



UPPSALA
UNIVERSITET

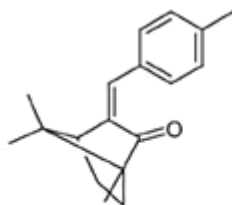
Projektrapport från utbildningen i

EKOTOXIKOLOGI

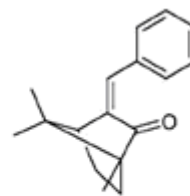
Ekotoxikologiska avdelningen

Nr 127

Östrogena effekter av UV-filtren 4-metylbensylidenkamfer (4-MBC) och 3-bensylidenkamfer (3-BC) i vaktelembryon (*Coturnix japonica*)



4-MBC



3-BC

Madelene Törnqvist

INNEHÅLL

INNEHÅLL.....	2
FÖRORD	3
SAMMANFATTNING	4
1. INTRODUKTION	5
1.1 INLEDNING.....	5
1.2 SYFTE	6
1.2 UV-FILTER I MILJÖN	6
1.3 ÖSTROGENRECEPTORER.....	7
1.4 KÖNSDIFFERENTIERING I VAKTEL.....	8
1.5 ENDOKRINSTÖRANDE EFFEKTER	9
1.6 3-BC och 4-MBC I TIDIGARE TOXICITETSSTUDIER	9
1.7 METABOLITER.....	10
1.8 VITELLOGENIN OCH APOLIPOPROTEIN SOM BIOMARKÖRER.....	10
2. MATERIAL OCH METOD.....	11
2.1 KEMIKALIER	11
2.3 REALTIDS RT-PCR	11
2.4 STATISTIK.....	13
2.5 TRANSIENT TRANSFEKTION.....	13
<i>Försöksuppställning 1</i>	13
<i>Försöksuppställning 2</i>	13
<i>Försöksuppställning 3</i>	14
<i>Försöksuppställning 4</i>	14
3. RESULTAT.....	15
3.1 <i>IN VITRO</i> -FÖRSÖK	15
3.2 mRNA-UTTRYCK.....	15
4. DISKUSSION	16
4.1 <i>IN VITRO</i> -FÖRSÖK.....	16
4.2 mRNA-UTTRYCK.....	17
5. REFERENSER	19

FÖRORD

Denna rapport utgör den skriftliga delen av ett examensarbete. Examensarbetet leder till en magisterexamen i biologi, med inriktningen ekotoxikologi, och är utfört på avdelningen för ekotoxikologi på Uppsala universitet.

Här vill jag tillägna ett stort tack till Dr Jan Olsson, som inspirerat mig och varit en god handledare, och önska honom lycka till med sin fortsatta forskning. Jag vill också ge ett stort tack till Jeanette Axelsson som tog sig tid att hjälpa mig trots att den egna disputationen var nära. Tack till professor Björn Brunström som kommenterat mitt skrivna arbete på ett noggrant och betydelsefullt sätt och till Jan Örberg, som genom att vara en fantastiskt bra lärare har gjort att jag trivts så bra under hela min utbildning till ekotoxikolog. Under examensarbetet har alla på avdelningen bidragit till trevligt umgänge, och därför vill jag också tacka alla er. Till sist, tack Martin.

SAMMANFATTNING

UV-filtren är organiska ämnen som har till uppgift att skydda oss människor och olika slags material från solens UV-strålning. Idag används de i ökande mängder, trots att deras toxikologi och effekter i miljön inte är särskilt välstuderade. Det har väckts oro med anledning av att UV-filtren liksom många andra antropogena ämnen, kan ge reproduktionsstörande effekter samtidigt som ämnena går att detektera i miljön.

I det här examensarbetet studerades östrogena effekter hos vaktelembryon exponerade för UV-filtren 4-metylbensylidenkamfer och 3-bensylidenkamfer, som båda är tillåtna i Sverige. Vakteläggen inkuberades i tre dygn injicerades i äggulan med 3-BC (100 µg/g ägg), 4-MBC (50 µg/g ägg), PCB-blandningen Clophen A50 (10 µg/g ägg) eller UV-filtren i kombination med Clophen A50. Med kvantitativ realtids-PCR studerades mRNA-uttrycket av gener som kan bli uppreglerade i fågel av östrogena ämnen. Varken uttrycket av Vitellogenin, Apolipoprotein eller östrogenreceptor α var uppreglerat i jämförelse med kontroller. Resultatet tyder på att förändringar i uttryck av de studerade generna inte är en känslig respons på exponering för UV-filtren.

I syfte att ta reda på om 3-BC och 4-MBC fungerar som ligander till östrogenreceptorn i vaktel, gjordes en cellstudie som dock främst kom att innebära metodutveckling. HeLa-celler transfekterades transient med plasmider. Både plasmider innehållande östrogenreceptorer från vaktel och plasmid med östrogenresponselement användes. När en receptor binder till ett östrogenresponselement fås en luminiscenssignal vid tillsats av luciferin. Flera försök gjordes utan att någon signal detekterades. Responsen på östrogenexponering kontrollerades fyra dygn efter transfektionen. Resultaten från kontrollen visade att cellerna inte uttryckte receptorerna. Ytterligare studier behövs för att ta reda på hur interaktionen mellan UV-filtren och östrogenreceptorerna ser ut i vaktel.

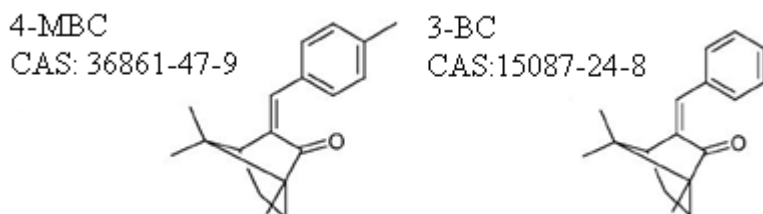
1. INTRODUKTION

1.1 INLEDNING

Den senaste tiden har medvetenheten om riskerna med solens strålning vuxit och de kemiska ämnen som har till uppgift att skydda mot UV-strålning används i ökande mängder. De tillsätts i kosmetika och i hud- och hårprodukter, som exempelvis solskyddsmedel, krämer, schampo och parfymer. Användningen är också betydande i material som plaster och tyger. UV-skyddande oorganiska partiklar reflekterar solens strålar medan UV-skyddande organiska ämnen har egenskaper som gör att UV-strålarna omvandlas till ett mer långvågigt ljus.

Alla de organiska ämnena som fungerar som solskyddsfilter är lipofila, vilket kan medföra att de bioackumuleras i biologisk vävnad. De är även fotostabila och bryts inte ned i kontakt med vatten. Ett fungerande UV-filter har därmed egenskaper som förknippas med potentiella miljöföroreningar. Flera UV-filter har detekterats i naturen och en del har visat sig vara östrogena (Schlumpf *et al.*, 2001). Bensofenon-3 och oktyl metoxycinnamat har detekterats i human bröstmjölk (Hany *et al.*, 1995). Idag är kunskapen om UV-filtrens toxikologi, kinetik och sätt att interagera med andra miljöfaktorer fortfarande ofullständig och därför behövs mer forskning på området.

4-metylbensylidenkamfer (4-MBC) och 3-bensylidenkamfer (3-BC) (figur 1) är två av totalt 28 UV-filter som är tillåtna för användning på den svenska marknaden i kosmetika och hygieniska produkter avsedda för att filtrera strålning och därigenom skydda huden från skadliga effekter (Läkemedelsverkets föreskrifter; LVFS 2007:4).



Figur 1. Kemisk struktur och CAS-nummer för 4-MBC och 3-BC.

Sedan en lång tid tillbaka har fåglar varnat oss människor om olika förändringar i miljön, inte minst tack vare intresset för fåglar i vår omgivning. Eftersom fåglar kan tillhöra olika trofnivåer och leva i terrestra och marina såväl som sötvattenshabitat kan fåglar exponeras för en rad olika föroreningar och därför är många arter utsatta. De har också visat sig vara goda indikatorer för skadliga effekter orsakade av miljöföroreningar, vilket uppmärksammades på 1960-talet då fåglar dog bland annat till följd av jordbrukets användning av organiska kvicksilverföreningar. Flera fiskätande arter som häckat vid Stora sjöarna (USA) har uppvisat dålig reproduktionsförmåga på grund av höga koncentrationer polyklorerade dioxiner/furaner och polyklorerade bifenyler (PCBer) (Gilbertson *et al.*, 1991). Ännu mer känt är kanske att p,p'-DDE, en metabolit från DDT, kan orsaka äggskalsförtunning hos många fågelarter (Peakall *et al.* 1973).

Fåglar fungerar bra som försöksdjur eftersom det är lätt att exponera embryot med en bestämd dos genom *in ovo*-injektion i olika utvecklingsstadier. Japansk vaktel (*Coturnix japonica*) är en art med kort generationstid som är fördelaktig att använda i embryostudier eftersom embryona är små, men stora nog att plocka ut organ från och det krävs relativt små mängder av testkemikalien till följd av äggens storlek. Dessutom är arten väl studerad vad gäller normal könsdifferentiering och sexuellt beteende. Vitellogenin (VTG) och Apolipoprotein (Apo) är två östrogenreglerade gener som kan användas som biomarkörer hos fåglar vid exponering för kroppsfrämmande östrogener. Östrogenreceptor α (ER α) är en av de två hittills beskrivna receptorerna dit de östrogena ämnena binder i fågel.

1.2 SYFTE

Syftet med det här arbetet var att undersöka om generna VTG, Apo och ER α uppregleras i levern hos vaktelembryon efter exponering för UV-filtren 3-BC och 4-MBC. Dessutom var målsättningen att jämföra den östrogena effekten av UV-filtren själva med effekten av kombinationer av dem med en teknisk blandning av PCB-er (CA50). Syftet var också att i ett *in vitro*-försök undersöka om 3-BC och 4-MBC kan agera som östrogenreceptor-ligander.

1.2 UV-FILTER I MILJÖN

UV-filtren kan nå den akvatiska miljön direkt från huden på människor som vistas i vatten och indirekt via reningsverk. Då koncentrationen av UV-filter studerades i två Schweiziska sjöar sträckte den sig mellan <2 ng/L (detektionsgräns) och 35 ng/L på vintern. Under sommaren uppmättes de högsta koncentrationerna på 82 och 125 ng/L (4-MBC respektive benzofenon-3), vilket överensstämmer med att de båda sjöarna då användes för rekreation (Poiger *et al.*, 2004).

Slam från reningsverk har också visat sig innehålla UV-filter, bland annat 4-MBC (Plagellat *et al.*, 2006), och UV-filtren kan nå den terrestra miljön om slammet används i jordbruk. Analyser av slam från 14 olika reningsverk i Schweiz, klassificerade efter avloppsvattnets ursprung (industri, stad, landsbygd o.s.v.), har visat att de undersökta UV-filtren i avloppsvattnet huvudsakligen kommer från privata hushåll (Plagellat *et al.*, 2006). Ytterligare en studie gjord i Schweiz visade att koncentrationen UV-filter i avloppsvatten minskade med 92-99 % efter att vattnet passerat genom reningsverk. Dock var nivåerna i utgående vatten ändå så höga att de gick att detektera vid kemisk analys. Sorbtion på fasta ytor och biodegradering var de två dominerande faktorerna som bidrog till minskningen (Kupper *et al.*, 2006).

Log K_{OW} kan med hjälp av molekylstrukturerna beräknas till 5,92 för 4-MBC och 5,37 för 3-BC (SRC hemsida). Halter av 4-MBC upp till 166 ng/g fettvikt har uppmätts i fisk (sik, *Coregonus sp.*; mört, *Rutilus rutilus*; abborre, *Perca fluviatilis*). I studien var 4-MBC-koncentrationerna lägre i fisk än i semipermeabla membraner (SPMD) exponerade i samma sjöar, vilket tyder på att molekylerna metaboliseras i fisk (Balmer *et al.*, 2005). I bäcköringar (*Salmo trutta fario*) tagna från schweiziska bäckar med ett inflöde från reningsverk, har koncentrationer på 1800 ng/g fett och 2400 ng/g fett uppmätts av UV-filtren 4-MBC respektive Oktokrylen (Buser *et al.*, 2006).

Studier på människor har visat att 4-MBC och andra UV-filter absorberas genom huden och de har detekterats i urinen (Janjua *et al.*, 2004). I en annan studie har 4-MBC visat sig metaboliseras till 3-(4-karboxybensyliden)-6-hydroxykamfer och 3-(4-karboxybensyliden)kamfer i både råttor och människor (Schauer *et al.*, 2006). Metaboliterna analyserades med anledning av tidigare resultat som visat på att 4-MBC haft högre effekt *in vivo* jämfört med *in vitro* (Schlumpf *et al.*, 2004a, Tinwell *et al.*, 2002). Några metaboliter till 3-BC har inte rapporterats.

1.3 ÖSTROGENRECEPTORER

Det endogena steroidhormonet 17- β -östradiol har olika effekter i många vävnader. Majoriteten av dessa effekter medieras av ligandaktiverade transkriptionsfaktorer (Whitfield *et al.*, 1999) kallade östrogenreceptorer (ER). Två former av ER har beskrivits, ER α och ER β (Kuiper *et al.*, 1996). De kan aktivera gener genom att binda till östrogenresponselement (ERE) som sitter i promotorregionen på många mottagargener, men de kan också interagera med transkriptionsfaktorer och binda indirekt till andra responselement på gener som saknar ERE. Dessutom har en icke-genomisk mekanism, som dock är litet studerad, observerats i flera vävnader. Den icke-genomiska mekanismen börjar med att en ligand aktiverar en receptor. Via en så kallad "second messenger" sätts en signalkaskad igång som påverkar jonkanaler, eller alternativt ökar kväveoxid-halten i cytoplasman, och därmed ges en snabb fysiologisk respons (Kushner *et al.* reviewartikel, 2003).

VTG i fåglar och grodor, samt prolaktin i däggdjur, är ett par exempel på de många gener som regleras genom att östrogenreceptorn binder till ERE. ER kan binda via två olika mekanismer, en ligandberoende och en som är beroende av en signal från en tillväxtfaktor. Den ligandberoende är en direkt mekanism som sätts igång efter att en ligand bundit till receptorn. Då frigörs receptorn från olika komplex med chaperonproteiner, och dimeriserar genom c-terminalen på dess ligand-bindande domän (LBD). Sedan binder dimeren till ERE via receptorns DNA-bindande domän (DBD). LBD och DBD är gensekvenser som är bland de mest välbevarade hos gruppen nukleära receptorer, dit östrogenreceptorerna hör. När receptorn bundit till DNA sker en aktivering genom komplexbildning av ett antal medaktiverare, som värvas av aktiveringsfunktioner på receptorn. Antiöstrogener, exempelvis tamoxifen, agerar genom att blockera just en aktiveringsfunktion. Medregulatorer förändrar kromatinets struktur och underlättar för RNA polymeras II så att transkription kan starta (Kushner *et al.* reviewartikel, 2003).

Traditionellt förknippas östrogener med honans reproduktion, men östrogener har även betydelse för hanens reproduktion (Hess *et al.*, 1997). Dessutom har hormonerna effekt i ett antal vävnader som inte har med reproduktionen att göra, exempelvis benvävnad, det kardiovaskulära systemet och det centrala nervsystemet. Samma ligand kan ha olika bindningsaffinitet till ER α och ER β , bland annat har 17- β -östradiol en fem gånger högre affinitet för ER α än ER β , och receptorerna uttrycks också olika mycket i olika vävnader, vilket har visats i *in vitro*-studier på råttor. I studierna visades nivåskillnader av östrogenreceptorerna i olika vävnader i reproduktionsorganen. Uttrycket var också olika i jämförda organ, där det relativa uttrycket av ER α var måttligt till högt i livmoder, testikel,

hypofys, äggstockar, njure, bitestikel och binjure medan ER β -uttrycket var på liknande nivåer i prostata, äggstockar, lunga, urinblåsa, hjärna, livmoder och testiklar (Kuiper *et al.*, 1996, Kuiper *et al.*, 1997). Östrogenreceptorer från två olika arter kan också vara olika känsliga för samma östrogen (Kunz och Fent, 2006b).

1.4 KÖNSDIFFERENTIERING I VAKTEL

För att förstå hur östrogenlika kemikalier kan ha effekt på fåglars reproduktion är det viktigt att känna till hur könsdifferentieringen normalt sker. Hos fåglar är det hanen som bär två homologa könskromosomer (ZZ) och honan har ett heterogent könskromosompar (ZW), vilket skiljer sig från däggdjur där det är tvärtom. Något som också skiljer fåglar från däggdjur är vilket kön som utvecklas i avsaknad av tillräckliga halter steroidhormoner under embryoutvecklingen. Hos fåglar är östrogen det avgörande hormonet, och hanliga könskaraktärer utvecklas om östrogenhalten är låg under den tidiga embryoutvecklingen. Könet hos däggdjur avgörs istället av halten testosteron. Däggdjuren utvecklar honliga könskaraktärer om halten testosteron är låg under samma period i utvecklingen (Jost, 1978). Mekanismen bakom könsbestämningen hos fåglar är inte klarlagd, men gener som har ett högt uttryck i gonaderna innan könsbestämningen sker, har identifierats i både hanar och honor. Den i fåglar Z-tillhörande genen *DMRT1* (Nanda *et al.*, 1999) har ett högt uttryck i kycklingembryon innan gonaddifferentieringen, och *PKCIW* som föreslås sitta på W-kromosomen, uttrycks under samma period i honor (Hori *et al.*, 2000, Smith *et al.*, 1999).

Innan någon differentiering skett i vaktel är gonaderna hos han- och honembryon likadana och består av en medulla och en cortex. I honor utvecklas den vänstra gonadens cortex till äggstock medan båda gonaderna blir testiklar hos hanar. Det tidiga embryot har också dubbelsidiga Müllerska och Wolffska gångar. Hos honor utvecklas den vänstra Müllerska gången till äggladare medan den högra tillbakabildas och de Wolffska gångarna kvarstår som rudimentära organ. De Wolffska gångarna differentieras till sädesledare i hanar, hos vilka de Müllerska gångarna samtidigt tillbakabildas.

Koncentrationen av steroidhormoner i gonaderna skiljer sig mellan honor och hanar tidigt i embryoutvecklingen (Sheib *et al.*, 1985). En studie gjord av Ottinger på vaktel under embryoutvecklingen och efter kläckning visade en signifikant högre halt östrogen i honor än hanar, både vad gäller halt i plasma och gonader (Ottinger *et al.*, 2001). Genetiska kycklinghonor har utvecklat testiklar och hanlig fenotyp i fall där östrogensyntesen inhiberats genom behandling med en aromatasinhibitor innan könsdifferentieringen, vilket visar på östrogenets betydelse i gonaddifferentieringen (Elbrecht och Smith, 1992). Den östrogena effekten medieras via östrogenreceptorerna (Jensen och Jacobsen, 1962). Östrogenreceptorer har påvisats i gonader hos både honliga och hanliga kycklingembryon vid dygn fem, innan den morfologiska gonaddifferentieringen startat (Smith *et al.*, 1997). I vaktel uttrycks ER β i gonader hos vuxna individer (Lakaye *et al.*, 1998), och nyligen har både ER α och ER β detekterats i gonader samt Müllerska gångar från embryon. Dock var ER β -nivåerna för låga för att kunna kvantifieras. Uttrycket av ER α var signifikant högre i honor jämfört med i hanar (dygn sju och åtta) och dessutom var ER α högre uttryckt i vänster gonad än i höger hos sju dygn gamla honembryon (Mattsson *et al.*, 2008)

1.5 ENDOKRINSTÖRANDE EFFEKTER

Att östrogenreceptorer finns i en vävnad betyder att även xenoöstrogener kan binda till dem och ge effekt. Ett flertal studier har visat att östrogen kan framkalla en total eller partiell feminisering av en genetisk fågelhane. Tidigt visades exempel på feminisering hos fågelembryon som utveckling av ovotestis och bevarande av de Müllerska gångarna (Willier *et al.*, 1935). Sedan dess har även missbildningar av de Müllerska gångarna i honembryon efter östrogenexponering beskrivits och Berg *et al.* (1999; 2001) har kunnat visa att de morfologiska förändringar som skett i både hanar och honor är dosrelaterade. Effekter på ägglidarna har också studerats; i tolv veckor gamla vaktelhonor som behandlats med dietylstilbestrol i äggen (0,9 eller 1,9 µg/ägg) minskade vikten på ägglidarna med 50 % (Gildersleeve *et al.*, 1985).

Hjärnans utveckling och reproduktionsbeteendet har studerats i fåglar efter exponering för olika xenoöstrogener under embryonalutvecklingen. Etinylöstradiol (EE₂) injicerat i äggulan på vaktelägg ger minskat sexuellt beteende hos vuxna hanfåglar vid koncentrationen 6 ng/g ägg (Halldin *et al.*, 1999).

1.6 3-BC och 4-MBC I TIDIGARE TOXICITETSSTUDIER

I studier på råtta (Long Evans) upptäcktes 3-BCs och 4-MBCs östrogena effekter. Bland annat påvisades en dosrelaterad förändring av vikten på könsorganen samt försenad pubertet hos hanar efter exponering för 4-MBC och 3-BC (Schlumpf *et al.*, 2001; 2004b). Därefter har det gjorts ett antal studier på fisk, som även de gett resultat som tyder på att föreningarna har endokrinstörande egenskaper. 3-BC ger effekter på reproduktionssystemet hos elritsa (*Pimephales promelas*), såsom induktion av VTG-koncentrationen i plasma, samt störningar av spermatocyt- och oocytutvecklingen (Kunz *et al.*, 2006b). Även 3-BC orsakar VTG-induktion i regnbåge (*Oncorhynchus mykiss*) (Holbech *et al.*, 2002). I en studie på hanliga tandkarpar (*Oryzias latipes*) har också 4-MBC visats ha östrogen effekt och ger ökad plasmakoncentration av VTG, signifikant högre uttryck av VTG-mRNA än kontroller samt ökat uttryck av mRNA för ER α (Inui *et al.*, 2003).

Nyligen har också en studie av UV-filtrens effekt på fågel gjorts. Försöket gjordes parallellt med detta och effekterna av 4-MBC och 3-BC, ensamma och i kombination med CA50, undersöktes i kyckling. Både reproduktionsorganens morfologi och levercellernas uttryck av östrogeninducerade gener studerades. Resultaten visar att 3-BC orsakar en ökad testikelarea-assymetri hos kycklingembryon exponerade i gulan för 100 µg/g ägg, men även har effekt i låg dos (30 µg/g ägg) i kombination med CA50 (0,1 µg/g). Testikelarea-assymetrin räknas ut genom att multiplicera bredden på den vänstra testikeln med den vänstra testikelns längd och sedan dividera med produkten av den högra testikelns längd och bredd. Även honornas högra Müllerska gång påverkades, och blev längre hos honor exponerade för både 3-BC och 4-MBC (3-BC i doser från 30 µg/g och 4-MBC i dosen 100 µg/g), samt för kombinationer med CA50. Missbildning av de Müllerska gångarna hos hanar visades i embryon exponerade för 3-BC (100 µg/g) samt de som injicerats med både 3-BC och CA50. Genuttrycket av ER α , ER β , VTG och Zona radiata protein 1 (Zrp1) studerades med kvantitativ Realtids-PCR i lever från kycklingembryon som exponerats via injektion i äggens luftkammare. Endast uttrycket av

genen Zrp 1 var förhöjt, och det efter exponering för 200 µg/ ägg 3-BC ($p < 0,01$) (Axelsson *et al.*, 2008).

Interaktion mellan 4-MBC och östrogenreceptorerna har demonstrerats *in vitro* (Schreurs *et al.*, 2002, Mueller *et al.*, 2003). I en studie där 3-BC och 4-MBC fick konkurrera med $16\alpha^{125}\text{I}$ -estradiol om bindning till rekombinanta humana ER band de båda till ER β (IC₅₀: 3-BC 11,8µM; 4-MBC 35,3µM) men inte till ER α (Schlumpf *et al.*, 2004a). Det tyder på att 3-BC och 4-MBC är ER β -selektiva och resultaten visade också på en högre potens av 3-BC jämfört med 4-MBC. Båda UV-filtren har mer effektiv antiöstrogen samt antiandrogen verkan än östrogen effekt, enligt en studie gjord *in vitro* med humana ER α och humana androgenreceptorer (Kunz och Fent, 2006b). Dessutom har additiva effekter på transkriptionen av pS2-genen i humana bröstcancerceller (MCF-7) rapporterats för 4-MBC i kombination med andra UV-filter (Heneweer *et al.*, 2005). Synergistiska effekter har visats med kombinationer av 3-BC och andra UV-filter (Kunz och Fent, 2006a).

1.7 METABOLITER

PCB-blandningen CA50 inducerar CYP- aktiviteten i fåglar (Murk *et al.*, 1994). I en tidigare studie av Halldin *et al.* (2005) undersöktes det sexuella beteendet hos vaktelhanar som behandlats *in ovo* med metoxyklor eller CA50 respektive en blandning av de båda. Resultaten visade att varken CA50 eller metoxyklor påverkade aktiviteten, men blandningen orsakade en signifikant reduktion av det sexuella beteendet. Förklaringen kan vara att metaboliten till metoxyklor har en högre affinitet till östrogenreceptorerna än metoxyklor själv, och att det är metaboliten som orsakar effekterna. En annan möjlighet är att effekten är additiv, eftersom CA50 eventuellt kan ha östrogen effekt. I vaktel orsakade föreningen ovotestis (Axelsson *et al.*, 2008)

1.8 VITELLOGENIN OCH APOLIPOPROTEIN SOM BIOMARKÖRER

Förutom förändring av gonaderna, kan exponering för östrogener resultera i att fåglar får förändrat uttryck av östrogenreglerade gener. Xenoöstrogener kan hos ovipara djur inducera levercellens uttryck och öka serumkoncentrationen av ägguleprotein-prekursorer som VTG och Apo (Marin och Matozzo, 2004, Shibuya *et al.*, 2005, Sumpter och Jobling, 1995, Wiskocil *et al.*, 1980). Fåglars ägguleproteiner är en komplex grupp av vitamin- och mineralbindande proteiner, lipoproteiner och fosfoproteiner. De syntetiseras i det äggläggande djurets lever under reglering av östrogen (Bergink *et al.*, 1974). VTG och Apo kan användas som biomarkörer hos fåglar vid exponering för kroppsfrämmande östrogener.

2. MATERIAL OCH METOD

Vaktelägg från Olstorp (Färjelanda, Sverige) hade inkuberats i $37\pm 0,5^\circ\text{C}$ och 60 % luftfuktighet i tre dygn varefter de injicerats med 3-BC (100 $\mu\text{g/g}$ ägg), 4-MBC (50 $\mu\text{g/g}$ ägg), CA50 (10 $\mu\text{g/g}$ ägg) eller UV-filtren i kombination med CA50. Injektionen skedde i gulan med hjälp av en Hamiltonspruta med 27G-kanyl, och volymen var 20 μl . Hålet fylldes igen med smält paraffin och äggen inkuberades till dygn 16 då embryona avlivades genom cervikal dislokation. Leverprover plockades ut för realtidsPCR-analys samt genetisk könsbestämning, och snabbfrysades i flytande kväve. Könsbestämningen skedde både okulärt med hjälp av stereomikroskop, och genetiskt från leverproverna. Den kvantitativa realtids PCRen var optimerad för vaktel avseende reagensen som användes, samt gällande annealingtemperatur och primerkoncentration.

En reporterplasmid innehållande tre östrogenresponselement (3xERE) framför reportergenen luciferas, samt genen Neo^R som ger resistens mot geneticin (pGL2-TATA.luc.neo = pGL2-3xERE) (Wilson *et al.*, 2004), var redan konstruerade och hade stabilt transfekterats in i HeLa-celler. Cellerna hade selekterats för geneticinresistens och förvarades i -80°C . Expressionsplasmider innehållande ER α - respektive två olika ER β -receptorer från vaktel hade konstruerats, pcDNA3.1ER α 17.22, pcDNA3.1ER β 12.16 och pcDNA3.1ER β 17.22. Östrogenreceptorerna var klonade från 12 respektive 17 dygn gamla vaktelembryon. Plasmiderna innehöll även den eukaryota selektionsgenen för zeocinresistens. Eftersom reporterplasmiden och expressionsplasmiden har olika selektionsgener kan de transfekteras och selekteras i samma cell.

2.1 KEMIKALIER

UV-filtret 4-MBC var inköpt från Merck (VWR) och 3BC kom från Induchem genom Kajsa Kavat Kosmetik AB. Clophen A50 erhöles från Bayer (Leverkusen, Tyskland) och etinylöstradiol (EE2) var inköpt från Sigma-Aldrich (USA).

2.3 REALTIDS RT-PCR

Total-RNA preparerades från vävnadsproverna med Invisorb Spin Tissue RNA Mini Kit (Invitek, Belgien) och DNase-behandlades med DNA-freeTM Kit (Ambion, USA) för att eliminera kontaminering av DNA. Koncentrationen mättes på Nanodrop. Till cDNA-syntes användes 2 μg RNA och syntesen utfördes med AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Stratagene, USA). Primrarna som användes var så kallade random primers, vilket i det här fallet innebar nonamerer. Tjugo kontrollprover från ett tidigare likadant experiment DNase-behandlades, och kom härefter att behandlas som de andra proverna. Till realtidsPCR-reaktioner av generna VTG, Apo, ER α samt referensgenen β -actin, användes QuantiTect[®]SYBR Green PCR (QIAGEN, Washington, USA). Proverna späddes 1:20 med nukleasfritt vatten och 4 μl användes till vardera realtidsPCR-reaktionen, som utfördes med en Rotorgene 3000 (Corbett Research, Sydney, Australien). Primerkoncentrationen varierade mellan 0,4 och 2,0 μM för de olika generna och den totala reaktionsvolymen var 20 μl (se tabell 1 för mer detaljer om primrarna). Negativa kontroller förbereddes likadant med undantag för att enzymet vid cDNA-syntesen uteslöts. De negativa kontrollerna togs med för

att kontrollera att primrarna inte band till något genomiskt DNA som eventuellt kontaminerat RNA:t. Kontroller där provet bytts ut mot vatten kördes också för varje gen, för att kontrollera kvalitén på analysen. Vid analys av genen Apo uttryck användes en positiv kontroll från ett tidigare försök på vaktelembryon. Kontrollen var en individ som enligt tidigare resultat hade högt uttryck av Apo.

Varje prov analyserades i duplikat och på grund av det begränsade antalet platser i rotorn blandades proverna och fördelades på tre körningar per gen. Antalet realtidsPCR-cykler var 35-40 och föregicks av aktivering av polymeraset vid 95°C i 15 min. Varje cykel bestod av ett denatureringssteg vid 94°C i 15 s, annealing vid 51-59°C (tabell 1) i 30 s och slutligen ett elongeringssteg vid 72°C i 30 s. Reaktionseffektiviteten för respektive gen var mellan 1,8 och 2,0 (tabell 1) där 2,0 motsvarar 100 %. Effektiviteten för ER α räknades ut med hjälp av en spädningsserie som analyserades med realtids-PCR, de andra effektivitetsvärdena var sedan tidigare beräknade.

Tabell 1. Den annealingtemperatur och primerkoncentration som användes för vardera gen vid analys med realtids-qPCR av levervävnadsprover från vaktelembryon (*Coturnix japonica*) exponerade för 3-BC (100 μ g/g ägg), 4-MBC (50 μ g/g ägg), CA50 (10 μ g/g ägg) eller UV-filtren i kombination med CA50. Samt primrarnas sekvenser för respektive gen och genuttryckets effektivitet. Förkortningen VTG står för vitellogenin, Apo för Apolipoprotein och ER α för östrogenreceptor α .

Gen	Annealing-temperatur	Primer-koncentration	Primersekvenser (5'-3')	Effektivitet
VTG	53°C	1,0 μ M	Framåt: GAAAACCCTGAGCAACGGATAG Bakåt: TGGAACATCATCATGGAAATCTTG	2,0
Apo	59°C	0,4 μ M	Framåt: GCACTCAAGGTCCTCAGTGAT Bakåt: CCGTGTTACAGCTTCATAGATG	2,0
ER α	58°C	0,8 μ M	Framåt: CTTGCAGACAGAGAATTAGTGCACA Bakåt: GTTAAATCCACAAATCCTGGAACTC	1,8
B-actin	51°C	2,0 μ M	Framåt: CTG GAG AAG AGC TAT GAA Bakåt: ACT CCA TAC CCA AGA AAG	2,0

Genuttrycket normaliserades mot β -aktin som är en höguttryckt gen i fågel (Lee och Cotanche, 1995). Nedanstående ekvation användes för att beräkna det medelnormaliserade genuttrycket (MNE).

$MNE = (E_{ref})^{CT_{ref, medel}} / (E)^{CT_{medel}}$, där E_{ref} är effektiviteten för referensgenen β -aktin, CT_{ref} är medelvärdet av CT-värdena (CT= cycle treshold, det cykelantal där en signal över tröskelvärdet detekteras) för duplikaten körda med referensgenen. E är effektiviteten för den aktuella genen och CT_{medel} är medelvärdet av CT-värdena för duplikaten körda med den

aktuella genen (Muller *et al.*, 2002). Individer vars uttryck inte var detekterbart, gavs MNE-värdet 0.

2.4 STATISTIK

Effekterna på uttrycket av de olika generna analyserades med ett Kruskal Wallis-test ($p < 0,05$), följt av ett Dunn's Multiple Comparison-test där varje behandlad grupp jämfördes med respektive kontrollgrupp.

2.5 TRANSIENT TRANSFEKTION

Med anledning av att den transienta transfektion inte gav resultat, gjordes flera försök med olika utföranden, vilka här kallas för försöksuppställning 1-4 (tabell 2). Försöken planerades efter hand, för att utifrån det tidigare försökets resultat förbättra upplägget och så småningom optimera en metod. För att ta reda på om metoden fungerade användes EE2 som testsubstans.

En cellinje med HeLa-celler stabilt transfekterade med 3xERE (Hela-3xERE) startades upp från fryskultur i ett sterilfiltrerat medium bestående av DMEM-F12 utan fenolrött och 10 % steroidfritt fetalt kalvserum, samt antibiotika (penicillin och streptomycin) och antisvampmedel (Amphotericin B). Cellerna odlades i steril odlingsflaska i inkubator i 5 % CO₂ och temperaturen 37°C. När konfluensen uppnått ca 70 % trypsinerades cellerna med Trypsin-EDTA, delades för att få mer yta att växa på och placerades i en ny odlingsflaska.

Försöksuppställning 1

Plasmider innehållande östrogenreceptor α eller β (pcDNA3.1ER α 17.22 eller pcDNA3.1ER β 12.16) renades fram med HiSpeed Midi Kit (Qiagen, USA) från bakteriekultur (*E.coli*).

Transient transfektion till HeLa-3xERE utfördes med PlusTMReagent (Invitrogen, USA) med plasmiderna ovan i mängderna 0, 0,5, 1 och 2 μ g, i replikat av tre, till ett medium endast bestående av DMEM. Cellerna hade vid tillfället ca 70 % konfluens. Åtta timmar efter avslutad transfektion exponerades cellerna för etinylöstradiol (EE2) i koncentrationerna 0,01 nM och 0,1 nM. Det fanns kontroller som saknade exponering. Cellerna exponerades i sexton timmar och därefter tillsattes 5 μ l luciferin (30 mM). Avläsning av luminiscensen skedde med Victor3TM Multilabel Counter (PerkinElmer, USA) direkt efter tillsats av luciferin, samt en timme och ca 18 timmar efter tillsats av luciferin.

Försöksuppställning 2

Plasmider med östrogenresponselement från vaktel (pGL2-3xERE) renades fram enligt ovan och en ny cellinje med HeLa-celler startades upp i DMEM med 10 % FBS och 1 % L-glutamat.

Både den tidigare använda cellkulturen med HeLa-3xERE, och de nyss uppstartade HeLa-cellerna, trypsinerades och delades, för att ha den för kivet optimala tätheten på 50-80 % vid transfektion. Transient transfektion utfördes som tidigare, med en total plasmidmängd på 0, 0,5, 1 eller 2 μ g av pcDNA3.1ER α 17.22, pcDNA3.1ER β 12.16 samt pGL2-3xERE till Hela-kulturen. Till Hela-3xERE transfekterades 0, 0,5, 1 och 2 μ g pcDNA3.1ER α 17.22 respektive pcDNA3.1ER β 12.16. Exponering och avläsning skedde likt tidigare beskrivning.

Försöksuppställning 3

Transient transfektion utfördes liksom i försöksuppställning 2 men med en lägre total plasmidmängd, på 0, 0,25, 0,5 respektive 1 µg.

Försöksuppställning 4

Cellerna i vardera kulturen räknades till 50 000-100 000 i Bürker-kammare och placerades i 24-hålsplattor med 0,5 ml medium. Transient transfektion genomfördes med jetPEI™ (PolyPlus-transfection, Frankrike) med 1 µg DNA i replikat av 12 brunnar. Sex brunnar fick fungera som kontroller. Till HeLa-cellerna transfekterades både plasmider med en östrogenreceptor, pcDNA3.1ERβ17.22 respektive pcDNA3.1ERβ12.16, och plasmider innehållande östrogenresponselement, pGL2-3xERE. Till cellinjen som redan innehöll responselement transfekterades respektive östrogenreceptor. Cellerna exponerades efter 8 timmar för nyspädda EE2-lösningar i koncentrationerna 0,01 nM och 0,1 nM. 16 timmar därefter tillsattes 5 µl luciferin (30 mM) och 30 min efter det mättes luminiscensen med plattläsaren.

Tabell 2. Väsentliga skillnader mellan de olika försöksuppställningarna 1-4, som gjordes i syfte att transient transfektera HeLa-3xERE med expressionsplasmid innehållande östrogenreceptor pcDNA3.1 ERα17.22, pcDNA3.1ERβ17.22 eller pcDNA3.1ERβ12.16, samt HeLa-celler med någon av receptorerna, samt reporterplasmid innehållande 3 östrogenresponselement, pGL2-3xERE. Parametern celldöd studerades inte i den första uppställningen.

Försöks- uppställning	Tranfektions- reaktanter	Mängd plasmid (µg)	Antibiotika antivamp-medel	Celltäthet	Östrogen- receptor	Celldöd
1	Plus™Reagent	0, 0.5, 1, 2		Ca 70 %	ERα 17.22 ERβ 12.16	-
2	Plus™Reagent	0, 0.5, 1, 2		Ca 70 %	ERα 17.22 ERβ 12.16	x
3	Plus™Reagent	0, 0.25, 0.5, 1		Ca 70 %	ERα 17.22 ERβ 12.16	x
4	jetPEI™	1	x	Ca 50 %	ERβ 17.22 ERβ 12.16	

Celler som transfekterats enligt försöksuppställning 4, men inte exponerats för EE2, trypsinerades och överfördes till nya brunnar. Zeocin tillsattes i åtta olika koncentrationer mellan 0 och 1000 ng/µl till HeLa-kulturen med celler transfekterade med ERβ17.22 eller ERβ12.16. Geneticin tillsattes på samma sätt till HeLa-3ERE-kulturen och efter några dygn sattes även zeocin till dem. Överlevande celler från brunnarna innehållande 400 ng/µl zeocin trypsinerades och överfördes till en 5 ml odlingsflaska. Som kontroll till att cellerna själva inte innehöll resistens mot zeocin eller geneticin, exponerades även celler utan plasmider.

3. RESULTAT

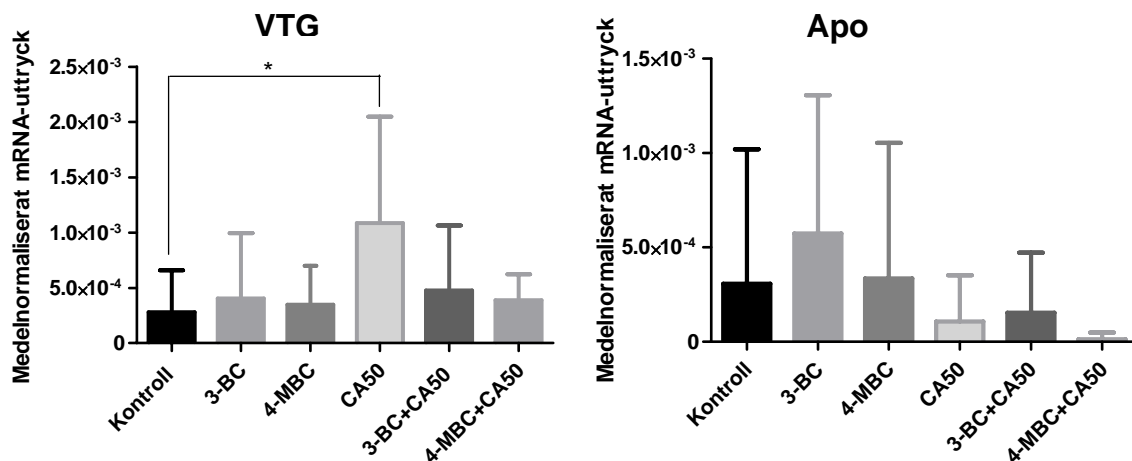
3.1 *IN VITRO*-FÖRSÖK

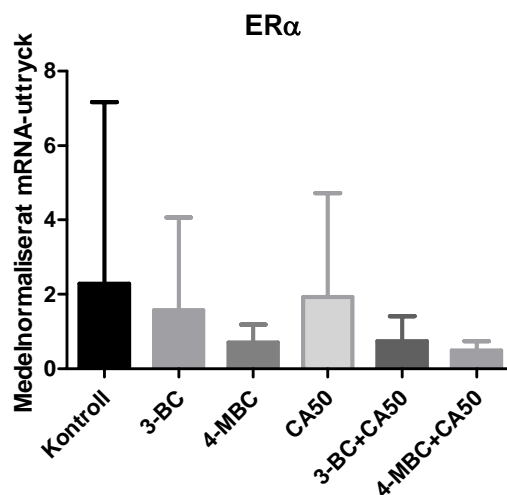
Först gjordes två likartade försök (1 och 2) med den enda skillnaden att avläsningen upprepades flera gånger i försöksuppställning 1. Vid andra uppställningen upptäcktes celldöd efter transfektionerna slutförts, vilket inte studerades vid det första tillfället. Inte i något av försöken kunde någon signal detekteras då luminiscensen lästes av med plattläsare. Med anledning av celldöden minskades DNA-koncentrationen till hälften till det tredje försöket för att minska belastningen, den så kallade genotoxiska effekten, på cellerna. Dock förekom även i försök 3 celldöd och därför testades ett nytt transfektionskit i försök 4, men det sista försöket med transient transfektion gav inte heller någon luminiscenssignal.

I HeLa-kulturen, med ERβ12.16 eller ERβ17.22, dog alla celler som exponerats för zeocin. De HeLa-3xERE-celler som exponerats för geneticin, överlevde inte tillsats av zeocin.

3.2 mRNA-UTTRYCK

Genen VTG var signifikant högre uttryckt i gruppen exponerad för CA50 än i kontrollgruppen ($P < 0,05$). Det var inga signifikanta skillnader mellan de individer som exponerats för UV-filter jämfört med kontrollerna gällande någon av de studerade generna, (figur 2).





Figur 2. Det medelnormaliserade mRNA-uttrycket av generna VTG, Apo, respektive ER α i lever från vaktelembryon (*Coturnix japonica*). Äggen hade injicerats med 3-BC (100 μ g/g ägg), 4-MBC (50 μ g/g ägg), CA50 (10 μ g/g ägg) eller UV-filtren i kombination med CA50. Genuttrycket är normaliserat mot genen β -aktin. Staplarna visar medelvärdet med övre standardavvikelse, *P<0,05. Antalet individer i varje grupp varierade mellan 6 och 32.

4. DISKUSSION

4.1 IN VITRO-FÖRSÖK

In vitro-test har visat sig vara användbara för att studera mekanismer på cellulär nivå, och är väsentliga för undersökning av risker för skadliga effekter. Dock har de begränsningar eftersom cellstudier inte kan efterlikna det endokrina systemet *in vivo*. Jämförelser mellan *in vitro*- och *in vivo*-försök avseende östrogena effekter i fisk har visat att *in vitro*-testerna kan undervärdera aktiviteten av de undersökta föreningarna (Kunz *et al.*, 2006a). I den här studien kom dock resultaten mer att handla om själva metoden.

Eftersom HeLa-kulturen (med ER β 12.16 respektive ER β 17.22) dog vid exponering för zeocin betyder det att resistensgenen Neo^R inte uttrycktes och därmed antas också att genen för vardera östrogenreceptorn inte var uttryckt. I Hela-3xERE-cellerna var antagligen östrogenreceptorerna inte heller uttryckta men den stabilt transfekterade plasmiden med östrogenresponselement fanns, eftersom cellerna överlevde tillsats av geneticin. Vid en transient tranfektion förs DNA-segmentet in i cellkärnan men integreras inte med cellens genom, vilket det gör vid en stabil transfektion. Uttrycket av den införda plasmiden är därför tillfälligt och upphör då den införda plasmiden bryts ned. Eventuellt kan nedbrytning av det införda DNA:t vara förklaringen till att östrogenreceptorerna inte var uttryckta i cellerna från försöksupställning 4, då testet gjordes fyra dygn efter transfektionen. En annan förklaring till resultaten kan vara att UV-filtren inte binder till östrogenreceptorerna utan istället verkar via en icke-genomisk mekanism. Ytterligare försök behövs för att testa detta.

Vad gäller försök 2 och 3, och antagligen även försök 1, var cytotoxicitet ett faktum, vilket inte iakttogs vid försök 4. Tranfektionsreagensen som användes vid det sista försöket (jetPEI) har dokumenterats ge låg cytotoxicitet i koncentrationer optimala för transfektion (Boussif *et al.*, 1995). Reagenserna kondenserar till positivt laddade partiklar som binder till proteoglykaner på cellmembranet och tar sig sedan genom cellmembranet via endocytos (Mislick och Baldeschwieler, 1996). Väl därinne agerar de som pH-buffert och skyddar DNA:t från att brytas ned. PlusReagent™ innehåller däremot fettbaserade reagenser som diffunderar in genom cellmembranet. Celldöden kan ha orsakats av genotoxicitet på grund av en hög koncentration plasmid i cellerna. En avvägning måste alltid göras av hur mycket plasmid som ska transfekteras från början. Ju mer plasmid, desto större signal fås vid mätning men det ger en högre genotoxisk effekt. En lägre koncentration ger däremot en hög utspädningseffekt från cellgeneration till cellgeneration och en lägre signal fås samtidigt som den genotoxiska effekten minskar.

Liksom det finns två östrogenreceptorer beskrivna, ER α och ER β , finns det också olika ERE. Det har föreslagits att olika ER-ligandkomplex kan ha olika affinitet för olika ERE (Stancel *et al.*, 1995), vilket medför en risk att missbedöma den testade kemikalien beroende på vilken receptor och vilket östrogenresponselement som används. ER α från vaktel har bindningsaffinitet för etinylöstradiol, och låg affinitet för till exempel xenoöstrogenerna bisfenol och nonylfenol. För fortsatt forskning hade det varit intressant att veta hur bindningen ser ut även för ER β .

4.2 mRNA-UTTRYCK

Att mäta induktion av vitellogenin och apolipoprotein har i många studier visat sig vara ett känsligt och specifikt test i ovipara djur för att uppskatta en viss förenings östrogena effekt (Marin och Matozzo, 2004, Shibuya *et al.*, 2005, Sumpter och Jobling, 1995, Wiskocil *et al.*, 1980). Bisfenol A, som har östrogen effekt i fåglar (Berg *et al.*, 2001), kan inducera VTG hos regnbåge (Lindholm *et al.*, 2000) och enligt en studie på råttor är 3-BC betydligt mer potent att inducera cellproliferation i humana bröstcancer-celler (MCF-7) än bisfenol A (Schlumpf *et al.*, 2004a). Det är svårt att dra paralleller mellan hur bisfenol A och 3-BC agerar i råttor jämfört med i fåglar, men kanske krävs det andra slags markörer än de här studerade, för just UV-filtren 3-BC och 4-MBC för att testa östrogena effekter i fåglar. Resultat som stödjer detta är den parallella studien på kycklingembryon som påvisade att proteinet Zrp 1, men inte VTG, inducerades av 3-BC (Axelsson *et al.*, 2008). I den studien injicerades UV-filtren via luftkammaren vilket ger en mer akut exponering än vid ägguleinjektion. En förklaring till att ingen induktion av VTG, Apo eller ER α skedde i denna studie kan vara att mRNA:t för generna hunnit nedregleras igen innan levern plockades ut 13 dygn efter exponering. Eventuellt var det heller inte optimalt att injicera äggen efter tre dagars inkubation. Injektion i äggulan har dock en hög ekotoxikologisk relevans. För äggläggande honor är exkretion via äggulan en viktig eliminationsväg och betyder att fågelembryot i det vilda utsätts för många lipofila föroreningar som förs över från fågelhonan till äggens gula.

Anledningen till att CA50 gav induktion av VTG kan vara att föreningen bryts ner långsammare än 4-MBC och 3-BC. Tidigare har CA50 inducerat ökad cortexarea hos

vaktelembryon (Axelsson *et al.*, 2008) och eventuellt kan föreningen ha östrogen verkan. Den avsaknade induktionen av VTG i grupperna exponerade för både UV-filtren och CA50 kan bero på att genuttrycket av den studerade genen var nära tröskelnivån, och därmed blev individvariationen hög. Hög variation mellan individer har även observerats i andra liknande tester med VTG (Holbech *et al.*, 2002, Lindholst *et al.*, 2000).

Sammanfattningsvis har 3-BC och 4-MBC i detta försök inte orsakat något förhöjt uttryck av generna för Vitellogenin, Apolipoprotein eller östrogenreceptor α , vilket förväntas av ämnen med östrogena effekter. Detta säger dock inte att kemikalierna ej utgör ett eventuellt hot för vår omgivande fauna, på grund av att denna studie inte kan fastställa att de inte har en östrogen effekt. Dessutom har flertalet andra studier kunnat visa på östrogena egenskaper, och särskilt 3-BC har gett kraftiga morfologiska förändringar på Müllerska gångar hos fågelembryon. Vidare behövs ytterligare metodutveckling för att med ett *in vitro*-försök kunna undersöka om 3-BC och 4-MBC kan agera som östrogenreceptor-ligander i fågel. På grund av resultat från andra försök, och de halter som uppmätts i miljön, finns det fortfarande anledning att misstänka dessa två kemikalier som exotoxikologiska problem.

5. REFERENSER

- Axelsson J. Differentiation of Brain and Reproductive Organs in Birds. Akad.avh. 2008. Institutionen för Fysiologi och utvecklingsbiologi, Avdelningen för Ekotoxikologi, Uppsala Universitet.
- Balmer, M. E., H. R. Buser, M. D. Muller, och T. Poiger. 2005. Occurrence of some organic UV filters in wastewater, in surface waters, and in fish from Swiss Lakes. *Environmental Science & Technology* 39:953-962.
- Berg, C., K. Halldin, och B. Brunström. 2001. Effects of bisphenol A and tetrabromobisphenol A on sex organ development in quail and chicken embryos. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20:2836-2840.
- Berg, C., K. Halldin, A. K. Fridolfsson, I. Brandt, och B. Brunström. 1999. The avian egg as a test system for endocrine disrupters: effects of diethylstilbestrol and ethynylestradiol on sex organ development. *The Science of the Total Environment* 233:57-66.
- Bergink, E.W., Wallace, R.A., Van De Berg, J.A., Bos, E.S., Gruber, M., och Geert, A.B.1974. Estrogen-Induced Synthesis of Yolk Protein in Roosters. *American Zoologist* 14: 1177-1193
- Boussif, O., F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, och J. P. Behr. 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:7297-7301.
- Buser, H. R., M. E. Balmer, P. Schmid, och M. Kohler. 2006. Occurrence of UV filters 4-methylbenzylidene camphor and octocrylene in fish from various Swiss rivers with inputs from wastewater treatment plants. *Environmental Science & Technology* 40:1427-1431.
- Elbrecht, A., och R. G. Smith. 1992. Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. *Science* 255:467-470.
- Gilbertson, M., T. Kubiak, J. Ludwig, och G. Fox. 1991. Great Lakes embryo mortality, edema, and deformities syndrome (GLEMEDS) in colonial fish-eating birds: similarity to chick-edema disease. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 33:455-520.
- Gildersleeve, R. P., H. A. Tilson, och C. L. Mitchell. 1985. Injection of diethylstilbestrol on the first day of incubation affects morphology of sex glands and reproductive behavior of Japanese quail. *Teratology* 31:101-109.
- Hany, J., och Nagel, R. 1995. Nachweis von UV-Filtersubstanzen in Muttermilch. *Det. Lebensm.-undsch.* 91, 341-345.
- Halldin, K., J. Axelsson, och B. Brunström. 2005. Embryonic co-exposure to methoxychlor and Clophen A50 alters sexual behavior in adult male quail. *Archives of Toxicology* 79:237-242.

- Halldin, K., C. Berg, I. Brandt, och B. Brunstrom. 1999. Sexual behavior in Japanese quail as a test end point for endocrine disruption: effects of in ovo exposure to ethinylestradiol and diethylstilbestrol. *Environmental Health Perspectives* 107:861-866.
- Heneweer, M., M. Muusse, M. van den Berg, och J. T. Sanderson. 2005. Additive estrogenic effects of mixtures of frequently used UV filters on pS2-gene transcription in MCF-7 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 208:170-177.
- Hess, R.A., Bunick, D., Lee, K.H., Bahr, J., Taylor, J.A., Korach, K.S., och Lubahn, D.B. 1997. A role for oestrogens in the male reproductive system, *Nature* 390; 509-12.
- Holbech, H., U. Norum, B. Korsgaard, och B. Poul. 2002. The chemical UV-filter 3-benzylidene camphor causes an oestrogenic effect in an in vivo fish assay. *Pharmacology & Toxicology* 91:204-208.
- Hori, T., S. Asakawa, Y. Itoh, N. Shimizu, och S. Mizuno. 2000. Wpkci, encoding an altered form of PKCI, is conserved widely on the avian W chromosome and expressed in early female embryos: implication of its role in female sex determination. *Molecular Biology of the Cell* 11:3645-3660.
- Inui, M., T. Adachi, S. Takenaka, H. Inui, M. Nakazawa, M. Ueda, H. Watanabe, C. Mori, T. Iguchi, och K. Miyatake. 2003. Effect of UV screens and preservatives on vitellogenin and choriogenin production in male medaka (*Oryzias latipes*). *Toxicology* 194:43-50.
- Janjua, N. R., B. Mogensen, A. M. Andersson, J. H. Petersen, M. Henriksen, N. E. Skakkebaek, och H. C. Wulf. 2004. Systemic absorption of the sunscreens benzophenone-3, octyl-methoxycinnamate, and 3-(4-methyl-benzylidene) camphor after whole-body topical application and reproductive hormone levels in humans. *The Journal of Investigative Dermatology* 123:57-61.
- Jensen EV., och Jacobsen HI. 1962. Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent Progress in Hormone Research* 18: 387-414.
- Jost, A. 1978. Basic sexual trends in the development of vertebrates. *Ciba Foundation symposium* 5-18.
- Kuiper, G. G., B. Carlsson, K. Grandien, E. Enmark, J. Haggblad, S. Nilsson, och J. A. Gustafsson. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138:863-870.
- Kuiper, G. G., E. Enmark, M. Peltö-Huikko, S. Nilsson, och J. A. Gustafsson. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:5925-5930.
- Kunz, P. Y., och K. Fent. 2006a. Multiple hormonal activities of UV filters and comparison of in vivo and in vitro estrogenic activity of ethyl-4-aminobenzoate in fish. *Aquatic Toxicology* 79:305-324.

- Kunz, P. Y., och K. Fent. 2006b. Estrogenic activity of UV filter mixtures. *Toxicology and Applied Pharmacology* 217:86-99.
- Kunz, P. Y., H. F. Galicia, och K. Fent. 2006a. Comparison of in vitro and in vivo estrogenic activity of UV filters in fish. *Toxicological Sciences* 90:349-361.
- Kunz, P. Y., T. Gries, och K. Fent. 2006b. The ultraviolet filter 3-benzylidene camphor adversely affects reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicological Sciences* 93:311-321.
- Kupper, T., Plagellat, C., Brandli R.C., de Alencastro, L.F., Grandjean, D., och Tarradellas, J. 2006. *Water Research* 40:2603-12
- Kushner, P.J., Webb, P., Uht, R.M., Liu, M-M., och Price, R.H. 2003. Estrogen receptor action through target genes with classical and alternative response elements. *Pure and Applied Chemistry* 75:1757-1769.
- Lakaye, B., A. Foidart, T. Grisar, och J. Balthazart. 1998. Partial cloning and distribution of estrogen receptor beta in the avian brain. *Neuroreport* 9:2743-2748.
- Lee, K. H., och D. A. Cotanche. 1995. Detection of beta-actin mRNA by RT-PCR in normal and regenerating chicken cochleae. *Hearing Research* 87:9-15.
- Lindholm, C., K. L. Pedersen, och S. N. Pedersen. 2000. Estrogenic response of bisphenol A in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 48:87-94.
- Läkemedelsverkets föreskrifter om förbud och begränsningar för vissa ämnen att ingå i kosmetiska eller hygieniska produkter. 2007. Bilaga 5 i LVFS 2007:4
- Marin, M. G., och V. Matozzo. 2004. Vitellogenin induction as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic environments. *Marine Pollution Bulletin* 48:835-839.
- Mattsson, A., Olsson, J., och Brunström, B. 2008. Selective ER α activation disrupts sex organ differentiation and induces expression of vitellogenin II and very low density apolipoprotein II in Japanese quail embryos. *Reproduction, under tryckning*
- Mislick, K. A., och J. D. Baldeschwieler. 1996. Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:12349-12354.
- Mueller, S. O., M. Kling, P. Arifin Firzani, A. Mecky, E. Duranti, J. Shields-Botella, R. Delansorne, T. Broschard, och P. J. Kramer. 2003. Activation of estrogen receptor alpha and ERbeta by 4-methylbenzylidene-camphor in human and rat cells: comparison with phyto- and xenoestrogens. *Toxicology Letters* 142:89-101.
- Muller, P.Y., Janovjak, H., Miserez, A.R., och Dobbie, Z. 2002. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *Biotechniques* 32: 147-155.

- Murk, A. J., J. H. Van den Berg, M. Fellingner, M. J. Rozemeijer, C. Swennen, P. Duiven, J. P. Boon, A. Brouwer, och J. H. Koeman. 1994. Toxic and biochemical effects of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (CB-77) and clophen A50 on eider duckling (*Somateria mollissima*) in a semi-field experiment. *Environmental Pollution* 86:21-30.
- Nanda, I., Z. Shan, M. Schartl, D. W. Burt, M. Koehler, H. Nothwang, F. Grutzner, I. R. Paton, D. Windsor, I. Dunn, W. Engel, P. Staeheli, S. Mizuno, T. Haaf, och M. Schmid. 1999. 300 million years of conserved synteny between chicken Z and human chromosome 9. *Nature Genetics* 21:258-259.
- Ottinger M.A., Pitts S., och Abdelnabi. 2001. Steroid hormones during embryonic development in Japanese Quail: Plasma, gonadal, and adrenal levels. *Poultry Science* 80:795-799.
- Peakall, D.B., och Lincer, J.L. 1973. DDE-induced egg-shell thinning: Structural and physiological effects in three species. *Comparative and General Pharmacology* 4:305-313.
- Plagellat, C., T. Kupper, R. Furrer, L. F. de Alencastro, D. Grandjean, och J. Tarradellas. 2006. Concentrations and specific loads of UV filters in sewage sludge originating from a monitoring network in Switzerland. *Chemosphere* 62:915-925.
- Poiger, T., H. R. Buser, M. E. Balmer, P. A. Bergqvist, och M. D. Muller. 2004. Occurrence of UV filter compounds from sunscreens in surface waters: regional mass balance in two Swiss lakes. *Chemosphere* 55:951-963.
- Schauer, U. M., W. Volkel, A. Heusener, T. Colnot, T. H. Broschard, F. von Landenberg, och W. Dekant. 2006. Kinetics of 3-(4-methylbenzylidene)camphor in rats and humans after dermal application. *Toxicology and Applied Pharmacology* 216:339-346.
- Scheib D., Guichard A, Mignot TM, och Reyss-Brion M. 1985. Early sex differences in hormonal potentialities of gonads from quail embryos with a sex-linked pigmentation marker: an in vitro radioimmunoassay study. *General and Comparative Endocrinology* 60:266-272.
- Schlumpf, M., B. Cotton, M. Conscience, V. Haller, B. Steinmann, och W. Lichtensteiger. 2001. In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens. *Environmental Health Perspectives* 109:239-244.
- Schlumpf, M., H. Jarry, W. Wuttke, R. Ma, och W. Lichtensteiger. 2004a. Estrogenic activity and estrogen receptor beta binding of the UV filter 3-benzylidene camphor. Comparison with 4-methylbenzylidene camphor. *Toxicology* 199:109-120.
- Schlumpf, M., P. Schmid, S. Durrer, M. Conscience, K. Maerker, M. Henseler, M. Gruetter, I. Herzog, S. Reolon, R. Ceccatelli, O. Faass, E. Stutz, H. Jarry, W. Wuttke, och W. Lichtensteiger. 2004b. Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters--an update. *Toxicology* 205:113-122.
- Schreurs, R., P. Lanser, W. Seinen, och B. van der Burg. 2002. Estrogenic activity of UV filters determined by an in vitro reporter gene assay and an in vivo transgenic zebrafish assay. *Archives of Toxicology* 76:257-261.

- Shibuya, K., M. Wada, M. Mizutani, K. Sato, M. Itabashi, och T. Sakamoto. 2005. Vitellogenin detection and chick pathology are useful endpoints to evaluate endocrine-disrupting effects in avian one-generation reproduction study. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24:1654-1666.
- Smith, C. A., J. E. Andrews, och A. H. Sinclair. 1997. Gonadal sex differentiation in chicken embryos: expression of estrogen receptor and aromatase genes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 60:295-302.
- Smith, C. A., P. J. McClive, P. S. Western, K. J. Reed, och A. H. Sinclair. 1999. Conservation of a sex-determining gene. *Nature* 402:601-602.
- SRC hemsida: http://www.syrres.com/esc/est_kowdemo.htm, 2008-01-14
- Stancel, G. M., H. L. Boettger-Tong, C. Chiappetta, S. M. Hyder, J. L. Kirkland, L. Murthy, och D. S. Loose-Mitchell. 1995. Toxicity of endogenous and environmental estrogens: what is the role of elemental interactions? *Environmental Health Perspectives* 7:29-33.
- Sumpter, J. P., och S. Jobling. 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives* 7:173-178.
- Tinwell, H., P. A. Lefevre, G. J. Moffat, A. Burns, J. Odum, T. D. Spurway, G. Orphanides, och J. Ashby. 2002. Confirmation of uterotrophic activity of 3-(4-methylbenzylidene)camphor in the immature rat. *Environmental Health Perspectives* 110:533-536.
- Völkel, W., Colnot, T., Schauer, U.M.D., Broschard, T.H., och Dekant, W. 2006. Toxicokinetics and biotransformation of 3-(4-methylbenzylidene)camphor in rats after oral administration. *Toxicology and Applied Pharmacology* 216:331-338.
- Whitfield, G. K., P. W. Jurutka, C. A. Haussler, och M. R. Haussler. 1999. Steroid hormone receptors: evolution, ligands, and molecular basis of biologic function. *Journal of Cellular Biochemistry* 32-33:110-122.
- Willier, B. H., T. F. Gallagher, och F. C. Koch. 1935. Sex-Modification in the Chick Embryo Resulting from Injections of Male and Female Hormones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 21:625-631.
- Wilson, V.S, Bobseine, K., och Earl Gray Jr. L. 2004. Development and Characterization of a Cell Line That Stably Expresses an Estrogen-Responsive Luciferase Reporter for the Detection of Estrogen Receptor Agonist and Antagonists. *Toxicological Sciences* 81:69-77.
- Wiskocil, R., P. Bensky, W. Dower, R. F. Goldberger, J. I. Gordon, och R. G. Deeley. 1980. Coordinate regulation of two estrogen-dependent genes in avian liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77:4474-4478.