr2a* uttrykt på likt nivå som i kontroll-egg ved 2, 2,5 og 3,5 dpf (fig. 4.6). I den nest høyeste eksponeringen (200 µg/l) finner man likt uttrykksmønster, sett bort fra ved 2,5 dpf der en av replikatene viste en høy oppregulering av *gmahr2a*. Hos egg eksponert for 200 µg/l filtrert råolje (WSF) følger *gmahr2a* uttrykket til den tilsvarende ufiltrerte gruppen. Etter overføring til rent sjøvann ser man en nedregulering av *gmahr2a* i alle eksponeringsgruppene, 5,5 dpf.

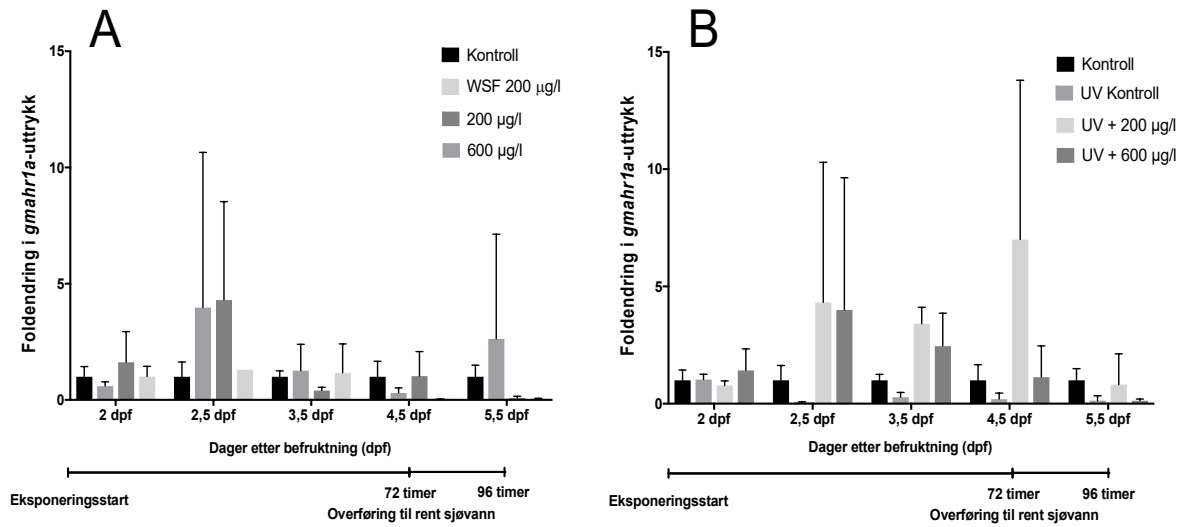


Figur 3.6: Foldendring i *gmahr2a*-uttrykk i torsk egg eksponert for råolje (A) og råolje med UV-bestråling (B). Eggene ble eksponert for to konsentrasjoner råolje, 600 og 200 µg/l (A og B), i tillegg ble en gruppe eksponert for filtrert 200 µg/l råolje (WSF) (A). Foldendringene ved 2,5 dpf er et gjennomsnitt av to biologiske replikater. Statistisk signifikante endringer er markert med stjerne (p-verdi < 0,05), variasjonen er oppgitt som standardavvik (SD).

Uttrykket av *gmahr2a* i UV + råolje eksponerte grupper er svakt oppregulert etter 2,5, 3,5 og 4,5 dpf. Ved 2 dpf er *gmahr2a* hos UV + råolje eksponerte egg på nivå med kontroll. Etter 2,5 dpf starter uttrykket å stige i begge råoljeeksponeringene med UV, og når en topp ved 3,5 dpf før uttrykkningen synker igjen 4,5 dpf. Etter overføring til rent sjøvann nedreguleres *gmahr2a* i den høyeste eksponeringen, imens uttrykket i den laveste synker kun noe. I egg eksponert for UV-belyst rent sjøvann er *gmahr2a* oppregulert til om lag det dobbelte av kontroll 2 dpf, ved 4,5 og 5,5 dpf er uttrykket i denne gruppen svakt nedregulert.

gmahr1a

Uttrykket av *gmahr1a* viste ingen signifikante endringer i noen av de eksponerte gruppene sammenlignet med kontrollgruppen. Det var i tillegg høy variasjon i *gmahr1a* uttrykk mellom eksponeringsgruppene, og mellom utviklingsstadium (fig. 4.7 A og B). Generelt var uttrykket lavt, ofte under kontroll-verdier, mens det i enkelte prøver ble påvist ekspresjon opp til 7-10 folds over kontroll. Det ble ikke observert et dose-respons-forhold i eksponering for verken råolje eller råolje med UV-bestråling.



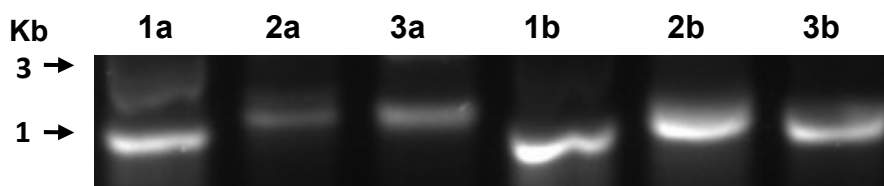
Figur 4.7: Foldendring av gmahr1a-mRNA i torskeegg eksponert for råolje (A) og råolje med UV-bestråling (B). Eggene ble eksponert for to konsentrasjoner råolje, 600 og 200 µg/l (A og B), i tillegg ble en gruppe eksponert for filtrert 200 µg/l råolje (WSF) (A). Foldendringene ved 2 dpf er et gjennomsnitt av to biologiske replikater. Signifikante målinger er markert med stjerne (p -verdi $< 0,05$), variasjonen er oppgitt som standardavvik (SD).

4.4 Lokalisering av genuttrykk med helkroppss ISH

Helkroppss ISH ble benyttet for å lokalisere uttrykket til genene *cyp1a*, *gmahr2a* og *gmahr1a* i torskeembryo og -larve 3 dph etter eksponering i 72 timer for høy dose råolje (600 µg/l) med UV-bestråling. Med unntak av visualiseringen av *cyp1a*-uttrykk i larver 3 dph hvor det ble benyttet larver eksponert for 600 µg/l råolje under normal belysning. Antall replikater av embryo og larver benyttet i visualisering av genuttrykket varierer mellom eksponeringsgruppene som følge av begrenset datamateriale og tap av vev under ISH-behandling.

4.4.1 RNA probesyntese

Fra hvert gen som ble undersøkt ble det laget en antisense- og en sense-RNA probe. Templatet ble amplifisert med hjelp av PCR, som videre ble brukt til å syntetisere probene. Resultatet av probesyntesen ble kontrollert med agarose gelelektroforese (fig. 4.8). Probene migrerte i gelen etter forventet størrelse: *gmahr1a* (777 bp), *gmahr2a* (1026 bp) og *cyp1a* (841 bp). Som forventet migrerte antisense- og sense-proben for hvert gen like langt i gelen. I kolonnen med *gmahr1a* (indikert som 1a i fig. 4.8) synes to bånd. Det øverste båndet antas å være supertvunnet-mRNA som ikke har blitt fullstendig denaturert i forvarmingen av proben og migrerer derfor i gelen med en annen hastighet.

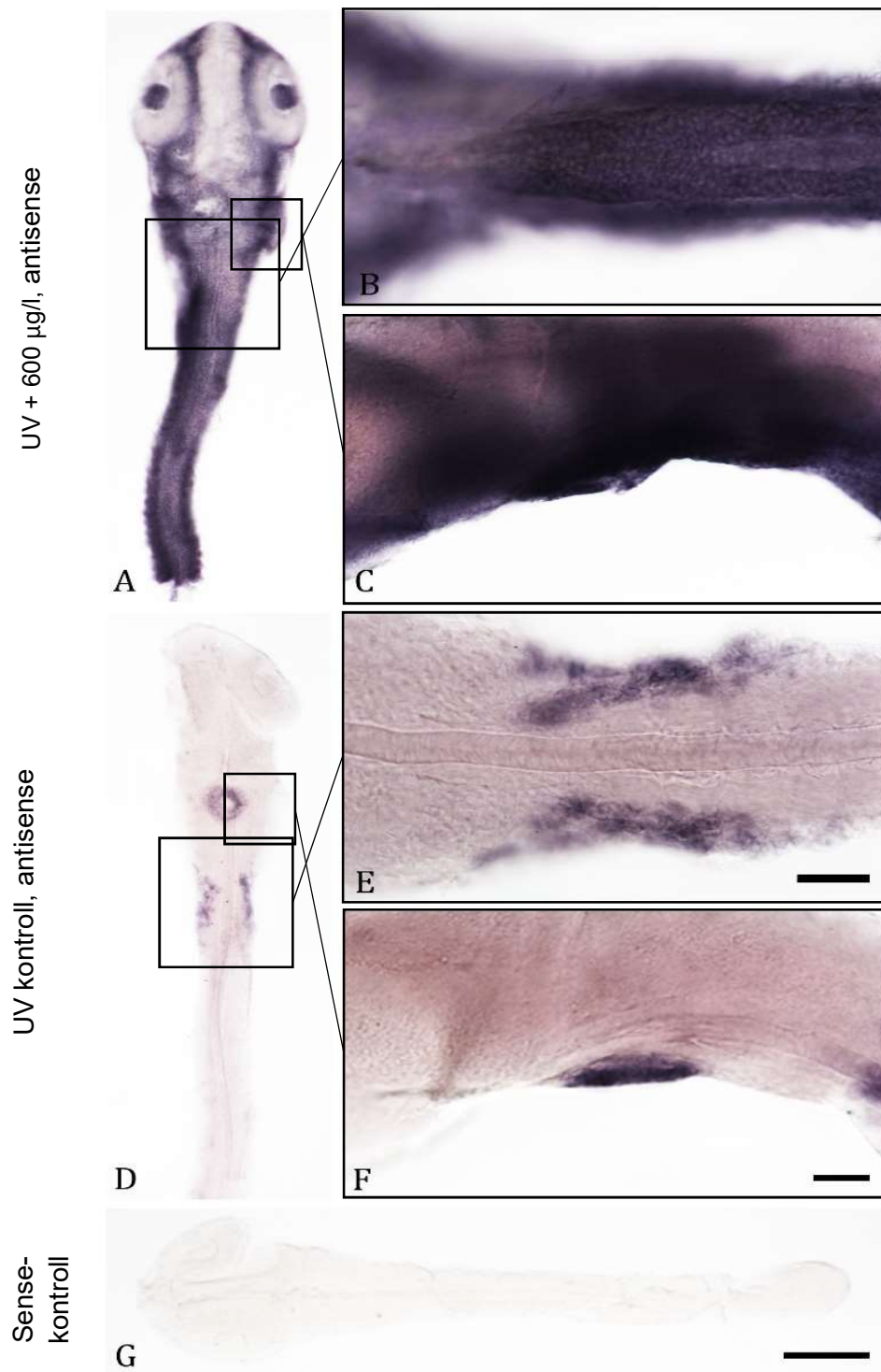


Figur 4.8: Agarose gelelektroforese av syntetiserte prober for *gmahr1a* (1), *gmahr2a* (2) og *cyp1a* (3), både antisense (a) og sense (b) -probe. Probene ble visualisert i gelen ved bruk av farging med GelRed. Kb = kilobaser.

4.4.2 Visualisering av genuttrykk av *gmahr1a*, *gmahr2a* og *cyp1a* i embryo og larve

Torskeembryoene ble dekorionert og plommesekk fjernet før probehybridisering. Behandlingstiden med kromogent substrat var ulikt for hvert gen, der *cyp1a* ble behandlet kortest ettersom genet var kraftig uttrykt og gav raskt signal. For både *gmahr2a* og *gmahr1a* tok behandlingen lengre tid som følge av at genene er lavt uttrykt. Vev behandlet med antisense- og tilsvarende sense-RNA probe ble fjernet fra behandlingen etter lik hybridiseringstid. Resultatene fra visualiseringen blir presentert som sammensettinger av bilder hvor det fokuseres på ulike organ. Hvilke organ som ble prioritert var avhengig av hvor det ble funnet sterkest oppregulering og hvor det tidligere har blitt funnet uttrykk av de samme genene i andre arter.

cyp1a
4,5 dpf

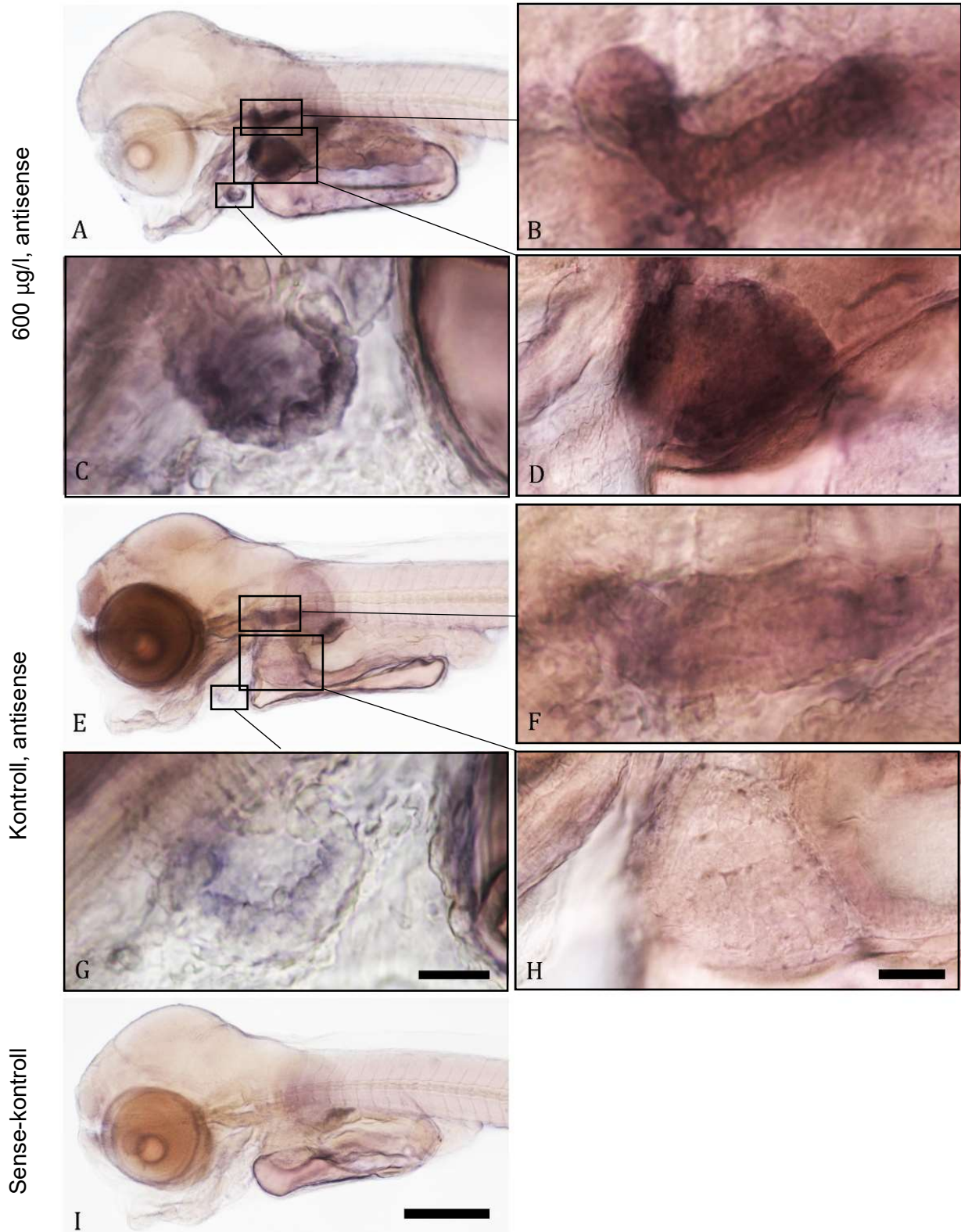


Figur 4.9: Uttrykk av *cyp1a*-mRNA i torskembryo etter 72 timer eksponering for 600 µg/l råolje med UV-bestråling (A-C) sammenlignet med UV kontroll (D-F) og sense-kontroll (G). A, D og G viser hele embryo sett fra dorsal vinkel. B og E viser midtre del av embryo fra dorsal vinkel. C og F viser hjerteregionen sett fra lateral vinkel. Målestokk A, D, G: 0,5 mm. Målestokk B, E, F, C: 50 µm. N=3.

Etter 72 timers eksponering for lave konsentrasjoner råolje med UV-bestråling ble *cyp1a* kraftig oppregulert i epidermis, linsen og i den ytterste delen av retina i torskeembryo 4,5 dpf (fig. 4.9, A-C). Uttrykket i epidermis var lokalisert over hele embryo, med unntak av områder i hoderegionen. I tillegg var uttrykk fraværende i de innerste $\frac{3}{4}$ -delene av retina i øyet. I epidermis var oppreguleringen kraftigst langs ryggsøylen (fig. 4.9. B). Uttrykket i hjertet kunne ikke skilles fra oppreguleringen i omkringliggende epidermis (fig. 4.9. C). I embryo eksponert for UV-lys i rent sjøvann (UV-kontroll) var uttrykket betydelig lavere, men likevel sterkt i avgrensede områder. *Cyp1a* ble funnet oppregulert i hjerteprimordiet, som synes som en ringformasjon i fig. 4.9. D, og i to lateralmotsatte ansamlinger i somittene langs ryggsøylen i området hvor notokorden blir til medulla oblongata (fig. 4.9. E). Det ble ikke funnet innmerkning i embryo behandlet med sense-RNA probe (fig. 4.9. C).

3 dph

I torskelarver 3 dph eksponert for 600 µg/l råolje på eggstadiet ble det funnet en høyere vedvarende oppregulering av *cyp1a* i spesifikke organ (fig. 4.10. A-D) sammenlignet med kontroll (fig. 4.10. E-H). I eksponert larve kan uttrykk av *cyp1a*-transkript synes i endoteliet til torskehjertet (fig. 4.10. C), i otisk plakode (fig. 3.10 B), og i lever (fig. 4.10 D). I kontroll-larve ble et konstitutivt *cyp1a*-uttrykk lokalisert i endotelium til hjertet (fig. 4.10. G), i den otiske plakoden (fig. 4.10. F), men ikke i lever (fig. 4.10. H). I kontroll-larven ble også noe *cyp1a*-uttrykk lokalisert helt kranialt i området hvor lukteorganet, brystfennene og gjellene utvikles (fig. 4.10 E). Øynene til kontroll-larven har et høyere pigmentinnhold sammenlignet med eksponert og sense-kontroll, som gjør lokalisering av uttrykk problematisk i dette området. Fargingen i dette området er dermed ikke som følge av tilstedeværelse av *cyp1a*-transkript, men pigment. I sense-kontroll ble det funnet noe innmerkning i brystfennene og i området ved lukteorganet. (fig. 4.10. I).



Figur 4.10: Visualisering av *cyp1a*-transkript i torskelarver 3 dph etter råoljeeksponering på eggstadiet (A, B, C, D), sammenlignet med kontroll (E, F, G, H) og sense-kontroll (I). A, E og I viser innmerkning fra proben i fremre del av larven, sett fra lateral vinkel. C og G viser nærbilde av hjertet. D og H viser området hvor lever utvikles. B og F viser nærbilde av området hvor otisk plakode utvikles. Som følge av ulik behandlingstid i blekingssteget har øynene til larven ulik pigmentering, pigmentnivået er høyest i kontroll-larve. Målestokk A, E, I: 0,5 mm. Målestokk B, C, F, G: 25 µm. Målestokk D, H: 50 µm. N=2

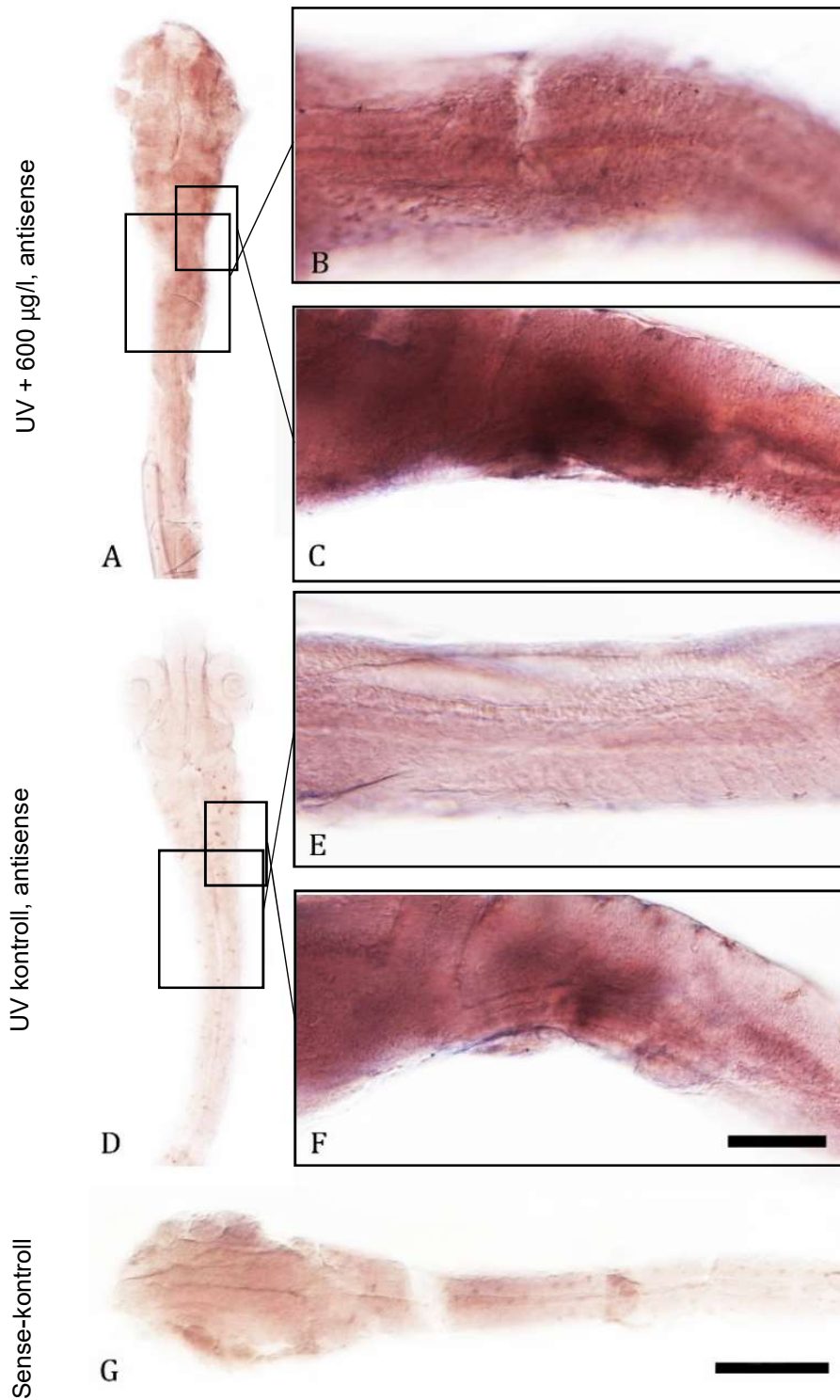
gmahr2a

4,5 dpf

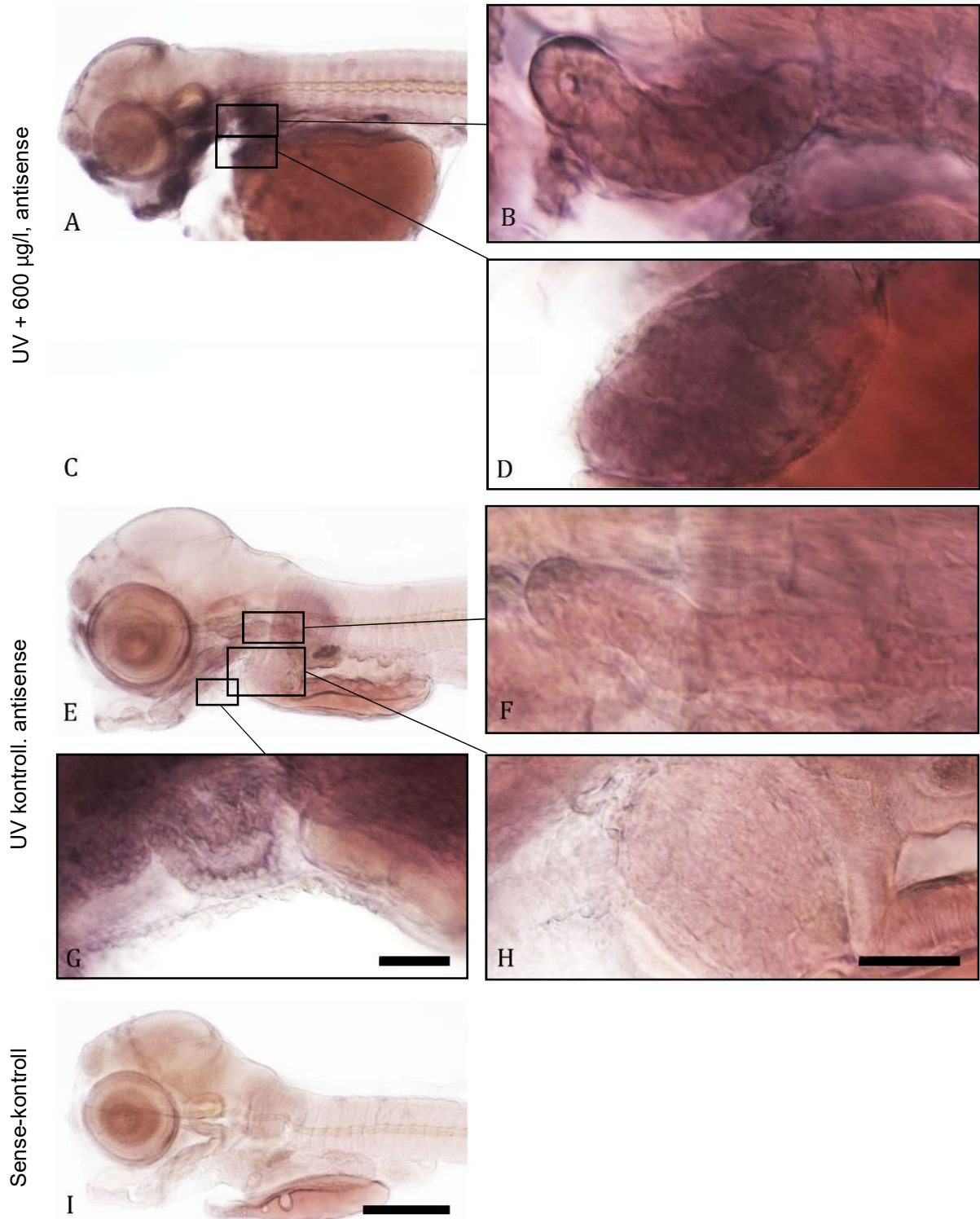
I torskembryo 4,5 dpf ble *gmahr2a*-uttrykk funnet jevnt over hele embryo (fig 4.11), med et noe høyere uttrykk i embryo eksponert for råolje med UV-bestråling (fig. 4.11. A-C). Uttrykket ble hovedsakelig lokalisert i epidermis (fig. 4.11. B og E). Det ble ikke funnet høyere konsentrasjon av *gmahr2a*-mRNA i hjertetprimordiet sammenlignet med omkringliggende epidermis. Dorsalt for hjertepremordiet ble det funnet områder hvor *gmahr2a* er kraftigere oppregulert enn omkringliggende vev (fig. 4.11. C og F). I embryo behandlet med sense-*gmahr2a* RNA-probe er noe innmerkning synlig i fremre halvdel av embryo (fig. 4.11. G).

3 dph

I torskelarver 3 dph var *gmahr2a* oppregulert i larve eksponert for råolje med UV-bestråling på eggstadiet, sammenlignet med UV-kontroll (fig. 4.12). I larve eksponert for råolje med UV-bestråling ble *gmahr2a*-mRNA funnet i flere ulike vevstyper, spesielt ved lukteorgan, kjeve og i områder i buken (fig. 4.12. A). I otisk plakode (fig. 4.12. B) og lever (fig. 4.12. D) i larver eksponert for råolje med UV-bestråling ble *gmahr2a* funnet mer uttrykt enn i UV-kontroll (fig. 4.12. F og H). Råolje + UV-eksponert larve ble skadet under håndtering som førte til tap av hjertet, og er derfor ikke inkludert. I UV-kontroll larve ble *gmahr2a*-mRNA funnet i endoteliumet til hjertet (fig. 4.12. F). I tillegg er *gmahr2a*-mRNA uttrykt i lukteorgan og i brystfinnene. Sense-kontroll larve viser ikke bakgrunnsinnmerkning (fig. 4.12. G).



Figur 4.11: Visualisering av gmahr2a-transkript i torskembryo 4,5 dpf etter 72 timers råoljeeksponering med UV bestråling (A, B, C), sammenlignet med UV kontroll (D, E, F) og sense-kontroll (G). Bilde A, D og G er oversikt over embryo sett fra dorsal vinkel. B og E viser ryggspylen fra dorsal vinkel. C og F viser område hvor hjertet utvikles, sett fra lateral vinkel. Målestokk A, D, G: 0,5 mm. Målestokk B, E, F, C: 50 µm. N=3

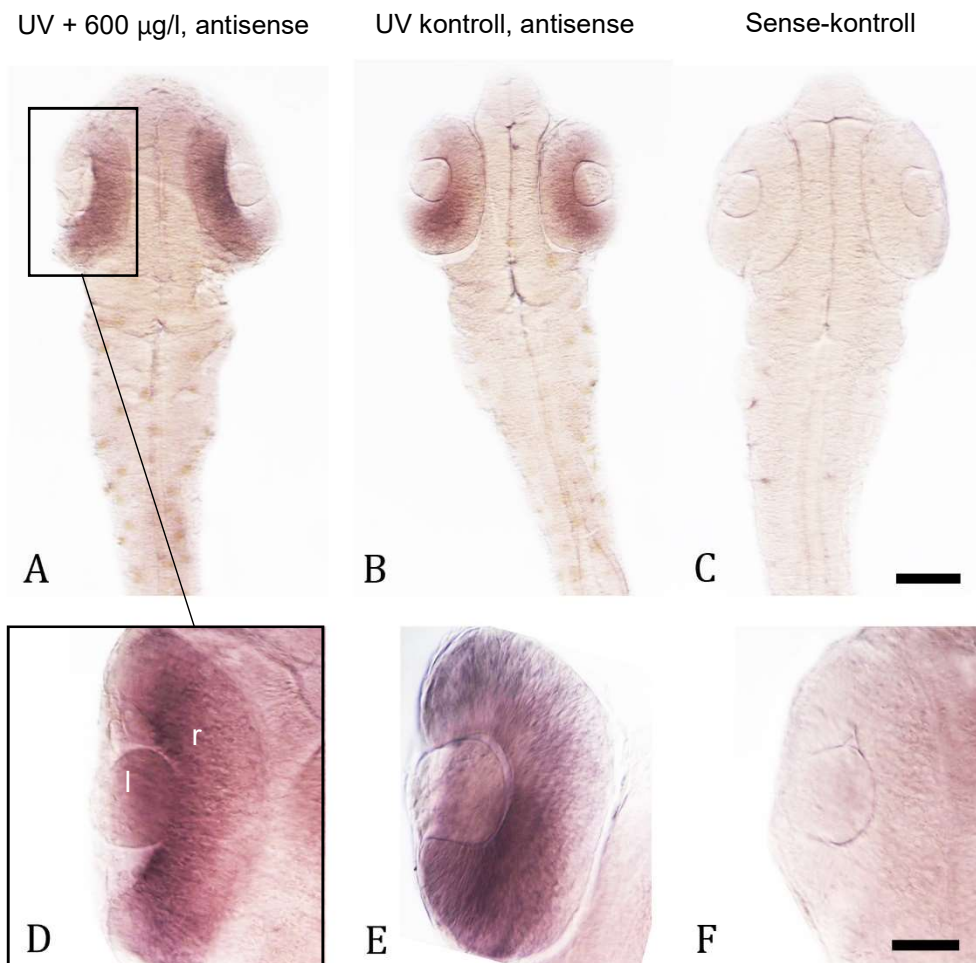


Figur 4.12: Visualisering av gmahr2a-mRNA i torskelarver 3 dph etter eksponering for råolje med UV-bestråling (A-D) og UV-lys i rent sjøvann (E-H). A, E og I viser fremre del av larven sett fra lateral vinkel. B og F viser området hvor otisk plakode utvikles. D og H viser området hvor lever utvikles. G viser hjertet. Larven eksponert for råolje med UV-bestråling ble skadet under behandling som førte til tap av hjertet (C). Målestokk A, E, I: 0,5 mm. Målestokk B, F, G: 25 µm. Målestokk D, H: 50 µm. N=3.

gmahr1a

4,5 dpf

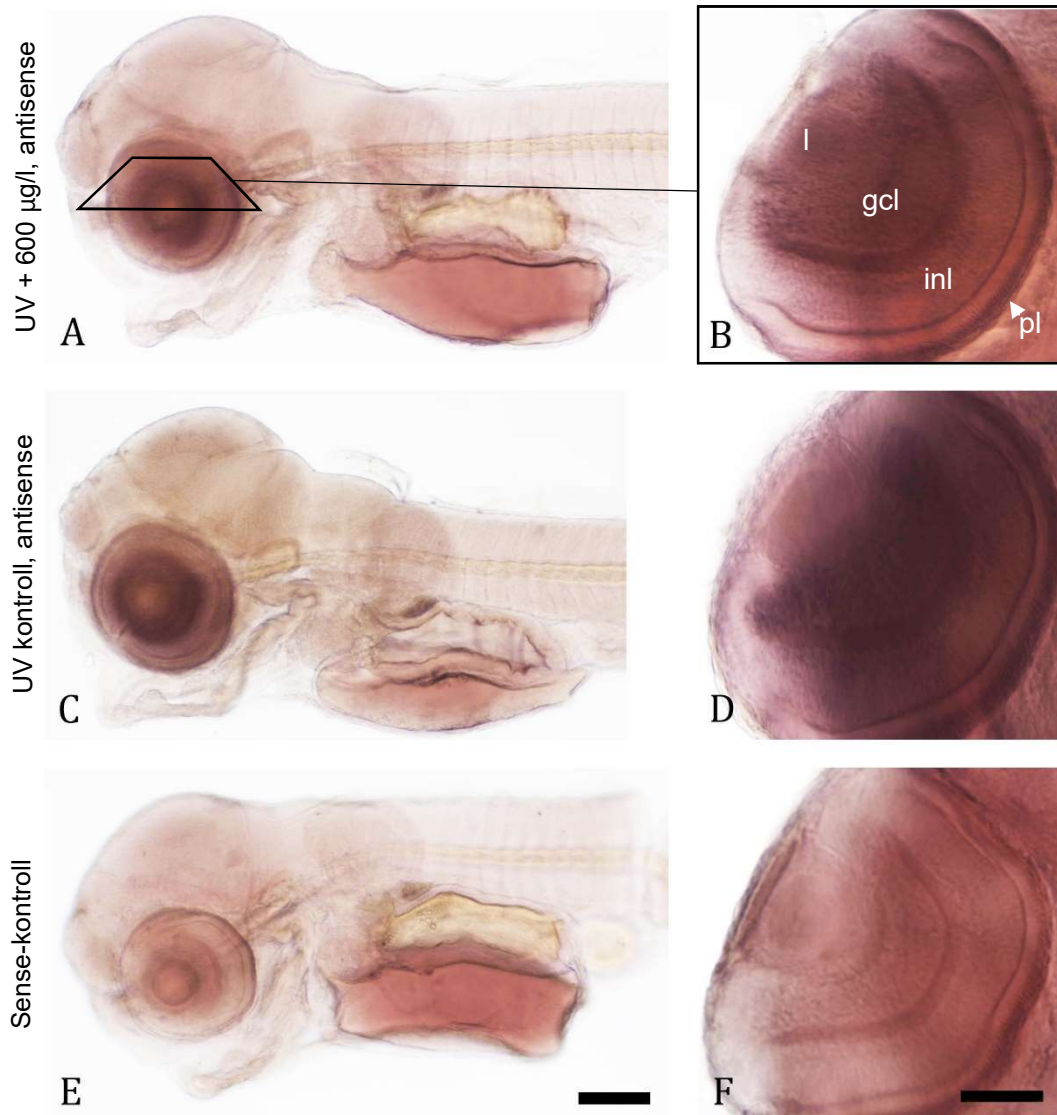
I torskembryo 4,5 dpf ble *gmahr1a*-uttrykk funnet utelukkende i de neuroblastiske cellene til retina i øyet, både i råolje + UV-eksponert og i UV-kontroll (fig. 4.13. A, B, D, E). *gmahr1a*-mRNA er jevnt fordelt i retina. Sense-kontroll viste ingen bakgrunnsinnmerkning (fig. 4.13. C og F).



Figur 4.13: *gmahr1a*-transkript i torskembryo 4,5 dpf etter eksponering for råolje med UV-bestråling (A, D), i UV-kontroll embryo (B, E) og sense-kontroll (C, F). Figur A, B og C viser fremre del av torskembryo 4,5 dpf sett fra dorsal vinkel. Figur D, E og F viser venstre øyet til henholdsvis råolje + UV-, UV kontroll- og Sense-kontroll-embryo. r=retina, l=linse. Målestokk A, B og C: 250 µm. Målestokk D, E og F: 25 µm. N=5.

3 dph

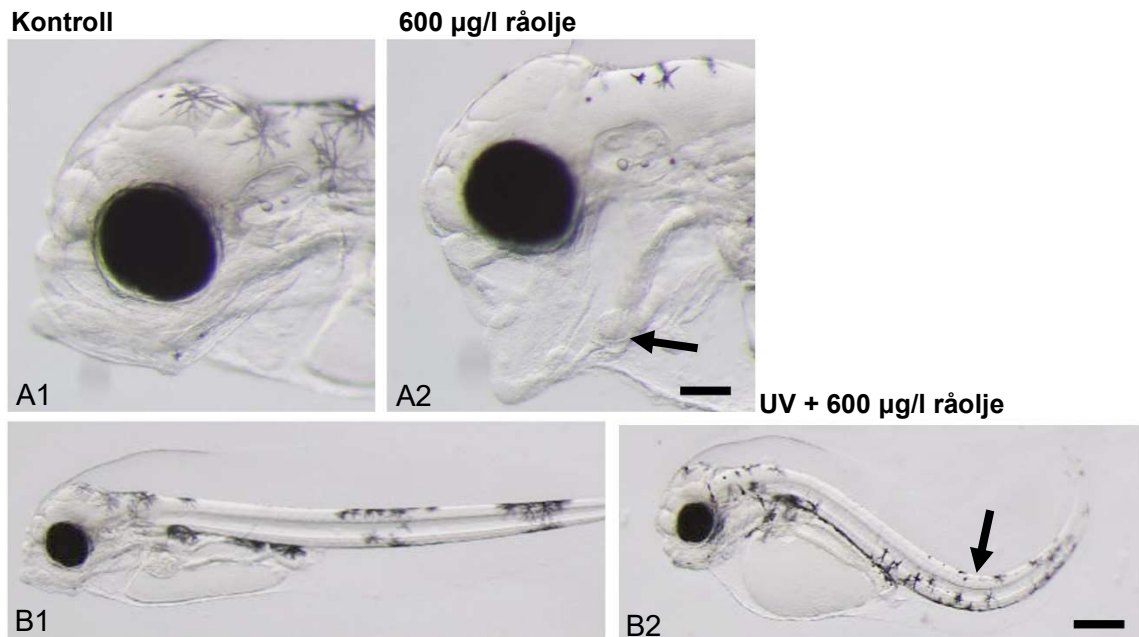
Uttrykksmønsteret til *gmahr1a* observert i embryo 4,5 dpf var bevart i torskelarver 3 dph. Både i larver eksponert for råolje + UV-bestråling og UV-lys i rent sjøvann ble *gmahr1a*-uttrykk lokalisert i øyets ganglioncellelag (fig. 4.14. A-D). Uttrykket ble ikke påvirket av eksponering for råolje. Sense-kontroll viste ingen bakgrunnsinnmerkning (fig. 4.14. E-F).



Figur 4.14: Visualisering av *gmahr1a*-mRNA i torskelarver 3 dph etter eksponering for råolje + UV-lys (A og B) og UV-lys i rent sjøvann (C og D), i tillegg til sense-kontroll (E og F). A, C og E viser fremre del av larven sett fra lateral vinkel. B, D og F viser venstre øyet sett fra dorsal vinkel. *gcl*=ganglioncellelaget, *inl*=indre kjernelag, *pl*=pigmentlag. Målestokk A, C og E: 0,5 mm, B, D og F: 50 μ m. N=5.

4.5 Deformitetsanalyse av larver 3 dph

Deformiteter i utvalgte fenotypiske trekk økte hos torskelarver 3 dph som følge av 72 timers eksponering for råolje og råolje med UV-bestråling (fra 1,5 dpf til 4,5 dpf). I gruppen eksponert for råolje og gruppen eksponert for råolje med UV-bestråling ble det funnet to ulike deformitetssyndrom (fig. 4.15).



Figur 4.15: Deformiteter hos torskelarver 3 dph eksponert for råolje med (B) og uten (A) UV-bestråling på eggstadiet sammenlignet med kontroll-larve holdt i rent sjøvann (A1 og B1). Sort pil i A2 viser kjevemisdannelse. Sort pil i B2 viser krummet ryggrad (skoliose). Målestokk A=100 µm, B=300 µm.

I råoljeeksponerte larver ble det funnet en økt forekomst av kraniedeformiteter, spesielt i kjeveområdet. Larven har da en munn låst i gapende posisjon. Avviket fra kontroll er representert med målingen kalt «kjevevinkel» i tabell 4.2. I larver 3 dph eksponert for råolje med UV-bestråling ble det observert en økt dannelse av kroppsaksedeformiteter i form av krummet ryggrad (skoliose). Denne typen ble også funnet i larver eksponert for den høyeste dosen råolje i normalt lys, men i mye større grad i UV-eksponerte larver. I den høyeste råoljedosen med UV-bestråling hadde over halvparten av larvene 3 dph utviklet skoliose (tab. 4.2).

Det ble ikke funnet signifikant endring i ødemarealet proksimalt til perikardiet og plommesekken i torskelarver 3 dph eksponert for råolje i normalt lys. UV-bestrålte larver i rent sjøvann (kontroll) har mest ødem av alle gruppene, og ødemet synker til kontrollverdier i begge de UV-bestrålte råolje eksponeringene.

Kroppslengden til larvene blir forkortet med $0,5 \pm 0,2$ mm etter eksponering for den høyeste råoljedosen med UV-bestråling. Eksponering for UV-lys i rent sjøvann har samme forkortende

effekt på kroppslengden som den høyeste råoljekonsentrasjonen i normalt lys. Den nest høyeste dosen råolje med UV-lys gir tilsvarende forkortning.

Avstanden fra øye til nese ble kortere i larvene eksponert for 600 µg/l råolje under normalt lys, denne forskjellen ble ikke funnet i 200 µg/l-gruppen. I UV-belyste grupper ble det ikke funnet forskjell i øye-nese lengde.

Kjevelengden til larver eksponert for den høyeste råoljekonsentrasjonen både under normalt lys og UV-lys ble forkortet av behandlingen. Larver holdt i den nest høyeste råoljekonsentrasjonen opplevde ikke denne reduksjonen.

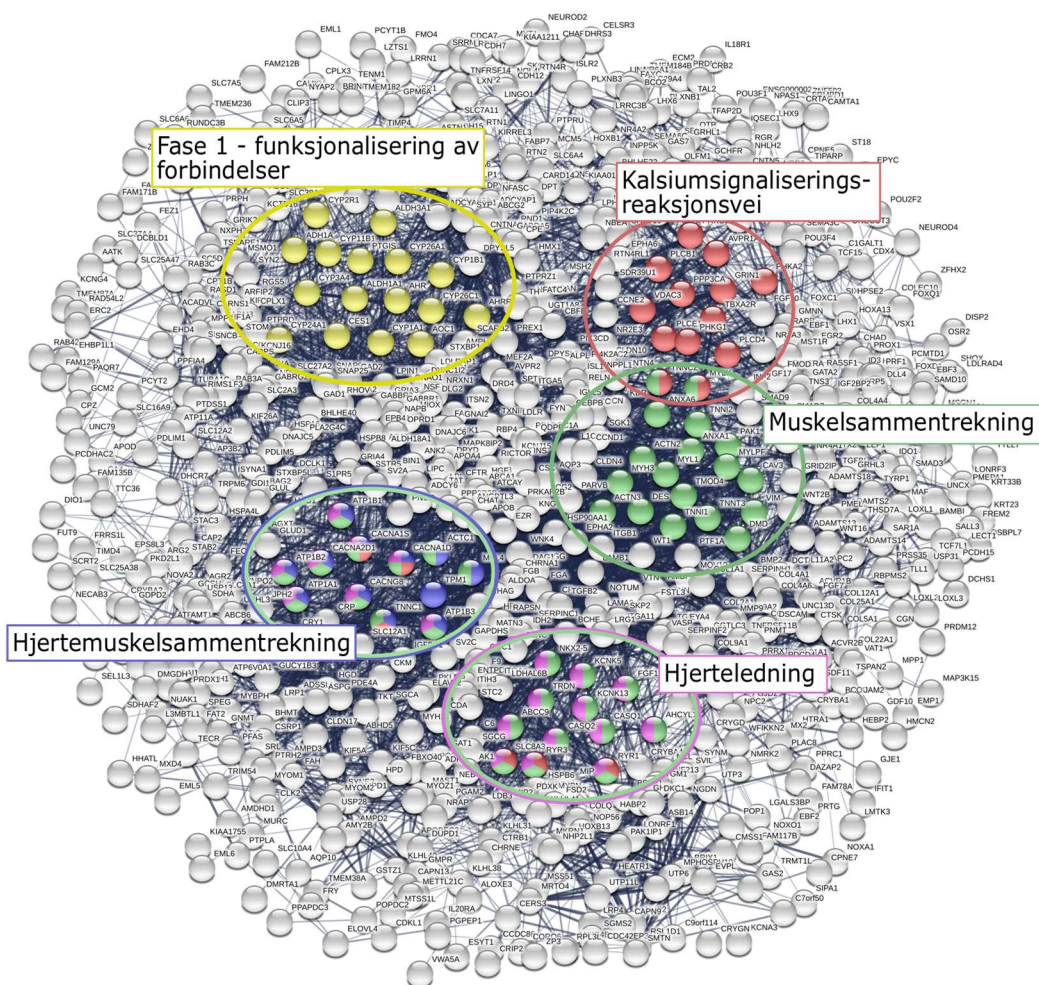
Arealet til finnelappen dorsalt på hodet til torskelarver 3 dph ble redusert av alle behandlingene med råolje, men den største reduksjonen kom i larver eksponert for den høyeste dosen råolje med UV-lys, der arealet ble mer enn halvert.

Tabell 4.2: Målinger av utvalgte fenotypiske trekk i torskelarver 3 dph etter 72 timers eksponering for råolje og råolje med UV-bestråling. Forskjellen mellom kontroll og eksponerte individer ble testet med enveis-ANOVA. Statistisk signifikante forskjeller eksponerte grupper og deres respektive kontrollgrupper er markert med fet skrift, og graden av signifikans er oppgitt som stjerner bak tallene (*= $p < 0,05$, **= $p < 0,005$, ***= $p < 0,0005$).

N = 30	Ødem areal (%)	Lengde (mm)	Ethmoid-plate (µm)	Kjevelengde (µm)	Kjevevinkel (grader)	Finnelapp (mm²)	Skoliose (%)
Kontroll	38,2	4,2 ±0,1	138 ±16,4	367 ±37,8	119 ±5,0	3,41 ±0,8	0
600 µg/l	38,3	4,0** ±0,2	110*** ±27,6	299*** ±58,4	131*** ±14,7	2,91 ±0,9	6
200 µg/l	42,6	4,2 ±0,1	132 ±16,9	357 ±29,2	116 ±4,4	2,66** ±0,8	0
UV Kontroll	36,5	4,0** ±0,2	136 ±19,0	365 ±31,3	117 ±7,5	3,5 ±2,5	16
UV + 600 µg/l	24,1	3,7*** ±0,2	131 ±16,4	304*** ±35,1	116 ±9,3	1,7** ±0,6	56
UV + 200 µg/l	35,1	4,0 ±0,2	131 ±18,7	358 ±26,7	113 ±6,8	2,4 ±0,5	10

4.6 Nettverksanalyse av differensielt uttrykkede gener i råoljeeksponerte torskeembryo 4,5 dpf

For å studere globale endringer i genuttrykning (transkriptomet) etter eksponering for råolje ble RNA-sekvensering utført på prøver opparbeidet fra egg som ble høstet 4,5 dpf etter eksponering for høy dose råolje (600 µg/l) fra 1,5 til 4,5 dpf, samt den respektive kontrollgruppen. Totalt ble 2906 gener funnet som differensielt uttrykt i disse torskeeggene (FDR < 0,05). Uttrykket av gene med de 1000 laveste FDR-verdiene ble brukt videre i STRING-nettverksanalyse (FDR < 0,0003), og utvalgte anrikede reaksjonsveier fra KEGG- og Reactome-databasene er visualisert med farger i figur 4.16. Signifikant anrikede reaksjonsveier inkluderte «Fase 1 – funksjonalisering av forbindelser», «Kalsiumsignaliseringsreaksjonsvei», «Hjerteledning», «Hjertemuskel-sammentrekning» og «muskel-sammentrekning». Fullstendig liste av anrikede reaksjonsveier, inkludert gene som inngår i reaksjonsveiene, finnes i tabell 8.1 og 8.2 i appendiks (i tabellene er reaksjonsveiene som er uthevet i fig. 4.16 uthevet med gult).



Uthevede reaksjonsveier	Database	Justert p-verdi (FDR)
Muskelsammentrekning	Reactome	$2,75 \times 10^{-11}$
Hjerteledning	Reactome	$8,7 \times 10^{-4}$
Fase 1 – funksjonalisering av forbindelser	Reactome	0,0030
Hjertemuskelsammentrekning	KEGG	0,0055
Kalsiumsignalisering-reaksjonsveien	KEGG	0,0104

Figur 4.16: Nettverk av gener oppregulert i torskkeegg 4,5 dpf etter eksponering for 600 µg/l råolje, med utvalgte reaksjonsveier uthevet med farger. Hver node (grå sirkel) representerer ett differensielt uttrykt protein (FDR < 0,0003). Farge er lagt over utvalgte noder og representerer navngitt reaksjonsvei. Flerfargede noder representerer gener som er involvert i mer enn én av de uthevede reaksjonsveiene. Tabellen under figuren viser justert p-verdi (FDR) for de utvalgte reaksjonsveiene. Figuren ble generert med STRING (<https://www.string-db.org>) og anrikede reaksjonsveier ble hentet fra KEGG- og Reactome-databasene.

5. Diskusjon

I forbindelse med planene om oljeutvinning nær gyteområdene til NØA torsk har det i denne oppgaven blitt undersøkt hvordan tidlige livsstadier av torsk responderer på eksponering for lave råoljekonsentrasjoner. Effekt av eksponering ble målt ved bruk av biomarkøren *cyp1a* ved ulike utviklingsstadier, og senskader i form av deformiteter etter eksponering ble undersøkt i larver 3 dph. Det ble i tillegg gjort kjemisk analyse av eksponeringsmediet ved start og slutt av eksponeringen. Råoljen førte til en sterk og doseavhengig *cyp1a*-oppregulering i torskeegg etter eksponering tidlig i embryogenesen. Eksponeringen førte videre til en forhøyet forekomst av deformiteter i kjeve og i ryggspylen hos larver 3 dph. UV-belyst råolje forsterket induksjonen av *cyp1a* i torskeegg, og førte til økt dødelighet og et særegent deformitetssyndrom i larver 3 dph sammenlignet med larver eksponert under normale lysforhold. *Cyp1a*-transkript ble lokalisert over hele embryo 4,5 dpf etter eksponering for råolje med UV-bestråling og et forhøyet *cyp1a* uttrykk ble lokalisert i hjerte og i området hvor lever og otisk plakode utvikles ni dager etter eksponering i larver 3 dph.

Kunnskap om Ahr-signalveien i torsk er viktig for å videre utvikle arten som modellorganisme i toksikologiske studier og som indikatorart for marine økosystem. I denne oppgaven ble *Ahr*-uttrykk lokalisert med helkroppss ISH og målt kvantitativt med sanntids-qPCR i embryo 4,5 dpf og i larve 3 dph i torsk. *gmahr1a* og *gmahr2a* hadde et isoformspesifikt mønster i både vevsuttrykk i torskeembryo 4,5 dpf og i larver 3 dph, samt på respons på eksponering for råolje med UV-bestråling. Uttrykket av *gmahr2a* ble oppregulert etter eksponering for råolje + UV, mens *gmahr1a*-mRNA ikke ble påvirket av verken råolje eller råolje + UV-eksponering. Videre ble det funnet en samlokalisering av *gmahr2a*- og *cyp1a*-uttrykk, både i embryo 4,5 dpf og hos larver 3 dph,

Nettverksanalyse av differensielt uttrykkede gener (FDR < 0,0003) viste anrikelse av reaksjonsveier knyttet til muskelfunksjon, hjertesvikt og aktivering av AHR-signalveien.

5.1 Biomarkøren *cyp1a* ble tidlig og sterkt indusert i torskeegg eksponert for lave råoljekonsentrasjoner

Cyp1a ble doseavhengig oppregulert i torskeegg eksponert for miljømessig relevante konsentrasjoner av råolje og råolje + UV. Bestråling med UV hadde samtidig en forsterkende effekt på *cyp1a* induksjonen. I torskeegg eksponert under normale lysforhold ble *cyp1a* oppregulert allerede etter 12 timer eksponering (2 dpf). Videre, ved 2,5 dpf økte *cyp1a*-

uttrykket kraftig og ble holdt stabilt til eksponeringen var over. Ved 5,5 dpf, 24 timer etter overføring til rent sjøvann, sank *cyp1a*-uttrykket betydelig. Torskeegg eksponert for UV-bestrålt råolje gav en *cyp1a*-induksjon tidligere og kraftigere enn i egg eksponert for råolje under normalt lys.

Råoljeeksponerte fisk i tidlige livsstadier har tidligere vist en kraftig oppregulering av *cyp1a*, og er en etablert biomarkør for PAH-eksponering i akvatiske organismer (Goksøyr, 1994; Incardona *et al.*, 2006; Sørhus *et al.*, 2015; Sørensen *et al.*, 2017). I hyseegg (*Melanogrammus aeglefinus*) har *cyp1a*-induksjon blitt studert etter eksponering for tilsvarende konsentrasjoner råolje som i denne oppgaven (600 µg/l og 60 µg/l) over en syv dagers periode fra 2 dpf til 10 dpf (Sørhus *et al.*, 2016). I denne arten fant man også en kraftig *cyp1a*-oppregulering som respons på eksponering, men uttrykket følger en annen tidsprofil enn det som ble observert i torsk. Den relative økningen av *cyp1a*-uttrykning i hyseegg etter 24 og 72 timers eksponering er lavere enn hva som ble observert i torskeegg i denne oppgaven, men stiger jevnt og når en topp etter seks dagers eksponering med ~180 fold økning i genuttrykk. Til sammenligning er dette noe over nivået målt i torskeegg etter kun tre dagers eksponering. Hyse og torsk tilhører samme familie (*Gadidae*) og har mange likhetstrekk, men til forskjell fra torsk har hyseegg en tynn ytre membran som omkranser korion (Sørhus *et al.*, 2015). Ved eksponering for dispergert råolje akkumuleres det oljedråper på den ytre membranen til hyseeggene som viste å øke bioakkumuleringen av PAH-forbindelser i hyseembryo. Dette gjenspeiles i et høyt og langvarig *cyp1a*-uttrykk, også etter uttak fra eksponeringsmediet. I torskeembryo, som mangler denne ekstra membranen og ikke akkumulerer oljedråper på korion på tilsvarende måte, faller *cyp1a*-uttrykket betydelig ett døgn etter overføring til rent sjøvann. Dette underbygger påstanden om at oljedråpedannelse på hyseegget en viktig faktor i overføring av PAHer fra råoljen til embryo. Men det kan heller ikke utelukkes at lipidmembranen til hyse fungerer som en ytterligere barriere for AHR-agonister og kan derfor medvirke til den tregere induksjonen av *cyp1a* i hyseegg. I en annen studie undersøkte Sørensen *et al.* induksjonen av *cyp1a* i torskeegg 11 dager etter befruktning (dpf) etter kontinuerlig eksponering for 600 µg/l råolje i normalt lys fra 1 dpf til eggene klekkes ved 12 dpf (Sørensen *et al.*, 2017). Det ble da observert en ~50 folds oppregulering av *cyp1a* uttrykning, som indikerer at det er en høyere induksjon tidlig i eksponeringen som til tross for kontinuerlig eksponering synker til et lavere nivå med eksponeringstiden. Den samme studien rapporterte at akkumuleringsraten til PAHer i torskeembryo utover i eksponeringen var negativ, som betyr at embryoene evner å eliminere PAHer fra vevet og kan være med å forklare det synkende uttrykket til *cyp1a* over en lengre eksponeringsperiode (Sørensen *et al.*, 2017).

I torskeegg eksponert for 200 µg/l filtrert råolje (WSF) i denne oppgaven var *cyp1a*-induksjonen like sterk som i egg eksponert for tilsvarende konsentrasjon ufiltrert råolje, men

oppreguleringen fulgte en ulik tidsprofil. At *cyp1a* oppreguleres på samme nivå i WSF-eksponerte egg som ufiltrert-gruppen er i tråd med tidligere studier som viser at toksisiteten til PAHer i råolje ikke er avhengig av oljedråpedannelse (Carls *et al.*, 2008; Carls and Meador, 2009). Kjemisk analyse av eksponeringsmediet til WSF-gruppen viste at tPAH-innholdet var halvert ved eksponeringsslutt, til tross for kontinuerlig tilførsel av råolje. Halveringen kan skyldes svikt i tilførselsystemet under eksponering, som kan ha blitt reflektert i *cyp1a*-uttrykket ved 2,5 dpf og 4,5 dpf, som var lavere enn i ufiltrert-gruppe. En annen årsak til nedreguleringen kan skyldes at råoljekomposisjonen i WSF-gruppen er ulik komposisjonen i ufiltrert råolje, og at komponentene i WSF-gruppen absorberes saktere og elimineres raskere. Nivået av oppreguleringen av *cyp1a* indikerer likevel at bruken av spredningsmiddel etter et oljeutslipp ikke vil forhindre absorpsjonen av PAH forbindelser i torskkeegg.

5.2 UV-belyst råolje gav forhøyet *cyp1a*-induksjon i eksponerte torskkeegg
UV-lys gav økt dødelighet og *cyp1a* induksjon i råoljeeksponerte torskkeegg, sammenlignet med egg som ble eksponert under normale lysforhold. I egg holdt under UV-bestråling i rent sjøvann (UV kontroll) vises en svak oppregulering av *cyp1a* etter 12 timer eksponering, men følges av nedregulering til under kontrollnivå ved senere tidspunkt.

Det er godt dokumentert at UV-lys har en forverrende effekt på toksisiteten til PAHer i akvatiske organismer, som blant annet økt dødelighet (Arfsten *et al.*, 1996; Barron *et al.*, 2003; Incardona *et al.*, 2012). Det samsvarer med funnene i dette forsøket. Den toksiske mekanismen bak UV-belyst råolje på tidlige livsstadier til fisk er blitt forbundet med UV-lys sin evne å aktivere komponenter som har akkumulert i embryo eller larve til blant annet reaktive quinonforbindelser og ROS (Barron *et al.*, 2003). En studie som evaluerte toksisiteten til forskjellige oksygenerte PAHer på tidlige livsstadier av sebrafisk fant at flere slike forbindelser evner å inducere *cyp1a* (Knecht *et al.*, 2013). Quinonforbindelsen benz(a)antracen-7,12-dion (7,12-B[a]AQ) ble funnet å føre til en høy *cyp1a* induksjon igjennom aktivering av drAhr2, i tillegg til aktivering av flere reaksjonsveier knyttet til oksidativt stress. Dette støtter den forhøyede dødeligheten observert i råolje + UV-eksponerte torskkeegg, og at UV-lys kan ha medført en strukturendring i råoljekomponentene i embryo som har ført til ytterligere Ahr-aktivering.

Studier har blitt utført for å undersøke hvordan UV-eksponering alene kan føre til aktivering av Ahr-signalveien og oppregulering av *cyp1a* (Helferich and Denison, 1991; Becker *et al.*, 2016). Aktiveringen har vist seg å være særlig forbundet med fotomodifiserte produkter av tryptofan (Helferich and Denison, 1991). Ett slikt produkt er 6-formylindol[3,2-b]carbazol (FICZ), som etter eksponering av sebrafisk 2 dpf først oppregulerer uttrykk av *cyp1a* (etter 6 timer eksponering), men til tross for kontinuerlig eksponering faller uttrykket etter 12 timer (Jönsson *et al.*, 2009). Uttrykksmønsteret ble forklart av at FICZ har vist å være et godt substrat til

CYP1A og vil bli raskere metabolisert ved økende tilstedeværelse av enzymet (Bergander *et al.*, 2004). Dette underbygger reguleringsmønsteret til *cyp1a* observert i torskkeegg holdt i UV kontroll, hvor en svak oppregulering ved 2 dpf følges av en nedregulering til under kontrollnivå ved senere tidspunkter. Nedreguleringen i UV-kontroll fra 2,5 dpf indikerer videre at økningen i *cyp1a* som observeres i torskkeegg eksponert for råolje med UV ikke kan forklares av binding av FICZ til Ahr.

I eksponeringsmediet med 600 µg/l råolje med UV-bestråling ble det funnet et høyere tPAH-innhold sammenlignet med eksponeringsmediet 600 µg/l råolje i normalt lys. Dette kan indikere at råoljedosen til karene har vært ulik, og kan være med å forklare det forhøyede *cyp1a*-uttrykket i torskkegg fra UV + 600 µg/l råolje-gruppen. Derimot var tPAH innholdet i eksponeringsmediet med 200 µg/l råolje likt for UV-belyst kar og ikke UV-belyst kar, men eggene viste likevel et økt *cyp1a* uttrykk sammenlignet egg holdt i normalt lys. Dette indikerer at forhøyningen av *cyp1a* delvis er induert av UV-modifiserte produkter.

5.3 *Cyp1a*-oppregulering visualisert med helkropp ISH

Visualiseringen av *cyp1a*-uttrykk med helkropp ISH viser en omfattende aktivering av biomarkøren i embryo 4,5 dpf. Syv dager etter eksponeringsslutt er uttrykket bevart i hjertet og området hvor otisk plakode og lever utvikles i larver 3 dph. Som beskrevet i Sørhus *et al.* (2016), ble *cyp1a*-transkript lokalisert med ISH i hyselarver 8 dph etter 13 dagers eksponering for tilsvarende råoljekonsentrasjon som i denne oppgaven (600 µg/l). I eksponerte hyselarver er *cyp1a* induert i lever og hjertet som tilsvarer det som ble observert i torsk i dette forsøket, men i motsetning til torsk ble det også funnet oppregulering i bukspyttkjertel, tarm, nyre og i vaskulære endotelceller. Uttrykksforskjellen kan være gitt av at hyselarvene sin eksponering var over en lengre periode og i tillegg varte helt fram til vevsfiksering, til forskjell fra torskelarvene som ble fiksert ni dager (3 dph) etter eksponeringsslutt. I tillegg har det blitt vist forskjeller mellom individuelle PAHers toksikokinetiske egenskaper, som har vist seg å føre til særegne uttrykksmønstre av *cyp1a* etter eksponering av PAH-blandinger som råolje (Incardona *et al.*, 2006). I sebrafisk har uttrykket til *cyp1a* blitt lokalisert i embryo 24 hpf ved bruk av ISH etter eksponering for AHR-agonisten TCDD (Andreasen *et al.*, 2002). *Cyp1a* ble ved dette stadiet uttrykt kraftig i huden til embryo, tilsvarende uttrykket i torskkeembryo 4,5 dpf. Den omfattende induksjonen av *cyp1a* i torskkeembryo viser at skadelige PAH forbindelser har diffundert igjennom korion og kommet i kontakt med hele embryoet. På larvestadiet 72 hpf har også sebrafisk vist en tilsvarende induksjon i hjertet og lever etter eksponering for PAH forbindelser, som observert i torskelarver 3 dph etter eksponering for råolje (Incardona *et al.*, 2006). Funnet i denne oppgaven av forhøyet *cyp1a*-induksjon i hjerte og området hvor lever og otisk plakode utvikles i larver 3 dph etter syv dager i rent sjøvann var overraskende. Denne oppreguleringen kan være et resultat av at PAH komponenter fra råoljen har akkumulert i

plommesekken, og gradvis blitt frigjort til sirkulasjonen ved fortæring av plommesekken, som tidligere observert i regnbueørret (Van Leeuwen and Griffioen, 1985).

En kraftig biologisk respons ble målt i torskkeegg etter eksponering for lave konsentrasjoner råolje igjennom oppregulering av biomarkøren *cyp1a*. Dette bekrefter rask absorpsjon av *Ahr*-agonister inn i embryo etter eksponeringsstart. Miljømessig relevant UV-bestråling førte videre til en forhøyet *cyp1a*-induksjon som støtter observasjonene om at UV-lys kan føre til fotosensitisering av råoljekomponenter i embryo, og at sollys er en viktig faktor når en skal gjøre råolje-relaterte toksisitetstester i tidlige livsstadier til fisk. Oppreguleringen viser også at allerede ved 2 dpf (~25% epiboly) er *Ahr*-signalveien aktiv i torsk og evner å inducere *cyp1a*. Videre indikerer fallet i *cyp1a*-uttrykk etter overføring til rent sjøvann en effektiv eliminering av *Ahr*-agonister fra embryo, men et vedvarende signal i larver 3 dph antyder at komponenter fra råoljen fortsatt er tilstede lenge etter eksponeringen er over, mest sannsynlig som følge av akkumulering i plommesekken.

5.4 *Ahr* har et isoformspesifikt vevsuttrykk i tidlige livsstadier til torsk

Undersøkelsen med helkroppss ISH viser at *gmahr1a*- og *gmahr2a*-mRNA har ulik lokalitet både i torskkeembryo og larve 3 dph. *gmahr2a*-mRNA ble funnet spredt i hele embryo på eggstadiet 4,5 dpf, og ble lokalisert i flere vevstyper i larver 3 dph, inkludert området hvor leveren utvikles og i hjertet. *gmahr1a*-mRNA ble funnet utelukkende i øyet til både embryo og larve 3 dph. I embryo 4,5 dpf var uttrykket jevnt fordelt i de nevroblastiske cellene til retina, mens på larvestadiet var uttrykket avgrenset til ganglioncellelaget. *gmahr2a*-mRNA økte i torsk eksponert for råolje med UV-bestråling, mens mengden *gmahr1a*-mRNA ikke ble påvirket av råoljeeksponering med eller uten UV-eksponering.

Funnet av at *Ahr* har et isoformspesifikt vevsuttrykk i torsk er i tråd med tidligere studier gjort med teleoster (Powell *et al.*, 2000; Karchner, *et al.*, 2002; Hahn, *et al.*, 2017; Sugden *et al.*, 2017). I sebrafisk har lokaliteten til *Ahr*-isoformen *drahr2* blitt undersøkt ved tidlige utviklingsstadier (Andreasen *et al.*, 2002). *drahr2*-transkript ble da funnet spredt jevnt i embryo ved 10-sommersstadiet, som tilsvarer lokaliteten til *gmahr2a* ved samme utviklingsstadiet i torsk (4,5 dpf). Ved senere utviklingsstadier konsentrerte *drahr2*-uttrykket seg i strukturer som blodkar, hjerte, nyre, hjerne, ryggmarg og i andre sensoriske organ. Et slikt rikt vevsuttrykk ble også observert for *gmahr2a* i torsk på larvestadiet 3 dph, og indikerer en likhet i vevsuttrykket mellom *gmahr2a* og *drahr2*. I motsetning til *gmahr2a* i torsk eksponert for råolje med UV-lys, ble transkript av *drahr2* ikke oppregulert i sebrafisk etter eksponering for den kjente *Ahr*-agonisten TCDD. Observasjonen indikerer at råoljeeksponering øker uttrykket av *gmahr2a* i tidlige livsstadier av torsk.

Sugden *et al.* 2017 har brukt helkroppss ISH for å beskrive lokaliteten til uttrykket av *drahr* i sebrafisklarver 52 hpf med og uten eksponering for *Ahr*-agonisten BNF. Studien demonstrerte at *drahr2*-transkriptet er omfattende uttrykt i larven og ble oppregulert etter BNF-eksponering, mens *drahr1a* og *drahr1b* var uttrykt i færre vev og i mer avgrensede områder (henholdsvis i lever og øyet). *Drahr1a*- og *drahr1b*-uttrykk ble heller ikke i like stor grad påvirket av BNF-eksponering. Studien fant at *drahr1b*-uttrykk var avgrenset til øyet i larver 52 hpf, imens *drahr1a* ble funnet i leveren. Funnene av *drahr2* underbygger det som er observert for *gmahr2a* i tidlige livsstadier av torsk, hvor *gmahr2a* også her er den mest omfattende uttrykte *Ahr*-paralogen. Som beskrevet i Aranguren-Adabia *et al.*, *in prep* er *gmahr1a* nærmere beslektet med *drahr1b* sammenlignet med *drahr1a*, som er nærmere beslektet med *Ahr* i pattedyr (Hahn, *et al.*, 2017). Dette gjenspeiles i at lokaliteten til *gmahr1a* funnet i torsk 4,5 dpf og 3 dph følger *drahr1b*-uttrykk i larver 52 hpf, mens *drahr1a* derimot har en annen uttrykingsprofil. At *drahr1b* og *gmahr1a* viser et likt vevsuttrykk antyder også en funksjonsoverlapp mellom isoformene. I motsetning til sebrafisk eksponert for TCDD, ble *gmahr2a* og *drahr2* oppregulert av eksponering for henholdsvis råolje + UV og BNF. Dette indikerer at råolje + UV og BNF har en oppregulerende effekt på denne isoformen i tidlige livsstadier. Hos torskelarver 3 dph var oppreguleringen av *gmahr2a* høy i råolje + UV-eksponert larve sammenlignet med UV-kontroll. Denne forskjellen i oppregulering var uventet ettersom larvene har oppholdt seg i rent sjøvann med normal belysning siden eksponeringsslutt (4,5 dpf), men kan være et resultat av påvirkning fra akkumulerte råoljekomponenter fra plommesekken som gradvis fortæres.

I embryo av tannkarp *Fundulus heteroclitus* ble konstitutivt uttrykk av *ahr2a*- (*fhahr2a*) og *ahr1a*- (*fhahr1a*) mRNA detektert tidlig (49 hpf) (Powell *et al.*, 2000). I voksen fisk ble paralogene detektert i ulike vev, der *fhahr2a* ble funnet i alle vev undersøkt: inkudert hjerne, gjeller, tarm, hjerte, nyre, lever, gonade og milt. *fhahr1a*-uttrykket derimot var begrenset til hjerne, hjerte og gonade. Funnet i *F. heteroclitus* er overlappende med det som er funnet i voksen rød havkaruss (*Pagrus major*), hvor *pmahr1a* ble funnet i hjerne, hjerte, gonade og milt, mens *pmahr2a* ble også her funnet i alle vev undersøkt (Yamauchi *et al.*, 2005). Uttrykksforholdet mellom *ahr2*- og *ahr1*-transkript er likt i disse artene som det som ble funnet i tidlige livsstadier av torsk i denne studien, men i motsetning til *fhahr1a* og *pmahr1a* ble *gmahr1a* kun funnet uttrykt i øyet både 4,5 dpf og 3 dph. Denne ulikheten i lokaliteten av uttrykket til *gmahr1a* og *fhahr1a*/*pmahr1a* kan indikere en funksjonsforskjell mellom disse teleostene. Alternativt kan denne forskjellen komme av at artene er undersøkt på ulike utviklingsstadium, og at i voksen fisk er *ahr1* uttrykt i andre områder enn på larvestadiet.

I motsetning til funnene av *Ahr* i fisk er det kun beskrevet én *Ahr*-isoform i pattedyr. Ved bruk av ISH har man funnet transkripter av denne isoformen i tidlige utviklingsstadier av mus (13,5 dpf) (Jain *et al.*, 1998). Uttrykket var representert i flere vevstyper som til sammen utfører et

mangfoldig sett av fysiologiske funksjoner, dette inkluderer hypofysen, utsiden av tungen, slimhinnen til tarm, tymus, nyre og den urogenitale sinus. Som *gmahr2a* i tidlige livsstadier til torsk ble *Ahr*-transkript også funnet i lever og hjerte. Det brede spekteret av vevstyper som uttrykker *Ahr* i embryonalstadiet til mus reflekterer den pleiotropiske rollen *Ahr* har i pattedyr, i motsetning til hos fisk hvor rollen er mer begrenset ettersom funksjonene er fordelt på ulike isoformer (Hahn, *et al.*, 2017).

I torskeembryo 4,5 dpf behandlet med *gmahr2a* sense-RNA probe er noe bakgrunnsinnmerkning synlig i fremre halvdel av embryo. Dette indikerer at noe av innmerkingen observert i embryoene behandlet med *gmahr2a* antisense-RNA probe kan være støy som har opphav fra uhybridisert eller feilhybridisert probe. Dette kan oppstå om det skjer en feil i RNase-steget etter probehybridiseringen i helkroppss ISH-prosedyren, som hindrer RNase-enzymet fra å nedbryte all overflødig eller feilhybridisert probe i vevet. Dette kan skape støy i visualiseringen i form av innmerkning som ikke representerer hybridisert probe. Likevel er innmerkingen i antisense-embryo eksponert for råolje + UV høyere enn sense-embryo, og overlappende med *cyp1a*, som støtter at innmerkingen har opphav fra *gmahr2a*-transkript.

Til sammen viser uttrykket av *Ahr* i torsk en overlapp med hvordan *Ahr* er uttrykt i andre fiskearter, i form av at *gmahr2a* er den mest dominerende paralogen og er uttrykt i flest vev, mens *gmahr1a* har et mer begrenset vevsuttrykk.

5.5 *Ahr2a*-uttrykk overlapper med *cyp1a* i torskeembryo og larve

ISH og qPCR analysene viste at råolje- og råolje + UV-eksponering på eggstadiet førte til en oppregulering av *cyp1a*. I råolje + UV-eksponert torskeembryo 4,5 dpf var uttrykk av *cyp1a* samlokalisert med *gmahr2a* i epidermis, samlokaliseringen var også bevart i larve 3 dph i hjertet og i området hvor otisk plakode og lever utvikles.

Flere studier med sebrafisk har indikert at det er *drahr2*-isoformen som er ansvarlig for fremmedstoffrespons, deriblant induksjon av *cyp1a* (Andreasen *et al.*, 2002; Incardona *et al.*, 2006; Sugden *et al.*, 2017). I Sugden *et al.*, 2017 ble oppreguleringen av *cyp1a* etter eksponering for BNF i tillegg undersøkt i sebrafisk-mutanter hvor *Ahr*-variantene var hver for seg avslått ved bruk av TALEN mutagenese. Resultatet demonstrerte at tap av *drahr2*, men ikke *drahr1a* og *drahr1b*, førte til betydelig reduksjon i oppreguleringen av *cyp1a* i hele larven. Undersøkelser med avslått *Ahr* har også blitt gjort i Incardona *et al.*, 2006 hvor sebrafisklarver 72 hpf ble eksponert for individuelle PAH forbindelser. Denne studien viste at *cyp1a* ble oppregulert i lever og i forskjellige blodkar i hoderegionen, og at uttrykket var *drahr2*-avhengig. Funnene støtter at *drahr2* er hovedregulatoren av *cyp1a*-uttrykk i sebrafisk. En studie med *Ahr* fra regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) antyder at også i denne arten er det hovedsakelig én

Ahr-isoform (*omahr2a*) som induserer biotransformasjonzymmer som *cyp1a* (Abnet *et al.*, 2002). Disse observasjonene i sebrafisk og regnbueørret underbygger samlokaliseringen av *gmarh2a* og *cyp1a* i eksponerte torskeembryo og larve, og kan videre indikere at *gmarh2a* har en funksjonell overlapp med *drahr2* og *omahr2a* i reguleringen av *cyp1a*. Incardona *et al.*, 2006 viste likevel også at *cyp1a*-uttrykket i endokardiet til hjertet var også tilstede i larver hvor *drahr2* var avslått, som kan indikere at *cyp1a*-uttrykket i dette området er uavhengig av *drahr2*. Slik *Ahr*-uavhengig *cyp1a* induksjon har også blitt observert tidligere (Andreasen *et al.*, 2002; Sugden *et al.*, 2017) og kan være opphavet til noe av *cyp1a* uttrykket som er synlig i torskelarvene 3 dph.

I kontroll og UV-kontroll larvene var henholdsvis *cyp1a*- og *gmahr2a*-mRNA lavere uttrykt, men også her overlappet plasseringen til uttrykket. Overlappende innmerking kan synes i hjertet, i området ved lukteorganet, brystfinnen og i fotoreseptorlaget til netthinnen. Embryo 4,5 dpf eksponert for UV-lys i rent sjøvann viste et sterkt og avgrenset *cyp1a*-uttrykk i forløpervevet til hjertet, og i to lateralmotsatte samlinger i de fremste somittene, kaudalt for hjerteprimordiet. Denne oppreguleringen var overraskende i fravær av råolje fra eksponeringen, men kan skyldes *Ahr*-aktivering av tryptofanderivater produsert av UV-eksponering, som diskutert ovenfor. Samlokaliseringen av *gmahr2a* og *cyp1a* kunne ikke observeres i UV kontroll embryo. Dette støtter at den sterke og avgrensede *cyp1a*-induksjonen i råoljeeksponert torskeembryo var *gmahr2a*-uavhengig, og indikerer at *cyp1a*-oppreguleringen har et ukjent endogent opphav. En annen mulighet er at *gmahr2a* var tilstede i hjerteprimordiet, men uttrykket var for lavt til at signalet fra proben ble synlig, noe som kan være en feilkilde når man undersøker lavt uttrykkede gen ved bruk av helkroppss ISH.

Cyp1a-uttrykket i råoljeeksponerte torskelarver 3 dph var synlig i otisk plakode, lever og hjerte. *gmahr2a*-uttrykket i råolje + UV-eksponerte larver overlappet med *cyp1a* i lever og otisk plakode, men ved dette stadiet inkluderte *gmahr2a*-uttrykket også flere vevstyper som lukteorgan, tarm, hjerne, fotoreseptorlaget i øyet og kjeve-områdene. En slik skjevhet har også blitt observert tidligere i TCDD-eksponert sebrafisk (Andreasen *et al.* 2002), der *drahr2* ble funnet i blant annet hjerte, ryggmarg og i sensoriske organ hvor *cyp1a* var fraværende. Forskjellen kan ha flere årsaker. Blant annet kan det komme av at råoljekomponentene som har aktivert *cyp1a*-induksjon ikke har vandret til disse områdene i larven.

I motsetning til *gmahr2a* ble ikke *cyp1a* indusert i områder med *gmahr1a*-mRNA, hverken i eksponert- eller kontroll-gruppe. I BNF-eksponerte sebrafisklarver ble derimot *cyp1a*-uttrykk bevart i øyet til *drahr2*-mutantene, og indikerte dermed at *drahr1b*, som ble uttrykt i øyet, kan ha en kompenserende funksjon for *drahr2* i sebrafisk når det kommer til *cyp1a*-uttrykk. Den samme støttende rollen ble derimot ikke observert i torsk, som viste *gmahr1a*-uttrykk i øyet,

men med et fravær av *cyp1a* både i embryo og larve. Til sammen indikerer det at *gmahr1a* på tross av nært slektskap og likt vevsuttrykk har en ulik evne til å regulere *cyp1a* i torsk, sammenlignet med *ahr1b* i sebrafisk. Videre indikerer det at *gmahr1a* har en annen fysiologisk funksjon enn den klassiske rollen som fremmedstoffsensitiv og regulator av toksisk respons.

I amfibien *Xenopus laevis* er det funnet to varianter av *Ahr*, *xlahr1a* og *xlahr1b*. Disse har oppstått fra en nylig genduplikasjon trolig spesifikk til *Xenopus*-slekten, som har gitt *Ahr*-paralogene meget lik struktur og egenskap (Lavine *et al.*, 2005). I motsetning til *Ahr*-paralogene i torsk (*gmahr1a* og *-2a*) sitt tilsynelatende isoformspesifikke uttrykk og evne til å inducere *cyp1a*, har *xlahr1a* og *-1b* vist et tilnærmet likt vevsuttrykk og lik evne å binde TCDD.

Ahr er en kjent for å mediere toksiske effekter, samtidig blir *Ahr* stadig tilegnet nye fysiologiske funksjoner som er ikke relatert til toksisitet. Kunnskap om *Ahr* sitt vevsuttrykk og funksjon er nødvendig for å videreutvikle torsk som en modellorganisme og indikatorart. I torsk er paralogene *gmahr1a* og *gmahr2a* nylig identifisert, og i denne oppgaven ble uttrykket undersøkt med helkroppss ISH og sanntids-qPCR i embryo 4,5 dpf og larve 3 dph. Uttrykket overlappet med hvordan *ahr1* og *ahr2* er beskrevet i andre teleoster, hvor *ahr2* er uttrykt i mange vev, mens *ahr1* har et mer begrenset uttrykk. Som observert i andre studier indikerer samlokaliseringen av *gmahr2a* og *cyp1a* at også i torsk er det denne paralogen som regulerer induksjonen av gener relatert til fremmedstoffrespons. Transkript av *gmahr1a* ble funnet i de nevroblastiske cellene til retina i embryo 4,5 dpf og i ganglioncellelaget til larve 3 dph. Disse lokalitetene overlappet ikke med uttrykket av *cyp1a*, som indikerer en fysiologisk funksjon i disse vevene for *gmahr1a*, annet enn en fremmedstoffsensitiv.

5.6 Torskeembryo eksponert for lave råoljekonsentrasjoner med og uten UV-lys førte til deformiteter på larvestadiet (3 dph)

Torskeegg eksponert for lave konsentrasjoner råolje og råolje med UV-bestråling fra 1,5 dpf til 4,5 dpf resulterte i en økning av deformiteter på larvestadiet 3 dph. I gruppen med normal belysning ble deformitetene hovedsakelig funnet i kraniet.

Torsk er tidligere vist å danne lignende misdannelser etter eksponering for råolje. I én studie ble torskeegg og -larver eksponert for 50 og 250 µg/l WSF-råolje over en periode på tre uker (fra en uke før klekking til to uker etter klekking) (Tilseth *et al.*, 1981). Som observert i denne oppgaven førte råoljeeksponeringen beskrevet i Tilseth *et al.*, 1981 til en økt forekomst av kraniedeformiteter i larvene, som også viste å gi larvene en redusert kapasitet til å innta føde. I motsetning til deformitetene vist i Tilseth *et al.*, 1981 ble det ved tilsvarende eksponering i denne oppgaven (200 µg/l) observert signifikante forskjeller i kun én av de målte trekkene mellom eksponert og kontroll. Dette indikerer at lengden på eksponeringen for råolje er avgjørende for forekomsten av deformiteter ved senere utviklingsstadium. Videre antyder

fraværet av misdannelser i 200 µg/l-gruppen at denne eksponeringen ved dette stadiet ikke utløser mekanismene som danner deformiteter senere i utviklingen. Likevel er dette en toksisk eksponering for torskeegget som ble bekreftet av kraftig oppregulering av *cyp1a*. I Sørhus *et al.* (2016) ble det funnet deformitetsdannelse i hyselarver 3 dph etter eksponering for råolje på embryostadiet i åtte dager (2 dpf – 10 dpf). I likhet med torsk ble det funnet misdannelser i kraniet. Hyselarven fikk underutviklet overkjeve, hengende underkjeve og en sterk reduksjon i andre benformasjoner i kraniet. I motsetning til torsk ble disse misdannelsene også funnet i hyse eksponert for lavere råoljekonsentrasjoner (60 µg/l), hvor til sammenligning torskelarvene 3 dph etter eksponering for 200 µg/l råolje var tilnærmet lik kontroll. Hyseegg er mer sårbar for oljeeksponering som følge av dråpedannelse på korion (Sørhus *et al.*, 2015), og effektene ved eksponering for denne konsentrasjonen gjenspeiler dette. Som diskutert i Sørhus *et al.*, 2016 har lignende kraniedeformiteter blitt observert i sebrafisklarver etter at muskulaturen var blitt paralyisert på embryostadiet (Shwartz *et al.*, 2012). I denne studien ble deformitetsdannelsen forklart med at fraværet av muskelsammentrekning hindret riktig konvergent utstrekning av chondrocyttene til kjevebenene. Dette førte til misdannelser med sterk likhet til kraniedeformitetene observert i råoljeeksponerte torskelarver. Overlappen indikerer at råoljen kan innvirke på mekanismene som styrer muskelsammentrekningen i torskeembryo/larve. Til sammen underbygger studiene at eksponering for lave konsentrasjoner råolje på eggstadiet fører til kraniedeformiteter på larvestadiet som observert hos torsk i denne oppgaven.

Det ble ikke observert en økning i ødem rundt plommesekken inkludert perikardiet, verken i gruppen eksponert for råolje eller råolje med UV-bestråling. Råoljeeksponering av tidlige livsstadier til fisk har i flere studier vist å føre til defekt i hjertet, som ofte har medført en økning i ødem rundt perikardiet til embryoene/larvene (Incardona, *et al.*, 2004; Incardona *et al.*, 2009; Edmunds *et al.*, 2015; Sørhus *et al.*, 2016). Dette har blitt knyttet til trisykliske PAH-er sin evne å blokkere ionekanaler som forstyrrer Ca²⁺- og K⁺-homeostasen i hjertemuskelcellene, og fører til økt forekomst av såkalt «stille-hjerte» hvor hjertemusklene stopper å slå. I gullmakrellen *Coryphaena hippurus* ble det observert ødemdannelse rundt perikardiet etter 48 timers råoljeeksponering på eggstadiet. Ødemdannelsen ble observert etter eksponering for mellom 0,6 – 3,1 µg/l tPAH, og var den mest sensitive av indikatorene på hjertetoksisitet (Edmunds *et al.*, 2015). I hyselarvene studert i Sørhus *et al.* 2016 ble det funnet en doseavhengig økning i plommesekkødem (som inkluderer perikardiet) etter eksponering på eggstadiet (2 dpf – 10 dpf), som ble knyttet til forstyrrelser i ionetransporten til hjertemusklene. Fraværet av ødemdannelse i torskelarvene i dette forsøket var derfor uventet, og kan indikere at mekanismer er tilstede i torsk som motvirker effektene som forårsaker ødemdannelse, alternativt at ødemdannelsen er reversibel. Likevel trengs det nærmere studier av slag- og hjerterytmen til torskehjertet før toksiske effekter på hjertet kan utelukkes. Utviklingen av

kraniedeformiteter uten ødemdannelse støtter at deformitetene i torskelarvene kan ha oppstått gjennom en annen mekanisme enn via sirkulasjonssvikt.

Larver eksponert for UV-bestrålt råolje opplevde et ulikt deformitetssyndrom fra larver eksponert for kun råolje. UV-eksponerte larver skilte seg fra larver i normalt lys ved dannelse av kurvatur i ryggraden (skoliose), et trekk som var spesielt fremtredende i 600 µg/l råolje + UV-gruppen. I larver eksponert for UV-lys i rent sjøvann (UV-kontroll) var forekomsten av skoliose på 16%, som økte til 56% i den høyeste råoljedosen med UV-bestråling. Denne observasjonen underbygger UV-lys sin evne å reagere med komponenter i larven som gir konsekvenser for embryoutviklingen, og at fotomodifiserte produkter av råoljen har en forsterkende effekt i utviklingen av denne deformiteten. Larvene eksponert for råolje + UV hadde i tillegg en noe større plommesekk og var kortere, som er tegn på at mekanismer knyttet til vekst er påvirket av behandlingen. Lengden til larvene var også signifikant redusert i gruppen eksponert for UV-lys i rent sjøvann (UV kontroll), som indikerer at UV-stråling i seg selv har en effekt på veksten til larvene.

Målingene av fenotypiske trekk i torskelarver 3 dph demonstrerer at en kort råoljeeksponering på eggstadiet kan føre til senskader i form av deformiteter i larvene. Ko-eksponering med råolje og miljømessig relevant UV-bestråling fører til et unikt deformitetssyndrom, med økt forekomst av kroppsaksedeformiteter i form av skoliose. Slike senskader burde inkluderes i risikovurderingen av et potensielt oljeutslipp utenfor LoVeSe, ettersom de kan gi opphav til alvorlige konsekvenser for torskens næringsinntak og reproduksjon videre i livssyklusen.

5.7 Nettverksanalysen viste signifikant anrikelse av reaksjonsveier knyttet til muskelsammentrekning, hjertesvikt og AHR-aktivering

Ved nettverksanalyse av differensielt uttrykte gener i råoljeeksponert torskeembryo 4,5 dpf (FDR < 0,0003) ble det funnet flere anrikede reaksjonsveier som er relatert til muskelfunksjon og hjertesvikt. I tillegg var proteiner som er aktive i fase 1 av biotransformasjonen oppregulert, inkludert AHR-regulerte proteiner.

Flere av de anrikede reaksjonsveiene i råoljeeksponerte torskeembryo 4,5 dpf var relatert til muskelfunksjon (tabell 8.1 og 8.2, appendiks). Et protein som er sentralt i aktiveringen av muskulaturen gjennom intracellulær frigjørelse av kalsium i muskelceller fra sarkoplasmatiske retikulum er ryanodin reseptor (RYR) (Schmitt, *et al.*, 2014). RYR1 og 3 var differensielt uttrykt i torskeembryo 4,5 dpf og inngikk blant annet i den anrikede reaksjonsveien «kalsiumsignalisering-reaksjonsvei» (tabell 8.1, appendiks). Den observerte oppreguleringen av RYR kan være en kompenserende mekanisme som følge av forstyrrelse av kalsiumhomeostasen. Forstyrrelsen er en kjent effekt av blokkeringen av ionekanaler av trisykliske PAHer (Brette *et al.*, 2017). Oppreguleringen av RYR i tillegg til flere andre proteiner

relatert til muskelfunksjon underbygger videre hypotesen om at deformitetene observert i torsk og hyse kan relateres til tap av muskelfunksjon under utviklingen av larvene, slik som observert hos sebrafisk i Shwartz *et al.*, 2012.

Noen av reaksjonsveiene med lavest FDR-verdi var knyttet til hjertemuskelpatologier, blant annet hypertrofisk kardiomyopati ($FDR < 8,87 \cdot 10^{-7}$), arrytmogenisk høyre-ventrikkulær kardiomyopati ($FDR < 3,22 \cdot 10^{-7}$) og dilatert kardiomyopati ($FDR < 7,25 \cdot 10^{-6}$) (tabell 8.1, appendiks). Anrikningene av disse reaksjonsveiene antyder at råoljeeksponeringen har innvirkning på funksjonen til hjertemuskelen i torskeembryo, og støtter tidligere studier som har demonstrert at eksponering for råoljeblandinger er toksisk for teleosthertet (Incardona, *et al.*, 2004; Incardona *et al.*, 2015; Brette *et al.*, 2017; Khursigara *et al.*, 2017). Denne påvirkningen på hjertemuskulaturen i torskeembryo 4,5 dpf førte ikke til en økning i plommesekkødem i larver 3 dph, men peker på et behov for videre undersøkelser av råoljens effekter på torskehjertet.

Videre viste nettverksanalysen med STRING at reaksjonsveien «Fase 1 – funksjonalisering av forbindelser» fra Reactome-databasen var anrikt i råoljeeksponerte torskeembryo 4,5 dpf (tabell 8.2, appendiks). Signifikant oppregulerte proteiner som inngikk i denne reaksjonsveien var blant annet CYP1A1, CYP1B1, aryl hydrokarbonreseptor repressor (AHRR) og ALDH3A1, som alle blir induert av AHR-aktivering (Nebert *et al.*, 2000; Denison and Nagy, 2003; Yamauchi *et al.*, 2005). Anrikelsen av denne reaksjonsveien underbygger derfor AHR-aktiveringen observert i qPCR-analysen i form av *cyp1a*-induksjon.

6. Oppsummering og Konklusjon

Lave konsentrasjoner (600 og 200 µg/l) råolje førte til en doseavhengig oppregulering av *cyp1a* i torskkegg, og UV-bestråling hadde en stimulerende effekt på oppreguleringen av dette genet. Uttrykket var synlig etter 24 timers eksponering, som antyder at *Ahr*-signalveien er funksjonell i torskkegg allerede ved 2,5 dpf, før epiboly inntreffer. Videre viste ISH av larver 3 dph at *cyp1a* uttrykket ble bevart i hjertet og områder i buken hvor lever og otisk plakode utvikles over ni dager etter eksponeringen fant sted. Dette indikerer en vedvarende effekt av eksponeringen som påvirker embryo negativt lenge etter at eksponeringen er over.

gmahr1a og *gmahr2a* har et isoformspesifikt uttrykk i torskeembryo og –larve, og samlokaliseringen mellom *cyp1a* og *gmahr2a* indikerer at det er *gmahr2a* som har den klassiske rollen som fremmedstoffsensitiv i tidlige livsstadier av torsk. *gmahr1a* er kun uttrykt i øyet hos embryo og larve, og uttrykket konsentrerer seg i ganglioncellelaget til retina hos torskelarven. I motsetning til *gmahr2a* overlappet ikke *gmahr1a*-uttrykk med *cyp1a* som indikerer at *gmahr1a* i tidlige livsstadier til torsk ikke har *cyp1a* som sitt primære målgen, og har mulig en annen fysiologisk rolle enn en fremmedstoffsensitiv.

En kort eksponering på eggstadiet førte til deformiteter hos torskelarver 3 dph. Larver fra egg eksponert med normal belysning opplevde økte deformiteter hovedsakelig knyttet til kraniet, mens larver fra egg eksponert med UV-bestråling fikk hovedsakelig kroppsaksedeformiteter lokalisert i ryggstøylene (skoliose). I motsetning til tidligere observerte ødemdannelse som følge av råoljeeksponering, førte denne eksponeringen til ingen signifikante endringer i ødem verken råolje eller råolje + UV-eksponert torskelarve.

Nettverksanalysen av differensielt uttrykkede gener i torskeembryo 4,5 dpf viste anrikelse av reaksjonsveien som underbygget den observerte aktiveringen av AHR-signalveien. I tillegg avdekket analysen aktiveringen av reaksjonsveier som kan være medvirkende til deformitetsdannelsen observert hos råoljeeksponerte larver 3 dph.

Funnene indikerer at eggstadiet til torsk, som flyter fritt i vannsøylen, er sensitiv for kontakt med lave konsentrasjoner råolje, og at sollyset som treffer eggene i sjøen utenfor LoVeSe kan medvirke til å forsterke de toksiske effektene av olje som nevnt ovenfor. Videre viser funnene at AHR, en viktig mediator av PAH-toksisitet, har tilsynelatende distinkte roller som er ulikt fordelt på *Ahr*-paralogene i torsk: *gmahr1a* og *gmahr2a*.

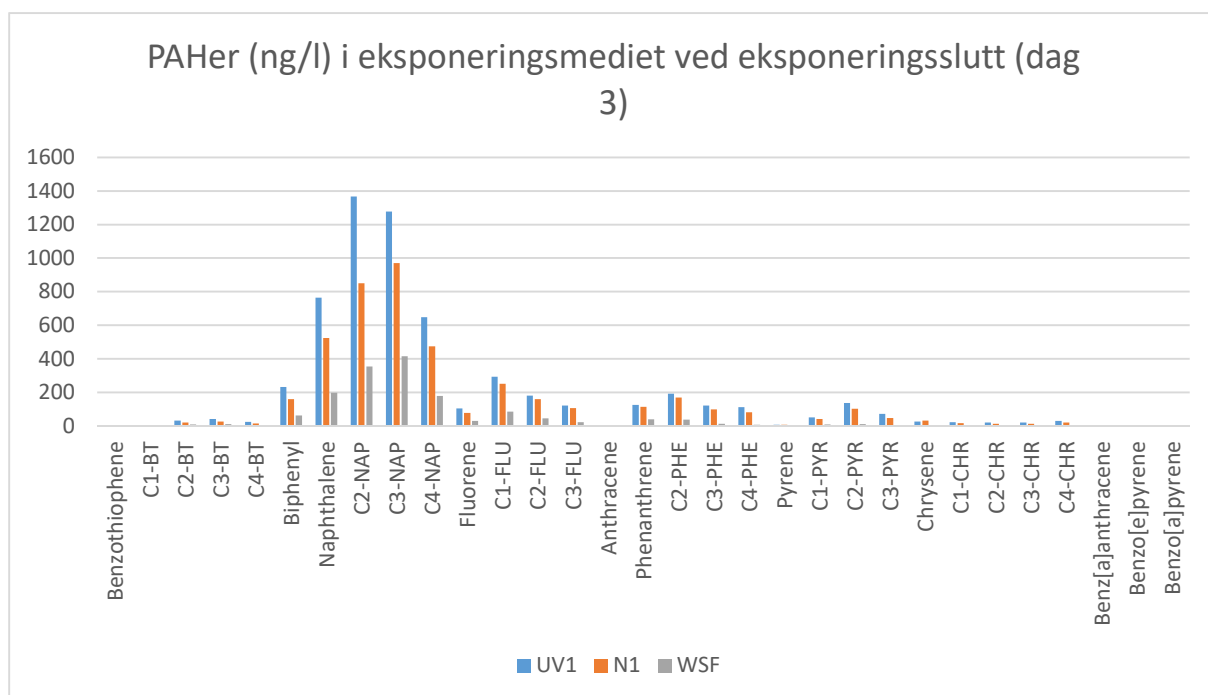
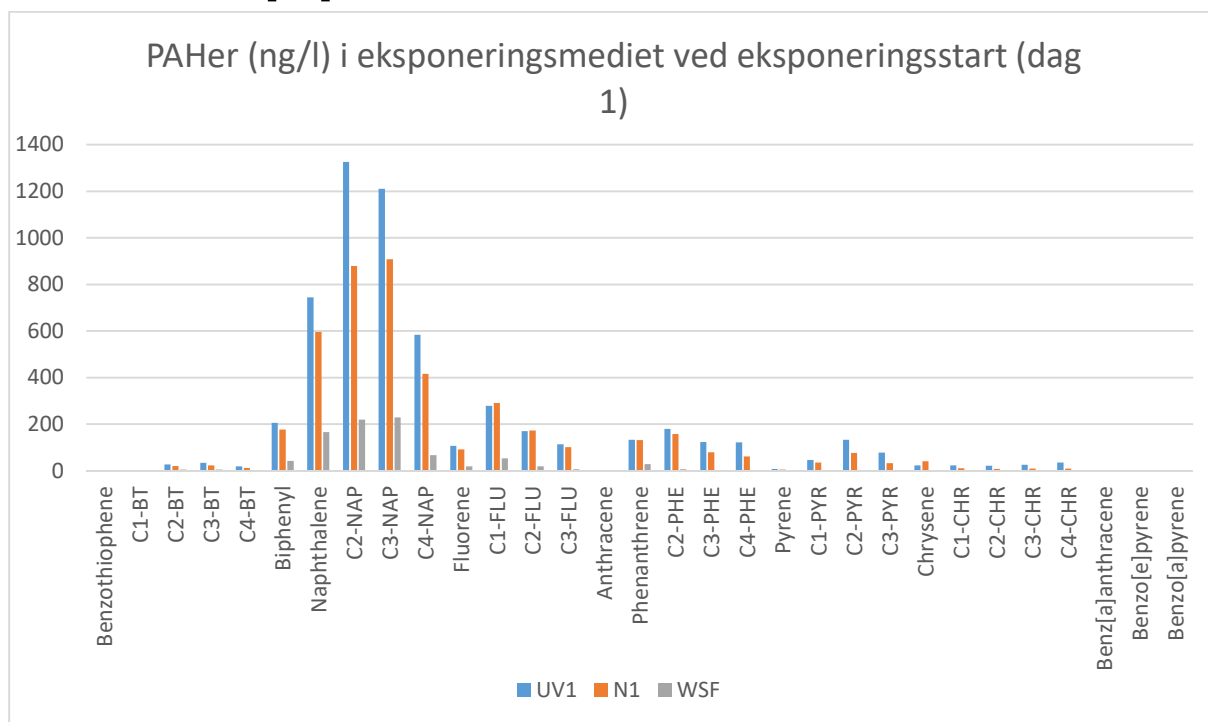
7. Videre arbeid

I denne oppgaven har det blitt vist at torskkeegg eksponert for vann kontaminert med lave konsentrasjoner råolje raskt absorberer AHR-agonister fra oljen, som førte til økt *cyp1a*-uttrykk. Siden begge råoljekonsentrasjonene testet i dette forsøket gav høy oppregulering av CYP1A, burde fremtidige forsøk undersøke uttrykket ved lavere konsentrasjoner med hensikt å finne en terskelverdi for induksjonen. Videre bør det gjøres kjemisk analyse av embryo før og etter eksponering for å estimere akkumuleringen av PAH-er, og deretter undersøke korrelasjonen mellom tPAH-innholdet i embryo og *cyp1a*-induksjon.

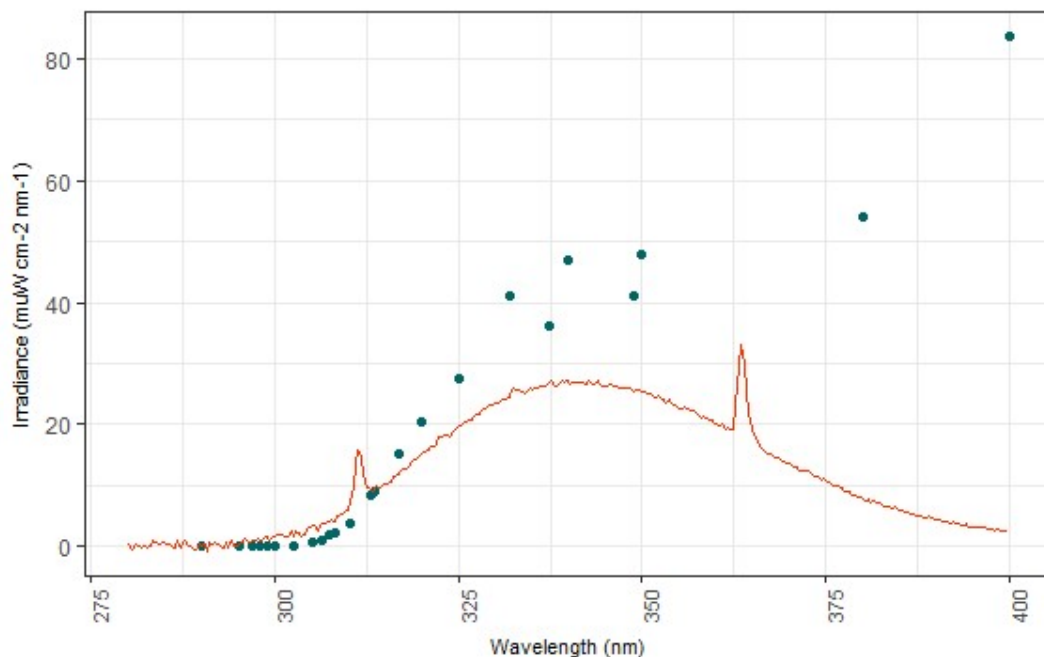
Råoljeeksponeringen med og uten UV-bestråling førte til økt dødelighet og *cyp1a*-induksjon hos torskkeegg. I tillegg førte UV-bestråling til et særegent deformitetssyndrom i torskelarver 3 dph. For å videre utlede mekanismene bak UV-påvirkningen anbefales det også å gjøre kjemisk analyse av embryo for å undersøke dannelsen av fotoinduserte oksygenforbindelser som PAH-quinoner i embryo. En slik undersøkelse kan pares med en måling av induksjonen til gener relatert til oksidativt stress, som glutathion-s-transferaser (*gst*) eller superoksid dismutase (*sod*).

Genuttrykket til *cyp1a*, *gmahr2a* og *gmahr1a* ble lokalisert i torskeembryo og –larve i denne oppgaven ved bruk av helkroppss ISH. Metoden gir en topografisk oversikt over uttrykket til genene i embryoet/larven. For å videre identifisere hvilke organ/celletyper uttrykket stammer fra, anbefales det å gjøre oppfølgende studier med immunohistokjemi rettet mot *cyp1a*, *gmahr2a* og *gmahr1a* i vevssnitt av embryo/larve. Denne metoden vil trolig være sensitiv nok til å produsere resultat som kan underbygge/avkrefte forholdet mellom *gmAhr* og *cyp1a* som ble observert i denne oppgaven.

8. Appendiks



Figur 8.1: Måling av individuelle PAHer i eksponeringsmediet ved dag 1 (øvers) og dag 3 (neders) av eksponeringen.



Figur 8.2: Sammenligning av midtdags stråling fra solen 30. April 2016 71 grader Nord i Barrow, Alaska (blå prikker) med UV-strålingen gitt av UV-lampene brukt i dette forsøket (rød linje). UV-lampene ble målt med 0,5 nm intervaller, imens solstrålingen ble målt med 1-30 nm intervaller.

Tabell 8.1: Anrikede reaksjonsveier, og uttrykkede proteiner (FDR < 0,0003) som er assosiert med reaksjonsveiene, hentet fra KEGG-databasen (Reaksjonsveiene uthevet i fig. 4.16, er i denne tabellen uthevet med gul). Reaksjonsveiene står i rekkefølge etter FDR-verdi, hvor lavest starter øverst. Generert med STRING (www.string-db.org).

#ID	Reaksjonsvei	FDR	Proteiner assosiert med reaksjonsveien
hsa04512	ECM-receptor interaction	1.46e-07	CHAD, COL1A1, COL2A1, COL4A1, COL4A3, COL4A4, COL4A6, COL9A1, COL9A2, COL9A3, DAG1, ITGA11, ITGA5, ITGA8, ITGB1, LAMA2, LAMB1, RELN, SV2A, SV2C, TNN, VTN
hsa04974	Protein digestion and absorption	3.91e-07	ATP1A1, ATP1B1, ATP1B2, ATP1B3, COL11A2, COL12A1, COL1A1, COL21A1, COL22A1, COL2A1, COL4A1, COL4A3, COL4A4, COL4A6, COL5A1, COL9A1, COL9A2, COL9A3, CTRB1, KCNK5, SLC38A2, SLC8A3
hsa04510	Focal adhesion	6.08e-07	CAV3, CCND1, CHAD, COL1A1, COL2A1, COL4A1, COL4A3, COL4A4, COL4A6, COL9A1, COL9A2, COL9A3, FLNC, FYN, HGF, ITGA11, ITGA5, ITGA8, ITGB1, KDR, LAMA2, LAMB1, MYLK, MYLPP, PAK1, PARVB, PIK3CD, PRKCB, RELN, TNN, VASP, VTN
hsa05410	Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	8.87e-07	ACTC1, CACNA1D, CACNA1S, CACNA2D1, CACNG8, DAG1, DES, DMD, ITGA11, ITGA5, ITGA8, ITGB1, LAMA2, PRKAB1, PRKAG2, SGCA, SGCG, TGFB2, TNNC1, TPM1
hsa05412	Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	3.22e-06	ACTN2, ACTN3, CACNA1D, CACNA1S, CACNA2D1, CACNG8, DAG1, DES, DMD, ITGA11, ITGA5, ITGA8, ITGB1, LAMA2, LEF1, SGCA, SGCG, TCF7L1
hsa01100	Metabolic pathways	3.53e-06	ABAT, ACADVL, ADH1A, ADK, ADSSL1, AGXT, AHCYL1, AK1, ALAS1, ALDH18A1, ALDH1A1, ALDH3A1, ALDOA, ALPL, AMDHD1, AMPD1, AMPD2, AMPD3, AMT, AMY2B, AOC1, ARG2, ATIC, ATP6AP1, ATP6V0A1, BDH1, BHMT, C1GALT1, CDA, CERS3, CES1, CHDH, CKB, CKM, CYP11B1, CYP1A1, CYP24A1,

			CYP26A1,CYP26C1,CYP2R1,CYP3A4,DCT,DHCR7,DHRS3,DMGDH,DPYD,FAH,FECH,FUT9,GAD1,GAD2,GALNT6,GAPDHS,GCSH,GK,GLUD1,GLUL,GMDS,GPI,GSTZ1,HAO1,HGD,HPD,HPSE2,IDH2,IDO1,INPP5K,ISYNA1,LDHAL6B,LIPC,LPIN1,MSMO1,NMRK2,ODC1,PCYT1B,PCYT2,PDXK,PFAS,PFKM,PGAM2,PI4K2A,PKLR,PLA2G4C,PLCB1,PLCD4,PLCE1,PNMT,PTDSS1,PTGIS,QDPR,SAT1,SC5D,SDHA,SGMS2,SHMT2,ST3GAL1,TAT,TH,TKT,TYRP1,UGT1A8
hsa05414	Dilated cardiomyopathy (DCM)	7.25e-06	ACTC1,ADCY6,CACNA1D,CACNA1S,CACNA2D1,CACNG8,DAG1,DES,DMD,ITGA11,ITGA5,ITGA8,ITGB1,LAMA2,SGCA,SGCG,TGFB2,TNNC1,TPM1
hsa04727	GABAergic synapse	2.65e-05	ABAT,ADCY6,CACNA1D,CACNA1S,GABBR1,GABBR2,GABRA5,GABRG2,GAD1,GAD2,GLUL,GNAI2,GNAO1,NSF,PRKCB,SLC32A1,SLC38A2,SLC6A1
hsa00350	Tyrosine metabolism	0.00014	ADH1A,ALDH3A1,DCT,FAH,GSTZ1,HGD,HPD,PNMT,TAT,TH,TYRP1
hsa00260	Glycine, serine and threonine metabolism	0.0012	AGXT,ALAS1,AMT,BHMT,CHDH,DMGDH,GCSH,GNMT,PGAM2,SHMT2
hsa04724	Glutamatergic synapse	0.0012	ADCY6,CACNA1D,GLUL,GNAI2,GNAO1,GRIA2,GRIA3,GRIA4,GRIK2,GRIN1,PLA2G4C,PLCB1,PPP3CA,PRKCB,SLC17A6,SLC1A2,SLC38A2
hsa04979	Cholesterol metabolism	0.0012	ABCA1,ANGPTL3,APOA4,APOB,LDLR,LDLRAP1,LIPC,LPL,LRP1,NPC2,VDAC3
hsa04713	Circadian entrainment	0.0016	ADCY6,ADCYAP1R1,CACNA1D,GNAI2,GNAO1,GRIA2,GRIA3,GRIA4,GRIN1,GUCY1B3,PLCB1,PRKCB,RASD1,RYR1,RYR3
hsa04971	Gastric acid secretion	0.0016	ADCY6,ATP1A1,ATP1B1,ATP1B2,ATP1B3,CFTR,EZR,GNAI2,KCNJ15,KCNJ16,MYLK,PLCB1,PRKCB
hsa04911	Insulin secretion	0.0017	ADCY6,ADCYAP1,ADCYAP1R1,ATP1A1,ATP1B1,ATP1B2,ATP1B3,CACNA1D,CACNA1S,INS,PLCB1,PRKCB,RAB3A,SNAP25
hsa05205	Proteoglycans in cancer	0.0017	ANK1,ANK2,CAV3,CCND1,COL21A1,DCN,EZR,FLNC,HGF,HPSE2,ITGA5,ITGB1,KDR,MMP9,PAK1,PDCD4,PIK3CD,PLCE1,PRKCB,TGFB2,VTN,WNT16,WNT2B
hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway	0.0024	CCND1,CCNE2,CHAD,COL1A1,COL2A1,COL4A1,COL4A3,COL4A4,COL4A6,COL9A1,COL9A2,COL9A3,EPHA2,FGF10,FGF17,FGF7,HGF,HSP90AA1,INS,ITGA11,ITGA5,ITGA8,ITGB1,KDR,LAMA2,LAMB1,NR4A1,PIK3CD,PPP2R2B,RELN,SGK1,TNN,VTN
hsa04921	Oxytocin signaling pathway	0.0024	ADCY6,CACNA1D,CACNA1S,CACNA2D1,CACNG8,CCND1,GNAI2,GNAO1,GUCY1B3,MYLK,NFATC4,PLA2G4C,PLCB1,PPP3CA,PRKAB1,PRKAG2,PRKCB,RYR1,RYR3
hsa05165	Human papillomavirus infection	0.0024	APC2,ATP6V0A1,CCND1,CCNE2,CHAD,CHD4,COL1A1,COL2A1,COL4A1,COL4A3,COL4A4,COL4A6,COL9A1,COL9A2,COL9A3,DLG2,HEYL,ITGA11,ITGA5,ITGA8,ITGB1,LAMA2,LAMB1,PIK3CD,PPP2R2B,RELN,TCF7L1,TNN,VTN,WNT16,WNT2B
hsa04022	cGMP-PKG signaling pathway	0.0046	ADCY6,ATP1A1,ATP1B1,ATP1B2,ATP1B3,CACNA1D,CACNA1S,GNAI2,GUCY1B3,INS,MEF2A,MYLK,NFATC4,OPRD1,PLCB1,PPP3CA,SLC8A3,VASP,VDAC3
hsa04360	Axon guidance	0.0046	DCC,DPYSL2,DPYSL5,EPHA2,EPHA6,FYN,GNAI2,ITGB1,L1CAM,NFATC4,PAK1,PIK3CD,PLXNB1,PLXNB3,PPP3CA,RND1,SEMA3B,SEMA3C,SEMA4D,SEMA6C
hsa04973	Carbohydrate digestion and absorption	0.0046	AMY2B,ATP1A1,ATP1B1,ATP1B2,ATP1B3,CACNA1D,PIK3CD,PRKCB,SLC37A4
hsa04260	Cardiac muscle contraction	0.0055	ACTC1,ATP1A1,ATP1B1,ATP1B2,ATP1B3,CACNA1D,CACNA1S,CACNA2D1,CACNG8,MYL4,TNNC1,TPM1
hsa04024	cAMP signaling pathway	0.0065	ADCY6,ADCYAP1R1,ATP1A1,ATP1B1,ATP1B2,ATP1B3,CACNA1D,CACNA1S,CFTR,GABBR1,GABBR2,GNAI2,GRIA2,GRIA3,GRIA4,GRIN1,PAK1,PDE4A,PIK3CD,PLCE1,SSTR5
hsa04960	Aldosterone-regulated sodium reabsorption	0.0076	ATP1A1,ATP1B1,ATP1B2,ATP1B3,INS,PIK3CD,PRKCB,SGK1
hsa05222	Small cell lung cancer	0.0076	CCND1,CCNE2,COL4A1,COL4A3,COL4A4,COL4A6,GADD45G,ITGB1,LAMA2,LAMB1,PIK3CD,RARB,SKP2

hsa01230	Biosynthesis of amino acids	0.0101	ALDH18A1,ALDOA,ARG2,GLUL,LDH2,PFKM,PGAM2,PKLR,SHMT2,TAT,TKT
hsa04611	Platelet activation	0.0102	ADCY6,COL1A1,FGA,FGB,FGG,FYN,GNAI2,GUCY1B3,ITGB1,MYLK,PIK3CD,PLA2G4C,PLCB1,TBXA2R,VASP
hsa04721	Synaptic vesicle cycle	0.0102	ATP6V0A1,CPLX1,CPLX3,NSF,RAB3A,RIMS1,SLC17A6,SLC32A1,SNAP25,STXBP1
hsa05033	Nicotine addiction	0.0102	GABRA5,GABRG2,GRIA2,GRIA3,GRIA4,GRIN1,SLC17A6,SLC32A1
hsa04020	Calcium signaling pathway	0.0104	AVPR1A,CACNA1D,CACNA1S,GRIN1,MYLK,PHKA2,PHKG1,PLCB1,PLCD4,PLCE1,PPP3CA,PRKCB,RYR1,RYR3,SLC8A3,TBXA2R,TNNC1,TNNC2,VDAC3
hsa04933	AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	0.0104	CCND1,COL1A1,COL4A1,COL4A3,COL4A4,COL4A6,PIK3CD,PLCB1,PLCD4,PLCE1,PRKCB,SMAD3,TGFB2
hsa04261	Adrenergic signaling in cardiomyocytes	0.0110	ACTC1,ADCY6,ATP1A1,ATP1B1,ATP1B2,ATP1B3,CACNA1D,CACNA1S,CACNA2D1,CACNG8,GNAI2,MYL4,PLCB1,PPP2R2B,TNNC1,TPM1
hsa04530	Tight junction	0.0110	CACNA1D,CCND1,CFTR,CGN,CLDN10,CLDN17,CLDN4,DLG2,EZR,ITGB1,JAM2,MYH13,MYH3,PPP2R2B,PRKAB1,PRKAG2,TUBA1C,VASP
hsa04934	Cushing's syndrome	0.0110	ADCY6,AHR,APC2,CACNA1D,CACNA1S,CCND1,CCNE2,CYP11B1,GNAI2,LDLR,LEF1,NR4A1,PLCB1,RASD1,TCF7L1,WNT16,WNT2B
hsa04964	Proximal tubule bicarbonate reclamation	0.0110	ATP1A1,ATP1B1,ATP1B2,ATP1B3,CA4,GLUD1
hsa01200	Carbon metabolism	0.0130	AGXT,ALDOA,AMT,GCSH,GLUD1,GPI,HAO1,IDH2,PFKM,PGAM2,PKLR,SDHA,SHMT2,TKT
hsa00250	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	0.0159	ABAT,ADSSL1,AGXT,GAD1,GAD2,GLUD1,GLUL
hsa04925	Aldosterone synthesis and secretion	0.0159	ADCY6,ATP1A1,ATP1B1,ATP1B2,ATP1B3,CACNA1D,CACNA1S,LDLR,NR4A1,NR4A2,PLCB1,PRKCB
hsa05226	Gastric cancer	0.0159	APC2,CCND1,CCNE2,FGF10,FGF17,FGF7,GADD45G,HGF,LEF1,PIK3CD,RARB,SMAD3,TCF7L1,TGFB2,WNT16,WNT2B
hsa04723	Retrograde endocannabinoid signaling	0.0160	ADCY6,CACNA1D,CACNA1S,CNR1,GABRA5,GABRG2,GNAI2,GNAO1,GRIA2,GRIA3,GRIA4,PLCB1,PRKCB,RIMS1,SLC17A6,SLC32A1
hsa04350	TGF-beta signaling pathway	0.0176	ACVR1B,ACVR2B,BAMBI,BMP2,DCN,ID3,PITX2,SMAD3,SMAD7,SMAD9,TGFB2
hsa00330	Arginine and proline metabolism	0.0186	ALDH18A1,AOC1,ARG2,CARNS1,CKB,CKM,ODC1,SAT1
hsa04730	Long-term depression	0.0193	GNAI2,GNAO1,GRIA2,GRIA3,GUCY1B3,PLA2G4C,PLCB1,PRKCB,RYR1
hsa00100	Steroid biosynthesis	0.0201	CYP24A1,CYP2R1,DHCR7,MSMO1,SC5D
hsa00562	Inositol phosphate metabolism	0.0201	INPP5K,INPPL1,ISYNA1,MIOX,PI4K2A,PIK3CD,PIP4K2C,PLCB1,PLCD4,PLCE1
hsa00630	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	0.0201	AGXT,AMT,GCSH,GLUL,HAO1,SHMT2
hsa04670	Leukocyte transendothelial migration	0.0201	CLDN10,CLDN17,CLDN4,EZR,GNAI2,ITGB1,JAM2,MMP9,MYL9,PIK3CD,PRKCB,SIPA1,VASP
hsa00830	Retinol metabolism	0.0211	ADH1A,ALDH1A1,CYP1A1,CYP26A1,CYP26C1,CYP3A4,DHRS3,RDH5,UGT1A8
hsa04728	Dopaminergic synapse	0.0213	CACNA1D,DRD4,GNAI2,GNAO1,GRIA2,GRIA3,GRIA4,KIF5A,KIF5C,PLCB1,PPP2R2B,PPP3CA,PRKCB,TH
hsa04924	Renin secretion	0.0223	ADCY6,ADCYAP1,ADCYAP1R1,CACNA1D,CACNA1S,GNAI2,GUCY1B3,PLCB1,PPP3CA
hsa04015	Rap1 signaling pathway	0.0225	ADCY6,CNR1,EPHA2,FGF10,FGF17,FGF7,GNAI2,GNAO1,GRIN1,HGF,INS,ITGB1,KDR,PIK3CD,PLCB1,PLCE1,PRKCB,SIPA1
hsa05200	Pathways in cancer	0.0225	ADCY6,APC2,BMP2,CCND1,CCNE2,COL4A1,COL4A3,COL4A4,

			COL4A6,DCC,DLL4,FGF10,FGF17,FGF7,GADD45G,GNAI2,GSTA3,HEYL,HGF,HSP90AA1,IL23R,ITGB1,LAMA2,LAMB1,LEF1,MMP9,MSH2,PIK3CD,PLCB1,PRKCB,RARB,RASSF1,SKP2,SMAD3,TCF7L1,TGFB2,WNT16,WNT2B
hsa00410	beta-Alanine metabolism	0.0261	ABAT,ALDH3A1,CARNS1,DPYD,GAD1,GAD2
hsa04371	Apelin signaling pathway	0.0264	ADCY6,CCND1,GNAI2,MEF2A,MYL4,MYLK,PLCB1,PPARGC1A,PRKAB1,PRKAG2,RYR1,RYR3,SLC8A3,SMAD3
hsa05206	MicroRNAs in cancer	0.0284	APC2,CCND1,CCNE2,CYP1B1,CYP24A1,EZR,ITGA5,MMP9,PDCD4,PRKCB,RASSF1,TGFB2,TNN,TPM1,VIM
hsa00010	Glycolysis / Gluconeogenesis	0.0312	ADH1A,ALDH3A1,ALDOA,GAPDHS,GPI,LDHAL6B,PFKM,PGAM2,PKLR
hsa04972	Pancreatic secretion	0.0319	ADCY6,AMY2B,ATP1A1,ATP1B1,ATP1B2,ATP1B3,CFTR,CTRB1,PLCB1,PRKCB,SLC12A2
hsa05416	Viral myocarditis	0.0319	CCND1,DAG1,DMD,FYN,LAMA2,PRF1,SGCA,SGCG
hsa04916	Melanogenesis	0.0380	ADCY6,DCT,GNAI2,GNAO1,LEF1,PLCB1,PRKCB,TCF7L1,TYRP1,WNT16,WNT2B
hsa04976	Bile secretion	0.0380	ABCG2,ADCY6,ATP1A1,ATP1B1,ATP1B2,ATP1B3,CFTR,CYP3A4,LDLR
hsa05210	Colorectal cancer	0.0390	APC2,CCND1,DCC,GADD45G,LEF1,MSH2,PIK3CD,SMAD3,TCF7L1,TGFB2
hsa04961	Endocrine and other factor-regulated calcium reabsorption	0.0395	ADCY6,ATP1A1,ATP1B1,ATP1B2,ATP1B3,PLCB1,PRKCB
hsa04310	Wnt signaling pathway	0.0401	APC2,BAMBI,CCND1,LEF1,NFATC4,NOTUM,PLCB1,PPP3CA,PRKCB,SFRP5,SMAD3,TCF7L1,WNT16,WNT2B
hsa04970	Salivary secretion	0.0401	ADCY6,ATP1A1,ATP1B1,ATP1B2,ATP1B3,GUCY1B3,PLCB1,PRKCB,RYR3,SLC12A2

Tabell 8.1: Anrikede reaksjonsveier, og uttrykkede proteiner (FDR < 0,0003) som er assosiert med reaksjonsveiene, hentet fra Reactome-databasen (Reaksjonsveiene uthevet i fig. 4.16, er i denne tabellen uthevet med gul). Reaksjonsveiene står i rekkefølge etter FDR-verdi, hvor lavest starter øverst. Generert med STRING (www.string-db.org).

#ID	Reaksjonsvei	FDR	Proteiner assosiert med reaksjonsveien
HSA-1474244	Extracellular matrix organization	2.03e-13	ADAMTS14,ADAMTS18,ADAMTS2,BMP2,CAPN13,CAPN3,CAPN9,COL11A2,COL12A1,COL1A1,COL21A1,COL22A1,COL25A1,COL2A1,COL4A1,COL4A3,COL4A4,COL4A6,COL5A1,COL9A1,COL9A2,COL9A3,CTRB1,CTSK,DAG1,DCN,DMD,FGA,FGB,FGG,FMOD,HTRA1,ITGA11,ITGA5,ITGA8,ITGB1,JAM2,KDR,LAMA2,LAMB1,LOXL1,LOXL2,LOXL3,LRP4,MATN3,MMP9,NCAN,NRXN1,PTPRS,SERPINH1,SPOCK3,TGFB2,TLL1,TNN,VTN
HSA-397014	Muscle contraction	2.75e-11	ABCC9,ACTC1,ACTN2,ACTN3,AHCYL1,ANXA1,ANXA6,ATP1A1,ATP1B1,ATP1B2,ATP1B3,CACNA1D,CACNA1S,CACNA2D1,CACNG8,CASQ1,CASQ2,CAV3,DES,DM,D,FGF13,KCNK13,KCNK5,MYH3,MYL1,MYL4,MYLK,MYLPF,NKX2-5,PAK1,RYR1,RYR3,SLC8A3,TMOD4,TNNC1,TNNC2,TNNI1,TNNI2,TNNT3,TRDN,VIM
HSA-112316	Neuronal System	1.96e-10	ABAT,ABCC9,ACTN2,ADCY6,BCHE,CACNG8,CHAT,CHRNA1,CHRNE,CPLX1,DLG2,DNAJC5,EPB41,GABBR1,GABBR2,GABRA5,GABRG2,GAD1,GAD2,GJD2,GLUL,GNAI2,GRIA2,GRIA3,GRIA4,GRIK2,GRIN1,KCNA3,KCNG4,KCNJ15,KCNJ16,KCNK13,KCNQ3,NRXN1,NRXN3,NSF,PDLIM5,PLCB1,PPFIA4,PPFIBP2,PRKCB,PTPRD,PTPRS,RAB3A,RIMS1,SLC1A2,SLC32A1,SLC38A2,SLC6A,SLC6A4,SLITRK3,SNAP25,STXBP1,SYN2
HSA-3000178	ECM proteoglycans	1.28e-09	COL1A1,COL2A1,COL4A1,COL4A3,COL4A4,COL4A6,COL5A1,COL9A1,COL9A2,COL9A3,DAG1,DCN,FMOD,ITGA8,ITGB1,LAMA2,LAMB1,LRP4,MATN3,NCAN,PTPRS,TGFB2,TNN,VTN
HSA-112315	Transmission across	2.41e-09	ABAT,ACTN2,ADCY6,BCHE,CACNG8,CHAT,CHRNA1,CHRNE,CPLX1,DLG2,DNAJC5,GABBR1,GABBR2,GABRA5,GABRG2,GAD1,GAD2,GLUL,GNAI2,GRIA2,GRIA3,G

	Chemical Synapses		RIA4,GRIK2,GRIN1,KCNJ15,KCNJ16,NSF,PLCB1,PPFIA4,PRKCB,RAB3A,RIMS1,SLC1A2,SLC32A1,SLC38A2,SLC6A1,SLC6A4,SNAP25,SYN2
HSA-1474290	Collagen formation	8.56e-08	ADAMTS14,ADAMTS2,COL11A2,COL12A1,COL1A1,COL21A1,COL22A1,COL25A1,COL2A1,COL4A1,COL4A3,COL4A4,COL4A6,COL5A1,COL9A1,COL9A2,COL9A3,LOXL1,LOXL2,LOXL3,MMP9,SERPINH1,TLL1
HSA-390522	Striated Muscle Contraction	1.14e-07	ACTC1,ACTN2,ACTN3,DES,DMD,MYH3,MYL1,MYL4,TMOD4,TNNC1,TNNC2,TNNI1,TNNI2,TNNT3,VIM
HSA-1430728	Metabolism	4.52e-07	ABCA1,ABCG2,ABHD5,ACADVL,ADCY6,ADH1A,ADK,ADSSL1,AGXT,AHCYL1,AHR,AHRR,AK1,ALAS1,ALDH1A1,ALDH3A1,ALDOA,ALOXE3,AMDHD1,AMPD1,AMPD2,AMPD3,AMT,ANKRD1,AOC1,APOA4,APOB,ARG2,ASPG,ATIC,BCHE,BCO2,BDH1,BHMT,CA4,CACNA1D,CARNS1,CDA,CERS3,CES1,CHAT,CHDH,CKB,CKM,CPNE7,CPT1B,CTRB1,CYP11B1,CYP1A1,CYP1B1,CYP24A1,CYP26A1,CYP26C1,CYP2R1,CYP3A4,DCN,DCT,DHCR7,DIO1,DMGDH,DPYD,ELOVL4,ENTD3,ESYT1,FABP1,FABP12,FABP7,FAH,FECH,FMOD,GAPDHS,GCHF,R,GCSH,GK,GLUD1,GLUL,GMPR,GNAI2,GNMT,GPC2,GPI,GRHL1,GSTA3,GSTZ1,HAO1,HGD,HPD,HPSE2,HSP90AA1,IDH2,IDO1,NPP5K,INPPL1,INS,ISYNA1,KERA,LDHAL6B,LDLR,LPIN1,LPL,LRP1,MIOX,MSMO1,NCAN,NMRK2,ODC1,OGN,OSBPL7,PCYT1B,PCYT2,PDXK,PFAS,PFKM,PGAM2,PHKA2,PHKG1,PI4K2A,PIK3CD,PIP4K2C,PLA2G4C,PLCB1,PLCD4,PLCE1,PNMT,PPARGC1A,PRKAG2,PRKAR2B,PTDSS1,PTGIS,PTPLA,QDPR,RBP4,RPL3L,SAT1,SC5D,SDHA,SGMS2,SHMT2,SLC27A2,SLC2A3,SLC37A4,SLC7A5,SNAP25,ST3GAL1,STAB2,STXBP1,TAT,TECR,TH,TKT,TYRP1,UGT1A8
HSA-1650814	Collagen biosynthesis and modifying enzymes	5.10e-07	ADAMTS14,ADAMTS2,COL11A2,COL12A1,COL1A1,COL21A1,COL22A1,COL25A1,COL2A1,COL4A1,COL4A3,COL4A4,COL4A6,COL5A1,COL9A1,COL9A2,COL9A3,SERPINH1,TLL1
HSA-216083	Integrin cell surface interactions	1.91e-06	COL1A1,COL2A1,COL4A1,COL4A3,COL4A4,COL4A6,COL5A1,COL9A1,COL9A2,COL9A3,FGA,FGB,FGG,ITGA11,ITGA5,ITGA8,ITGB1,JAM2,KDR,VTN
HSA-8948216	Collagen chain trimerization	2.36e-06	COL11A2,COL12A1,COL1A1,COL21A1,COL22A1,COL25A1,COL2A1,COL4A1,COL4A3,COL4A4,COL5A1,COL9A1,COL9A2,COL9A3
HSA-2022090	Assembly of collagen fibrils and other multimeric structures	2.52e-06	COL11A2,COL12A1,COL1A1,COL2A1,COL4A1,COL4A3,COL4A4,COL4A6,COL5A1,COL9A1,COL9A2,COL9A3,LOXL1,LOXL2,LOXL3,MMP9,TLL1
HSA-1474228	Degradation of the extracellular matrix	4.24e-06	ADAMTS18,CAPN13,CAPN3,CAPN9,COL11A2,COL12A1,COL1A1,COL25A1,COL2A1,COL4A1,COL4A3,COL4A4,COL4A6,COL5A1,COL9A1,COL9A2,COL9A3,CTRB1,CTSK,DCN,HTRA1,LAMB1,MMP9,SPOCK3,TLL1
HSA-112310	Neurotransmitter release cycle	6.05e-06	ABAT,CHAT,CPLX1,DNAJC5,GAD1,GAD2,PPFIA4,RAB3A,RIMS1,SLC1A2,SLC32A1,SLC38A2,SLC6A1,SNAP25,SYN2
HSA-888590	GABA synthesis, release, reuptake and degradation	1.13e-05	ABAT,CPLX1,DNAJC5,GAD1,GAD2,RAB3A,RIMS1,SLC32A1,SLC6A1,SNAP25
HSA-3000171	Non-integrin membrane-ECM interactions	3.34e-05	COL11A2,COL1A1,COL2A1,COL4A1,COL4A3,COL4A4,COL4A6,COL5A1,DAG1,DMD,ITGB1,LAMA2,LAMB1,NRXN1,VTN
HSA-2243919	Crosslinking of collagen fibrils	8.24e-05	COL1A1,COL4A1,COL4A3,COL4A4,COL4A6,LOXL1,LOXL2,LOXL3,TLL1
HSA-1442490	Collagen degradation	8.62e-05	COL11A2,COL12A1,COL1A1,COL25A1,COL2A1,COL4A1,COL4A3,COL4A4,COL4A6,COL5A1,COL9A1,COL9A2,COL9A3,CTSK,MMP9
HSA-382551	Transport of small molecules	0.00015	ABCA1,ABCB6,ABCC9,ABCG2,ADCY6,ADD2,ANGPTL3,APOA4,APOB,APOD,AQP10,AQP3,ATP11A,ATP1A1,ATP1B1,ATP1B2,ATP1B3,ATP6AP1,ATP6V0A1,AVPR2,CA4,CASQ1,CASQ2,CFTR,CP,LDLR,LDLRAP1,LIPC,LPL,MIP,NPC2,PQLC2,PRKAR

			2B,RHAG,RYR1,RYR3,SGK1,SLC12A1,SLC12A2,SLC17A6,SLC1A2,SLC27A6,SLC29A4,SLC2A3,SLC32A1,SLC38A2,SLC39A2,SLC4A1,SLC6A1,SLC6A18,SLC6A5,SLC6A6,SLC7A11,SLC7A5,SLC8A3,SLC9B1,STOM,TRDN,TRPM6,UNC79,VDAC3,WNK4
HSA-375165	NCAM signaling for neurite outgrowth	0.00080	CACNA1D,CACNA1S,COL2A1,COL4A1,COL4A3,COL4A4,COL5A1,COL9A1,COL9A2,COL9A3,FYN,NCAN,SPTB
HSA-419037	NCAM1 interactions	0.00080	CACNA1D,CACNA1S,COL2A1,COL4A1,COL4A3,COL4A4,COL5A1,COL9A1,COL9A2,COL9A3,NCAN
HSA-5576891	Cardiac conduction	0.00087	ABCC9,AHCYL1,ATP1A1,ATP1B1,ATP1B2,ATP1B3,CACNA1D,CACNA1S,CACNA2D1,CACNG8,CASQ1,CASQ2,FGF13,KCNK13,KCNK5,NKX2-5,RYR1,RYR3,SLC8A3,TRDN
HSA-112314	Neurotransmitter receptors and postsynaptic signal transmission	0.00091	ACTN2,ADCY6,CACNG8,CHRNA1,CHRNE,DLG2,GABBR1,GABBR2,GABRA5,GABRG2,GNAI2,GRIA2,GRIA3,GRIA4,GRIK2,GRIN1,KCNJ15,KCNJ16,NSF,PLCB1,PRKCB
HSA-5578775	Ion homeostasis	0.00097	ABCC9,AHCYL1,ATP1A1,ATP1B1,ATP1B2,ATP1B3,CASQ1,CASQ2,RYR1,RYR3,SLC8A3,TRDN
HSA-422475	Axon guidance	0.0012	ANK1,ANK2,CACNA1D,CACNA1S,CAP2,COL2A1,COL4A1,COL4A3,COL4A4,COL5A1,COL9A1,COL9A2,COL9A3,DAG1,DCC,DPYSL2,DPYSL3,DPYSL4,DPYSL5,DSCAM,EPHA2,EPHA6,EZR,FYN,GRIN1,HSP90AA1,ISL1,ITGA5,ITGB1,KCNQ3,L1CAM,LAMB1,LHX9,MMP9,NCAN,NFASC,NRP2,PAK1,PIK3CD,PLXNB1,PLXNB3,RELN,RND1,RPL3L,SEMA4D,SPTB,TUBA1C,VASP
HSA-71182	Phenylalanine and tyrosine catabolism	0.0023	FAH,GSTZ1,HGD,HPD,QDPR,TAT
HSA-211945	Phase I - Functionalization of compounds	0.0030	ADH1A,AHR,AHRR,ALDH1A1,ALDH3A1,AOC1,CES1,CYP11B1,CYP1A1,CYP1B1,CYP24A1,CYP26A1,CYP26C1,CYP2R1,CYP3A4,PTGIS
HSA-6794362	Protein-protein interactions at synapses	0.0039	DLG2,EPB41,GRIA3,GRIA4,GRIN1,NRXN1,NRXN3,PDLIM5,PPFIA4,PPFIBP2,PTPRD,PTPRS,SLITRK3,STXBP1
HSA-373755	Semaphorin interactions	0.0040	DPYSL2,DPYSL3,DPYSL4,DPYSL5,FYN,HSP90AA1,ITGB1,PAK1,PLXNB1,PLXNB3,RND1,SEMA4D
HSA-6788656	Histidine, lysine, phenylalanine, tyrosine, proline and tryptophan catabolism	0.0050	AMDHD1,CARNS1,FAH,GSTZ1,HGD,HPD,IDO1,QDPR,SLC7A5,TAT
HSA-8874081	MET activates PTK2 signaling	0.0056	COL11A2,COL1A1,COL2A1,COL5A1,HGF,ITGB1,LAMA2,LAMB1
HSA-210500	Glutamate Neurotransmitter Release Cycle	0.0068	CPLX1,PPFIA4,RAB3A,RIMS1,SLC1A2,SLC38A2,SNAP25
HSA-2214320	Anchoring fibril formation	0.0068	COL1A1,COL4A1,COL4A3,COL4A4,COL4A6,TLL1
HSA-8875878	MET promotes cell motility	0.0068	COL11A2,COL1A1,COL2A1,COL5A1,HGF,ITGB1,LAMA2,LAMB1,TNS3

HSA-1266738	Developmental Biology	0.0069	ACVR1B,ACVR2B,ADAM22,ANK1,ANK2,CACNA1D,CACNA1S,CACNG8,CAP2,CDH15,CEBPB,COL2A1,COL4A1,COL4A3,COL4A4,COL5A1,COL9A1,COL9A2,COL9A3,DAG1,DCC,DPYSL2,DPYSL3,DPYSL4,DPYSL5,DCSCAM,EBF1,EGR2,EPHA2,EPHA6,EVPL,EZR,FGF10,FYN,GRIN1,HOXB1,HSP90AA1,INS,INSM1,ISL1,ITGA5,ITGB1,KCNQ3,KRT23,KRT33B,L1CAM,LAMB1,LGI1,LHX9,LPL,MEF2A,MMP9,NCAN,NFASC,NRP2,ONECUT3,PAK1,PIK3CD,PLXNB1,PLXNB3,PPARGC1A,PTF1A,RARB,RELN,RND1,RPL3L,SALL1,SEMA4D,SMAD3,SPTB,TGM1,TUBA1C,VASP
HSA-264642	Acetylcholine Neurotransmitter Release Cycle	0.0085	CHAT,CPLX1,PPFIA4,RAB3A,RIMS1,SNAP25
HSA-181429	Serotonin Neurotransmitter Release Cycle	0.0107	CPLX1,PPFIA4,RAB3A,RIMS1,SNAP25,SYN2
HSA-210991	Basigin interactions	0.0109	ATP1B1,ATP1B2,ATP1B3,ITGB1,L1CAM,SLC7A11,SLC7A5
HSA-8964026	Chylomicron clearance	0.0109	APOB,LDLR,LDLRAP1,LIPC
HSA-1566948	Elastic fibre formation	0.0116	BMP2,ITGA5,ITGA8,ITGB1,LOXL1,LOXL2,LOXL3,TGFB2,VTN
HSA-71291	Metabolism of amino acids and derivatives	0.0116	AGXT,AMDHD1,AMT,ARG2,ASPG,BHMT,CARNS1,CHDH,CKB,CKM,DCT,DIO1,DMGDH,FAH,GCSH,GLUD1,GLUL,GNMT,GSTZ1,HAO1,HGD,HPD,IDO1,ODC1,PNMT,QDPR,RPL3L,SAT1,SLC7A5,TAT,TH,TYRP1
HSA-9006934	Signaling by Receptor Tyrosine Kinases	0.0131	ADCYAP1,ADCYAP1R1,AHCYL1,ATP6AP1,ATP6V0A1,COL11A2,COL1A1,COL2A1,COL4A1,COL4A3,COL4A4,COL5A1,COL9A1,COL9A2,COL9A3,CSK,FGF10,FGF7,FYN,HGF,HSP90AA1,INS,ITGB1,KDR,KIDINS220,LAMA2,LAMB1,MEF2A,MMP9,MST1R,NRP2,PAK1,PRKCB,PTPRS,PTPRU,RICTOR,TNS3
HSA-211916	Vitamins	0.0155	CYP24A1,CYP26A1,CYP26C1,CYP2R1
HSA-373760	L1CAM interactions	0.0155	ANK1,ANK2,DPYSL2,EZR,ITGA5,ITGB1,KCNQ3,L1CAM,LAMB1,NCAN,NFASC,NRP2,PAK1,SPTB,TUBA1C
HSA-438066	Unblocking of NMDA receptors, glutamate binding and activation	0.0180	ACTN2,DLG2,GRIA2,GRIA3,GRIA4,GRIN1
HSA-8957275	Post-translational protein phosphorylation	0.0180	APOB,CP,FGA,FGG,FSTL3,HRC,IGFBP1,KNG1,LAMB1,MATN3,NOTUM,SCG2,SERPINC1,STC2
HSA-416993	Trafficking of GluR2-containing AMPA receptors	0.0194	GRIA2,GRIA3,GRIA4,NSF,PRKCB
HSA-74217	Purine salvage	0.0194	ADK,AMPD1,AMPD2,AMPD3,GMPR
HSA-3000157	Laminin interactions	0.0215	COL4A1,COL4A3,COL4A4,COL4A6,ITGB1,LAMA2,LAMB1

HSA-212676	Dopamine Neurotransmitter Release Cycle	0.0246	CPLX1,PPFIA4,RAB3A,RIMS1,SNAP25,SYN2
HSA-5365859	RA biosynthesis pathway	0.0246	ADH1A,ALDH1A1,CYP26A1,CYP26C1,DHRS3,RDH5
HSA-8956321	Nucleotide salvage	0.0287	ADK,AMPD1,AMPD2,AMPD3,CDA,GMPR
HSA-1500931	Cell-Cell communication	0.0289	ACTN2,ACTN3,CADM3,CDH12,CDH15,CDH7,CLDN10,CLDN17,CLDN4,FLNC,FYN,ITGB1,KIRREL3,PARVB,VASP
HSA-211897	Cytochrome P450 - arranged by substrate type	0.0308	AHR,CYP11B1,CYP1A1,CYP1B1,CYP24A1,CYP26A1,CYP26C1,CYP2R1,CYP3A4,PTGIS
HSA-5362517	Signaling by Retinoic Acid	0.0308	ADH1A,ALDH1A1,CPT1B,CYP26A1,CYP26C1,DHRS3,RARB,RDH5
HSA-399956	CRMPs in Sema3A signaling	0.0342	DPYSL2,DPYSL3,DPYSL4,DPYSL5,FYN
HSA-975634	Retinoid metabolism and transport	0.0342	APOA4,APOB,BCO2,GPC2,LDLR,LPL,LRP1,RBP4
HSA-15869	Metabolism of nucleotides	0.0396	ADK,ADSSL1,AK1,AMPD1,AMPD2,AMPD3,ATIC,CDA,DPYD,ENTPD3,GMPR,PFA S
HSA-181430	Norepinephrine Neurotransmitter Release Cycle	0.0411	CPLX1,PPFIA4,RAB3A,RIMS1,SNAP25
HSA-983712	Ion channel transport	0.0446	ATP11A,ATP1A1,ATP1B1,ATP1B2,ATP1B3,ATP6AP1,ATP6VOA1,CASQ1,CASQ2,RYR1,RYR3,SGK1,SLC9B1,STOM,TRDN,TRPM6,UNC79,WNK4
HSA-399710	Activation of AMPA receptors	0.0453	GRIA2,GRIA3,GRIA4
HSA-5250968	Toxicity of botulinum toxin type A (BoNT/A)	0.0453	SNAP25,SV2A,SV2C
HSA-381426	Regulation of Insulin-like Growth Factor (IGF) transport and uptake by Insulin-like Growth Factor Binding Proteins (IGFBPs)	0.0464	APOB,CP,FGA,FGG,FSTL3,HRC,IGFBP1,KNG1,LAMB1,MATN3,NOTUM,SCG2,SERPINC1,STC2
HSA-399719	Trafficking of AMPA receptors	0.0464	CACNG8,GRIA2,GRIA3,GRIA4,NSF,PRKCB
HSA-5083635	Defective B3GALTL causes Peters-plus syndrome (PpS)	0.0464	ADAMTS13,ADAMTS14,ADAMTS18,ADAMTS2,B3GALTL,SPON1,THSD7A

HSA-6790901	rRNA modification in the nucleus and cytosol	0.0482	DKC1,HEATR1,MPHOSPH10,NHP2,NHP2L1,NOP56,UTP11L,UTP3,UTP6
HSA-5173214	O-glycosylation of TSR domain-containing proteins	0.0498	ADAMTS13,ADAMTS14,ADAMTS18,ADAMTS2,B3GALTL,SPON1,THSD7A

Activation of the aryl hydrocarbon receptor (Ahr) pathway in egg and larvae of Atlantic cod (*Gadus morhua*) after crude oil exposure with and without UV radiation

Lars Eirik Myklatun¹, Elin Sørhus², Libe Aranguren¹, Anders Goksøyr¹, Sonnich Meier² og Odd André Karlsen¹
¹Department of Biological Sciences, University of Bergen, Norway
²Institute of Marine Research, Bergen, Norway

Lars Eirik Myklatun
 University of Bergen
 lmy001@uib.no

Background:

Drilling for oil outside Lofoten, Vesterålen and Senja has been a controversial issue in the last few years¹, due to possible conflicts with the spawning grounds for several of the North Atlantic fishes, among them Atlantic cod (*Gadus morhua*). A potential oil spill in this area would expose eggs and larvae at their most vulnerable stage of their life cycle². Crude oil contains polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) which has previously shown to be toxic to a large group of marine organisms, including fish. In addition, PAH's drifting at the top of the water column can absorb UV radiation from sunlight and get photooxidized to quinone compounds, which can cause oxidative stress in eggs and larvae³(Fig. 1). The enzyme cytochrome P450 1A (Cyp1a) is a known biomarker for PAH exposure (Fig. 2⁴), quantification of *cyp1a* expression will reveal the extent to which cod eggs and larvae are exposed to PAH's. In addition, comparing crude oil exposed and crude oil+UV exposed eggs may inform on whether UV radiation plays a part in *cyp1a* induction from crude oil exposure.

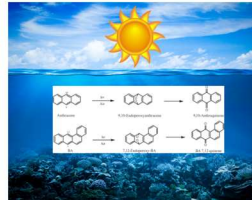


Fig. 1: Photooxidation of PAH's. The absorbance of solar radiation by PAH's turns them in to free radicals which, in the presence of oxygen, can be transformed into reactive oxygen species that can damage DNA, like quinone compounds³.

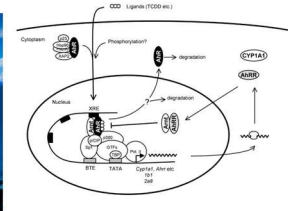


Fig. 2: Induction of *cyp1a* by Aryl hydrocarbon (Ahr) activation. PAH's binds to the transcription factor Ahr, located in the cytosol. The ligand-receptor complex diffuses into the nucleus where it binds ARNT, this complex subsequently binds to XRE on DNA which induces *cyp1a* transcription⁵.

Methods:

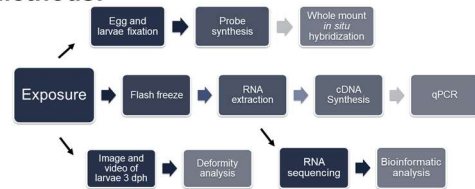


Fig.3: A flow chart showing the different methods to be used in this study, and the stages leading from the exposure of crude oil and crude oil + UV radiation to the final analysis.

Fertilized eggs from Atlantic cod were exposed to relevant concentrations of crude oil (3-600 µg/L) with and without UV radiation (UV-B and UV-C) over a period of 72 hours. After 72 hours the eggs were transferred to clean seawater for hatching. The eggs were sampled after 12, 24, 48, 72 and 96 hours, counted under a microscope and snap frozen on dry ice (-80°C). Expression of *cyp1a* was quantified by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) with the LightCycler® 480 SYBR® Green 1 Master by Roche and amplified in C1000™ Thermal Cycler from BioRad. The expression of *cyp1a* was visualized spatially in larvae 3 dph with the use of «whole mount» *in situ* hybridization, as described in Thisse (2008). Deformities in larvae will be estimated by image and video analysis of the larvae taken 3 dph. Furthermore, total RNA of the two highest exposure groups (600 µg/L and 200 µg/L) will be RNA sequenced and subjected to further bioinformatic analysis (Fig. 3).

Results:

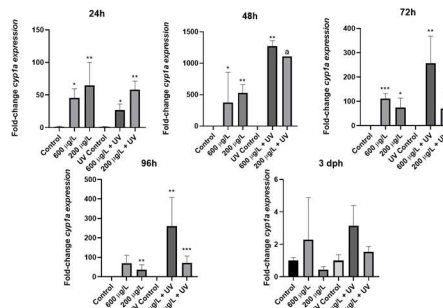


Fig. 4: Fold change in induction of *cyp1a* in eggs from Atlantic cod 24, 48, 72, 96 hours and 3 dph after exposure to crude oil and crude oil + UV. Asterisks indicate significant fold change in groups exposed to crude oil and crude oil + UV radiation when compared to their respective control groups (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$). The «a» indicates that the fold change in the 200 µg/L + UV group was calculated from only one sample containing 10 eggs.

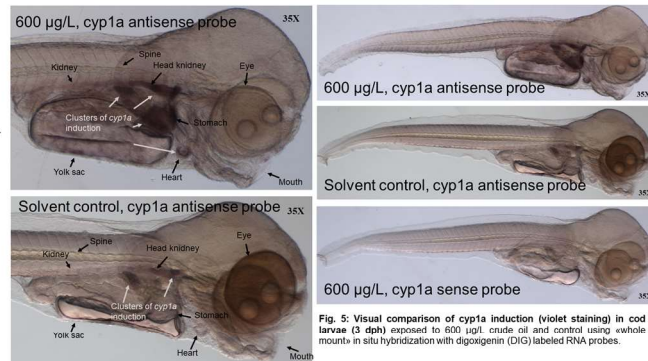


Fig. 5: Visual comparison of *cyp1a* induction (violet staining) in cod larvae (3 dph) exposed to 600 µg/L crude oil and control using «whole mount» *in situ* hybridization with digoxigenin (DIG) labeled RNA probes.

CONCLUSION

Exposure to relevant concentrations of crude oil and crude oil + UV radiation significantly induced *cyp1a* in all exposure groups of eggs and larvae of Atlantic cod as revealed by qPCR (Fig. 4), except 3 dph, although the trend is conserved. UV radiation alone did not have a significant effect on *cyp1a* induction. In addition, the expression pattern was visualized in larvae 3 dph by «whole mount» *in situ* hybridization, showing strong, localized clusters of expression in heart, head kidney and stomach in the 600 µg/L exposure group compared to control.

REFERENCES

- ¹Krumnick, K. J. and Rose, G. A. (2018) Marine Science, 89
- ²Olsen, E. et al. (2010) ICES Journal of Marine Science, 67
- ³Lee, R. F. (2003) Spill Science & Technology Bulletin, 8(2)
- ⁴Goksøyr, A. (1994) Toxicology Letters, 74
- ⁵Fuji-Kuriyama & Mimura, EBRC, 2005

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was funded by the Research Council of Norway through the cCod 1.0 (248840) and the EGGTOX projects (267820).
 cCod 2.0 (project no. 244564)



UNIVERSITY OF BERGEN



Figur 8.3: Poster med noe av arbeidet fra masteroppgaven som ble presentert på vintermøtet til Norsk Selskap for Farmakologi og Toksikologi (NSFT) 26. januar 2019.

Kilder

- Abnet, C. C. *et al.* (2002) 'Two Forms of Aryl Hydrocarbon Receptor Type 2 in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)', *Journal of Biological Chemistry*, 274(21), pp. 15159–15166. doi: 10.1074/jbc.274.21.15159.
- Andreasen, E. A. *et al.* (2002) 'Tissue-specific expression of AHR2, ARNT2, and CYP1A in zebrafish embryos and larvae: Effects of developmental stage and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure', *Toxicological Sciences*, 68(2), pp. 403–419. doi: 10.1093/toxsci/68.2.403.
- Arfsten, D. P., Schaeffer, D. J. and Mulveny, D. C. (1996) 'The effects of near ultraviolet radiation on the toxic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons in animals and plants: A review', *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 33(1), pp. 1–24. doi: 10.1006/eesa.1996.0001.
- Barron, M. G. *et al.* (2003) 'Photoenhanced toxicity of aqueous phase and chemically dispersed weathered Alaska North Slope crude oil to Pacific herring eggs and larvae', *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(3), pp. 650–660. doi: 10.1897/1551-5028(2003)022<0650:PTOAPA>2.0.CO;2.
- Becker, A. *et al.* (2016) 'Gene expression profiling reveals aryl hydrocarbon receptor as a possible target for photobiomodulation when using blue light', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(June), pp. 1–11. doi: 10.1038/srep33847.
- Bergander, L. *et al.* (2004) 'Metabolic fate of the Ah receptor ligand 6-formylindolo[3,2-b]carbazole', *Chemico-Biological Interactions*, 149(2–3), pp. 151–164. doi: 10.1016/j.cbi.2004.08.005.
- Brannon, E. L. *et al.* (2006) 'Toxicity of weathered Exxon Valdez crude oil to pink salmon embryos', *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(4), pp. 962–972. doi: 10.1897/05-129R1.1.
- Brette, F. *et al.* (2017) 'A Novel Cardiotoxic Mechanism for a Pervasive Global Pollutant', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 7, pp. 1–9. doi: 10.1038/srep41476.
- Burcham, P. C. (2014) *Introduction to Toxicology*. 1st edn. Perth: Springer.
- Carls, M. G. *et al.* (2008) 'Fish embryos are damaged by dissolved PAHs, not oil particles', *Aquatic Toxicology*, 88(2), pp. 121–127. doi: 10.1016/j.aquatox.2008.03.014.
- Carls, M. G. and Meador, J. P. (2009) 'A Perspective on the toxicity of petrogenic pahs to developing fish embryos related to environmental chemistry', *Human and Ecological Risk Assessment*, 15(6), pp. 1084–1098. doi: 10.1080/10807030903304708.
- Carroll, J. *et al.* (2017) 'Assessing impacts of simulated oil spills on the Northeast Arctic cod fishery', *Marine Pollution Bulletin*. Elsevier, 126(October 2017), pp. 63–73. doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.10.069.
- Cohen, A. (2019) *Russia Sets Sights On Energy Resources Under Arctic Circle*. Available at: <https://www.forbes.com/sites/arielcohen/2019/04/17/russia-sets-sights-on-energy-resources-under-arctic-circle/#3d80e9ce6eea> (Accessed: 11 June 2019).
- Cohen, D. . *et al.* (1990) *FAO Species Catalogue an Annotated and Illustrated Catalogue prepared by*. 10th edn.
- Denison, M. S. *et al.* (2002) 'Ligand binding and activation of the Ah receptor', *Chemico-Biological Interactions*, 141(1–2), pp. 3–24. doi: 10.1016/S0009-2797(02)00063-7.
- Denison, M. S. and Nagy, S. R. (2003) 'A <sc>CTIVATION OF THE</sc> A <sc>RYL</sc> H <sc>YDROCARBON</sc> R <sc>ECEPTOR BY</sc> S <sc>TRUCTURALLY</sc> D

<sc>IVERSE</sc> E <sc>XOGENOUS AND</sc> E <sc>NDOGENOUS</sc> C
<sc>HEMICALS</sc>', *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 43(1), pp. 309–334. doi:
10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.135828.

Edmunds, R. C. *et al.* (2015) 'Corresponding morphological and molecular indicators of crude oil toxicity to the developing hearts of mahi mahi', *Scientific Reports*, 5(August), pp. 1–18. doi:
10.1038/srep17326.

Eide, M. *et al.* (2014) 'Precision-cut liver slices of Atlantic cod (*Gadus morhua*): An in vitro system for studying the effects of environmental contaminants', *Aquatic Toxicology*, 153, pp. 110–115. doi:
10.1016/j.aquatox.2013.10.027.

Eilertsen, M. *et al.* (2014) 'Exorhodopsin and melanopsin systems in the pineal complex and brain at early developmental stages of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*)', *Journal of Comparative Neurology*, 522(18), pp. 4003–4022. doi: 10.1002/cne.23652.

Esser, C. and Rannug, A. (2015) 'The Aryl Hydrocarbon Receptor in Barrier Organ Physiology, Immunology, and Toxicology', *Pharmacological Reviews*, 67(2), pp. 259–279. doi:
10.1124/pr.114.009001.

Føyn, L., Quilfeldt, C. and Olsen, E. (2002) 'Miljø- og ressursbeskrivelse av området Lofoten - Barentshavet', *Fisken og havet*, (6).

Fu, P. P. *et al.* (2012) 'Phototoxicity and environmental transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-light-induced reactive oxygen species, lipid peroxidation, and DNA damage', *Journal of Environmental Science and Health - Part C Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews*, 30(1), pp. 1–41. doi: 10.1080/10590501.2012.653887.

Fujii-Kuriyama, Y. and Mimura, J. (2005) 'Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(1), pp. 311–317. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.08.162.

Garner, L. V. T., Brown, D. R. and Di Giulio, R. T. (2013) 'Knockdown of AHR1A but not AHR1B exacerbates PAH and PCB-126 toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos', *Aquatic Toxicology*. Elsevier B.V., 142–143, pp. 336–346. doi: 10.1016/j.aquatox.2013.09.007.

Gasiewicz, T. A., Singh, K. P. and Bennett, J. A. (2014) 'The Ah receptor in stem cell cycling, regulation, and quiescence', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1310(1), pp. 44–50. doi:
10.1111/nyas.12361.

Glasauer, S. M. K. and Neuhauss, S. C. F. (2014) 'Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences', *Molecular Genetics and Genomics*, 289(6), pp. 1045–1060. doi:
10.1007/s00438-014-0889-2.

Goksøyr, A. (1994) 'Use of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish as a biomarker of aquatic pollution', *Toxicology Letters*, 74(Table 1), pp. 29–30. doi: 10.1016/0378-4274(94)90283-6.

Goodale, B. C. *et al.* (2012) 'AHR2 mutant reveals functional diversity of aryl hydrocarbon receptors in zebrafish', *PLoS ONE*, 7(1). doi: 10.1371/journal.pone.0029346.

Hahn, M. E., Karchner, S. I. and Merson, R. R. (2017) 'Diversity as opportunity: Insights from 600 million years of AHR evolution', *Current Opinion in Toxicology*. Elsevier Ltd, 2(February 2017), pp. 58–71. doi: 10.1016/j.cotox.2017.02.003.

Hansson, M. C. and Hahn, M. E. (2008) 'Functional properties of the four Atlantic salmon (*Salmo salar*) aryl hydrocarbon receptor type 2 (AHR2) isoforms', *Aquatic Toxicology*, 86(2), pp. 121–130. doi: 10.1016/j.aquatox.2007.10.012.

- Helferich, W. G. and Denison, M. S. (1991) 'Ultraviolet Photoproducts of Tryptophan Can Act as Dioxin Agonists', *Mol. Pharmacol.*, 40(5), pp. 674–678.
- Hjermann, D. *et al.* (2007) 'Fish and oil in the Lofoten-Barents Sea system: Synoptic review of the effect of oil spills on fish populations', *Marine Ecology Progress Series*, 339, pp. 283–299. doi: 10.3354/meps339283.
- Hodson, P. V. (2017) 'The Toxicity to Fish Embryos of PAH in Crude and Refined Oils', *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer US, 73(1), pp. 12–18. doi: 10.1007/s00244-016-0357-6.
- Hommedal, S. (2018) *Noen torsk er tøffere enn andre*. Available at: <https://www.hi.no/hi/nyheter/2018/juni/noen-torsk-er-toffere-enn-andre> (Accessed: 12 June 2019).
- Hylland, K. (2006) 'Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ecotoxicology in marine ecosystems', *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A*, 69(1–2), pp. 109–123. doi: 10.1080/15287390500259327.
- Hylland, K. *et al.* (2008) 'Water column monitoring near oil installations in the North Sea 2001-2004', *Marine Pollution Bulletin*, 56(3), pp. 414–429.
- Incardona, J. P. *et al.* (2006) 'Developmental toxicity of 4-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish is differentially dependent on AH receptor isoforms and hepatic cytochrome P4501A metabolism', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 217(3), pp. 308–321. doi: 10.1016/j.taap.2006.09.018.
- Incardona, J. P. *et al.* (2009) 'Cardiac arrhythmia is the primary response of embryonic pacific herring (*Clupea pallasii*) exposed to crude oil during weathering', *Environmental Science and Technology*, 43(1), pp. 201–207. doi: 10.1021/es802270t.
- Incardona, J. P. *et al.* (2012) 'Potent phototoxicity of marine bunker oil to translucent herring embryos after prolonged weathering', *PLoS ONE*, 7(2). doi: 10.1371/journal.pone.0030116.
- Incardona, J. P. *et al.* (2015) 'Very low embryonic crude oil exposures cause lasting cardiac defects in salmon and herring', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 5, pp. 1–13. doi: 10.1038/srep13499.
- Incardona, J. P. (2017) 'Molecular Mechanisms of Crude Oil Developmental Toxicity in Fish', *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer US, 73(1), pp. 19–32. doi: 10.1007/s00244-017-0381-1.
- Incardona, J. P., Collier, T. K. and Scholz, N. L. (2004) 'Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 196(2), pp. 191–205. doi: 10.1016/j.taap.2003.11.026.
- Jain, S. *et al.* (1998) '<Expression of ARNT, ARNT2, HIF1 alpha, HIF2 alpha and Ah receptor mRNAs in the developing mouse..pdf>', 73, pp. 117–123.
- Jayasundara, N. *et al.* (2015) 'AHR2-mediated transcriptomic responses underlying the synergistic cardiac developmental toxicity of PAHs', *Toxicological Sciences*, 143(2). doi: 10.1093/toxsci/kfu245.
- Jönsson, M. E. *et al.* (2009) 'The tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) binds multiple AHRs and induces multiple CYP1 genes via AHR2 in zebrafish', *Chemico-Biological Interactions*, 181(3), pp. 447–454. doi: 10.1016/j.cbi.2009.07.003.
- Jørstad, K. E. *et al.* (no date) 'Atlantic cod - *Gadus morhua*', *Geneimpact final scientific report*. Bergen.
- Karchner, S. I., Powell, W. H. and Hahn, M. E. (2002) 'Identification and Functional Characterization

- of Two Highly Divergent Aryl Hydrocarbon Receptors (AHR1 and AHR2) in the Teleost *Fundulus heteroclitus*', *Journal of Biological Chemistry*, 274(47), pp. 33814–33824. doi: 10.1074/jbc.274.47.33814.
- Khursigara, A. J. *et al.* (2017) 'Cardiac function and survival are affected by crude oil in larval red drum, *Sciaenops ocellatus*', *Science of the Total Environment*, 579. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.11.026.
- Knecht, A. L. *et al.* (2013) 'Comparative developmental toxicity of environmentally relevant oxygenated PAHs', *Toxicology and Applied Pharmacology*. Elsevier B.V., 271(2), pp. 266–275. doi: 10.1016/j.taap.2013.05.006.
- Lamb, D. C. *et al.* (2019) 'On the occurrence of cytochrome P450 in viruses', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, p. 201901080. doi: 10.1073/pnas.1901080116.
- Lavine, J. A. *et al.* (2005) 'Aryl hydrocarbon receptors in the frog *Xenopus laevis*: Two AhR1 paralogs exhibit low affinity for 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)', *Toxicological Sciences*, 88(1), pp. 60–72. doi: 10.1093/toxsci/kfi228.
- Van Leeuwen, C. J. and Griffioen, P. . (1985) 'Differences in susceptibility of early life stages of Rainbow trout (*Salmo gairdineri*) to environmental pollutants', *Aquatic Toxicology*, 7, pp. 59–78.
- Lille-Langøy, R. *et al.* (2019) 'Sequence Variations in pax6 (nr1i2) From Zebrafish (*Danio rerio*) Strains Affect Nuclear Receptor Function', *Toxicological Sciences*, 168(1), pp. 28–39. doi: 10.1093/toxsci/kfy269.
- Lovdata.no (2018) *Naturmangfoldsloven*. Available at: https://lovdata.no/dokument/NL/lov/2009-06-19-100#KAPITTEL_2 (Accessed: 10 May 2019).
- Misund, O. A. and Olsen, E. (2013) 'Lofoten, Vesterålen for cod, and cod fisheries, but not for oil?', *Marine Science*.
- Nebert, D. W. *et al.* (2000) 'Role of the Aromatic Hydrocarbon Receptor and [Ah] Gene Battery in the Oxidative Stress Response , Cell Cycle Control , and Apoptosis', 59(June 1999), pp. 65–85.
- Nordtug, T., Olsen, A. J., Altin, D., Meier, S., *et al.* (2011) 'Method for generating parameterized ecotoxicity data of dispersed oil for use in environmental modelling', *Marine Pollution Bulletin*. Elsevier Ltd, 62(10), pp. 2106–2113. doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.07.015.
- Nordtug, T., Olsen, A. J., Altin, D., Overrein, I., *et al.* (2011) 'Oil droplets do not affect assimilation and survival probability of first feeding larvae of North-East Arctic cod', *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 412–413, pp. 148–153. doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.10.021.
- Okey, A. B. (2007) 'An aryl hydrocarbon receptor odyssey to the shores of toxicology: The Deichmann Lecture, International Congress of Toxicology-XI', *Toxicological Sciences*, 98(1), pp. 5–38. doi: 10.1093/toxsci/kfm096.
- Olsen, E. *et al.* (2010) 'Cod, haddock, saithe, herring, and capelin in the Barents Sea and adjacent waters: A review of the biological value of the area', *ICES Journal of Marine Science*, 67(1), pp. 87–101. doi: 10.1093/icesjms/fsp229.
- Olsvik, P. A. *et al.* (2011) 'Transcriptional evidence for low contribution of oil droplets to acute toxicity from dispersed oil in first feeding Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae', *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*. Elsevier Inc., 154(4), pp. 333–345. doi: 10.1016/j.cbpc.2011.07.002.
- Pampanin, D. M. and Sydnes, M. O. (2013) 'Polycyclic Aromatic Hydrocarbons a Constituent of Petroleum: Presence and Influence in the Aquatic Environment', *Intech*, p. 13. doi:

<http://dx.doi.org/10.5772/57353>.

Peakall, D. B. (1994) 'The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction', *Ecotoxicology*, 3(3), pp. 157–160. doi: 10.1007/BF00117080.

Petersen, G. I. and Kristensen, P. (1998) 'Bioaccumulation of lipophilic substances in fish early life stages', *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(7), pp. 1385–1395. doi: 10.1897/1551-5028(1998)017<1385:BOLSIF>2.3.CO;2.

Petit, J. J.-L. *et al.* (2004) 'Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype.', *Nature*, 431(7011), pp. 946–57. doi: 10.1038/nature03025.

Poland, A., Glover, E. and Kende, A. S. (1976) 'Stereospecific, High Affinity Binding of by Hepatic', 251(27), pp. 4936–4946.

Powell, W. H. *et al.* (2000) 'Developmental and tissue-specific expression of AHR1, AHR2, and ARNT2 in dioxin-sensitive and -resistant populations of the marine fish *Fundulus heteroclitus*.', *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 57(2), pp. 229–39. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11006353>.

Qin, H. and Powell-Coffman, J. A. (2004) 'The *Caenorhabditis elegans* aryl hydrocarbon receptor, AHR-1, regulates neuronal development', *Developmental Biology*, 270(1), pp. 64–75. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.02.004.

Rannug, A. and Rannug, U. (2018) 'The tryptophan derivative 6-formylindolo[3,2-b]carbazole, FICZ, a dynamic mediator of endogenous aryl hydrocarbon receptor signaling, balances cell growth and differentiation', *Critical Reviews in Toxicology*. Taylor & Francis, 48(7), pp. 555–574. doi: 10.1080/10408444.2018.1493086.

Rau, M. *et al.* (2005) 'Assessment of the phototoxicity of weathered Alaska North Slope crude oil to juvenile pink salmon', *Chemosphere*, 60(1), pp. 105–110. doi: 10.1016/j.chemosphere.2004.12.006.

Schmitt, N., Grunnet, M. and Olesen, S. P. (2014) 'Cardiac potassium channel subtypes: New roles in repolarization and arrhythmia', *Physiological Reviews*, 94(2), pp. 609–653. doi: 10.1152/physrev.00022.2013.

Shwartz, Y. *et al.* (2012) 'Muscle contraction controls skeletal morphogenesis through regulation of chondrocyte convergent extension', *Developmental Biology*, 370(1), pp. 154–163. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.07.026.

Sørensen, L. *et al.* (2017) 'Oil droplet fouling and differential toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in embryos of Atlantic haddock and cod', *PLoS ONE*, 12(7), pp. 1–26. doi: 10.1371/journal.pone.0180048.

Sørhus, E. *et al.* (2015) 'Unexpected interaction with dispersed crude oil droplets drives severe toxicity in Atlantic haddock embryos', *PLoS ONE*, 10(4), pp. 1–21. doi: 10.1371/journal.pone.0124376.

Sørhus, E. *et al.* (2016) 'Crude oil exposures reveal roles for intracellular calcium cycling in haddock craniofacial and cardiac development', *Scientific Reports*, 6(5020), pp. 1–21. doi: 10.1038/srep31058.

Star, B. *et al.* (2011) 'The genome sequence of Atlantic cod reveals a unique immune system', *Nature*, 477(7363), pp. 207–210. doi: 10.1038/nature10342.

Stockinger, B. *et al.* (2014) 'The Aryl Hydrocarbon Receptor: Multitasking in the Immune System', *Annual Review of Immunology*, 32(1), pp. 403–432. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120245.

Sugden, W. W. *et al.* (2017) 'Genetic dissection of endothelial transcriptional activity of zebrafish aryl hydrocarbon receptors (AHRs)', *PLoS ONE*, 12(8), pp. 1–22. doi: 10.1371/journal.pone.0183433.

Sundby, S. (1991) 'Factors affecting the vertical distribution of eggs', *ICES Marine Science Symposium*, 192(1), pp. 33–38. Available at: <http://www.jstor.org/stable/10.2307/1961656>.

Tanguay, R. L. *et al.* (1999) 'Cloning and characterization of the zebrafish (*Danio rerio*) aryl hydrocarbon receptor', *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1444(1), pp. 35–48. doi: 10.1016/S0167-4781(98)00252-8.

Thisse, C. and Thisse, B. (2008) 'High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos', *Nature Protocols*, 3(1), pp. 59–69. doi: 10.1038/nprot.2007.514.

Tilseth, S., Solberg, T. S. and Westrheim, K. (1981) *Sublethal effects of the water-soluble fraction of Ekofisk crude oil on the early larval stages of cod (Gadus morhua L.)*.

Tørresen, O. K. *et al.* (2017) 'An improved genome assembly uncovers prolific tandem repeats in Atlantic cod', *BMC Genomics*. *BMC Genomics*, 18(1), pp. 1–23. doi: 10.1186/s12864-016-3448-x.

Valen, R. *et al.* (2014) 'Molecular evidence that only two opsin subfamilies, the blue light- (SWS2) and green light-sensitive (RH2), drive color vision in Atlantic Cod (*Gadus morhua*)', *PLoS ONE*, 9(12), pp. 1–24. doi: 10.1371/journal.pone.0115436.

Vikebø, F. (2014) 'Spatio-temporal overlap of oil spills and early life stages of fish', *ICES Journal of Marine Science*, 71(4), pp. 970–981.

Wang, Z. *et al.* (2003) 'Characteristics of spilled oils, fuels, and petroleum products: 1. Composition and properties of selected oils', *USEPA Publication*, (December 2014), pp. 1–286. Available at: <http://nepis.epa.gov/Adobe/PDF../P1000AE6.pdf%5Cnpapers2://publication/uuid/504BA836-2847-4C34-9BF4-4DA351C932B6%5Cnpapers2://publication/uuid/COAC5D53-502E-44D7-9EA1-4D8B00FD9C0C>.

Yadatie, F. *et al.* (2018) 'RNA-Seq analysis of transcriptome responses in Atlantic cod (*Gadus morhua*) precision-cut liver slices exposed to benzo[a]pyrene and 17A-ethynylestradiol', *Aquatic Toxicology*. Elsevier, 201(June), pp. 174–186. doi: 10.1016/j.aquatox.2018.06.003.

Yamauchi, M. *et al.* (2005) 'Molecular characterization of the aryl hydrocarbon receptors (AHR1 and AHR2) from red seabream (*Pagrus major*)', *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 141(2), pp. 177–187. doi: 10.1016/j.cca.2005.06.003.