

Zur Analyse der Cadmium-induzierten Modulation östrogenen Parameter *in vivo*

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Felix Michael Kluxen

aus Bonn

2012

Angefertigt am Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin an der Deutschen Sporthochschule Köln und dem Leibniz-Institut für Arbeitsforschung an der TU Dortmund – IfADo.

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Patrick Diel

Korreferent: Prof. Dr. Peter Proksch

Tag der mündlichen Prüfung:

Erklärung der Selbstständigkeit

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die Zitate deutlich kenntlich gemacht zu haben.

Köln, den

Felix Michael Kluxen

Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Professor Gisela H. Degen und Professor Patrick Diel für die Bereitstellung des Themas. Zahlreiche, lange Diskussionen mit zwei teilweise völlig verschiedenen Sichtweisen beizuwohnen war außerordentlich interessant und hilfreich. Herr Professor Proksch der HHU Düsseldorf erklärte sich bereit einen Kölner bei sich promovieren zu lassen – das ist nicht selbstverständlich. Weiterhin waren Martina Bennat und Prof. Dr. Wim Wätjen immer für mich ansprechbar. Ich danke “meinen” zahlreichen Praktikantinnen und Famulantinnen Rebecca Paprott, Verena Bamberger, Laura Happ, Katrin Neuss, Janka Schultem und Katharina Kaiser für das Ertragen stundenlanger Monologe. Während meiner Promotion hatte ich das Vergnügen zwei Masterarbeiten von zwei strebsamen jungen Damen zu betreuen. Von den Ergebnissen dieser Arbeiten zehren Teile dieser Dissertation. Dafür danke ich Eugenia Becker und Katharina Krüger. Ohne die fachliche und persönliche Unterstützung meiner Kollegen wäre das Erstellen dieser Arbeit deutlich schwerer geworden. Allen voran hat mir Dr. Nicola Höfer das Labor erklärt – daneben danke ich Dr. Almut Molzberger, Anne Kurat, Jonas Hengevoß, Dr. Martina Velders, Stephanie Mosler, Dennis Müller, Ute Laudenbach-Leschowsky, Anika Voß, Sandrine Tchoukouegno Ngueu, Dr. Nora Zoth, Tina Blei, Carmen Weigt und Kristin Hu (geordnet ungefähr von West nach Ost) für eine gesunde Arbeitsatmosphäre. Ein Danke auch an den 7. Stock für die emotionale Unterstützung bei Western Blot-Unglücken. Meinen Kollegen aus dem GRK1427 danke ich (sowohl den alten als auch den neueren) für interessante und anstrengende Toxikologie-Kurse. Dr. Georg Kretzschmar danke ich für die “Einführung” in den ER-AhR-Rezeptor *Crosstalk*.

Eine nicht unwesentliche Anzahl an Personen trugen zu meiner Ausbildung bei. Das möchte ich hiermit festhalten und mich dafür bedanken. Dr. Carola Pörtner gewährte mir Einblicke in die problemorientierte Forschung in der Industrie. Dr. Sean M. Sullivan, Dr. Wouter H. Driessen, Prof. Dr. Hartmut Derendorf und Dr. Stephan Schmidt betreuten, ermöglichten und organisierten meinen Aufenthalt an der Universität Florida.¹ Dr. Werner Klinkhammer und Prof. Dr. Matthias Kassack erlaubten mir meine ersten Schritte in den Laboren der Universität Bonn und Universität Düsseldorf. Dr. Alexander von Petersenn und mein Vater Dr. Heinz-J. Kluxen gaben mir immer die Möglichkeit in ihren Apotheken zu arbeiten.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Fr. Degen und Hr. Diel danke ich für die finanzielle Unterstützung – ebenso meinen beiden Eltern und Rieke.

¹Renzo Casareto, Dr. Jack DiGiovanna, Dr. Wouter H. Driessen and Dr. Bettina Proneth, Dr. Kate and Matt Fredericks, Alicia Minch Register, Arielle and Dr. Stephan Schmidt and the Guilleaumes made me miss Germany considerably less – you are not only a footnote.

Aus *The Disappearing Spoon*:

Thirteen years later [after the Mitsui company acknowledged that cadmium caused itai-itai disease], the horror of the element forty-eight still retained such a hold on Japan that when filmmakers needed to kill off Godzilla in the then-latest sequel, *The Return of Godzilla*, the Japanese military in the film deployed cadmium-tipped missiles. Considering that the H-bomb had given Godzilla life, that's a pretty dim view of this element. (Kean, 2010)

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	ii
Abbildungsverzeichnis	vii
Tabellenverzeichnis	x
Abkürzungsverzeichnis	xi
1 Einleitung	1
1.1 Cadmium	1
1.1.1 Geschichte	1
1.1.2 Chemische Eigenschaften	2
1.1.3 Vorkommen, Exposition	3
1.1.4 Verwendung und Bedeutung	4
1.1.5 Akute und chronische Toxizität	4
1.1.6 Toxikokinetik	5
Duodenale Resorption von Cadmium	6
1.1.7 Sexualdimorphismus	6
1.2 Östrogene	7
1.2.1 Östrogen-sensitive Zielgewebe	7
1.2.2 Nukleäre Rezeptoren: Der ER	8
Struktur	8
Nicht-klassische Signaltransduktion	9
ER-Subtypen Alpha und Beta	10
1.2.3 Liganden des ER	10
Agonisten	11
Antagonisten	13
1.2.4 Identifikation östrogenen Substanzen	13
1.3 Cadmium – Interaktion mit Östrogenen	14
1.3.1 <i>In vitro</i> Befunde	14
Cd-induzierte östrogene Wirkung <i>in vitro</i>	15
Cd-induzierte Modulation östrogenen Wirkungen <i>in vitro</i>	16
1.3.2 <i>In vivo</i> Befunde	16
Cd-induzierte östrogene Wirkung <i>in vivo</i>	17
Cd-induzierte Wirkungen in Reporter-Tiermodellen	18
Cd-induzierte Modulation der HHG und Steroidsynthese	18
1.4 Zielsetzung	19

2	Publikationen	20
2.1	Publikation 1: "Investigations on the estrogenic activity of the metallohormone cadmium in the rat intestine"	21
2.2	Publikation 2: "ER beta specific agonists and genistein inhibit proliferation and induce apoptosis in the large and small intestine"	34
2.3	Publikation 3: "Cadmium modulates expression of aryl hydrocarbon receptor associated genes in rat uterus by interaction with the estrogen receptor" . . .	44
2.4	Publikation 4: "The metalloestrogen cadmium modulates AhR-associated gene expression in the small intestine of rats similar to ethinyl-estradiol" (<i>in press</i>)	56
3	Unveröffentlichte Daten	69
3.1	Analysen im Rattendarm – Microarray-Versuch	69
3.2	Cadmium moduliert die östrogen-sensitive Genexpression im Uterus nach oraler Aufnahme	92
3.2.1	Ergebnisse	92
3.3	Wirkung von Cd in intakten weiblichen Wistar-Ratten	94
3.3.1	Ergebnisse Uterus	94
3.3.2	Ergebnisse Darm	94
3.4	ER-Beta Expression in der immortalisierten Darmzelllinie HCEC	99
4	Diskussion	101
4.1	Wesentliche Ergebnisse	101
4.2	Interaktion von Endokrinen Disruptoren mit östrogenen Signaltransduktion .	101
4.2.1	Wirkmechanismus des Metalloöstrogens Cadmium: Arbeitshypothese .	102
4.3	ER-Alpha-vermittelte östrogene Wirkung von Cadmium	103
4.3.1	Wirkmechanismus der agonistischen Wirkung Cadmiums	103
4.3.2	Nicht-monotone Dosis-Wirkungs-Beziehung	105
	Pilot-Experiment in intakten Tieren	107
4.4	Die östrogene Wirkung von Cadmium in vorwiegend ER-Beta-exprimierendem Gewebe	108
4.4.1	Microarray	108
4.4.2	ER-unabhängige Modulation AhR-assoziierter Gene im Darm	109
	Interaktion von Cd mit Östrogenen im Darm	109
	Verfügbarkeit von Testsystemen zur Aufklärung des molekularen Mechanismus der östrogenen Wirkung Cadmiums	109
4.5	Modulation der Darmhomöostase durch Cadmium	110
4.6	Ausblick	111
4.7	Bedeutung der Ergebnisse	112
A	Material und Methoden	113
A.1	Unveröffentlichte Daten	113
A.1.1	Microarray	113
A.1.2	Cadmium moduliert östrogen-sensitive Genexpression im Uterus nach oraler Aufnahme	113
A.1.3	Cd-induzierte Modulation der Darmhomöostase in intakten weiblichen Wistar-Ratten	113
A.1.4	Zellversuch	113

A.2 Eingesetzte Software	113
Zusammenfassung	115
Abstract	117
Literatur	119

Abbildungsverzeichnis

1.1	Anteil verschiedener Lebensmittel in Prozent an der Cd-Aufnahme (<i>Dotchart</i> , basierend auf Blume 2010). “Zusammengesetzte Lebensmittel” sind mit “Z. LM” abgekürzt.	3
1.2	Weltweite Verwendung von Cd bei Endbenutzern. <i>Piechart</i> , basierend auf Daten der <i>The International Cadmium Association</i> aus dem Jahr 2003 (ICdA, 2012).	4
1.3	Die Strukturen der weiblichen Sexualhormone (A) Östron, (B) Östradiol und (C) Östriol.	8
1.4	Einige Liganden des ER – (a) das endogene Östrogen 17beta-Östradiol, (b) das synthetische 17alpha-Ethinylöstradiol, (c) der Endokrine Disruptor Diethylstilbestrol, (d) das Phytoöstrogen Genistein, die selektiven ER-Subtyp Agonisten (f) 16alpha-LE ₂ (ER-Alpha), (g) 8beta-VE ₂ (ER-Beta), die Anti-östrogene (e) Tamoxifen (kein reines Anti-östrogen), (h) ZK191703 und (i) ICI 182,780 (Faslodex).	12
3.1	129 genes are regulated in rat-mucosa after oral exposure with EE ₂ or Cd (see Table 3.2–3.4.). EE ₂ modulated 21 known and 5 unknown transcripts. The sets of genes modulated by two of three compounds (unions) are depicted in Table 3.5	87
3.2	Relative mRNA expression of Mt2a expression after 3 days gavage (Cd 0.5 and 2 mg/kg b.wt, EE ₂ 0.1 mg/kg b.wt). Mean values (fold induction) ± SD are given for n=7 animals per dose group; * (asterisk) marks values significantly different from the control (OVX) or as indicated by lines. P < 0.05	87
3.3	Cd induces (a) Reg1a, (b) Papss2, (c) Akr1c11 and (d) Slc37a2 mRNA expression dose-dependently and similar to EE ₂ after 3 days gavage (Cd 0.5 and 2 mg/kg b.wt, EE ₂ 0.1 mg/kg b.wt). Mean values (fold induction) ± SD are given for n=7 animals per dose group; * (asterisk) marks values significantly different from the control (OVX) or as indicated by lines. P < 0.05	88
3.4	(a) Bcl6, (b) Fam55b, (c) Fabp6, and (d) Il-33 mRNA expression is modulated by EE ₂ and with a nonmonotonic dose-response by Cd after 3 days gavage (Cd 0.5 and 2 mg/kg b.wt, EE ₂ 0.1 mg/kg b.wt). Mean values (fold induction) ± SD are given for n=7 animals per dose group; * (asterisk) marks values significantly different from the control (OVX) or as indicated by lines. P < 0.05	89
3.5	(suppl.) Principal component analysis shows that the biological replicates are scattered.	90
3.6	(suppl.) Correlation on the transcriptional expression levels of the arrays shows a strong positive correlation.	91

3.7	Cd moduliert die EE ₂ -induzierte Modulation des Uterusfeuchtgewichts (A) und die relative mRNA Expression von (B) Complement c3, (C) Ahr und (D) Gsta2 in Rattenuterus. Analysen nach 3 Tagen oraler Behandlung mit 0.1 mg/kg b.wt EE ₂ , 2 mg/kg KG CdCl ₂ oder beidem. * Werte, die sich signifikant ($P \leq 0.05$) von OVX-Kontrolle oder den mit Linien gekennzeichneten Gruppen unterscheiden.	93
3.8	Das relative Uterusfeuchtgewicht (Abb. links) und die Vaginalepithelhöhe (Abb. rechts) nach viermaliger Applikation von 0.5 oder 5 µg Cd in intakten, nicht-zyklussynchronisierter Wistar-Weibchen zeigen eine deutliche Abnahme der intraindividuellen Verteilung.	94
3.9	Der Proliferationsmarker PCNA wird in Dünndarm intakter weiblicher Wistar-Ratten nach viermaliger i.p.-Injektion von CdCl ₂ dosisabhängig induziert – (A) Relative mRNA-Expression (FI) und (B) densitometrische Auswertung der Proteinexpression, dargestellt relative Proteinexpression (FI) von PCNA. Kontrolle = 1. (C) Repräsentative Aufnahmen (20x) der DAB-Färbung von PCNA im Dünndarm (K = Kontrolle; Cd 0,5 = 0,5 µg Cd/kg KG; Cd 5 = 5 µg Cd/kg KG), (D) Auswertung der PCNA positiv gefärbten Zellen/Krypten (%) nach der IHC. Pro Tier wurden jeweils 20 Krypten ausgewertet. * = signifikant ($p \leq 0.05$) gegen Kontrolle	96
3.10	Der Proliferationsmarker PCNA wird in Kolon intakter weiblicher Wistar Ratten nach viermaliger i.p.-Injektion von CdCl ₂ dosisabhängig reprimiert — (A) Relative mRNA-Expression (FI) und (B) densitometrische Auswertung der Proteinexpression, dargestellt als relative Proteinexpression (FI) von PCNA. Kontrolle = 1. (C) Repräsentative Aufnahmen (20x) der DAB-Färbung von PCNA im Kolon (K = Kontrolle; Cd 0,5 = 0,5 µg Cd/kg KG; Cd 5 = 5 µg Cd/kg KG), (D) Auswertung der PCNA positiv gefärbten Zellen/Krypten (%) nach der IHC. Pro Tier wurden jeweils 20 Krypten ausgewertet. * = signifikant ($p \leq 0.05$) gegen Kontrolle	97
3.11	Der Apoptosemarker (A) Caspase 3 wird in Dünndarm intakter weiblicher Wistar Ratten nach viermaliger i.p.-Injektion von CdCl ₂ dosisabhängig induziert. (B) Die Expression des Apoptosemarkers M30 in Kolon wird durch eine Behandlung mit Cd nicht moduliert – densitometrische Auswertung der Proteinexpression, dargestellt als relative Proteinexpression (FI). Kontrolle = 1. (K = Kontrolle; Cd 0,5 = 0,5 µg Cd/kg KG; Cd 5 = 5 µg Cd/kg KG)	98
3.12	ER-Beta-Protein Expression in HCEC nach 5 Tagen Behandlung mit H ₂ O, DMSO-Kontrolle oder 17beta-Östradiol (E ₂ , 10 ⁻⁸ M in 0.1% DMSO)	100
3.13	ER-Alpha- und ER-Beta-mRNA in MCF-7, HCEC, HT-29 und Caco-2 (a) und ER-Beta-Protein-Expression in HCEC, HCT-116, HT-29 und Caco-2 nach 5 Tagen Behandlung mit DMSO-Kontrolle oder 17beta-Östradiol (E ₂ , 10 ⁻⁸ M in 0.1% DMSO)	100
4.1	Modulation der AhR-Signaltransduktion durch aktivierten ER-Alpha (<i>tethering</i>) nach Matthews and Gustafsson 2006	103

4.2	Cd-induzierte Modulation von C3-mRNA in Rattenuterus nach (A) 3 Tagen i. p. oder (B) 3 Tagen gavage. Für beide Expositionswege zeigt sich eine nicht-monotone Dosis-Wirkung-Beziehung. Reproduziert aus den Orginaldaten – teilweise dargestellt in Höfer et al. 2009. * markiert Werte signifikant unterschiedlich von Ovx-Kontrolle, $P \leq 0.05$	106
4.3	ComputermodeLL einer nicht-monotonen Dosis-Wirkung-Beziehung eines agonistisch wirkenden exogenen Liganden X am ER. Aufgetragen ist die theoretische Expression eines Ziel-Proteins des Rezeptors gegen die Konzentration von X. (A) Bei Annahme eines vorliegenden endogenen Liganden L. (B) Bei der Annahme einer geringen Assoziationsraten-Konstante von X, ER-Dimere zu bilden. Aus Li et al. 2007.	107
4.4	Relative mRNA-Expression von Ahr und Cyp1a1. Geringe Dosen Cd induzieren beide Gene in intakten Wistar-Ratten-Weibchen wie der selektive ER-Beta Agonist 8beta-VE ₂ in Ovx-Tieren. Vermutlich über eine Antagonisierung der Wirkung endogener Östrogene an ER-Alpha. (A, B) modifiziert aus Krüger 2012, (C) aus Rataj et al. 2012.	108

Tabellenverzeichnis

3.1	Primers (designed in Primer3 0.4.0) used in control real-time RT-PCR of the genes that were modulated in the microarray by the indicated compounds with a p-value ≤ 0.05 and a FC ≥ 2 or ≤ -2	81
3.2	Genes in rat-mucosa that are modulated after three days oral treatment with 0.1 mg/kg b.wt 17alpha-ethylestradiol.	81
3.3	Genes in rat-mucosa that are modulated after three days oral treatment with 0.5 mg/kg b.wt CdCl ₂	82
3.4	Genes in rat-mucosa that are modulated after three days oral treatment with 4 mg/kg b.wt CdCl ₂	83
3.5	Transcripts that are similarly regulated by two or three compounds.	85
A.1	HCEC-Zellen wurden in "Basalem HCEC Zellkulturmedium" (PAN BIOTECH GmbH; Katalog-Nr.:SO-10500) mit folgenden Zusätzen kultiviert	113

Abkürzungsverzeichnis

AhR Arylhydrocarbonrezeptor, auch Dioxinrezeptor

AR Androgenrezeptor

CAT Chloramphenicol-Acetyl-Transferase

Cd Cadmium

DBD DNA-Bindungsdomäne

EFSA Europäische Lebensmittelsicherheitsbehörde, engl. *European food safety agency*

ER Östrogenrezeptor, engl. *estrogen receptor*

ERE *estrogen responsive element*

FSH Follikelstimulierendes Hormon, auch Follitropin

GR Glukokortikoidrezeptor

GRE *glucocorticoid responsive element*

HRE *hormone responsive element*

HHG Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden

HRT Hormonersatztherapie, engl. *hormone replacement therapy*

ICdA *The International Cadmium Association*

IHC Immunhistochemie

KG Körpergewicht

LBD Liganden-Bindungsdomäne

MT Metallothionein

NR Nukleärer Rezeptor

OECD Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, engl. *Organisation for Economic Co-operation and Development*

QD *Quantum dots*

RoHS Leitlinie 2002/95/EG – *Restriction of (the use of certain) hazardous substances*

REACH Verordnung 1907/2006 – *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*

SD *Sprague-Dawley-Ratten*

SERM *selective estrogen receptor modulator*

SHBG *sex hormone-binding globulin*

TWI duldbare orale wöchentliche Aufnahmemenge, engl. *tolerable weekly intake*

UEH Uterusepithelhöhe

VEH Vaginalepithelhöhe

WHO Weltgesundheitsorganisation, engl. *World Health Organization*

YES “Hefe-Östrogen-Test”, engl. *Yeast estrogen screen*

1 Einleitung

Cadmium (Cd) ist eines der giftigsten Schwermetalle und eine ubiquitär verbreitete Umweltkontaminante. Als industrieller Schadstoff stellt es außerdem eine Gefahr in der Arbeitsumgebung dar. Seit Ende der Achtziger Jahre wurden Schwermetalle auf potentielle hormonartige Wirkungen untersucht. Eine östrogenartige Wirkung von Cd erstmals 1994 *in vitro* (Garcia-Morales et al., 1994) und später auch in tierexperimentellen Studien beobachtet (Johnson et al., 2003). Das mag erst einmal überraschen, da sich Cd bzw. Cd^{2+} strukturell völlig von endogenen Östrogenen wie dem 17beta-Östradiol oder Phytoöstrogenen wie Genistein unterscheidet (siehe Abb.1.4a und d auf Seite 12).

Die sich daraus ableitende potentielle Gesundheitsgefährdung und der molekulare Mechanismus der potentiellen endokrinen Disruption¹ durch Cd ist ungeklärt. 2009 setzte die Europäische Lebensmittelsicherheitsbehörde (EFSA, engl. *European food safety agency*) die duldbare orale wöchentliche Aufnahmemenge (TWI, engl. *tolerable weekly intake*) von Cd von vormals 7 µg/kg, dem Grenzwert der Weltgesundheitsorganisation (WHO, engl. *World Health Organization*), auf 2.5 µg/kg herunter. Die Korrelation von Cd-Konzentrationen im Urin und beta-2-Microglobulin als Marker für Nephrotoxizität dienten als Bewertungsgrundlage (EFSA, 2009a). Eine potentielle hormonelle Wirkung von Cd wurde zwar als mögliche Gefahrenquelle identifiziert, allerdings nicht für die Grenzwertbestimmung hinzugezogen (EFSA, 2009b). Es ist ungeklärt, welche Gefahr von der Überschreitung des TWI bei verschiedenen Bevölkerungsgruppen ausgeht (EFSA, 2012). Die Novellierung der Trinkwasserverordnung der Bundesrepublik Deutschland, eine Herabsetzung des Grenzwertes für Cd von 0.005 auf 0.003 mg/l, ist vorerst die neuste regulatorische Maßnahme.

Nachfolgend werden zunächst einige Grundlagen zu Cd und Östrogenen beschrieben, die für die Einordnung in den physiologischen und toxikologischen Gesamtzusammenhang nötig und von Interesse sind. Anschließend werden die bisherigen Erkenntnisse zu einer potentiellen endokrinen Disruption durch Cd dargestellt.

1.1 Cadmium

1.1.1 Geschichte

Insgesamt beanspruchten neun verschiedene Chemiker, Ärzte und Apotheker gleichzeitig für sich, Cd entdeckt zu haben.² Das sind mehr eigenständige Entdecker als für jedes andere

¹Endokrine Disruptoren werden wie folgt definiert: “An *endocrine disruptor* is an exogenous substance or mixture that alters function(s) of the endocrine system and consequently causes adverse health effects in an intact organism or its progeny, or (sub)populations. [...] A *potential endocrine disruptor* is an exogenous substance or mixture that possesses properties that might lead to endocrine disruption in an intact organism or its progeny, or (sub)populations.” (Degen, 2004) Endokrine Disruptoren werden auch als *hormonally active xenobiotics* (Krimsky, 2001), *endocrine disrupting chemicals* oder *compounds* (Diamanti-Kandarakis et al., 2009)(EDCs) bezeichnet.

²vgl. <http://elements.vanderkrogt.net/>

Element. Heute wird die Entdeckung des Cds Friedrich Stromeyer alleine (Nordberg, 2009) oder zusammen mit Carl Samuel Hermann zugesprochen. Der Apotheker Hermann gründete 1793 die erste chemische Fabrik Deutschlands (Rasenberger, 2009), Hermania – Chemische Fabrik zu Schönebeck, und entdeckte das Metall als Verunreinigung in von ihm hergestellten Zinkoxid (Hermann, 1818a).

Hermann berichtete Friedrich Stromeyer – einem ausgewiesenen Experten für Metalle – von seinem Fund und schickte ihm eine Probe “schlesischen Zinkerzes”. Es ergab sich aber aus der nun folgenden Korrespondenz, dass Stromeyer dieses Metall bereits früher (Ende 1817) in Zinkcarbonat isoliert hatte (Hermann, 1818b), welches er in Apotheken des Fürstentums Hildesheim vorfand. Allerdings war die Menge des neuen Metalls in Hermanns Probe deutlich höher (Stromeyer, 1819).

Hierzu gibt es jedoch eine Vorgeschichte: Zinkoxid wurde in Apotheken zur Herstellung von Salben (wie auch heute noch) verwendet, fand aber auch Einsatz als “Antispasmodicum” bei Kindern. Als solches unterlag es einer genaueren Kontrolle. Medizinalrat Heinrich Roloff³ fiel bei Kontrollen verschiedener Apotheken des Bezirks Magdeburg auf, dass Hermanns Zinkoxid nach Versetzen mit Säure und Schwefelwasserstoff einen für Arsensulfide typischen gelben Niederschlag zeigte (Rolof, 1818). Er konfiszierte das Oxid umgehend und unterrichtete die herstellende Firma – also Hermann.

Roloff fand später zusammen mit Medizinal-Assessor Heukenkamp heraus, dass es sich bei der Verunreinigung des Zinkoxids nicht um Arsen handeln konnte, sondern ein noch unbekanntes Metall sein musste und besprach diesen Fund wohl auch mit Hermann (Roloff, 1822). Zwei von Roloff beauftragte Medizinal-Assessoren aus Berlin (Kluge und Staberoh) hatten von Roloff früh eine Probe erhalten und kamen ebenfalls zu dem Schluss ein neues Element entdeckt zu haben.⁴ Roloff schickte auch Friedrich Stromeyer eine Probe, der aber darauf hinwies das Metall bereits, genau wie auch Hermann, gefunden zu haben.

Roloff fühlte sich von Hermann hintergangen (Roloff, 1822) und Prof. Ludwig Wilhelm Gilbert, der damalige Herausgeber der *Annalen der Physik*, und Stromeyer sollten nun zwischen den beiden vermitteln (Hermann, 1818a; Stromeyer, 1819). Hermann hatte aber Stromeyer schon die Benennung des Metalles überlassen, der es “Kadmium” (nach lat. *cadmea*, oxidische oder carbonathaltige Zinkerde) nennen wollte, entgegen der laufenden Diskussion neue Element nach Himmelskörpern oder griechischen Göttern zu benennen.⁵ Damit zog sich Roloff aus der Diskussion zurück.

1.1.2 Chemische Eigenschaften

Cd hat die Ordnungszahl 48, wird den Schwermetallen⁶ zugeordnet und ist Teil der Zinkgruppe des Periodensystems der Elemente. ^{nat}.Cd hat eine relative Atommasse von 112.41 u und liegt in verschiedenen Isotopen vor. So werden z.B. ¹⁰⁹Cd und ^{113m}Cd zur Bestimmung von Cd-Fluxen *in vivo* verwendet. Zwar ähnelt Cd²⁺ der Elektronenkonfiguration nach Zink (Zn²⁺ –

³auch Johann Christoph Heinrich Roloff; in eigenen Veröffentlichungen sowohl Roloff als auch Rolof (hier entsprechend zitiert) und in englischer Literatur manchmal Rollow

⁴Sie schlugen den Namen “Klaprothium” für das Metall vor, nach dem gerade verstorbenen Chemiker Martin Heinrich Klaproth (Scerri, 2007), u. a. dem Entdecker des Urans.

⁵Vgl. Selen 1817; Vestium (später Ruthenium) 1808; Cer, Iridium, Palladium 1803; Uran 1798.

⁶Elemente werden normalerweise nach ihren chemischen Eigenschaften klassifiziert. Die Zugehörigkeit zur Gruppe der “Schwermetalle” beruht jedoch (bisher) auf keiner wissenschaftlichen Basis, sondern wird meist verwendet um Metalle zu beschreiben, die als Umweltkontaminanten auftreten (Duffus, 2002).

voll besetztes d-Orbital, $[\text{Kr}]d^{10}$), der Ionenradiusdurchmesser ist allerdings näher an dem von Calcium (Ca^{2+}) (Shannon, 1976). Allein aus diesen stoffinhärenten Eigenschaften lässt sich eine mögliche Interaktion dieser Ionen in physiologischer Umgebung erahnen.

1.1.3 Vorkommen, Exposition

Cd ist ein sehr seltenes Element, und es sind praktisch keine gediegenen Cd-Vorkommen bekannt (Wedepohl, 1995). Es ist hauptsächlich als Sulfid mit Zinkerz vergesellschaftet und fällt als Nebenprodukt beim Zinkabbau an. Natürlicherweise verteilt es sich regional über das Grund-/Trinkwasser und seltener bei Vulkanausbrüchen über die Luft und gelangt so in die Nahrungskette (UNEP, 2010). Pflanzen scheinen Cd^{2+} -Ionen aufgrund der Ähnlichkeit zu Zink gut akkumulieren zu können. In der nichtrauchenden⁷ Bevölkerung ist die Hauptexpositionsquelle die Nahrung. In Abb. 1.1 ist der Anteil verschiedener Lebensmittel an der Cd-Aufnahme dargestellt.

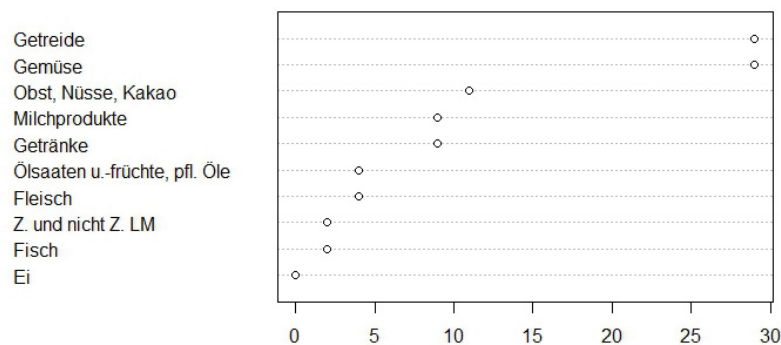


Abb. 1.1: Anteil verschiedener Lebensmittel in Prozent an der Cd-Aufnahme (Dotchart, basierend auf Blume 2010). „Zusammengesetzte Lebensmittel“ sind mit „Z. LM“ abgekürzt.

Die tägliche Aufnahme von Cd in Deutschland wurde 2010 vom LExUKon-Projekt auf knapp $1.5 \mu\text{g}/\text{d}/\text{kg KG}$ geschätzt (58 % des TWI der EFSA 2009, $2.5 \mu\text{g}/\text{d}/\text{kg KG}$) und ist für beide Geschlechter gleich.⁸ Es zeigte sich jedoch, dass die Belastung der Gruppe der 14–18 Jährigen und Vegetarier höher ist und der TWI auch überschritten werden kann.⁹ Das bedeutet, dass die auf Nierentoxizität beruhenden Grenzwerte bereits bei extremen Ernährungsverhalten überschritten werden können. Die Cd-Aufnahme ist jedoch multifaktoriell: bei industrieller Verwendung (s. u., 1.1.4) kann Cd z. B. bei Prozessen der Zinkdarstellung bzw. bei Verwendung unzureichend aufgereinigten Zinks, z. B. beim Löten oder Schweißen, freigesetzt werden. Durch unsachgemäße Entsorgung, o. g. Freisetzungsprozesse und die Tatsache, dass Cd ein bio-persistenter Stoff ist, steigt die in der Umwelt befindliche „freie“ Cd-Menge kontinuierlich an.

⁷Tabakpflanzen (Gattung *Nicotiana*) nehmen ebenfalls Cd^{2+} -Ionen über den Boden auf. Die zusätzliche Exposition pro Zigarette entspricht etwa $0.1 \mu\text{g Cd}$ (Umweltbundesamt, 2011).

⁸Bei der Resorption gibt es aber Unterschiede, siehe 1.1.7 auf Seite 6.

⁹Wenn das Verzehrverhalten im 95. Perzentil des mittlerern Verzehrverhaltens liegt.

1.1.4 Verwendung und Bedeutung

Heute wird Cd vor allem in den zu Beginn des 20. Jhd. von Jungner entwickelten (Hansson, 1963) Ni-Cd-Akkumulatoren eingesetzt (ICdA, 2012) (vgl. auch Abb. 1.2). Die industrielle Nutzung von Cd in Elektronikgeräten ist seit 2002 und in Löt- und Kunststoffprodukten seit 2011 in der EU durch die Leitlinie 2002/95/EG – *Restriction of (the use of certain) hazardous substances* (RoHS) beziehungsweise die Verordnung 1907/2006 – *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals* (REACH) stark eingeschränkt oder verboten. Für Ni-Cd-Akkumulatoren gibt es in Deutschland (noch) Ausnahmeregelungen (siehe BattG §3 Abs. 2).

Historisch betrachtet ist die Nutzung von Cd als Farbe seit dem Mittelalter von Bedeutung.¹⁰ Bei Serienprodukten ist eine Verwendung von Cd-haltigen Farbpigmenten nach REACH Verordnung in der EU verboten. Ein Verstoß gegen das Verbot bei Importprodukten ist heute eine der häufigsten Ursachen für die Medienpräsenz von Cd.¹¹

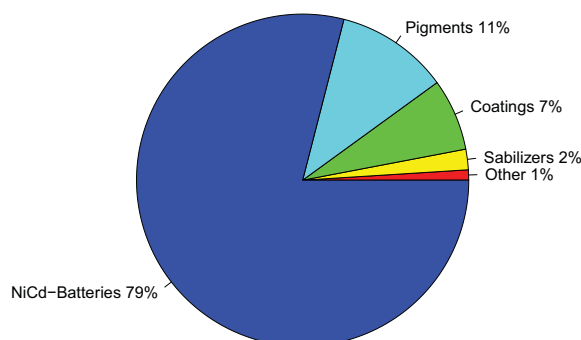


Abb. 1.2: Weltweite Verwendung von Cd bei Endbenutzern. *Piechart*, basierend auf Daten der *The International Cadmium Association* aus dem Jahr 2003 (ICdA, 2012).

1.1.5 Akute und chronische Toxizität

Die Toxikologie von Cd und seinen Salzen in Menschen und Tieren ist gut charakterisiert und schon seit über einem Jahrhundert bekannt (Nordberg, 2009).

Unspezifische, akute gastrointestinale Syndrome nach Ingestion und Schädigungen der Lunge nach Inhalation durch Cd-haltige Pulver oder Dämpfe sind schon relativ früh beschrieben wurden (Sovet, 1858). Das toxische Potential von Cd wurde aber erst nach der vermehrten Verwendung im 1. Weltkrieg entdeckt und in ersten Tierversuchen untersucht (Schwartz and Alsberg, 1923). Eine Cd-induzierte Denaturierung von Proteinen und Schädigungen der Grenzflächenfunktionen der Epithelien sind die Mechanismen einer akuten Vergiftung mit relativ

¹⁰Bis zur Entdeckung des Cds war es mit Pigmentenmischungen nicht möglich einen kraftvollen Neutralton für Gelb (Neutralgelb) darzustellen. So erklärt sich nachfolgend die starke Nutzung von Cd-Sulfid als Farbpigment in der Malerei bis heute.

¹¹Z.B. das Auftreten von Cd-haltiger Farbe auf Trinkgläsern oder Schmuckprodukten Anfang 2010. Siehe <http://www.google.com/trends/?q=Cadmium&ctab=0&geo=all&date=all>.

hoher Dosis (Marquardt and Schäfer, 2004). Die Symptome nach Inhalation großer Mengen Cd-Dämpfe gleichen dem Metaldampffieber (engl. *metal fume fever*) (Nordberg, 2007) – ist also ähnlich zu einem Grippalen Infekt mit einer zusätzlichen akuten, diffus-fibrosierenden Alveolitis (Nemery, 1990).

Chronische Cd-Vergiftungen treten vorwiegend in der Cd-verarbeitenden Industrie auf. Zielorgan einer chronischen Cd-Vergiftung ist die Niere – sowohl nach inhalativer Aufnahme als auch nach Ingestion (ATSDR, 2012). Zwar reichert sich Cd zuerst (in den ersten Stunden, siehe 1.1.6) in der Leber an (Zalups and Ahmad, 2003), wird dann aber in die Niere umverteilt. Geringe Mengen Cd ($< 30 \mu\text{g}/\text{Tag}$) können bereits Nierendysfunktionen auslösen (Satarug et al., 2000). Cd-induzierte Lebervergiftungen sind beim Menschen unbekannt.

Eine größere chronische Vergiftung durch kontaminierte Nahrung ist bisher erst einmal aufgetreten und betraf besonders die Knochen. Ab 1946 wurden in Japan (Hagino and Kono, 1946) Fälle von Patienten beschrieben, die über starke Schmerzen in Rücken und Beinen klagten – die sogenannte Itai-itai-Erkrankung¹². Auslöser waren hohe Cd-Konzentrationen in Fluss-, Meer- und Grundwasser durch nahegelegenden Zinkabbau und nachfolgend einer Exposition über Fisch und Reis. Die Patienten wiesen eine massive Osteoporose und Knochendeformationen auf. Der zugrundeliegende Mechanismus war wahrscheinlich ein multifaktorieller Prozess: Cd moduliert calciotrope Hormone, stört die Calcium- und Vitamin D-Homöostase und führt zu einer Dysfunktion des renalen Tubulus (Järup et al., 1998). Daneben moduliert Cd auch die Knochenresorption und -bildung direkt (Berglund et al., 2000; Bhattacharyya, 2009).

1.1.6 Toxikokinetik

Menschen werden hauptsächlich via Inhalation oder Ingestion mit verschiedenen Cd-Salzen oder Cd-haltigen Proteinkomplexen exponiert (ATSDR, 2012). Während das Metall über die Lunge sehr gut resorbiert werden kann (zu etwa 50 %), ist die Resorption über das Darmepithel deutlich schlechter – etwa 5–10 %.

Nach der Resorption in den Organismus unterliegt Cd komplexen Verteilungsvorgängen (Zalups and Ahmad, 2003). In Blut bindet Cd zuerst und vorwiegend an Albumin und wird später in Blut- und Gewebezellen an Metallothioneine (MT)¹³ gebunden.

In den ersten Stunden nach einer Exposition reichert sich Cd in der Leber an. Dort kann der Cd-Proteinkomplex verdaut, und das wiederum freiwerdende Cd an MT gebunden werden. Aus der Leber gelangt Cd entweder wieder in das Blut oder in den enterohepatischen Kreislauf.¹⁴ Nach und nach wird Cd in die Niere umverteilt – Cd-MT gelangt durch die glomeruläre Filtration in den Nierentubulus und in das Epithel (Kägi and Vallee, 1960; Margoshes and Vallee, 1957; Zalups and Ahmad, 2003). Das Gleiche passiert, wenn direkt an MT gebundenes Cd resorbiert wird. Im Lysosom der Tubulizellen kann der Komplex wiederum aufgebrochen werden, worüber dann in den Zellen ein Schaden, z. B. durch Cd-induzierten oxidativen Stress, ausgelöst werden kann. So erklärt sich auch die Nierentoxizität, wenn schnell große Mengen Cd-MT aufgenommen werden (ATSDR, 2012).

¹²jap. Itai-itai-byo, “Aua-aua-Erkrankung”

¹³MT sind kleine, Cystein-reiche Proteine, die eine Rolle in der Zinkhomöostase spielen, aber auch andere Metalle binden können (Coyle et al., 2002). Sie scheinen auch die Toxizität von Cd zu beeinflussen (Klaassen et al., 2009; Nordberg, 2009).

¹⁴Hier allerdings hauptsächlich an GSH und weniger an MT gebunden.

Duodenale Resorption von Cadmium

Nach oraler Exposition wird Cd hauptsächlich im Duodenum und im proximalen Ileum resorbiert (Andersen et al., 1994). Allerdings gelangt auch das meiste des inhalierten (Moore et al., 1973) und ein Teil des parenteral zugeführten Cds in den Gastrointestinaltrakt. Letzteres geschieht über den enterohepatischen Kreislauf – nach Akkumulation in der Leber (Konjugation an GSH) wird es über biliäre Exkretion ausgeschieden und reabsorbiert (Zalups and Ahmad, 2003).

Die Resorption im Darm geschieht relativ schnell und führt (wahrscheinlich wegen der Induktion und nachfolgenden Bindung an MT) zu einer Akkumulation in der Mucosa mit langsamer Freisetzung in das systemische Kompartiment (Elsenhans et al., 1997). Dabei können Nahrungsinhaltsstoffe wie Eisen (Groten et al., 1992), Zink (Hoadley and Cousins, 1985) oder Calcium (Hoadley and Johnson, 1987) und auch gleichzeitig aufgenommene Proteine und Aminosäuren in der Nahrung die Resorption beeinflussen. Auch wird CdCl₂ deutlich besser intestinal resorbiert als Cd-MT (Groten et al., 1994). Vermutlich nutzt Cd die Transportmechanismen von verschiedenen, mehrwertigen Metallionen: Gut untersucht ist der Transport von Cd über den *divalent metal transporter*, DMT1 (Leazer et al., 2002; Tallkvist et al., 2001), der für die Aufnahme von nicht an Häm gebundenem Eisen (Ferguson et al., 2001) in die Mukosazellen zuständig ist. Darüber hinaus scheinen auch der Zinktransporter (ZLT1) (Elisma and Jumarie, 2001) und verschiedene Calciumkanäle (Felley-Bosco and Diezi, 1992) Cd-Ionen transportieren zu können.¹⁵

Die Aufnahme von S-konjugiertem Cd (an GSH und Cystein, oder an Proteinen) ist nicht vollständig aufgeklärt – wahrscheinlich gelangt es über Transporter für Aminosäuren und Endozytose in die Mucosazellen (Zalups and Ahmad, 2003). Cd-MT scheint auch über die *tight junctions* direkt durch das Epithel zu gelangen (Sugawa et al., 1976). Interessanterweise kann Cd das E-cadherin-beta-catenin System, welches die epitheliale Barrierefunktion im Darm moduliert, stören (Prozialeck, 2000).¹⁶

1.1.7 Sexualdimorphismus

Es scheint deutliche Geschlechtsunterschiede bei der Toxizität von Cd zu geben (Vahter et al., 2002, 2007). So trat die Itai-itai-Erkrankung bei Frauen deutlich stärker und häufiger auf als bei Männern (Kjellström, 1992; Ogawa et al., 2004). Epidemiologische Studien zeigen, dass Frauen generell ein höheres Risiko für Cd-induzierte Knochenveränderungen haben als Männer (Staessen et al., 1999). Dazu beitragen kann, dass die Cd-induzierte Modulation der calciotropen Hormone und die Störung des Calcium- und Phosphat-Metabolismus bei Frauen stärker ausgeprägt ist (Vahter et al., 2002). Auch das Risiko einer Cd-induzierten Nierendysfunktion ist bei Frauen höher als in Männern (Nishijo et al., 2004). Es gibt Unterschiede bei der Cd-Aufnahme, -Verteilung und der -Gesamtbelastung der Geschlechter. Das ist vorwiegend damit zu erklären, dass die Eisenkonzentrationen bei Frauen insgesamt geringer sind.¹⁷ Durch eine Induktion der Transportmechanismen für Eisen kommt es zu einer vermehrten

¹⁵Daher modulieren auch in der Nahrung befindliche Elektrolyte die Cd-Resorption s.o. – so wird eine vermehrte Exposition gegenüber Cd bei Mangelzuständen von z. B. Eisen erreicht. Siehe Abschnitt 1.1.7.

¹⁶Östradiol und Cd scheinen die epitheliale Barrierefunktion im Darm auch über andere Mechanismen modulieren zu können. Es wurde allerdings bisher noch nicht untersucht, ob die Modulation dieser Mechanismen die Aufnahme von Cd beeinflussen.

¹⁷Wegen der Menstruation.

Cd-Resorption (Berglund et al., 1994; Åkesson et al., 2002).

Allerdings gibt es auch Untersuchungen, die eine Abhängigkeit vom Hormonstatus der Cd-induzierten toxischen Effekte zeigen. Die Immuntoxizität von Cd scheint in ovariectomierten Sprague-Dawley(SD)-Ratten durch Gabe von Östradiol verstärkt zu werden (Pillet et al., 2006). Eine deutliche Verstärkung der Cd-induzierten Mortalität wurde von Shimada *et al.* beschrieben: Östradiol-behandelte ovariectomierte F344-Ratten hatten nach Cd-Applikation eine geringere Überlebensrate als die Kontrolltiere (Shimada et al., 2012). Daneben gibt es Berichte, dass Östrogene toxische Effekte von Cd verringern können (Gunn et al., 1965). Diese Effekte (sowohl schädigende als auch protektive) sind allerdings nicht besonders gut charakterisiert, tragen aber zu der Hypothese bei, dass es eine Interaktion von weiblichen Sexualhormonen und dem Schwermetall gibt.

1.2 Östrogene

Östrogene sind die wichtigsten weiblichen Sexualhormone, sie regulieren Menarche und den Menstruationszyklus.¹⁸ Östrogene werden in pre-menopausalen Frauen v.a. in den ovariellen Follikeln (Granulosazellen) und im Gelbkörper (lat. *Corpus luteum*) synthetisiert. Das potenteste endogen gebildete Östrogen ist das 17beta-Östradiol (E₂, siehe Abb. 1.3B). Seine Biosynthese wird über die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden/Ovarien(HHG)-Achse geregelt und unterliegt zyklischen Schwankungen – mit den höchsten Konzentration in der Follikelphase (induziert durch das Follikelstimulierende Hormon, FSH).

Neben E₂ gibt es auch noch Östron (E₁, prädominant während der Menopause) und Östriol (E₃, prädominant während der Schwangerschaft; ter Horst 2010). In beiden Geschlechtern bilden auch Leber, Nebennierenrinde, Brustdrüse und Fettgewebe und im männlichen Organismus außerdem auch die Leydigzellen im Hoden geringe Mengen Östrogene (Carreau et al., 2011).

Östrogene werden wie alle Steroidhormone über das Blut (oder die Lymphe) verteilt und unterliegen dabei aufgrund ihrer Lipophilie einer starken Plasmabindung (> 97 %, v. a. an *sex hormone-binding globulin* (SHBG), aber auch an Albumin gebunden). An ihren Zielorganen spielen aktive Transportprozesse keine Rolle: die lipophilen Hormone diffundieren passiv über die Zellmembran und entfalten dann ihre biologische Wirkung in der Zelle über nukleäre Rezeptoren, die Östrogenrezeptoren (ER, siehe 1.2.2).¹⁹

Metabolisiert werden Steroidhormone hauptsächlich über die Leber mittels Sulfatierung und Glucuronidierung (Gruber et al., 2002).

1.2.1 Östrogen-sensitive Zielgewebe

Zu den östrogen-sensitiven Geweben zählen nicht nur die Reproduktionsorgane der Frau (Uterus, Brust), sondern viele weitere Gewebe wie Knochen, Muskel oder Darm (Diel, 2002). Eine verminderte Östrogenproduktion in postmenopausalen Frauen führt z. B. zu einem Verlust der Knochenmasse mit einhergehendem gesteigerten Risiko an Osteoporose zu erkranken (*Women's health initiative (WHI) – Postmenopausal Hormone Therapy Trials*). Dies ist östrogen-abhängig, weil es mittels einer Hormonersatztherapie (HRT) wieder gesenkt werden kann.

¹⁸Die Interaktion von Cd mit den "zweit"-wichtigsten weiblichen Sexualhormonen – den Gestagenen – wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

¹⁹Östrogene Wirkungen über Membran-assoziierte Rezeptoren wurden in dieser Arbeit nicht untersucht.

Östrogene beeinflussen die neuronale Entwicklung des Gehirns (McCarthy, 2011) und haben nach neuesten Erkenntnissen sogar anabole Eigenschaften – sowohl im weiblichen, als auch im männlichen Organismus (Velders et al., 2012).

Östrogene modulieren die Darmhomöostase – eine HRT senkt das Risiko an einem Kolonkarzinom zu erkranken signifikant (Chlebowski et al., 2004; Wada-Hiraike et al., 2006). Daneben führt eine Aktivierung von ER zu antiinflammatorischen Effekten im Darm (Harnish et al., 2004).

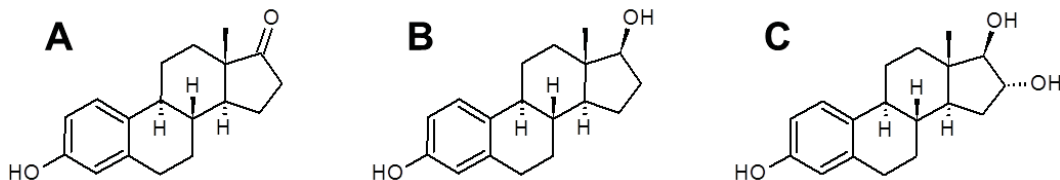


Abb. 1.3: Die Strukturen der weiblichen Sexualhormone (A) Östron, (B) Östradiol und (C) Östriol.

1.2.2 Nukleäre Rezeptoren: Der ER

Der ER gehört zur Klasse der Nukleären Rezeptoren (NR). Diese (*i. e.* NR) sind Teil evolutionär-verwandter, DNA-bindender Transkriptionsfaktoren, die eine Vielzahl von physiologischen Vorgängen steuern (Gronemeyer et al., 2004). Einer der ersten “identifizierten”²⁰ NR war der ER. Die vielfältige Rolle von NR wird in Germain et al. 2006 folgendermaßen zusammengefasst:

NRs modulate transcription through several distinct mechanisms, which include both activation and repression activities. These activities, making NR signaling remarkably complex, can be genomic or nongenomic and ligand-dependent or -independent, and can mediate gene repression, the release of gene repression, gene activation, or gene transrepression. NRs can also be the targets of other signaling pathways that modify the receptor post-translationally and affect its function.

Struktur

NR bestehen aus 5–6 Domänen (der ER aus 6), die mit den Buchstaben A–F (vom N- zum C-terminalen Ende hin) auf der Basis von Homologie und Funktion gekennzeichnet werden (Krust et al., 1986). Alle NR haben im Wesentlichen zwei funktionsbestimmende Teile und zwar eine DNA-Bindungsdomäne (DBD, auf Domäne C) und eine Ligandenbindungsdomäne (LBD, auf Domäne E) – wobei diese Domänen auch die größte Homologie der NR untereinander besitzen²¹.

²⁰Es wurde beobachtet, dass 17beta-Östradiol spezifisch im Uterus gebunden wird (Jensen, 1962). Daraus wurde geschlossen, dass die Wirkung von Östrogenen über ein Rezeptorprotein erfolgen muss (siehe Review Nilsson et al. 2001). Geklont wurde der Rezeptor aber erst später (Green et al., 1986).

²¹Dies wird durch die Tatsache unterstrichen, dass es möglich ist, NR-Chimären herzustellen. Green et al. haben in einem ER die DBD gegen die des Glucocorticoidrezeptors (GR) ausgetauscht. Hier führt nun die Bindung von Östrogen zur Transkription von Zielgenen des GR (Green et al., 1988).

Die DBD des ER ist evolutionär stärker konserviert – zu etwa 97 % bei ER-Alpha und ER-Beta (Enmark et al., 1997)²² – als die LBD, welche für die Bindung der Liganden, Koregulatoren (im Fall von ER z.B. *Heat-shock proteins*, HSPs (Pratt and Toft, 1997)) und Dimerisierungspartner verantwortlich ist. In der DBD des ER finden sich auch die zwei typischen, Cystein-reichen Zinkfinger motive²³, bestehend aus zwei alpha-Helices und einer Carboxy-Gruppe, die u.a. die Bindung des Rezeptors an die DNA und Dimerisierungspartner vermitteln. Hier finden sich verschiedene charakteristische Sequenzelemente, von denen für den ER die sogenannte P-Box die wichtigste ist: sie ist in beiden ER-Subtypen identisch und bestimmt die Sequenzspezifität (und wiederum die Dimerisierungspartner) mit der die Rezeptoren an die zugehörigen *response elements* binden (Laudet, 1997)²⁴.

Am N-terminalen Ende (in der A/B Domäne) findet sich die Aktivierungsfunktion 1 (AF-1, McInerney and Katzenellenbogen 1996), welche auch eine liganden-unabhängige Aktivierung des Rezeptors erlaubt. Für den ER sind u.a. cAMP-, Dopamin-, epidermal growth factor/insulin-like growth factor- und MAP-Kinase-induzierte Aktivierung beschrieben (Cenni and Picard, 1999).

Die LBD (Domäne E) wird aus 12 alpha-Helices gebildet, die eine keilförmige, hydrophobe Tasche umschließen. Die liganden-abhängige Aktivierungsfunktion 2 (AF-2) befindet sich am C-terminalen Ende auf Helix 12. Nach Bindung eines Liganden schiebt sich die AF-2 über die Ligandenbindungstasche und schließt diese ab. Dies führt zu einer flexiblen Konformationsänderung (Aktivierung) des Rezeptors, welche das Ablösen von Chaperonen, die Bindung an Dimerisierungspartner, Co-Faktoren und schließlich die Bindung an die HRE (genauer *estrogen response elements*, ERE, klassische Regulierung der Transkription) vermittelt (Nilsson et al., 2001). Die im Anschluss befindliche F-Domäne moduliert die Wirksamkeit gebundener Liganden und die transkriptionelle Aktivität der ER (Montano et al., 1995).

Nicht-klassische Signaltransduktion

Der ER kann auch andere Zielsequenzen ohne ERE in der Promotorregion aktivieren – eine s. g. nicht-klassische Regulierung (Matthews and Gustafsson, 2003; Heldring et al., 2007). Dies erfolgt über eine Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren wie dem *Nuclear Factor* (Nf)- κ B, AP-1 (Paech et al., 1997) und SP-1 (Porter et al., 1997) – d. h. der ER bindet nicht direkt an die DNA (*tethered*). ER modulieren z. B. die Expression von c-Jun, c-fos und c-myc über eine nicht-klassische Transkriptionsregulierung (Siewit et al., 2010; Björnström and Sjöberg, 2004; Heldring et al., 2007).

Neben der direkten Bindung von ER an die zugehörigen ERE und der Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren, kann der ER auch liganden-unabhängig aktiviert werden (Cenni and Picard, 1999). Wachstumsfaktoren führen zu einer Aktivierung verschiedener Kinasekaskaden (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK), der Induktion von *cAMP-dependent protein kinase* (PKA) und der Induktion von Cyclinen – worüber der ER phosphoryliert und aktiviert werden kann.

Daneben dimerisiert der ER auch mit anderen NR oder moduliert als Co-Faktor deren Signaltransduktion (*Crosstalk*). Der ER wird als besonders *promiscuous*²⁵ beschrieben (Bar-

²² Auf die ER-Subtypen wird in Abschnitt 1.2.2 näher eingegangen.

²³ Daher die Zuordnung zu den Zinkfinger-Proteinen.

²⁴ Die P-Box ist hochspezifisch und stark konserviert zwischen den verschiedenen NR. D. h. bereits der Austausch einer Aminosäure wechselt die Spezifität zu ERE zu GRE.

²⁵ engl. sexuell freizügig bzw. "besonders häufig den Partner wechselnd"

nes, 2001; Ricketts et al., 2005; Wiseman, 2005). Ein Beispiel für einen solchen *Crosstalk* ist die Interaktion des ER mit dem Arylhydrocarbonrezeptor (AhR) (Wagner et al., 2008). Diese Interaktion wurde in den Veröffentlichungen 2.3 und 2.4 untersucht und im Detail beschrieben.

ER-Subtypen Alpha und Beta

Es gibt zwei Subtypen des ER, ER-Alpha und ER-Beta (Kuiper et al., 1996), die gewebespezifische Expressionsmuster zeigen (Kuiper et al., 1997): In den klassischen östrogen-sensitiven Geweben wie Uterus und Brustdrüse wird v. a. der ER-Alpha exprimiert. In nicht-klassischen östrogen-sensitiven Geweben wie dem Darmepithel wird fast ausschließlich der ER-Beta exprimiert (Campbell-Thompson, 1997; Konstantinopoulos et al., 2003). Die beiden Subtypen werden von zwei separaten Genen auf verschiedenen Chromosomen kodiert – sind also keine *Splicevarianten* (Enmark and Gustafsson, 1999).

Viele Zelltypen exprimieren sowohl ER-Alpha als auch ER-Beta, was eine Voraussage der genauen Wirkung einer potentiell östrogenen Substanz außerordentlich erschweren kann (Elsby et al., 2000). Eine Aktivierung der ER führt zu ER-Homo- und ER-Heterodimeren (Pettersson et al., 1997).

Die Komplexität einer östrogenen Antwort ergibt sich u. a. daraus, dass die ER-Subtypen gegenseitig ihre Signaltransduktion beeinflussen können. Eine ER-Alpha-induzierte proliferative Wirkung (Diel, 2002; Katzenellenbogen et al., 2000) kann durch eine ER-Beta-Aktivierung antagonisiert werden (Pettersson et al., 2000; Matthews and Gustafsson, 2003). Dieses “Ying – Yang”-Verhältnis (Lindberg et al., 2003) der beiden Rezeptoren steuert die Gewebekomöostase.

Gewebedifferenzierungsprozesse unterscheiden sich stark in ER-Alpha-*knockout* (ERKO) und ER-Beta-*knockout* (bERKO) Mäusen (Couse and Korach, 2004): So ist die Proliferation in Uterus (Couse and Korach, 2004) und glatten Muskelzellen (Gustafsson, 1999) von bERKO Mäusen stärker als im Wildtyp – also Mäusen, die beide ER-Subtypen exprimieren. Eine selektive Aktivierung von ER-Beta wirkt anabol im weiblichen (Weigt et al., 2012) und männlichen (Velders et al., 2012) Muskel, wahrscheinlich über eine Aktivierung von Satellitenzellen (Velders et al., 2012). bERKO-Mäuse zeigen eine geringere Expression von Muskelzellregenerations- und Satellitenzell-Markern als ERKO- oder Wildtyp-Mäuse (Velders et al., 2012).

Auch im Darm (*i. e.* Kolon) zeigt sich eine Beteiligung von ER-Beta an antiinflammatorischen Prozessen und Modulation der Gewebekomöostase (Harnish et al., 2004; Wada-Hiraike et al., 2006; Weige et al., 2009)(siehe 2.2). Interessanterweise scheint die ER-Beta-Expression in Kolontumorzellen und Kolonkrebszelllinien vermindert zu sein (Jassam et al., 2005; Konstantinopoulos et al., 2003; Martinetti et al., 2005).

1.2.3 Liganden des ER

Die Hormonantwort eines Gewebes hängt zum großen Teil von den Kofaktoren ab, mit denen der Rezeptor nach Bindung eines Liganden interagieren kann (Nagy and Schwabe, 2004). Die Bindung eines Liganden führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors. Verschiedene Liganden können zu unterschiedlichen Konformationen des Rezeptors führen, die wiederum die Rekrutierung von Kofaktoren beeinflussen können. Darüber hinaus werden je nach Gewebe unterschiedliche Koregulatoren exprimiert. Aus diesen Gründen lassen sich Liganden der NR häufig nicht eindeutig klassischen Agonisten oder Antagonisten zuordnen. Deshalb

gibt es Voll-, Partial- und Inverse-Agonisten²⁶ (und Antagonisten) und Moleküle, die nur einen Teil der Funktionen eines NR induzieren können bzw. zell- oder gewebe selektiv wirken (Gronemeyer et al., 2004).

Kofaktoren können sowohl aktivierende als auch reprimierende Funktionen ausüben und werden in entsprechende Klassen eingeteilt: Koaktivatoren der p160-Familie (*steroid receptor coactivators 1-3* und p300, (Waters et al., 2006). Korepressoren wie AF-2-interagierende Proteine RIP140 (Treuter et al., 1998) und SHP (Johansson et al., 2000), die SRC 1 antagonisieren, und *nuclear receptor corepressor* (N-cor), *silencing mediator of retinoid and thyroid receptors* (SMRT), welche die Transkription erschweren (Smith et al., 1997).

Die LBD der ER ist deutlich größer (fast doppelt so groß), als es das molekulare Volumen der endogenen Östrogene erfordert (Brzozowski et al., 1997). Daher binden eine Reihe strukturell sehr unterschiedliche Stoffe an den ER (Heldring et al., 2007). Den Stoffen gemeinsam ist ihr geringes Molekulargewicht und ihre Lipophilie, und sie werden je nach Kontext (zusätzlich zum molekularen Mechanismus s.o.) in endogene – exogene und natürliche – synthetische Östrogene unterschieden.

Im Folgenden werden einige wichtige Liganden des ER vorgestellt. Die Stoffe sind klassische Rezeptorliganden, unterscheiden sich also grundsätzlich von Metalloöstrogenen wie Cd^{2+} , die die Wirkung klassischer Liganden nachahmen (und auf Basis der Struktur auch einen anderen molekularen Mechanismus haben sollten, vgl. Kapitel 4.2 ab Seite 101).

Agonisten

Agonisten sind Liganden, die nach Bindung an die LBD die Rezeptorkonfiguration in einen aktiven Zustand umformen. Anhand des 17beta-Östradiols (siehe Abb. 1.4a) lässt sich die Struktur-Wirkungsbeziehung östrogenen Stoffe beschreiben. Für die östrogene Wirkung ist der aromatische Ring A und die C3 Hydroxy-Gruppe essentiell. Der Abstand der C3 und C17 Hydroxy-Gruppen (etwa 1.245 nm) und eine planare, hydrophobe Struktur bestimmen die östrogene Potenz mit (Lemke and Williams, 2007). 17beta-Östradiol ist der stärkste natürliche Ligand am ER und hat eine ähnliche Affinität zu ER-Alpha und ER-Beta (Kuiper et al., 1997).

Das bekannteste synthetische Östrogen ist das 17alpha-Ethinylöstradiol (EE_2 , Inhoffen 1938 – siehe 1.4b). Es wird seit den 60er Jahren²⁷ in Kombination mit verschiedenen Gestagenen in oralen Kontrazeptiva zur hormonellen Verhütung eingesetzt.²⁸ 17beta-Östradiol unterliegt einer raschen Metabolisierung in der Leber, die seine orale Bioverfügbarkeit begrenzt (*First-Pass*-Effekt). Die gute Bioverfügbarkeit von EE_2 beruht auf dem Schutz des sekundären Carbinols in Position 17 durch die eingeführte Ethinylgruppe (Steinhilber et al., 2005). Im Gegensatz zu E_2 ist EE_2 hauptsächlich an Albumin gebunden²⁹ und oral verfügbar. In unseren Untersuchungen wurde als positiv Östrogen-Kontrolle entweder E_2 s.c. oder i.p. eingesetzt und bei oraler Exposition EE_2 über das Trinkwasser oder per gavage appliziert.

Ein auf den ersten Blick strukturell anders aufgebauter Ligand (Stilben-Struktur) ist Diethylstilbestrol (DES, siehe Abb. 1.4c). Es wurde in unseren Untersuchungen nicht verwendet, zeigt aber deutlich, dass allein anhand der Struktur nicht unbedingt ein Ligand des ER zu

²⁶Inverse-Agonisten können Korepressoren rekrutieren. Partial-Agonisten entfalten auch in hoher Konzentration nicht die volle Wirkung eines Voll-Agonisten.

²⁷Anovlar, Schering AG Berlin

²⁸Die zugrundeliegende Theorie – negatives, hormonelles *feed-back* (Herunterregulation der FSH-Ausschüttung) – wurde erstmals von Haberland formuliert (Haberland, 1921).

²⁹genau wie auch Cd, siehe 1.1.6

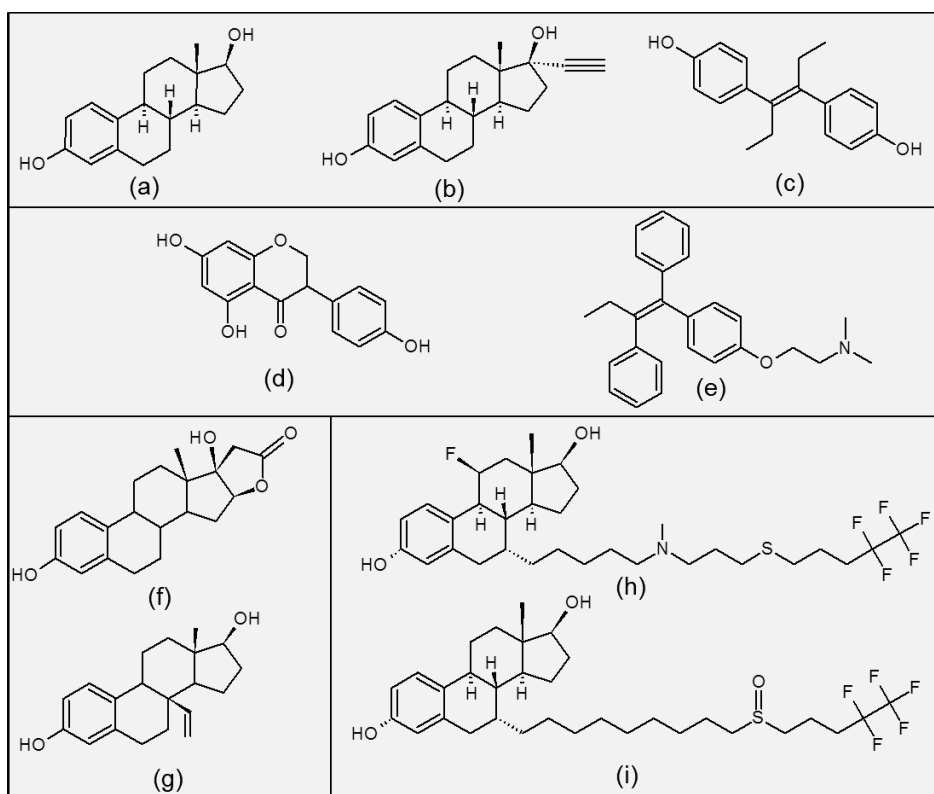


Abb. 1.4: Einige Liganden des ER – (a) das endogene Östrogen 17 β -Östradiol, (b) das synthetische 17 α -Ethinylöstradiol, (c) der Endokrine Disruptor Diethylstilbestrol, (d) das Phytoöstrogen Genistein, die selektiven ER-Subtyp Agonisten (f) 16 α -LE₂ (ER-Alpha), (g) 8 β -VE₂ (ER-Beta), die Anti-östrogene (e) Tamoxifen (kein reines Anti-östrogen), (h) ZK191703 und (i) ICI 182,780 (Faslodex).

erkennen ist. DES bindet mit hoher Affinität an den ER und hat (im Rückblick) als erster Endokriner Disruptor eine traurige Berühmtheit erlangt (Langston, 2008). DES wurde seit Mitte der 1940er Jahre bei drohendem Abort zur Erhaltung der Schwangerschaft eingesetzt (Marquardt and Schäfer, 2004). Bei den Töchtern DES-behandelter Mütter kam es zu einer erhöhten Inzidenz an Vaginalkarzinomen (Melnick et al., 1987). DES hat eine ähnliche Wirkstärke wie EE₂ und die toxischen Effekte von DES werden vorwiegend über den ER-Alpha vermittelt (Mueller et al., 2004).

Verschiedene sekundäre Naturstoffe mit phenolischen Hydroxylgruppen, wie Stilben-Derivate oder Isoflavone, können ebenfalls an den ER binden. Das Phytoöstrogen Genistein (siehe Abb. 1.4d) bindet vorwiegend (etwa 30-mal stärker) an den ER-Beta (Henley and Korach, 2010) und kann auch viele ER-Beta-vermittelte Effekte induzieren.³⁰ Ob diese Effekte positiv oder negativ zu bewerten sind, wird z.Z. noch diskutiert. Wir haben Genistein in Veröffentlichung 2.2 eingesetzt und dessen Wirkung mit der von selektiven ER-Agonisten verglichen.

Bei der pharmakologischen Behandlung pathologischer Zustände ist die selektive Aktivie-

³⁰Es gibt allerdings auch Befunde, die zeigen, dass Genistein eine ER-Alpha-vermittelte Signaltransduktion induzieren kann (Mueller et al., 2004).

rung der ER-Subtypen interessant (Gustafsson, 1998).³¹ ER-Subtyp-spezifische Agonisten sind das 16alpha-LE₂ (für ER-Alpha, siehe Abb. 1.4f) und 8beta-VE₂ (für ER-Beta, siehe Abb. 1.4g).

Eine selektive Aktivierung von ER-Beta führt im Darmepithel zu antiproliferativen und proapoptotischen Effekten. Dieses könnte sich präventiv auf die Entstehung von Kolonkarzinomen auswirken (siehe Veröffentlichung 2.2). Eine selektive Aktivierung von ER-Beta in der Muskulatur führt zu regenerativen, protektiven und anabolen Effekten im weiblichen Muskel und anabolen Effekten im männlichen Muskel – hiervon könnten Sarkopeniepatienten profitieren bzw. Krankheitsbilder, die von der Muskelmasse (Diabetes Typ 2, Metabolisches Syndrom) abhängen, positiv beeinflusst werden (Velders et al., 2012; Weigt et al., 2012). Diese Substanzen sind ein wichtiges Werkzeug, um die molekularen Mechanismen der ER-Signaltransduktion aufzuklären (Nilsson and Gustafsson, 2011).

Antagonisten

Antagonisten sind Liganden, welche die Bildung des aktiven Zustandes eines Rezeptors verhindern. Dabei wird die Konformationsänderung der Helix 12 der LBD verhindert (Nilsson et al., 2001). Wenn dies nur teilweise geschieht, kann der Ligand auch eine partial-agonistische Wirkung haben. Das Antiöstrogen Tamoxifen (siehe 1.4e) stellte sich im Nachhinein als *selective estrogen receptor modulator* (SERM) heraus. Das bedeutet, dass gewebeabhängig der ER aktiviert oder deaktiviert wird.³² Tamoxifen wird in der Brustkrebstherapie eingesetzt, um östrogen-vermittelte Proliferation zu antagonisieren.

ER-Antagonisten sind Faslodex (ICI 182,780) und ZK191703.³³ Sie dienen ebenfalls, wie die selektiven Agonisten, als wichtiges Werkzeug um die molekularen Mechanismen der ER aufzuklären.

1.2.4 Identifikation östrogenen Substanzen

Die Identifikation potentiell östrogenen Stoffe ist sowohl mit *in vivo* als auch mit *in vitro* Methoden möglich.

Der uterotrophe Bioassay ist heute immer noch der “Goldstandard” – er wird schon sehr lange in der Wirkstofffindung und in der Toxikologie eingesetzt. Der uterotrophe Assay basiert auf der Fähigkeit östrogenen Stoffe, das Uterusfeuchtgewicht östrogen-defizienter (gonaden/o-varienektomierter) Tiere zu beeinflussen. Heute gibt es eine OECD Guideline (#440), die bei der Testung potentieller endokriner Disruptoren (v. a. Agonisten, aber auch Antagonisten) verwendet wird. Ein östrogenen Stoff induziert zuerst durch Wassereinlagerung und nachfolgend durch eine gesteigerte Proliferation das Uterusfeuchtgewicht.

Zusätzlich lassen sich andere histologische und molekular-biologische Parameter bestimmen, die von Östrogenen moduliert werden (Diel et al., 2002). Neben dem Uterusgewicht wird auch die Höhe des Uterusepithels (UEH) und die Vaginalepithelhöhe (VEH) von Östrogenen moduliert. Klassische durch Östrogene regulierte Gene und Proteine sind *complement component*

³¹ Ab einer etwa 100-fach höheren Affinität zu einem Rezeptor(-Subtyp) wird von selektiven Agonisten gesprochen.

³² Die Wirkung von Tamoxifen wird von den im Gewebe exprimierten Kofaktoren bestimmt.

³³ Hierbei ist zu bedenken, dass auch wenn keine (partial-)agonistische Wirkung gefunden wurde, es via *Crosstalk* theoretisch zu einer liganden-unabhängigen Aktivierung des ER in bestimmten Geweben kommen könnte. ICI steht für Imperial Chemical Industries, heute AstraZeneca. ZK steht für Zentralkatalog, ein interne Bezeichnung der ehem. Schering AG, heute BayerHealthcare.

C3 (C3) und der Progesteronrezeptor (PR). Da für manche Zielgewebe nur wenige östrogen-sensitive Parameter bekannt sind, wurde in dieser Arbeit u. a. eine Reihe östrogen-sensitiver Gene mittels Microarray-Analyse identifiziert (siehe Kapitel 3.1).

Zu den *in vitro* Methoden zählen Proliferationsassays wie der *E-screen* (Soto et al., 1995) und Transaktivierungssysteme wie der *yeast estrogen screen* (YES) (Baker, 2001). Darüber lässt sich der molekulare Mechanismus über Genexpressionsanalysen in ER-Subtyp positiven und negativen Zelllinien näher untersuchen.

1.3 Cadmium – Interaktion mit Östrogenen

Die akute und chronische (“klassische”) toxische Wirkung von Cd ist wie unter 1.1.5 beschrieben lange bekannt und gut untersucht. Zwar wurde eine Modulation der Serumkonzentrationen von Metallionen (v. a. Calcium, Kupfer aber auch Cd) durch Östrogene (*i. e.* E₂) schon früh beobachtet – eine mögliche hormonähnliche Wirkung von Cd bzw. eine Modulation der Wirkung von Hormonen durch Cd aber sehr viel später entdeckt (Nordberg, 2009). Heute wird Cd als potentieller endokriner Disruptor (Degen, 2004; Takiguchi and Yoshihara, 2006) und Metallohormon (Byrne et al., 2009; Silva et al., 2012) angesehen. Cd kann die Wirkung von Steroidhormonen nachahmen oder beeinflussen, wobei der molekulare Wirkmechanismus immer noch ungeklärt ist.

1.3.1 *In vitro* Befunde

Verschiedene Experimente mit Metallionen führten zu der Hypothese, dass Metallionen eine östrogenartige Wirkung haben könnten. Divalente Kupferionen verstärken die zytosolische Bindung von 17beta-Östradiol in Uterusgewebe bei 37 °C deutlich (Fishman and Fishman, 1988). Weiterhin werden Metallionen eingesetzt, um die Struktur und Funktion von Steroid- und anderer Rezeptoren zu untersuchen: Dabei zeigte sich, dass sowohl Salze der Arsen(III)-Säure, als auch Cd die Bindung von tritiummarkiertem Dexamethason an den Glukokortikoidrezeptor inhibieren.³⁴ Die Beteiligung von engständigen Thiolgruppen in der Bindungsdomäne war eine frühe Hypothese (Simons et al., 1990). Predki *et al.* konnten zeigen, dass verschiedene Metallionen – darunter auch Cd – das Zink im Zinkfinger des ER ersetzen können (Predki and Sarkar, 1992). Für Cd wurde auch eine Modulation der Expression verschiedener Onkogene beschrieben (Alam et al., 1989; Tang and Enger, 1991). Deshalb wurde Cd ab 1994 besonders von Mary Beth Martin und Kollegen mit Hinblick auf die potentielle Beteiligung von Schwermetallen bei der Induktion von Brust- und Prostatakrebs untersucht (Byrne et al., 2009). In MCF-7 Zellen führt eine Behandlung mit 1 µM Cd zu einer ähnlichen Modulation von ER-Protein, *Trifoilfactor 1*/Ps2 mRNA, Progesteronrezeptor (PR) mRNA und PR-Protein und Zellproliferation wie eine Behandlung mit 1 nM E₂ (Garcia-Morales et al., 1994). Hierbei konnte die Cd-induzierte PR-Protein-Expression mit einem Antiöstrogen (ICI 164,384) verhindert werden. Auch zeigte sich die Cd-induzierte Expression von PR und Ps2 mRNA nur in Zellen mit ER (in MDA MB-231 Klon S-30 und nicht in AS-23) – also handelt es sich um einen rezeptorvermittelten Prozess.

In daran anschließenden Untersuchungen mit verschiedenen Krebszelllinien³⁵ wurde festge-

³⁴Im Gegensatz zu hohen Konzentrationen von Zinkionen, die keine Wirkung zeigten.

³⁵Vorwiegend Brustkrebszelllinien wie MCF-7, T47D, ZR-75-1 und SKBR3 mit verschiedenen ER-Expressionsmustern, aber nicht ausschließlich.

stellt (wie [Silva et al. 2012](#) zusammenfassen), dass Cd

- an den ER-Alpha bindet und ihn aktiviert
- die Transkription östrogen-regulierter Gene moduliert
- die Translation östrogen-regulierter Proteine moduliert
- verschiedene östrogen-regulierte Signaltransduktionswege aktiviert
- die Proliferation östrogen-abhängiger Zellen steigert.

Ein Teil dieser Experimente wird in dem folgenden Abschnitt kurz dargestellt.

Cd-induzierte östrogene Wirkung *in vitro*

1 μM CdCl_2 induziert (nach 36 h Inkubation) in MCF-7-ERE Zellen die Luciferase-Aktivität mit einer Effizienz von 70.8 % (gegen 1 nM E_2) und einer EC_{50} von $1.08 \cdot 10^{-7}$ M (E_2 : $2.65 \cdot 10^{-11}$ M) zwar deutlich schwächer als E_2 , aber stärker als die anderen untersuchten Schwermetalle (außer Bis(Tri-*n*-Butylzinn)).³⁶ Das Gleiche gilt für eine Steigerung der Zellproliferation nach 5 Tagen: 59.7 % für 100 nM CdCl_2 gegenüber 10 nM E_2 und eine EC_{50} von $1.48 \cdot 10^{-8}$ M (E_2 : $1.43 \cdot 10^{-10}$ M) ([Choe et al., 2003](#)).

Verschiedene humane ER-Alpha-Mutanten wurden in Fibroblasten-ähnliche COS-1 Zellen³⁷ mit einem östrogen-responsiven Chloramphenicol-acetyl-transferase(CAT)-Reporter³⁸ kotransfiziert, um den molekularen Wirkmechanismus von Cd näher zu untersuchen. Zusätzlich wurde die Bindungsaffinität von Cd an isolierten humanen, rekombinanten ER-Alpha und aus MCF-7 isolierten ER-Alpha untersucht. Cd induziert die CAT-Aktivität dosisabhängig (10^{-12} – 10^{-6} M) und ähnlich zu E_2 . Darüber hinaus wird die Cd-induzierte CAT-Aktivität bei Koinkubation mit einem Antiöstrogen (ICI 164,384) verhindert – ist also ER-Alpha-vermittelt. Cd bindet an den ER-Alpha-Wildtyp ($K_D = 4$ bis $5 \cdot 10^{-10}$ M) und Cd hemmt (nicht-kompetitiv³⁹) die Bindung von E_2 ($K_i = 2.96 \cdot 10^{-10}$ M) an den ER-Alpha-Wildtyp dosis- und prä-inkubationszeitabhängig. Diese Befunde sprechen für eine hohe Spezifität der Bindung von Cd an den ER-Alpha. Als an der Bindung von Cd in der LBD beteiligte Bindungsstellen werden C381, C447, E523, H524 und D538 diskutiert ([Stoica et al., 2000](#)).

Die Transaktivierung eines ERE-LUC Konstrukts durch CdCl_2 konnte auch in einem weiteren System (T47D Zellen, nach stabiler Transfektion als “T47D-KBluc” bezeichnet) nachgewiesen werden. CdCl_2 induziert die Luciferase-Aktivität dosisabhängig ($1 \cdot 10^{-5}$ – $1 \cdot 10^5$ nM) und in der höchsten Konzentration ähnlich stark wie 0.1 nM E_2 . Diese Induktion konnte mittels Antiöstrogen (ICI 182,780) antagonisiert werden, ist also ER vermittelt. Da T47D-Zellen aber sowohl ER-Alpha als auch ER-Beta exprimieren, konnte nicht festgestellt werden, welcher Subtyp die Signaltransduktion vermittelt ([Wilson et al., 2004](#)).

Um zu untersuchen, ob Cd die bereits berichtete MCF-7 Proliferation über Kinasekaskaden induziert, wurde der Einfluss von Cd auf ERK1/2, AKT und PDGFRalpha untersucht. Es

³⁶Luciferase ist ein Enzym aus dem Leuchtkäfer (“Glühwürmchen”) *Photinus pyralis*, welches mittels Substrat, ATP und Sauerstoff eine Lichtreaktion auslöst ([Greer and Szalay, 2002](#)).

³⁷Akronym: aus CV-1 Zellen (*Origin*) immortalisiert mittels SV-40 Virus, aus Nierengewebe.

³⁸Ein Konstrukt aus CAT-Reporter und *mouse mammary tumor virus* (MMTV) Promoter, in dem das GRE gegen zwei ERE ausgetauscht worden ist.

³⁹D. h. nicht wie ein “normaler Antagonist”.

bestätigte sich, dass Cd die Proliferation von MCF-7 Zellen induziert. Gleichzeitig induziert Cd auch die Phosphorylierung von ERK1/2, AKT und PDGFRalpha. Beides scheint ER-vermittelt zu sein, da der Effekt durch ein Antiöstrogen (ICI 182,780) verhindert wurde. Weil die Geschwindigkeit der Phosphorylierung langsamer war als erwartet (erst nach etwa 3 h eintrat) und die Induktion von Protoonkogenen (*c-fos* und *c-jun*) und PDGFA beobachtet wurde, scheinen diese die Phosphorylierung zu vermitteln (Brama et al., 2007). Das gleiche Muster wurde bei der Behandlung von MCF-7 Zellen mit Cd-haltigen *Quantum dots* (QD) beobachtet. Es zeigte sich eine QD-induzierte Steigerung der Proliferation, ER-Alpha-Aktivierung und biphasische Phosphorylierung von Akt und ERK1/2. Alle QD-induzierten Effekte konnten mit einem Antiöstrogen (ICI 182,780) antagonisiert werden (Jain et al., 2012). Zang et al. berichteten ebenfalls von einer Cd-induzierten ERK1/2 Phosphorylierung, die durch Antiöstrogen (ICI 182,780) antagonisiert wurde (Zang et al., 2009).

Der molekulare Mechanismus von Cd wurde von Siewit et al. in ER-Alpha positiven MCF-7, T-47D und ZR-75-1 Zellen weiter untersucht. Die Cd-induzierte Proliferation und Genexpression von ER-Zielgenen *CycD1*, *c-myc* und CTD wurde von Antiöstrogen (ICI 182,780) und Ri-ER-Alpha⁴⁰ antagonisiert. Mittels ChIP-Analyse wurde eine Cd-induzierte Translokation von ER-Alpha in den Nukleus an die Promotoren von *CycD1* und *c-myc* festgestellt. Die Induktion von *CycD1* und *c-myc* wird allerdings nicht durch eine direkte Bindung von ER-Alpha an die DNA vermittelt, sondern über einen *tethered*-Mechanismus via AP-1. Dieses besteht u. a. aus Proteinen, die durch die Protoonkogene *c-Jun* und *c-Fos* codiert werden (vgl. Brama et al. 2007). Die Hypothese ist, dass zumindest in Brustkrebszellen die Proliferation nicht direkt via ER-Alpha moduliert wird, sondern via *Crosstalk* mit anderen Transkriptionsfaktoren (Siewit et al., 2010).

Cd-induzierte Modulation östrogenen Wirkungen *in vitro*

Es gibt jedoch auch Befunde, die zeigen, dass Cd zwar an den ER bindet, den Rezeptor aber nicht aktiviert. In diesen Studien scheint Cd eher eine Inhibition E₂-vermittelter Effekte zu bewirken (Guével et al., 2000; Vetillard, 2005). In einem YES-Assay zeigte sich nur eine geringe Aktivierung von ER-Alpha (10 % der maximalen Aktivierung für 5×10^{-7} bis 5×10^{-6} M). Und für 6×10^{-11} bis 1×10^{-5} M CdCl₂ konnten Silva et al. weder eine proliferative Wirkung in MCF-7 Zellen feststellen, noch eine Phosphorylierung von ERK1/2 (bei 10^{-7} M CdCl₂). Allerdings inhibierte Cd die E₂-vermittelten Effekte (Silva et al., 2006). Zang et al. konnten keine Cd-induzierte Modulation der Ps2- und PR-mRNA-Expression in T47D Zellen feststellen, obwohl die gleichen Konzentrationen wie bei Stoica et al. 2000 gewählt worden waren (Zang et al., 2009).

1.3.2 *In vivo* Befunde

Die Studienlage zur östrogenen Wirkung von Cd in *in vivo* Experimenten ist übersichtlich. Es wurde der Einfluss von Cd auf HHG-Achse und Steroidsynthese in klassischen uterotrophen Assays und in Reportergen-Systemen untersucht. Zusammenfassend scheint Cd die HHG zu modulieren, in klassischen uterotrophen Assays östrogene Wirkungen zu zeigen und den ER-Alpha aktivieren zu können. Studien mit transgenen Tiermodellen können dies nicht oder

⁴⁰ mittels RNA-Interferenz: Kurze RNA-Stücke interagieren mit mRNA und führen zu deren Abbau und somit zur Unterbrechung der Signaltransduktion (Fire et al., 1998).

nur teilweise bestätigen. Die östrogene Wirkung von Cd nach oraler Applikation, also dem relevantesten Aufnahmepfad, ist bisher nur in fünf Studien untersucht worden (Han et al., 2006; Höfer et al., 2009, 2010; Ramachandran et al., 2011), wovon zwei (siehe Veröffentlichung 2.1 und 2.4) in dieser Dissertation vorgestellt werden.

Cd-induzierte östrogene Wirkung *in vivo*

Martin et al. waren die ersten, die eine hormonartige Wirkung von Cd *in vivo*⁴¹ festgestellt haben.⁴² Nachfolgend zu Untersuchungen über mögliche androgene Effekte von Cd (Martin et al., 2002) wurde eine östrogenartige Wirkung von Cd in weiblichen, ovariectomierten SD-Ratten untersucht (Johnson et al., 2003). Eine i. p.-Injektion von 5 µg CdCl₂ führte zu einem Anstieg des Uterusgewichtes und erhöhter C3- und PR-mRNA-Expression in Uterus und Brust. Diese Effekte wurden durch Gabe eines Antiöstrogens (ICI 182,780) antagonisiert. Ferner kam es nach einer *in utero* Exposition (0.5 und 5 µg/kg KG CdCl₂ i.p., trächtige Ratten) zu einer Veränderung des Brustgewebes.

In einer weiteren Studie mit Cd (0.12 u. 1.2 mg/kg KG i. p.) an Wistar-Ratten wurde die Zunahme des Uterusfeuchtgewichtes, der UEH und der Endometriumdicke in einem klassischen uterotrophen Assay beobachtet. Darüberhinaus wurde eine Cd-induzierte Verminderung der PCNA-Protein-Expression im Uterus festgestellt. Analog zu den *in vitro* Versuchen wurde ERK1/2 dosisabhängig von Cd induziert (Zhang et al., 2007). Aus dem gleichen Labor berichten Liu et al. nach einer i. p.-Injektion von 0.0064, 0.032, 0.16 oder 0.8 mg/kg KG CdCl₂ in SD-Ratten eine dosisabhängige Steigerung des Uterusfeuchtgewichtes und der Stromadicke. Allerdings fand sich keine Steigerung der PCNA-Expression, Endometriumdrüsenzanzahl oder UEH durch Cd im Gegensatz zu klaren Effekten von E₂ auf diese Parameter. Daraus schließen die Autoren, dass Cd nicht über eine ER-Interaktion zu einer Zunahme des Uterusfeuchtgewichtes führt (Liu et al., 2010).

Um (u. a.) die relevanten Cd-Dosen zu identifizieren, die eine Veränderung der Brustdrüsen herbeiführen, wurden weibliche Mäuse mit verschiedenem Hormon-Status (präpubertär, adult intakt, adult Ovx) mit 2–3 mg/kg KG CdCl₂ i. p. behandelt. Zusammenfassend zeigten sich zwei Ergebnisse: Während bei präpubertären Mäusen antiöstrogene Effekte zu beobachten waren (eine Störung des Brustdrüsengangwachstums, eine geringere Anzahl *terminal end buds* und ein vermindertes Uterusfeuchtgewicht), zeigt Cd bei erwachsenen Tieren (intakt und Ovx) eine östrogene Wirkung (umgekehrte o. g. Effekte) (Alonso-Gonzalez et al., 2007).⁴³

Eine mögliche Pfadabhängigkeit der östrogenen Wirkung von Cd wurde von Höfer et al. untersucht. Bis dahin waren erst zwei Studien veröffentlicht worden, in denen Cd oral appliziert wurde (Han et al., 2006; Pillet et al., 2006). Daneben fehlte eine klare Dosisabhängigkeit der von Johnson et al. berichteten Effekte. Es zeigte sich eine dosisabhängige Zunahme des Uterusfeuchtgewichtes und der UEH nach i. p.-Injektion von CdCl₂, aber nicht nach oraler Exposition. Allerdings wurde die C3-mRNA-Expression im Uterus sowohl nach parenteraler als auch nach oraler Exposition induziert. Hierbei war bei einer Dosis von 0.05–500 µg/kg KG CdCl₂ i. p. die C3-mRNA Expression geringer, als die der Ovx-Kontrolle (Höfer et al., 2009). In Untersuchungen zur Immuntoxizität von Cd wurde ebenfalls keine Modulation des

⁴¹Martin et al. 2002; Johnson et al. 2003 und *in vitro* s. o. Garcia-Morales et al. 1994

⁴²Es existiert allerdings ein chinesisches Paper, in dem ein uterotropher Effekt von Cd (0.1, 0.5 und 2.5 mg/kg KG 3 Tage i. p., SD-Ratten) bereits 2001 beschrieben worden ist (Shen et al., 2001).

⁴³Interessanterweise wurden die Cd-induzierten Effekte auf das Brustgewebe in dieser Studie von Melatonin antagonisiert.

Uterusfeuchtgewichtes durch Cd (5 und 25 ppm in Trinkwasser für 28 Tage) in SD-Ratten festgestellt (Pillet et al., 2006).

Cd-induzierte Wirkungen in Reporter-Tiermodellen

Daneben gibt es eine Reihe von Untersuchungen in transgenen ERE-LUC-Mausmodellen. Eine s.c.-Injektion von 5, 50 oder 500 µg/kg KG CdCl₂ führte in nicht-adulten Mäusen zwar zu einer dosisabhängigen Zunahme der UEH, aber zu keiner Modulation des Uterusfeuchtgewichtes. Auch wurde keine Aktivierung des ERE-Reporters beobachtet. Im Gegenteil, bei der niedrigsten Dosis (5 µg/kg KG) war die relative Luziferase-Aktivität geringer als bei der Kontrolle. Um zu untersuchen, ob vielleicht ein ERE-unabhängiger Mechanismus bei der Signaltransduktion eine Rolle spielt, wurde die Expression verschiedener Proteine untersucht. pMdm2 wurde von Cd dosisabhängig induziert, Erk1/2 wurde von der niedrigsten Cd-Dosis stärker induziert als von der höchsten (Ali et al., 2010). Hierzu ist anzumerken, dass anti-östrogene Effekte von Cd bereits vorher in einem Versuch mit präpubertären Ratten gezeigt wurden (Alonso-Gonzalez et al., 2007). Die Wirkung von Cd ist also offensichtlich anders im nicht-adulten Tier gegenüber einem ovariectomierten adulten Tier. Adulte Männchen zeigten ebenfalls keine Aktivierung des ERE-LUC-Reporters durch CdCl₂ (0.5–500 µg/kg KG s.c.), aber wieder eine Induktion von ERK1/2 durch die niedrigen Dosen (Ali et al., 2012). Die Autoren schließen aus ihren Untersuchungen, dass indirekte Mechanismen für eine Cd-induzierte Modulation des ER verantwortlich sind.

Bei der Verwendung von ovariectomierten adulten Mäusen eines anderen Stamms führte 1 µg/kg/KG/d CdCl₂ per gavage über 21 Tage zu einer Zunahme des Uterusfeuchtgewichtes. Eine CdCl₂-induzierte Aktivierung des ERE-Luc Reporters wurde nur im weißen Fettgewebe beobachtet. Die östrogen-sensitive PR-mRNA-Expression wurde ebenfalls nur im Fettgewebe moduliert (Ramachandran et al., 2011).

Cd-induzierte Modulation der HHG und Steroidsynthese

Neben der oben aufgeführten “direkten” östrogenen Wirkung von Cd könnte Cd auch indirekt, über eine Störung der Steroidbiosynthese und HHG-Feedbackmechanismen die Serum- und Gewebekonzentration von Östrogenen verändern und so die östrogene Signaltransduktion modulieren. Für relativ hohe Cd-Dosen ist das auch schon gezeigt worden.

Die Serumkonzentrationen des Follikelstimulierenden Hormons (FSH), Luteinisierenden Hormons (LH), E₂ und Progesterons in Schweinen waren deutlich niedriger in den Tieren, die eine mit 10 mg/kg CdCl₂-angereicherte Diät bekamen, gegenüber der Kontrolldiät. Allerdings war die nur bei der höchsten Dosis zu beobachten; in den Gruppen mit 0.5 und 5 mg CdCl₂/kg Futter gab es keine Modulation der Hormonkonzentrationen (Han et al., 2006).

In hohen Dosen kann Cd den Biosyntheseweg von Steroiden an verschiedenen Stellen modulieren: In SD-Ratten (Diöstrus, Gestationstag 7 u. 16) führte 3 und 5 mg/kg KG s.c. CdCl₂ zu niedrigeren Progesteron- und E₂-Serumkonzentrationen und 5 mg/kg KG zu einer deutlich geringeren Synthese von Testosteron, Progesteron und E₂ in *whole ovary culture*⁴⁴. Die deutlichsten Effekte waren bei den Tieren zu verzeichnen, die im Diöstrus und in der frühen Phase der Schwangerschaft waren (Piasek and Laskey, 1994).

⁴⁴Nach Behandlung *in vivo* werden die Ovarien entnommen und in Kultur genommen. Die Hormonkonzentrationen werden im Überstand bestimmt.

Um den Effekt von Cd auf reproduktive Prozesse zu untersuchen, sind Ovarien von im Östrus befindlichen Wistar-Ratten, die mit 0.25, 0.5, und 1 mg/kg KG/d CdCl₂ i. p. für 6 Wochen (5 Tage die Woche) behandelt wurden, in *whole ovary culture* genommen worden. Darüber hinaus wurden *whole ovary cultures* von Ovarien in verschiedenen Phasen des Östrus angelegt und *ex vivo* mit Cd (0.1, 1 und 2 mM) behandelt. Die *in vivo* behandelten Zellen zeigten bei der höchsten Dosierung (2 mg/kg KG) eine verminderte Progesteron- und E₂-Konzentration im Überstand. Im Überstand der *in vitro* belasteten Zellen zeigte sich eine Cd-induzierte Modulation der E₂- und Progesteron-Konzentrationen – und zwar abhängig von der Östrus-Phase, in der die Zellen entnommen worden sind. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass Cd die Ovarien direkt beeinflussen kann (Zhang et al., 2008).

1.4 Zielsetzung

Diese Dissertation ist im Rahmen eines Graduiertenkollegs der DFG (GK #1427 – Nahrungsinhaltsstoffe als Signalgeber nukleärer Rezeptoren im Darm) entstanden.

Wie unter Abschnitt 1.1.3 beschrieben, ist die Bevölkerung einer gewissen Cd-Exposition ausgesetzt. Cd wird zwar inzwischen als Metalloöstrogen angesehen, der Wirkmechanismus, die Wirkung auf nicht-klassische östrogene Zielgewebe und das davon ausgehende potentielle Risiko auf physiologische und pathologische Zustände des Körpers sind allerdings nicht zufriedenstellend charakterisiert. Vor diesem Hintergrund sind meine Untersuchungen einzuordnen. Folgende Fragestellungen wurden formuliert.

- Ist die hormonartige Wirkung von Cd ER-vermittelt? Sind östrogene Wirkung von Cd in klassischen und nicht-klassischen Östrogen-Zielgeweben unterschiedlich?
- Wie wirken Östrogene und Cd im Darm? Zeigen sich im Darmepithel, das zuerst mit dem Schwermetall in Kontakt kommt, Einflüsse auf die Darmhomöostase oder auf östrogenmodulierte Signalwege?
- Kann Cd die Wirkungen von endogenen Östrogenen beeinflussen?

Zur Untersuchung dieser Fragestellungen wurden verschiedene Tierversuche in weiblichen, ovariectomierten Wistar-Ratten und *in vitro* Experimente durchgeführt.

In Kapitel 2 ab Seite 20 finden sich die im Rahmen dieser Dissertation entstandenen Publikationen. Daneben wurden weitere Experimente durchgeführt, die in Kapitel 3 ab Seite 69 dargestellt werden. So wurden östrogen-sensitive Gene im Darm mittels Microarray identifiziert, die durch Cd dosisabhängig moduliert werden (siehe Kapitel 3.1). Die Wirkung von Cd vor dem Hintergrund körpereigener Östrogene wurde zum einen im Uterus ovariectomierter Ratten (siehe Kapitel 3.2) und zum andern im Rahmen einer Masterarbeit in intakten Tieren untersucht (siehe Kapitel 3.3 und Krüger 2012). Abschließend wird noch ein für mechanistische Untersuchungen potentiell interessantes *in vitro*-Modell für Cd-Wirkungen im Darm vorgestellt (siehe Kapitel 3.4).

2 Publikationen

Im Folgenden werden vier bereits publizierte Manuskripte vorgestellt und die wesentlichen Inhalte zusammengefasst, die im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation entstanden sind.

In “*Investigations on the estrogenic activity of the metallohormone cadmium in the rat intestine*” (2.1 ab Seite 21) konnte gezeigt werden, dass Cd auch in nicht-klassischen Geweben eine östrogenartige Wirkung zeigt. Cd inhibiert auch nach oraler Applikation die Expression von Ps2-mRNA, ER-Beta-mRNA und -Protein und PCNA-Protein im Darm und zeigt damit vergleichbare Wirkungen wie 17alpha-Ethinylestradiol.

Wie Östrogene grundsätzlich die Darmhomöostase modulieren, wurde in “*ER beta specific agonists and genistein inhibit proliferation and induce apoptosis in the large and small intestine*” (2.2 ab Seite 34) genauer untersucht. Zwar exprimiert der Darm nur geringe Mengen ER-Alpha, trotzdem führt eine selektive Aktivierung des Rezeptors sowohl zu einer Steigerung der Proliferations- als auch der Apoptoserate im Dünndarm und Kolon. Eine selektive Aktivierung des ER-Beta bewirkt eine Senkung der Proliferationsrate und eine Steigerung der Apoptoserate in beiden Darmabschnitten.

Auf diesen Arbeiten bauen die nachfolgenden Untersuchungen auf.¹ Zum einen wurde untersucht, ob die östrogenartige Wirkung von Cd in Uterus und Darm ER-vermittelt ist. Daneben wurde der Cd-induzierte ER-AhR-*Crosstalk* in Uterus und Darm charakterisiert. Zwar zeigte Johnson et al., dass eine Cd-induzierte Modulation des Uterusfeuchtgewichtes und der *complement* C3-mRNA-Expression mittels ER-Antagonist verhindert werden kann, jedoch ohne hinreichende Befunde zur Pfad- und Dosisabhängigkeit. In “*Cadmium modulates expression of aryl hydrocarbon receptor associated genes in rat uterus by interaction with the estrogen receptor*” (2.3 ab Seite 44) wurde genau dies untersucht: Cd induzierte C3-mRNA und PR-Protein-Expression (beides etablierte Marker für Östrogenität) dosisabhängig. Dieses wurde in Kombination mit einem ER-Antagonisten verhindert – ist also vermutlich ER-vermittelt. Auch zeigte sich, dass Cd die AhR-assozierte Geneexpression im Uterus via ER moduliert. Im Darm scheint der Mechanismus der Modulation AhR-assoziierter Gene anders zu sein, wie in “*The metalloestrogen cadmium modulates AhR-associated gene expression in the small intestine of rats similar to ethinyl-estradiol*” (2.4 ab Seite 56) dargestellt. Hier schienen ER-unabhängige oder ER-Beta vermittelte Signalwege eine Rolle zu spielen.

¹ Auch die Versuche, die in dem Kapitel “Unveröffentlichte Daten” gezeigt werden, siehe Kapitel 3 ab Seite 69.

2.1 Publikation 1: “Investigations on the estrogenic activity of the metallo hormone cadmium in the rat intestine”

N. Höfer, P. Diel, J. Wittsiepe, M. Wilhelm, **F. M. Kluxen** und G. H. Degen in *Archives of Toxicology*, 84(7):541–52. Eine Kopie von Publikation 1 findet sich ab Seite 22.

Zusammenfassung Cd, ein giftiges Schwermetall und eine wichtige Umweltkontaminante, wird heute als potentiell hormonaktive Substanz (od. Endokriner Disruptor) angesehen. Die östrogenen Effekte Cds sind bis jetzt nur in klassischen Östrogen-Zielgeweben, wie dem Uterus, und fast nur nach intraperitonealer (i. p.) Injektion von CdCl_2 untersucht worden. Allerdings werden ER auch im Darm exprimiert, und die Nahrung ist der Hauptaufnahmeweg von Cd in der Allgemeinbevölkerung. Deshalb wurden potentielle östrogene Effekte von Cd nun im Intestinaltrakt von ovariectomierten Wistar-Ratten nach oraler kurz- und langfristiger Behandlung von CdCl_2 (0.05–4 mg/kg KG für 3 Tage per Gavage und 0.4–9 mg/kg KG über 4 Wochen in Trinkwasser) oder nach i. p.-Injektion (0.00005–2 mg CdCl_2 /kg KG) untersucht und mit Steroid-Östrogen-behandelten (E_2 oder EE_2) Gruppen verglichen. Eine atomabsorptionsspektrometrische Analyse von Cd in Nieren und Dünndarm zeigte eine dosisabhängige Zunahme der Gewebekonzentration, mit relativ hoher Cd-Konzentration im Darm sowohl nach oraler, als auch i. p.-Applikation.

Die Expression von Metallothionein(Mt1a)-mRNA, einem typischen *metal response*-Parameter, war in Niere und Dünndarm von verschiedenen Cd-behandelten Gruppen klar induziert, allerdings bemerkenswerterweise auch durch Steroid-Östrogene. Die Expression von östrogen-regulierten Genen, *i. e.* pS2/TFF1, Vitamin-D-Rezeptor (VDR) und ER-Alpha und -Beta wurden als molekulare Parameter für Östrogenität untersucht: Die intestinale mRNA-Expression von pS2/TFF1 war in den Östrogen-Kontroll-Gruppen [gegenüber Negativkontrolle] signifikant herunterreguliert, allerdings auch nach einer einmaligen i. p.-Injektion und oraler Langzeitgabe von Cd.

Dagegen war weder die mRNA-, noch die Proteinexpression von VDR nach oraler Langzeitgabe von Cd reguliert. Im Dünndarm von Ovx-Ratten war die Expression von ER-Beta, aber nicht die von ER-Alpha nachzuweisen. ER-Beta-mRNA und Protein-Expression waren, wie in der EE_2 -Referenzgruppe, signifikant durch Cd herunterreguliert. Die mRNA-Expression und die Immunfärbung von *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA), als ein Marker für Zellproliferation, zeigte eine Verminderung [gegenüber der Kontrolle] nach Langzeitgabe von Cd und EE_2 . Zusammenfassend führte eine Exposition mit Cd zur Modulation molekularer und funktioneller Parameter für Östrogenität im Intestinaltrakt von OVX-Ratten. Da der Intestinaltrakt vor allem ER-Beta exprimiert und zudem eine wichtige Kontakt- und Aufnahmestelle für Lebensmittelkontaminanten darstellt, sind weitere Studien notwendig, um den spezifischen molekularen Mechanismus der Interaktion von Cd und dem Östrogenrezeptor zu untersuchen.

Archives of Toxicology, Impact Factor (2012): 4.674; Eigenanteil 10 % – Labortätigkeit, Auswertung der Ergebnisse, Co-Autor

Investigations on the estrogenic activity of the metallohormone cadmium in the rat intestine

Nicola Höfer · Patrick Diel · Jürgen Wittsiepe ·
Michael Wilhelm · Felix M. Kluxen · Gisela H. Degen

Received: 14 December 2009 / Accepted: 8 February 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract Cadmium (Cd), a toxic heavy metal and an important environmental pollutant, is now also regarded as potential endocrine disruptor. Its estrogenic effects have been examined so far just in classical target tissues, e.g. uterus, and mostly upon intraperitoneal (i.p.) injection of CdCl₂. Yet, estrogen receptors are also expressed in the gut, and food is the main source of cadmium intake in the general population. Therefore, possible estrogenic effects were now investigated in the intestine of ovariectomized Wistar rats after oral short- and long-term administration of CdCl₂ (0.05–4 mg/kg bw on 3 days by gavage and 0.4–9 mg/kg bw for 4 weeks in drinking water) or upon i.p. injection (0.00005–2 mg CdCl₂/kg bw), and compared to steroid estrogen (estradiol or ethinylestradiol) treated groups. Analysis of Cd in kidneys and small intestine by atomic absorption spectrometry showed dose-dependent increases in tissue levels with rather high Cd concentrations in the gut, both after oral and i.p. administration. Expression of metallothionein (MT1a), a typical metal response parameter, was clearly induced in kidney and

small intestine of several CdCl₂ treated groups, but also notably increased by steroid estrogens. Levels of estrogen-regulated genes, i.e. pS2/TFF1, vitamin D receptor (VDR), and estrogen receptor α and β (ER α/β) were studied as parameters of hormonal activity: The intestinal mRNA expression of pS2/TFF1 was significantly decreased in the estrogen reference groups, but also after single i.p. injection and oral long-term administration of CdCl₂. In contrast, the mRNA and protein expression of the VDR were unaffected by long-term administration of Cd via drinking water. We detected expression of ER β , but not ER α in the small intestine of OVX rats. ER β mRNA and protein expression were significantly down-regulated by Cd, similar to the ethinylestradiol reference group. The mRNA expression and immunostaining of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), as an index for cell proliferation, revealed decreases after long-term administration of Cd and ethinylestradiol. In summary, cadmium exposure was shown to modulate molecular and functional parameters of estrogenicity in the intestinal tract of OVX rats. As the intestine is known to express predominantly ER β , and is an important site of interaction with dietary contaminants, it is indicated to further investigate specific molecular mechanisms of cadmium and estrogen receptor interactions in more detail.

N. Höfer · P. Diel (✉) · F. M. Kluxen
Institute of Cardiovascular Research and Sports Medicine,
Department of Molecular and Cellular Sports Medicine,
German Sports University Cologne, Am Sportpark
Müngersdorf 6, 50933 Köln, Germany
e-mail: diel@dshs-koeln.de

N. Höfer · F. M. Kluxen · G. H. Degen
IfADo—Leibniz Research Centre for Working Environment
and Human Factors at the TU Dortmund, Ardeystr. 67,
44139 Dortmund, Germany

J. Wittsiepe · M. Wilhelm
Department of Hygiene, Social- and Environmental Medicine,
Ruhr-University Bochum, Universitätsstr. 150,
44801 Bochum, Germany

Keywords Cadmium · Endocrine disruption ·
Estrogenic activity · Route of exposure · Small intestine

Abbreviations

AAS	Atomic absorption spectrometry
bw	Body weight
CdCl ₂	Cadmium chloride
E ₂	17 β -Estradiol

EE	17 α -Ethinylestradiol
ER α/β	Estrogen receptor alpha/beta
i.p.	Intraperitoneal
OVX	Ovariectomized
(P)TWI	(Provisional) Tolerable weekly intake

Introduction

Cadmium has been recognized as an important occupational and environmental health hazard for many decades (Bernard 2008; Prins and Korach 2008; Nordberg 2009). The heavy metal exerts pronounced toxicity on kidney, lung, and bone of animals and humans as well as a wide spectrum of deleterious effects on reproductive tissues (DFG 2004; Godt et al. 2006; IPCS 2007). Moreover, cadmium is now also regarded as metalloestrogen and potential endocrine disruptor (Takiguchi and Yoshihara 2006; Byrne et al. 2009). Previous *in vitro* studies with CdCl₂ revealed activation of the estrogen receptor α (ER α) and typical estrogenic responses in MCF-7 breast cancer cells (Stoica et al. 2000). Rodent studies have shown that intraperitoneal (i.p.) injection of CdCl₂ increased uterine wet weights and promoted the growth and development of mammary glands (Johnson et al. 2003). But, since food is the most relevant source of cadmium exposure in non-smokers (EFSA 2009), *in vivo* studies were needed with oral Cd administration to assess its hormonal potency with a relevant exposure route.

Our recent study on estrogenicity of cadmium in the uterus, a classical estrogen target organ with predominant expression of ER α , included a wide range of doses and different administration schemes (Höfer et al. 2009): Ovariectomized Wistar rats received CdCl₂ on 3 days by gavage (0.05–4 mg/kg bw), and for 4 weeks in drinking water (0.4–9 mg/kg bw), or as single i.p. injection (0.00005–2 mg/kg bw). The analysis of molecular and histological parameters of estrogenicity and Cd tissue concentrations revealed pronounced dose- and route-dependent differences in uterine Cd levels and hormonal potency. Whilst the study confirmed an estrogenic effect of cadmium on the uterus upon i.p. injection, it also demonstrated considerably lower activity for oral exposure: Treatment with CdCl₂ (up to several mg/kg bw) by gavage or in drinking water did neither affect uterine wet weights nor epithelial thickness (Höfer et al. 2009). On the other hand, estrogen-regulated complement component C3 was clearly induced in the rat uterus, albeit at dose levels far exceeding those of dietary Cd exposure in humans.

This and previous data (reviewed by Takiguchi and Yoshihara 2006) demonstrate that signaling cascades in

classical estrogen target tissues can be affected by the metal ion. A model where Cd, similar to estradiol, activates ER α through the ligand binding domain has been proposed (Byrne et al. 2009). But, the precise mechanisms underlying estrogenic effects of cadmium remain to be elucidated, and also the question whether cadmium affects ER β -mediated responses. ER β is the predominant receptor form in the intestinal tract, and processes involved in inflammation of the gut and regulation of intestine cell homeostasis are apparently regulated by estrogens (Harnish 2006; Harris et al. 2003; Harris 2007; Wada-Hiraike et al. 2006a, b; Seibel et al. 2008). Moreover, the intestinal mucosa is extensively exposed to dietary constituents, e.g. phytoestrogens, and to contaminants such as cadmium.

Therefore, we have now investigated effects of cadmium on the intestinal tract of ovariectomized rats treated at several dose levels. The expression of pS2 gene, vitamin D receptor (VDR), and ER subtypes α and β served as biomarkers for estrogenicity. Effects on cell proliferation were studied by immunohistochemical and mRNA analysis of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the cadmium- and estrogen-treated rats. Cd tissue levels were analyzed by atomic absorption spectrometry in the kidney and small intestine of all groups after oral exposure and i.p. injection, and expression of metallothionein was determined as well established response marker to cadmium.

Materials and methods

Animals and experimental treatments

All animal husbandry and handling conditions were according to the Institutional Animal Care and Use Committee guidelines, and legal permission to conduct the animal experiments was obtained from the local responsible authorities.

Juvenile female Wistar rats of 4–5 weeks (101–125 g) were obtained from Janvier (Le-Genest St-Isle, France) and acclimatized for one week. Rats were kept under controlled conditions (temperature 20 $\pm$ 1°C, humidity 50–80%, illumination 12L/12D) and had free access to tap water and a diet low in phytoestrogen content (R/M-H, from Ssniff GmbH, Germany). Prior to the experiments, ovaries of the rats were ectomized (OVX). After the endogenous hormonal decline within 14 days, the animals were randomly allocated to vehicle or treatment groups (i.p. and drinking water experiment: n = 6 animals per group; gavage experiment: n = 8 animals per group).

Treatment conditions, described elsewhere in more detail (Höfer et al. 2009) were as follows: For the experiment with i.p. injection, CdCl₂ was dissolved in sterile water to achieve doses of 0.00005, 0.0005, 0.005, 0.05, 0.5,

or 2 mg/kg bw in an application volume of 1 ml/kg bw.; 17 β -estradiol (E₂) was dissolved in propanediol/ethanol (80:20, v:v) and administered at a dose level of 0.5 mg/kg bw. For gavage administration, CdCl₂ was dissolved in tap water and administered at doses of 0.05, 0.5, 2, or 4 mg/kg bw on three consecutive days; the estrogen reference group received ethinylestradiol (EE, dissolved in propanediol/ethanol, 80:20) at a daily dose of 0.1 mg/kg bw. For the subchronic (28 day) experiment, test compounds were administered in drinking water: EE (1 mg) was dissolved in a small amount of ethanol and then filled up to 1 L drinking water. CdCl₂ was dissolved in water at concentrations of 5, 50 or 150 mg/l (i.e. 5, 50, or 150 ppm). As rats consumed about 20 ml water per day this corresponds to Cd dose levels of 0.4, 4, or 9 mg/kg bw/day and 0.08 mg/kg bw/day for EE.

Tissue collection and preparation

Body weights of the rats were determined prior to sacrifice by decapitation. Freshly excised kidney and pieces of small intestine were collected and snap-frozen in liquid nitrogen for RNA/protein preparations and for cadmium analysis (see below). In addition, a piece of the small intestine was fixed in 4% formaldehyde and later embedded in paraffin for histological analysis.

RNA isolation and realtime RT-PCR

Total RNA of small intestine mucosa was isolated from frozen tissue with TRIzol[®] (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), according to the method of (Chomczynski and Sacchi 1987). TRIzol[®], a solution of phenol and guanidine for the isolation of total RNA from cells and tissues, was used followed by an enzymatic digestion of DNA (Desoxyribonuclease I, Karlsruhe, Invitrogen). First-strand cDNA synthesis was accomplished with SuperScript[®] Kit (Invitrogen). Amplification of cDNA by real-time RT-PCR was performed in a MX3005P thermal cycler (Stratagene) or an iCycler (Bio-Rad). The protocol comprised 5 min at 95°C followed by 45 cycles of 94, 60 and 72°C for 1 min each. For subunit 1A of cytochrome c oxidase we used the forward 5'-CGTCACAGCCCATGCATTCG-3' and the reverse 5'-CTGTTCATCCTGTTCCAGCTC-3', for VDR the forward primer 5'-GTGACTTTGACCGGAACGTG-3' and as reverse primer 5'-ATCATCTCCCTCTTACGCTG-3', for MT1a the forward primer 5'-TTACACCGTTGCTCCA GATTC-3' and as reverse primer 5'-CAGCACTGTTCTGT CACTTCAG-3', for pS2 the forward primer 5'-GGAAA AGGGTTGCTGTTTGG-3' and as reverse primer 5'-ACA GGTGTGTATGAAGCAGGTG-3' and for ER β we used forward primer 5'-CTACAGAGAGATGGTCAAAAGTG GA-3' and as reverse primer 5'-GGGCAAGGAGACAGA

AAGTAAGT-3', for PCNA we used forward primer 5'-GAGCAACTTGGAATCCCAGAACAGG-3' and as reverse primer 5'-CCAAGCTCCCCACTCGCAGAAAA CT-3'. The data were normalized relative to 1A expression via the delta-delta method of (Pfaffl 2001), where subunit 1A of cytochrome c oxidase served as reference gene.

Western blot analysis

Pooled frozen small intestine mucosa samples were homogenized and soaked in lysis buffer (50 mM Tris pH 8; 2 mM CaCl₂, 80 mM NaCl, 1% Tx100) with enzyme inhibitor PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride, dissolved in isopropanol) at final 10 mM. The protein concentrations were determined using DC Protein Assay (Bio-Rad, München, Germany). Equal amounts of sample protein (40 μ g), charged with equal amounts of SDS-loading buffer (4% SDS (sodium dodecyl sulfate), 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 0.04% bromophenolblue, 0.125 M Tris (pH 6.8) were loaded on a NuPAGE Novex 4–12% Bis–Tris Midi Gel (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), electrophoresed at 90 mA for 60 min and blotted onto nitrocellulose membranes (Hartenstein, Würzburg, Germany). The membranes were blocked with 5% BSA (bovine serum albumin, K41-001, PAA Laboratories, Pasching, Austria) in phosphate buffered saline at room temperature for 1 h.

Primary antibodies were diluted in 5% BSA in phosphate buffered saline: Actin 1:500 (A 5060, Sigma–Aldrich, Deisenhofen, Germany), VDR 1:300 (ab54387, Abcam, Camebridge, UK), ER β 1:200 (sc-8974, Santa Cruz, Heidelberg). Membranes were incubated with primary antibody solution over night at 4° and rinsed five times for 5 min each in PBS-T. Polyclonal Rabbit Anti-Mouse (P0260, Dako, Hamburg, Germany) was used as species-specific HRP-conjugated secondary antibody as well as Rabbit Anti-Rat (E0468, Dako, Hamburg, Germany: membrane was additionally incubated with horseradish peroxidase-complex since this second antibody is not HRP-conjugated). Membranes were again rinsed three times for 5 min each in PBS-T and then two times in PBS. Blot signals were visualized by the chemoluminescent POD-Substrate (Lumi-Light Plus, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and quantified by densitometry using the software Image J 1.38 (National Institutes of Health, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). The ratio of the reference protein to the target protein was calculated to account for inhomogeneous protein loading; actin served as reference protein.

Immunohistochemistry

Pieces of small intestine were fixed in neutral buffered formalin before being embedded in paraffin wax. 7 μ m

sections were mounted on slides precoated with polylysine (Menzel Gläser, Hilden, Germany), then cleared, hydrated and washed with PBS. Endogenous peroxidase was blocked with 0.3% hydrogen peroxide in methanol, followed by another wash with PBS. The cell wall was lysed with 0.25% Triton-X-100 in PBS. The slides were washed with PBS again prior to the blocking with 5% BSA. Sections were incubated with the primary antibody PCNA (1:100, M0879, Dako, Glustrup, Denmark) at 4° over night, washed with PBS and incubated with second antibody at room temperature for 1 h and washed with PBS. Sections were incubated with horseradish peroxidase-complex (HRP horseradish peroxidase, RPN1051, GE Healthcare, Munich, Germany), prior to addition of the substrate 3,3-diaminobenzidine (DAB). Control sections were processed as above, omitting the primary antibody. Sections were examined with a light microscope (Axiophot, Zeiss, Jena, Germany).

Cadmium measurements

The Cd content was analyzed by atomic absorption spectrometry (AAS) after sample preparation as described before (Höfer et al. 2009). In brief, the tissues were dried in a Speed Vac RC 1022 Jouan (Thermo Scientific) for 4 h at 60°C. HNO₃ (65%, puriss. p. a., Fluka, Buchs, Switzerland) was added to lyophilized organ samples (kidneys about 80–190 mg or pooled intestine for each dose group), digested with a high performance microwave system. A solution prepared from digested sample and bidistilled water was used for determination of cadmium by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS). For internal quality control together with each digestion run also reference material “Bovine Liver”, BCR No.185R Lot 0940 (LGC-Standards, Wesel, Germany) was analyzed. The detection limit was 5.0 µg/kg dry weight when using 100 mg lyophilisate.

Statistical analysis

Data on cadmium content in the kidneys were expressed as mean ± S.D. We used two-way analysis of variance followed by pair-wise comparison of selected means with the Mann–Whitney U test. Differences in gene expression were assessed by one-way ANOVA followed by Tukey's a posteriori test. Significance was set at * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$.

Results

Studies were conducted in ovariectomized (OVX) female Wistar rats using different administration routes and

treatment schemes for cadmium to assess its estrogenic effects, also in relation to steroid estrogen reference groups: In the first experiment, rats received a single i.p. injection of CdCl₂ at doses between 0.00005 and 2 mg/kg bw. Secondly, CdCl₂ was administered by gavage at doses of 0.05, 0.5, 2, and 4 mg/kg bw/d for 3 days. Moreover, CdCl₂ was given for 28 days in drinking water (5, 50 and 150 ppm) that provided daily oral doses of 0.4, 4 and 9 mg/kg bw. At termination of all three experiments, we have determined body and organ (liver, kidney) weights as indicators of cadmium toxicity, and also Cd contents in blood, liver and uteri as well as molecular and histological parameters of estrogenicity in the classical target tissue uterus (data given in Höfer et al. 2009). The second part of our investigation is reported here: It focused on studies of estrogenic effects of cadmium in the rat intestine, and included analysis of intestinal estrogen-regulated gene expression and the proliferation marker PCNA, along with an analysis of metallothionein (MT1a) expression and Cd contents in small intestine and in kidney.

To study the distribution of cadmium after i.p. and oral short-/long-term administration, the content in kidney and small intestine was measured by atomic absorption spectrometry (Table 1). As expected, Cd contents in these tissues increased with the administered dose. In the *kidneys*, the highest Cd levels were found after i.p. injection: Rats treated with 0.005 up to 2 mg/kg bw had significantly higher Cd-levels (0.07 up to 21 µg/g dry weight) compared to the OVX controls (0.05 µg/g dry weight). Gavage and drinking water administration led to much lower Cd levels in the kidneys (5.5 and 7.2 µg/g dry weight at the top doses of 4 and 9 mg/kg bw, respectively) than i.p. injection. Rats treated i.p. with a single dose of 0.5 or 2 mg CdCl₂/kg bw showed 14- and sevenfold higher kidney levels than animals treated orally for 3 days with the same doses, which documents a clear route-dependent difference in Cd content for this organ. Interestingly, rats receiving ethinylestradiol in the subchronic experiment showed elevated kidney Cd levels compared to the OVX control, an observation indicative of a possible role for estrogens in the disposition of cadmium (Blazka and Shaikh 1991).

The analysis of Cd-contents in the *small intestine* (Table 1) revealed also dose-related increases in Cd tissue levels. But, in this case the highest levels were found upon oral short-term administration: Three daily doses of 0.05–4 mg CdCl₂/kg bw by gavage resulted in Cd-levels of 0.94 up to 56.5 µg/g dry weight in the small intestine. Interestingly, oral administration by drinking water for 28 days led to clearly lower Cd-levels in the small intestine, with up to 8.3 µg/g dry weight. After i.p. injection of the heavy metal (up to 2 mg/kg bw) the intestinal Cd-levels ranged between 0.44 and 7.05 µg/g dry weight. These data indicate interesting differences for Cd-deposition in the small

Table 1 Cadmium content ($\mu\text{g/g}$ dry weight) in rat kidneys and small intestine after a single i.p. injection of CdCl_2 or E_2 and after oral short-term (3 days by gavage) and long-term (4 weeks by drinking water) administration of CdCl_2 or EE

Application	Dose (mg/kg b.w)	Kidney ^a		Small intestine ^b
		Dry weight ($\mu\text{g/g}$)	S.D.	Dry weight ($\mu\text{g/g}$)
i.p.	OVX	0.05	0.01	0.31
	Cd 0.00005	0.06	0.01	0.44
	Cd 0.0005	0.06	0.01	0.34
	Cd 0.005	0.07*	0.01	0.47
	Cd 0.05	1.03**	0.98	0.74
	Cd 0.5	7.33**	3.44	2.15
	Cd 2	20.97**	13.05	7.05
	E_2 0.5	0.06	0.03	0.34
Gavage	OVX	0.04	0.00	0.30
	Cd 0.05	0.08***	0.03	0.94
	Cd 0.5	0.50***	0.10	9.60
	Cd 2	2.89***	0.58	20.00
	Cd 4	5.50***	0.62	56.50
	EE 0.1	0.04	0.00	0.31
Drinking water	OVX	0.07	0.02	0.45
	Cd 0.4	n.d.	–	0.73
	Cd 4	n.d.	–	2.40
	Cd 9	7.22**	1.49	8.30
	EE 0.08	0.30*	0.23	0.44

n.d. Not determined

* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ significantly different from the control group (OVX); Mann–Whitney U -test^a For kidneys, mean values $\pm$ S.D. are given for $n = 6$ animals per dose group in the i.p. and drinking water experiment, and for $n = 8$ animals in the gavage experiment^b For the small intestine Cd-content was determined in tissue samples pooled for each dose group, the values therefore represent averages

intestine for different exposure routes and treatment duration.

The mRNA expression of metallothionein (MT1a) was investigated as a classical response parameter to cadmium exposure and toxicity (Chan and Cherian 1992; Chan et al. 1992; Jin et al. 1998; Ghoshal and Jacob 2001), both in the small intestine and in kidney. Results of this analysis are depicted in Figs. 1 and 2 for experiments with i.p. and gavage administration. Single injections of CdCl_2 resulted in an increased MT1a mRNA expression of about two- to three-fold at the top dose of 2 mg/kg bw (Fig. 1). Interestingly, MT1a expression in the small intestine and kidney was also increased at the lowest i.p. dose of 0.00005 mg/kg bw, and significantly higher in the kidney of E_2 -treated rats. After short-term oral treatment with CdCl_2 (Fig. 2a), MT1a level were strongly (almost tenfold) increased in the

small intestine, with an apparently bell-shaped dose–response between 0.5 and 4 mg/kg bw. In the kidney, MT1a was also induced, with the strongest effect (about ninefold) in the 2 mg CdCl_2/kg bw/day dose group, and a notable (four-fold) increase in the steroid estrogen group (Fig. 2b).

In focusing now on hormonal effects of cadmium in the small intestine, we investigated the expression of selected estrogen-regulated genes and proliferation as additional functional aspect. These results are shown in Figs. 3, 4, 5, 6 and 7.

The mRNA levels of pS2 (also known as TFF1: trefoil factor family 1) were examined in rats after single i.p. injection of CdCl_2 or subchronic exposure to the heavy metal ion with drinking water and in rats treated with steroid estrogens. As expected, pS2/TFF1 expression was significantly down-regulated in the estrogen-treated groups (Fig. 3a, b) compared to OVX controls. Likewise, mRNA expression of pS2/TFF1 was also strongly decreased after cadmium exposure (Fig. 3), with two exceptions (at one i.p. and one subchronic dose group). Whilst the lack of a decrease in the first case may be explained with the low Cd-level determined in the small intestine (at i.p. dose of 0.0005 mg/kg bw; Table 1) of the rats, we have no explanation for the response of the other, orally exposed Cd group.

The vitamin D receptor (VDR) served as another parameter for assessing estrogenic activity, since previous studies have shown that VDR is up-regulated in the duodenum after exposure to estrogens (Gilad et al. 2005; Gilad et al. 2006). We observed an increased VDR expression by real-time PCR analysis and Western blotting in the small intestine of the estrogen reference group in the subchronic oral experiment (Fig. 4). But, 4 weeks of exposure to cadmium by drinking water had no significant effect on the VDR expression in the small intestine of our rats.

Because of our interest in a possible modulation of estrogen receptors in the small intestine, we first analyzed the expression of $\text{ER}\alpha$ and $\text{ER}\beta$ in this tissue and in the uterus (Fig. 5a, b). In accordance with the literature (Kuiper et al. 1997), we detected $\text{ER}\alpha$ to be the predominant receptor form expressed in the uterus. In the small intestine of our OVX rats we could not detect any expression of the α -subtype, but weak expression of the $\text{ER}\beta$ (Fig. 5). By means of qPCR and Western blotting analysis we then examined $\text{ER}\beta$ expression in the small intestine (mucosa) of rats after oral exposure to CdCl_2 or to EE for 28 days: The treatment apparently decreased $\text{ER}\beta$ mRNA levels compared to OVX controls (Fig. 6a). $\text{ER}\beta$ expression analysis at the protein level confirmed a strong down-regulation in mucosa of estrogen-treated and cadmium-exposed groups, with a clear dose-related effect in the latter (Fig. 6b, c).

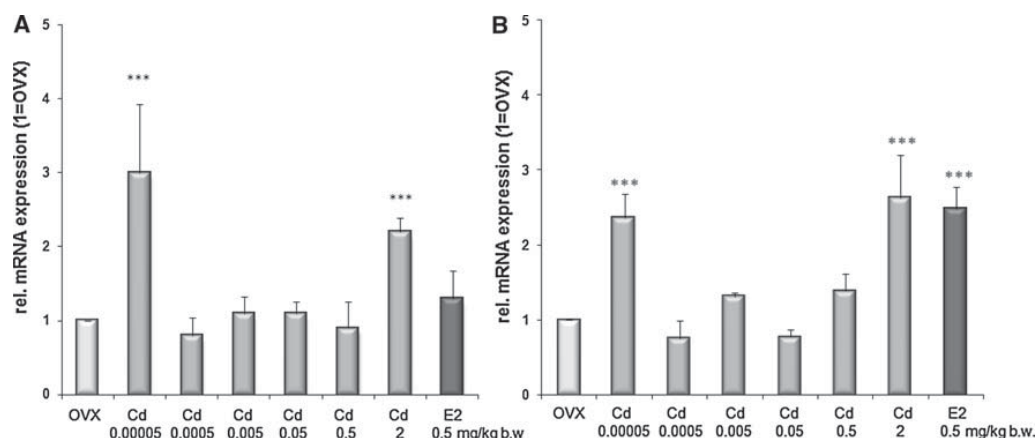


Fig. 1 Relative mRNA expression of metallothionein 1a (MT1a) in the mucosa of the small intestine (a) and in the kidney (b) after a single i.p. injection of CdCl₂ or E2. Mean values $\pm$ S.D. are given for

$n = 6$ animals per dose group. *** $P \leq 0.001$ significantly different from the control group (OVX), ANOVA

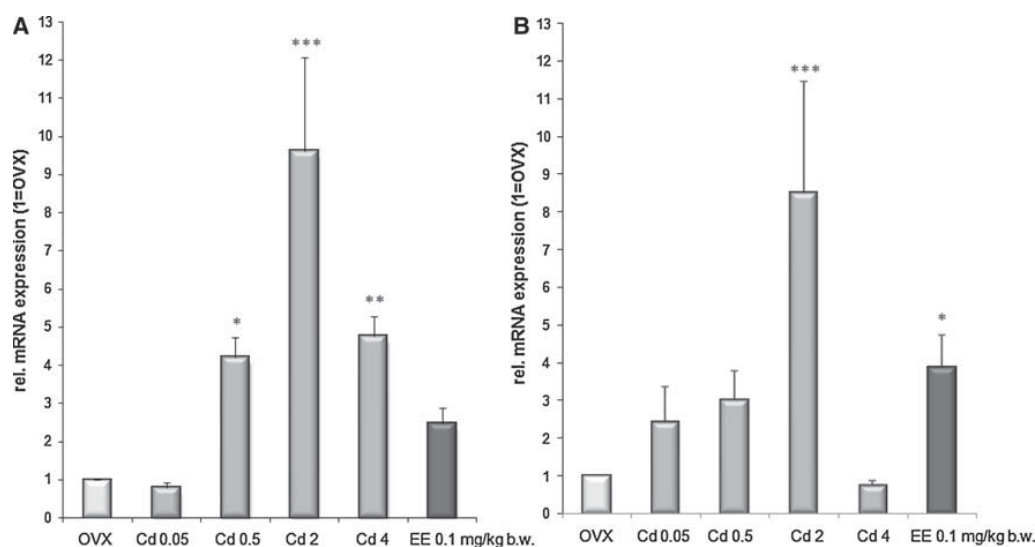


Fig. 2 Relative mRNA expression of metallothionein 1a (MT1a) in the mucosa of the small intestine (a) and in the kidney (b) after oral short-term administration of CdCl₂ or EE (3 days by gavage). Mean

values $\pm$ S.D. are given for $n = 8$ animals. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ significantly different from the control group (OVX), ANOVA

PCNA served as marker for cell proliferation (Koroxenidou et al. 2005; Diel et al. 2005). The mRNA expression and immunohistological examination showed a significant decrease of PCNA after oral long-term treatment with 9 mg CdCl₂/kg bw and 0.08 mg/kg bw EE, respectively (Fig. 7a, b).

Discussion

Estrogenicity of cadmium (Cd) has been investigated so far in classical hormone target tissues by several groups

(Johnson et al. 2003; Alonso-González et al. 2007; Zhang et al. 2007; Höfer et al. 2009). This is, to the best of our knowledge, the first study on possible estrogenic effects of the metalloprotein in the intestinal tract. We also determined metal tissue levels for different routes and duration of exposure. As shown in Table 1, administration of CdCl₂ resulted in clearly elevated heavy metal levels in the kidney, a well known target tissue for cadmium toxicity, and also in the small intestine. To link Cd exposure to a typical metal response parameter, we first investigated the expression of the metallothionein (MT) gene MT1a. MTs are a family of low-molecular-weight and cysteine-rich proteins comprised

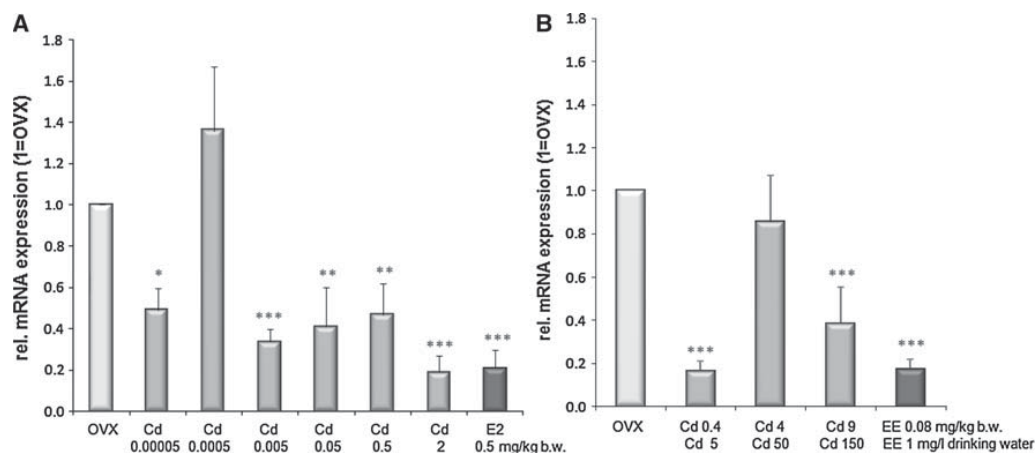


Fig. 3 Relative mRNA expression of pS2/TFF1 in the mucosa of the small intestine after **a** a single i.p. injection of CdCl₂ or E2, **b** after long-term administration of CdCl₂ or EE (4 weeks, by drinking

water). Mean values $\pm$ S.D. are given for $n = 6$ animals per dose group. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ significantly different from the control group (OVX), ANOVA

of four major classes and isoforms (Thirumoorthy et al. 2007). MT-I and MT-II are ubiquitously expressed and induced by a wide range of metals, drugs, inflammatory mediators and other factors (Klaassen et al. 1999; Coyle et al. 2002; Sato and Kondoh 2002). In ovariectomized rats, a single i.p. injection of 0.00005–2 mg CdCl₂/kg bw resulted in a similar modulation of MT1a expression in the kidney and in the small intestine (Fig. 1), with the lowest and highest administered doses of CdCl₂ increasing MT1a in both organs about threefold. The apparently U-shaped dose–response for MT1a was unrelated to Cd-content measured in the intestine after i.p. injection (Table 1).

Conversely, after oral short-term administration the MT1a expression in the intestine and in the kidney was dose dependently stimulated (Fig. 2), with a bell-shaped dose–response between 0.05 and 4 mg/kg bw and a stronger, up to tenfold increase of MT mRNA levels than upon i.p. injection. This result is in accordance with previous studies demonstrating that oral Cd administration increased mucosal MT levels more efficiently than parenteral (s.c.) injection (Elsenhans et al. 1994). That the highest oral dose of 4 mg CdCl₂/kg bw led to a less pronounced MT1a expression (about fivefold) in the small intestine compared to the group treated with 2 mg CdCl₂/kg bw (about ten-fold) might be due to an elevated excretion of Cd in the lumen or a release of mucosal cells as a consequence of local toxicity. Toxicity could also explain the lack of MT1a induction in the kidney observed after oral administration of 4 mg CdCl₂/kg bw, since Cd can cause renal damage at as low concentrations as 10 μ g per g (Nordberg 1998), and high Cd levels were found in kidney (>50 μ g/g; Table 1).

Remarkably, also the steroids estradiol and ethinylestradiol increased the MT1a expression after i.p. and oral

administration, with significant effects in the kidneys, indicating that MT1a is an estrogen responsive gene. This result is in line with previous in vivo studies demonstrating an increase of metallothionein after steroid estrogen treatment in kidneys (Blazka and Shaikh 1991) and in uterus (Rivera-Gonzalez et al. 1998). This raises the possibility that the stimulation of MT1a by Cd is an ER-mediated effect, rather than due to metal-induced oxidative stress. To answer this question further experiments using combinations of Cd and ER-antagonists will be performed in the future.

To investigate whether Cd exerts ER-mediated effects in the intestine, we assessed expression of genes known to be regulated by steroid estrogens, e.g. the classical ER-regulated gene pS2/TFF1 gene. PS2 is modulated by estradiol, not only in typical estrogen target cells such as MCF-7 (Brown et al. 1984), but also in the gut (Singh et al. 1998). The pS2 mRNA expression in the small intestine of the OVX rats in the i.p. and in the 28-days experiment was significantly down-regulated upon treatment with the steroid estrogens, and also after treatment with Cd at most dose levels (Fig. 3). To date, effects of Cd on the pS2 gene expression in the gut have not been studied. On the other hand, in Wistar rats exposed to water restraint stress (WRS) that induced gastric lesions, (Nie et al. 2004) observed an increase in pS2 expression. Interestingly, (Murphy 1998) and (Marchbank et al. 1998) assume a role in mucosal healing for pS2, and (Singh et al. 1998) detected pS2 mRNA with a significantly higher signal intensity in normal mucosa compared with cancer tissue.

The vitamin D receptor (VDR) served as another parameter of estrogenic activity. Previous studies have shown that the VDR is up-regulated in vitro in intestinal HT-29 cells (Gilad et al. 2006), and also in vivo in rat

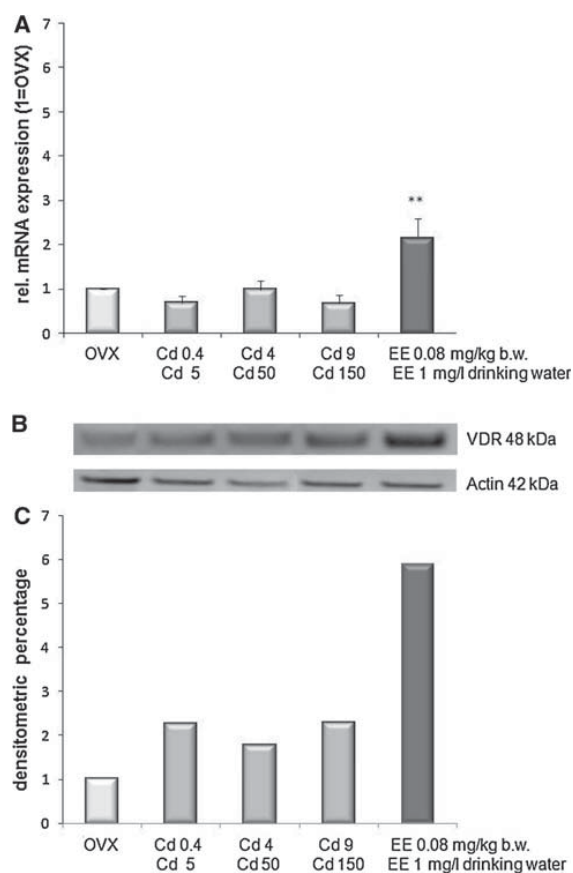


Fig. 4 Relative mRNA expression of vitamin D receptor (VDR) (a) and (b) Western blot analysis with associated densitometric analysis (c) of VDR protein expression in mucosa from control (OVX), Cd (longterm, 28 days) and EE-treated rats. **a** Mean values $\pm$ S.D. are given for $n = 6$ animals per dose group. ** $P \leq 0.01$ significantly different from the control group (OVX), ANOVA

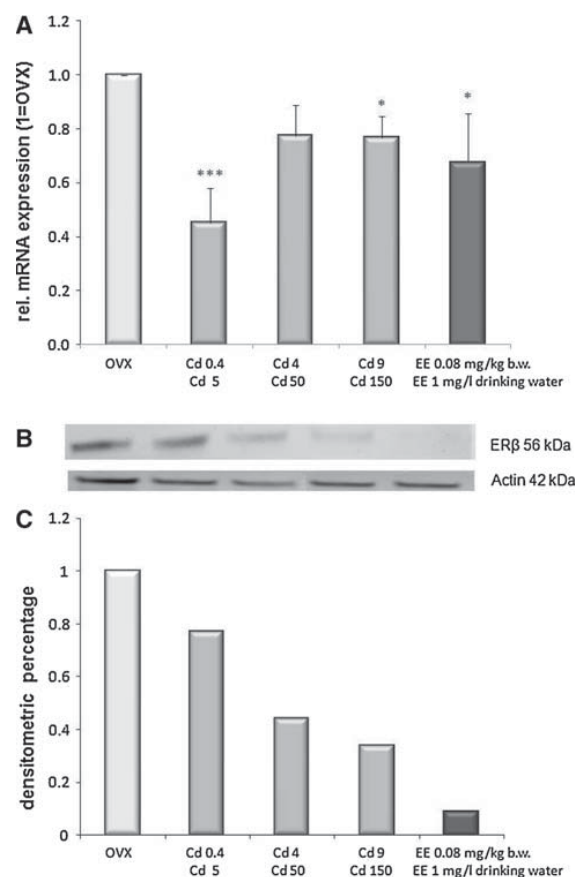


Fig. 6 Expression of estrogen receptor beta ($ER\beta$): Analysis of mRNA (a), and Western blot analysis (b) with associated densitometric analysis (c) of $ER\beta$ protein in the mucosa of the small intestine of rats treated with $CdCl_2$ and EE by drinking water for 28 days (longterm-experiment). **a** Mean values $\pm$ S.D. are given for $n = 6$ animals per dose group. * $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$ significantly different from the control group (OVX), ANOVA

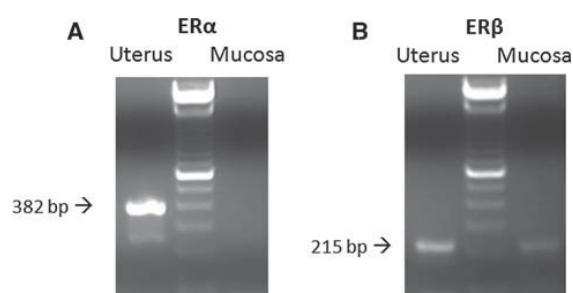
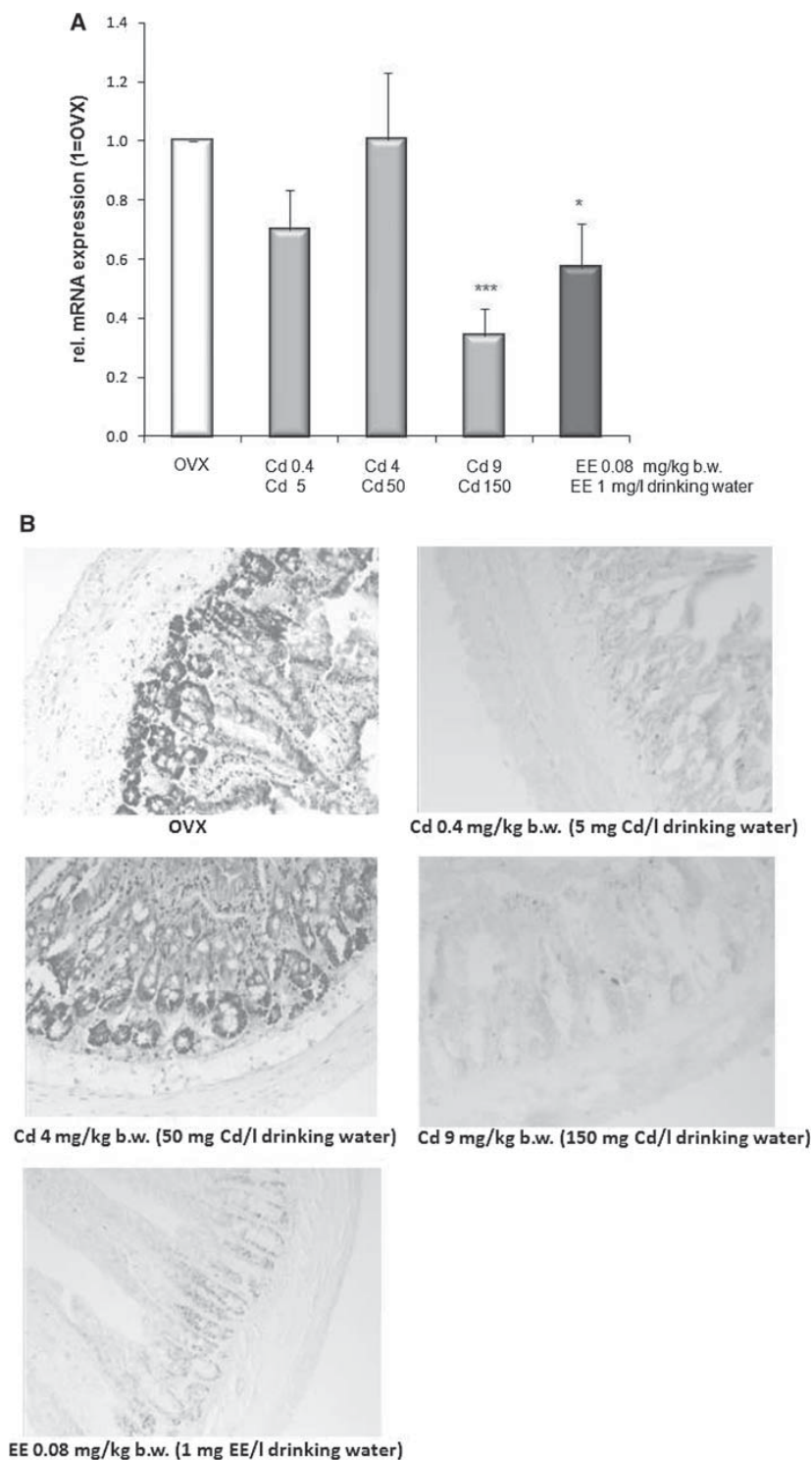


Fig. 5 $ER\alpha$ (a) and $ER\beta$ (b) expression in the uterus and mucosa of the small intestine of OVX Wistar rats

colonocytes and duodenocytes after exposure to estrogens (Liel et al. 1999; Schwartz et al. 2000). In line with this data, we found a clearly increased VDR expression by qPCR analysis and Western blotting in small intestine of

the EE treated group, whereas the 4-week oral administration of 0.4, 4 and 9 mg $CdCl_2/kg$ bw/day by drinking water showed no significant effects on VDR mRNA and protein expression in the small intestine of the rats (Fig. 4). Both, the different response of the VDR to steroid hormone and to Cd, and the comparable response of pS2–these compounds, are indicative for an estrogen receptor-mediated effect. These distinct responses can be explained in considering mechanisms of estrogen signaling for the two genes: The estrogen receptor contains eight conserved cysteine residues rich in SH-groups (Pettersson and Gustafsson 2001). The heavy metal Cd can readily bind to sulfhydryl-groups, apparently also at the 17β -estradiol binding site of the receptor (Young et al. 1977). As a result of interaction with the metalloestrogen, two estrogen receptors could then dimerize and bind to the estrogen

Fig. 7 Relative mRNA expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the mucosa of the small intestine (**a**), **b** immunohistochemical staining of PCNA in cross sections of the small intestine of control (OVX), Cd- and EE-treated animals (drinking water experiment). **a**: Mean values $\pm$ S.D. are given for $n = 6$ animals per dose group. $*P \leq 0.05$, $***P \leq 0.001$ significantly different from the control group (OVX), ANOVA



responsive elements (EREs) in the promoter region of target genes, as it happens after the usual activation by natural ligands and other estrogenic compounds (Nilsson et al. 2001; Byrne et al. 2009). The pS2 gene possesses an ERE in the promoter (Ribieras et al. 1998), and in our experiments this target gene was similarly affected by Cd and steroid hormone. But, there is no evidence for the existence of EREs within the promoter of the VDR gene (Gilad and Schwartz 2007), and upregulation of VDR gene expression by estradiol involves phosphorylation of Raf, ERK 1/2 and c-Jun (Gilad et al. 2005; Gilad et al. 2006; Gilad et al. 2007). It is unclear at present whether the metallohormone can activate these signaling events in the intestine which expresses subtype ER β . Cd was found to trigger a transient phosphorylation of ERK in MCF-7 cells expressing ER α , but not in MDA-MB231 cells that express only ER β (Liu et al. 2008). It is worth noting in this context that ER α was detected in the uterus, but not in the small intestine of our rats, whilst the ER β subtype was expressed in this tissue (Fig. 5). This expression pattern for ER α and β is in line with literature data on their tissue distribution (Kuiper et al. 1997; Kuiper et al. 1996; Enmark and Gustafsson 1999; Gustafsson 2000; Diel 2002; Couse and Korach 2004).

Estrogen receptor expression is known to be modulated by the natural ligand 17 β -estradiol (Grody et al. 1982; Enmark and Gustafsson 1999; Deroo and Korach 2006). Thus, we further investigated the potential modulation of the estrogen receptor subtype β in the small intestine of rats upon treatment with Cd: Using real-time PCR and Western blotting, we found a dose dependent down-regulation of ER β in small intestine at the mRNA (Fig. 6a) and also at the protein level (Fig. 6b, c) after long-term metallo-hormone (0.4, 4 and 9 mg CdCl₂/kg bw/d with drinking water) and steroid estrogen (EE 0.08 mg/kg/d) treatment. The ER β has been shown to play a crucial role in the regulation of inflammation (Gustafsson 2003; Harris et al. 2003; Harnish et al. 2004; Harnish 2006), and in tumour progression (Foley et al. 2000; Konstantinopoulos et al. 2003; Bardin et al. 2004; Martinetti et al. 2005).

Recently, we have demonstrated a modulation of tissue homeostasis in the intestine and colon by ER β -selective ligands (Fritzemeier et al. 2008). Therefore, we also studied the effects of Cd administration on intestinal tissue homeostasis. When measuring PCNA mRNA expression as an index for proliferation in the oral long-term experiment, we observed a significant decrease of PCNA in the groups treated with 9 mg CdCl₂/kg bw and 0.08 EE/kg bw, respectively, and the immunohistological examination of small intestine slices revealed the same picture (Fig. 7). Previously, Zhang et al. (2007) found a decreased expression of PCNA in the endometrium after i.p. injection of 1.2 mg CdCl₂/kg bw. Significant reductions in PCNA

expression have been described after oral administration of ethinylestradiol and/or ER β -selective ligands (Fritzemeier et al. 2008). This data supports the view that also Cd modulates intestinal tissue homeostasis via ER β -mediated mechanisms, although this has to be confirmed in future investigations.

In summary, data of the present study demonstrate a dose- and route dependent distribution of Cd in rats, with the highest levels in kidney upon i.p. injection, and in the intestine upon gavage administration. The heavy metal did induce metallothionein (MT1a) in both organs, with stronger effects upon oral administration. Novel and more important is the finding that classical response parameters for estrogenicity were affected concomitantly in the small intestine: Both, estrogen-responsive pS2 gene and ER β were clearly down-regulated by oral Cd administration. These effects are of concern with regard to intestinal diseases as pS2 is involved in mucosal healing and ER β in inflammatory bowel diseases. Moreover, a loss of ER β has been observed in the progression of intestinal cancers. Further studies are indicated to investigate specific mechanisms of Cd interactions with ER β , and studies on immunomodulatory effects of the heavy metal (Pillet et al. 2006), in particular in the gut as a tissue with high local Cd concentrations. Both aspects are important, even though EFSA has recently lowered PTWI values for Cd in food (EFSA 2009).

Acknowledgments Financial support by the Deutsche Forschungsgemeinschaft through DFG graduate colleague GRK 1427: “Food constituents as triggers of nuclear receptor-mediated intestinal signalling” and a stipend to N.H. are gratefully acknowledged. The authors wish to thank Ute Laudenbach-Leschowski for expert technical assistance in the conduct of the animal studies.

References

- Alonso-González C, González A, Mazarrasa O, Güezmes A, Sánchez-Mateos S, Martínez-Campa C, Cos S, Sánchez-Barceló EJ, Mediavilla MD (2007) Melatonin prevents the estrogenic effects of subchronic administration of cadmium on mice mammary glands. *J Pineal Res* 42:403–410
- Bardin A, Boule N, Lazennec G, Vignon F, Pujol P (2004) Loss of ER β expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocr Relat Cancer* 11(3):537–551
- Bernard A (2008) Cadmium & its adverse effects on human health. *Indian J Med Res* 128(4):557–564
- Blazka ME, Shaikh ZA (1991) Sex differences in hepatic and renal cadmium accumulation and metallothionein induction. Role of estradiol. *Biochem Pharmacol* 41(5):775–780
- Brown AM, Jeltsch JM, Roberts M, Chambon P (1984) Activation of pS2 gene transcription is a primary response to estrogen in the human breast cancer cell line MCF-7. *Proc Natl Acad Sci USA* 81(20):6344–6348
- Byrne C, Divekar SD, Storch GB, Parodi DA, Martin MB (2009) Cadmium—a metallohormone? *Toxicol Appl Pharmacol* 238(3):266–271

- Chan HM, Cherian MG (1992) Protective roles of metallothionein and glutathione in hepatotoxicity of cadmium. *Toxicology* 72(3):281–290
- Chan HM, Satoh M, Zalups RK, Cherian MG (1992) Exogenous metallothionein and renal toxicity of cadmium and mercury in rats. *Toxicology* 76(1):15–26
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1):156–159
- Couse JF, Korach KS (2004) Estrogen receptor- α mediates the detrimental effects of neonatal diethylstilbestrol (DES) exposure in the murine reproductive tract. *Toxicology* 205(1–2):55–63
- Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM (2002) Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci* 59:627–647
- Deroo BJ, Korach KS (2006) Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest* 116(3):561–570
- DFG (2004) Cadmium und seine anorganischen Verbindungen. Arbeitsmedizinisch-toxikologische Begründungen von MAK-Werten, 39. Lieferung. Wiley, Weinheim
- Diel P (2002) Tissue-specific estrogenic response and molecular mechanisms. *Toxicol Lett* 127(1–3):217–224
- Diel P, Laudenbach-Leschowsky U, Friedel A, Voss A, Roussel J (2005) Pulsed estradiol exposure has a limited ability to induce uterine proliferation in ovariectomised female Wistar rats. *Mol Cell Endocrinol* 230(1–2):7–15
- EFSA (2009) Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European commission on cadmium in food. *EFSA J* 980:1–139
- Elsenhans B, Kolb K, Schumann K, Forth W (1994) The longitudinal distribution of cadmium, zinc, copper, iron, and metallothionein in the small-intestinal mucosa of rats after administration of cadmium chloride. *Biol Trace Elem Res* 41(1–2):31–46
- Enmark E, Gustafsson JA (1999) Oestrogen receptors—an overview. *J Intern Med* 246(2):133–138
- Foley EF, Jazaeri AA, Shupnik MA, Jazaeri O, Rice LW (2000) Selective loss of estrogen receptor beta in malignant human colon. *Cancer Res* 60(2):245–248
- Fritzscheier KH, Hertrampf T, Diel P (2008) Alpha estratriene derivatives as ER-beta selective ligands for the prevention of intestinal cancer. European Patent No. 08160239.3–2123
- Ghoshal K, Jacob ST (2001) Regulation of metallothionein gene expression. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 66:357–384
- Gilad LA, Schwartz B (2007) Association of estrogen receptor beta with plasma-membrane caveola components: implication in control of vitamin D receptor. *J Mol Endocrinol* 38(6):603–618
- Gilad LA, Bresler T, Gnainsky J, Smirnoff P, Schwartz B (2005) Regulation of vitamin D receptor expression via estrogen-induced activation of the ERK 1/2 signaling pathway in colon and breast cancer cells. *J Endocrinol* 185(3):577–592
- Gilad LA, Tirosh O, Schwartz B (2006) Phytoestrogens regulate transcription and translation of vitamin D receptor in colon cancer cells. *J Endocrinol* 191(2):387–398
- Godt J, Scheidig F, Grosse-Siestrup C, Esche V, Brandenburg P, Reich A, Groneberg DA (2006) The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *J Occup Med Toxicol* 1:22
- Grody WW, Schrader WT, O'Malley BW (1982) Activation, transformation, and subunit structure of steroid hormone receptors. *Endocr Rev* 3(2):141–163
- Gustafsson JA (2000) Novel aspects of estrogen action. *J Soc Gynecol Invest* 7(1 Suppl):S8–S9
- Gustafsson JA (2003) What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signalling. *Trends Pharmacol Sci* 24(9):479–485
- Harnish DC (2006) Estrogen receptor ligands in the control of pathogenic inflammation. *Curr Opin Investig Drugs* 7(11):997–1001
- Harnish DC, Albert LM, Leathurby Y, Eckert AM, Ciarletta A, Kasaian M, Keith JC Jr (2004) Beneficial effects of estrogen treatment in the HLA-B27 transgenic rat model of inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286(1):G118–G125
- Harris HA (2007) Estrogen receptor-beta: recent lessons from in vivo studies. *Mol Endocrinol* 21(1):1–13
- Harris HA, Albert LM, Leathurby Y, Malamas MS, Mewshaw RE, Miller CP, Kharode YP, Marzolf J, Komm BS, Winneker RC, Frail DE, Henderson RA, Zhu Y, Keith JC Jr (2003) Evaluation of an estrogen receptor-beta agonist in animal models of human disease. *Endocrinology* 144(10):4241–4249
- Höfer N, Diel P, Wittsiepe J, Wilhelm M, Degen GH (2009) Dose- and route-dependent hormonal activity of the metalloestrogen cadmium in the rat uterus. *Toxicol Lett* 191(2–3):123–131
- IPCS INCHEM (2007) International Chemical Safety Card (ICSC) of Cadmium (PIM 089). The International Programme on Chemical Safety (IPCS)
- Jin T, Lu J, Nordberg M (1998) Toxicokinetics and biochemistry of cadmium with special emphasis on the role of metallothionein. *Neurotoxicology* 19(4–5):529–535
- Johnson MD, Kenney N, Stoica A, Hilakivi-Clarke L, Singh B, Chepko G, Clarke R, Sholler PF, Lirio AA, Foss C, Reiter R, Trock B, Paik S, Martin MB (2003) Cadmium mimics the in vivo effects of estrogen in the uterus and mammary gland. *Nat Med* 9(8):1081–1084
- Klaassen CD, Liu J, Choudhuri S (1999) Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39:267–294
- Konstantinopoulos PA, Kominea A, Vondoros G, Sykietis GP, Andricopoulos P, Varakis I, Sotiropoulou-Bonikou G, Papavasiliou AG (2003) Oestrogen receptor beta (ERbeta) is abundantly expressed in normal colonic mucosa, but declines in colon adenocarcinoma paralleling the tumour's dedifferentiation. *Eur J Cancer* 39(9):1251–1258
- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(12):5925–5930
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138(3):863–870
- Liel Y, Shany S, Smirnoff P, Schwartz B (1999) Estrogen increases 1,25-dihydroxyvitamin D receptors expression and bioresponse in the rat duodenal mucosa. *Endocrinology* 140(1):280–285
- Liu Z, Yu X, Shaikh ZA (2008) Rapid activation of ERK1/2 and AKT in human breast cancer cells by cadmium. *Toxicol Appl Pharmacol* 228(3):286–294
- Marchbank T, Westley BR, May FE, Calnan DP, Playford RJ (1998) Dimerization of human pS2 (TFF1) plays a key role in its protective/healing effects. *J Pathol* 185(2):153–158
- Martinetti V, Picariello L, Tognarini I, Carbonell Sala S, Gozzini A, Azzari C, Mavilia C, Tanini A, Falchetti A, Fiorelli G, Tonelli F, Brandi ML (2005) ERbeta is a potent inhibitor of cell proliferation in the HCT8 human colon cancer cell line through regulation of cell cycle components. *Endocr Relat Cancer* 12(2):455–469
- Murphy MS (1998) Growth factors and the gastrointestinal tract. *Nutrition* 14(10):771–774
- Nie SN, Sun HC, Wu XH, Qian XM (2004) Cyclooxygenase 2, pS2, inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor alpha in gastric adaptation to stress. *World J Gastroenterol* 10(23):3537–3541
- Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA (2001) Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 81(4):1535–1565

- Nordberg M (1998) Metallothioneins: historical review and state of knowledge. *Talanta* 46:243–254
- Nordberg GF (2009) Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicol Appl Pharmacol* 238(3):192–200
- Pettersson K, Gustafsson JA (2001) Role of estrogen receptor beta in estrogen action. *Annu Rev Physiol* 63:165–192
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9):e45
- Pillet S, D'Elia M, Bernier J, Bouqueneau JM, Fournier M, Cyr DG (2006) Immunomodulatory effects of estradiol and cadmium in adult female rats. *Toxicol Sci* 92(2):423–432
- Prins GS, Korach KS (2008) The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. *Steroids* 73(3):233–244
- Ribieras S, Tomasetto C, Rio MC (1998) The pS2/TFF1 trefoil factor, from basic research to clinical applications. *Biochim Biophys Acta* 1378(1):F61–F77
- Rivera-Gonzalez R, Petersen DN, Tkalecic G, Thompson DD, Brown TA (1998) Estrogen-induced genes in the uterus of ovariectomized rats and their regulation by droloxifene and tamoxifen. *J Steroid Biochem Mol Biol* 64(1–2):13–24
- Sato M, Kondoh M (2002) Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals. *Tohoku J Exp Med* 196(1):9–22
- Schwartz B, Smirnoff P, Shany S, Liel Y (2000) Estrogen controls expression and bioresponse of 1,25-dihydroxyvitamin D receptors in the rat colon. *Mol Cell Biochem* 203(1–2):87–93
- Seibel J, Molzberger AF, Hertrampf T, Laudénbach-Leschowski U, Degen GH, Diel P (2008) In utero and postnatal exposure to a phytoestrogen-enriched diet increases parameters of acute inflammation in a rat model of TNBS-induced colitis. *Arch Toxicol* 82(12):941–950
- Singh S, Poulson R, Hanby AM, Rogers LA, Wright NA, Sheppard MC, Langman MJ (1998) Expression of oestrogen receptor and oestrogen-inducible genes pS2 and ERD5 in large bowel mucosa and cancer. *J Pathol* 184(2):153–160
- Stoica A, Katzenellenbogen BS, Martin MB (2000) Activation of estrogen receptor-alpha by the heavy metal cadmium. *Mol Endocrinol* 14(4):545–553
- Takiguchi M, Yoshihara S (2006) New aspects of cadmium as endocrine disruptor. *Environ Sci* 13(2):107–116
- Thirumoorthy N, Manisenthil Kumar KT, Shyam Sundar A, Panayappan L, Chatterjee M (2007) Metallothionein: an overview. *World J Gastroenterol* 13(7):993–996
- Wada-Hiraike O, Imamov O, Hiraike H, Hulténby K, Schwend T, Omoto Y, Warner M, Gustafsson JA (2006a) (2006a) Role of estrogen receptor beta in colonic epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(8):2959–2964
- Wada-Hiraike O, Warner M, Gustafsson JA (2006b) New developments in oestrogen signalling in colonic epithelium. *Biochem Soc Trans Dec* 34(Pt 6):1114–1116
- Young PC, Cleary RE, Ragan WD (1977) Effect of metal ions on the binding of 17beta-estradiol to human endometrial cytosol. *Fertil Steril* 28(4):459–463
- Zhang W, Yang J, Wang J, Xia P, Xu Y, Jia H, Chen Y (2007) Comparative studies on the increase of uterine weight and related mechanisms of cadmium and p-nonylphenol. *Toxicology* 241(1–2):84–91

2.2 Publikation 2: “ER beta specific agonists and genistein inhibit proliferation and induce apoptosis in the large and small intestine”

B. Schleipen, T. Hertrampf, K. H. Fritzemeier, **F. M. Kluxen**, A. Lorenz, A. Molzberger, M. Velders und P. Diel in *Carcinogenesis*, 32(11):1675–83, 2011. Eine Kopie von Publikation 2 findet sich ab Seite 35.

Zusammenfassung Epidemiologische Daten weisen darauf hin, dass sich eine Behandlung mit Östrogenen oder Isoflavon-Aufnahme präventiv auf die Entstehung von Kolonkarzinomen auswirken können. Basierend auf diesen Ergebnissen war es Ziel dieser Studie, den Einfluss von ER-Subtyp-spezifischen Effekten auf die Darmhomöostase zu untersuchen.

Ovariectomierte, weibliche Wistar-Ratten wurden für drei Wochen entweder mit 17beta-Östradiol (4 mg/kg KG/d) (E₂), einem ER-Alpha-spezifischen Agonisten (ALPHA) (4 mg/kg KG/d), einem ER-Beta-spezifischen Agonisten (BETA) (100 mg/kg KG/d) oder Genistein (GEN) (10 mg/kg KG/d) behandelt. OVX- und SHAM-Tiere und solche, die sowohl mit BETA als auch dem reinen Antiöstrogen Fulvestrant (ICI 182780) (100 mg/kg KG/d und 3 mg/kg KG/d) behandelt wurden, dienten als Kontrolle.

Eine Behandlung mit GEN und BETA, aber nicht mit E₂ und ALPHA, reduzierte die Proliferation in Darmmukosazellen von Dünndarm und Kolon. Eine Behandlung mit BETA und GEN, aber nicht E₂, erhöhte die Apoptoserate in Dünndarm und Kolon. Die BETA-Behandlung induzierte antiproliferative und proapoptotische Aktivität auch in SHAM-Tieren. Diese Effekte wurden durch das reine Antiöstrogen Fulvestrant antagonisiert. PCR-Gen-Array-Untersuchungen zeigten, dass BETA zu einer Herunterregulierung des Onkogens *transformation-related-Protein 63* (P63) führt. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Aktivierung des ER-Beta durch selektive ER-Beta-Agonisten und GEN antiproliferative und proapoptotische Effekte im Intestinaltrakt induziert. Diese Beobachtung könnte darauf hindeuten, dass eine Behandlung mit GEN und spezifischen ER-Beta-Agonisten über eine Modulation der Gewebhomöostase das Epithel des Dünndarms und des Kolons vor einer Tumorentwicklung schützt.

Carcinogenesis, Impact Factor (2012): 5.702; Eigenanteil 10 % – Labortätigkeit, Auswertung der Ergebnisse, Co-Autor

ER β -specific agonists and genistein inhibit proliferation and induce apoptosis in the large and small intestine

B.Schleipen, T.Hertrampf, K.H.Fritzemeier¹, F.M.Kluxen, A.Lorenz, A.Molzberger, M.Velders and P.Diel*

Abt. molekulare und zelluläre Sportmedizin, Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin, Deutsche Sporthochschule Köln, Am Sportpark Müngersdorf 6, 50933 Cologne, Germany and ¹Bayer Schering Pharma AG Berlin, Müllerstrasse 170-178, 13353 Berlin, Germany

*To whom correspondence should be addressed. Department of Molecular and Cellular Sport Medicine, Deutsche Sporthochschule Köln, Am Sportpark Müngersdorf 6, 50933 Köln, Germany. Tel: +49 221 4982 5860; Fax: +49 221 4982 8370; Email: diel@dshs-koeln.de

Epidemiological data indicate that intake of estrogens and isoflavones may be beneficial for the prevention of colorectal cancer (CRC). Based on this data, the aim of the study was to investigate estrogen receptor (ER) subtype-specific effects on intestinal homeostasis. Ovariectomized (OVX) female Wistar rats were either treated with 17 β -estradiol (4 μ g/kg body wt/day) (E2), an ER α -specific agonist (ALPHA) (10 μ g/kg body wt/day), an ER β -specific agonist (BETA) (100 μ g/kg body wt/day) or genistein (GEN) (10 mg/kg body wt/day) for three weeks. Vehicle-treated OVX and SHAM animals and those cotreated with BETA and the pure antiestrogen Fulvestrant (ICI 182780) (100 μ g/kg body wt/day and 3 mg/kg body wt/day) served as controls. GEN and BETA treatment but not E2 and ALPHA administration reduced proliferation in ileal and colonic mucosa cells. The rate of apoptosis in the small intestine and colon was increased by treatment with BETA and GEN, but not by E2. BETA induced antiproliferative and proapoptotic activity also in SHAM animals. The effects were antagonized by the pure antiestrogen Fulvestrant. Polymerase chain reaction gene array analysis revealed that BETA resulted in the downregulation of the oncogene transformation-related protein 63 (p63). Our data indicate that activation of the ER β by specific ER β agonists and GEN induces antiproliferative and proapoptotic effects in the intestinal tract. This observation can be taken as an indication that intake of GEN and specific ER β agonists may protect the ileal and colonic epithelium from tumor development via modulation of tissue homeostasis.

Introduction

Postmenopausal hormone replacement therapy mediates protective effects in the intestinal tract and may effectively counteract tumor development (1,2). Thus, long-term supplementation of postmenopausal women with estrogen plus progestin results in a lower incidence of colorectal cancer (CRC) (3–5). Although it is consistently reported that estrogenic actions are responsible for these protective effects, the specific molecular mechanisms are still under investigation. In recent years, studies with estrogen receptor knockout mice (ERKO), and those performed with ER subtype-specific agonists, have heightened interest in novel estrogen targets in the body (6–8), such as the cardiovascular system, prostate, skeletal muscle and intestinal epithelium. In this context investigation of estrogen receptor (ER) subtype-specific actions seems to be promising and studies with ERKO and selective ER modulators suggest ER β -selective compounds to be useful in treating diseases like prostate cancer,

Abbreviations: CRC, colorectal cancer; ER, estrogen receptor; ER β KO, estrogen receptor β -knockout mice; GEN, genistein; HRP, horseradish peroxidase; mRNA, messenger RNA; OVX, ovariectomized; PCR, polymerase chain reaction; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling.

autoimmune diseases, neurodegeneration, malignancies of the immune system and colon cancer (9).

The distribution of ERs varies within different types of tissues (10). Thus, unlike classical estrogen sensitive tissues, such as the uterus and mammary gland, where ER α is the predominantly expressed receptor isoform (11), epithelial cells of the digestive tract express predominantly ER β (12,13), implicating a major importance of this ER subtype in small intestine and colon.

Studies conducted with ER subtype-specific ligands (14) and those performed with estrogen receptor β -knockout mice (ER β KOs) (15,16) have illustrated the involvement of ER β in cellular anti-inflammatory pathways and tissue homeostasis in the colon. These results suggest that ER β -specific ligands may be promising targets in the pharmaceutical and therapeutical treatment of inflammatory bowel disease and the prevention of CRC.

Interestingly, several studies have shown that the expression of ER β expression is significantly reduced in colon tumor cells and colon cancer cell lines (13,17,18). The potential role for ER β -specific ligands in prevention of CRC, and the importance of ER β -specific signaling for maintenance of colonic tissue homeostasis (15) as well as the epidemiological differences in occurrence of CRC in eastern and western populations (19) consequently led to investigations on the potential role of phytoestrogens in prevention of CRC (19).

Studies performed with ER β KOs suggest that ER β -specific agonists and ER β -selective phytoestrogens like genistein (GEN) and coumestrol (COU) may serve as potential regulators of intestinal tissue homeostasis (2,16). In this context, the aim of this study was to investigate the influence of ER α - and ER β -specific agonists and of GEN on cell proliferation and apoptosis of the small intestine and the colon. Recent data indicate that ER β -specific agonists and GEN inhibit epithelial proliferation of the prostate and mammary gland (19–21) and can even impede prostate cancer development (22). It can therefore be assumed that ER β -specific agonists supposably will also inhibit the proliferation of the intestinal epithelium.

To prove this hypothesis in this study, ovariectomized (OVX) rats were treated with 17 β -Estradiol (E2), the phytoestrogen GEN and ER subtype-specific agonists for ER α (ALPHA) and ER β (BETA) for 3 weeks. The novel highly selective steroidal ER β agonist 8 β -VE2 (BETA) and the highly selective ER α agonist 16 α -LE2 (ALPHA) (Figure 1A) belong to the most potent ER subtype-specific estrogens identified to date (23,24).

In order to evaluate if the potential effects of BETA also occur under normal physiological conditions in the presence of endogenous E2, intact SHAM-operated female rats were treated. To prove if the observed effects are mediated via ER β , one control group was cotreated with BETA and the pure antiestrogen Fulvestrant. Vehicle-treated OVX animals served as controls. In the large intestine, we analyzed the expression of the proliferation cell nuclear antigen (PCNA) as a marker for proliferation and cleaved cytokeratin-18 (M30) as a marker for specific measurement of epithelial apoptosis (25). In the small intestine, we analyzed apoptosis by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling (TUNEL) staining and caspase-3 activation. The TUNEL method labels fragmented DNA, which is a characteristic of the apoptotic cells (26). In addition to this, we analyzed PCNA as a marker for proliferation.

The aim of this study was to elucidate the effects of an ER β -specific agonist (BETA) on intestinal homeostasis. Based on previous studies, we hypothesized that BETA inhibits intestinal proliferation. A polymerase chain reaction (PCR) array analysis of apoptosis-related genes was performed to identify molecular mechanisms involved in the modulation of tissue homeostasis by ER β in the colon.

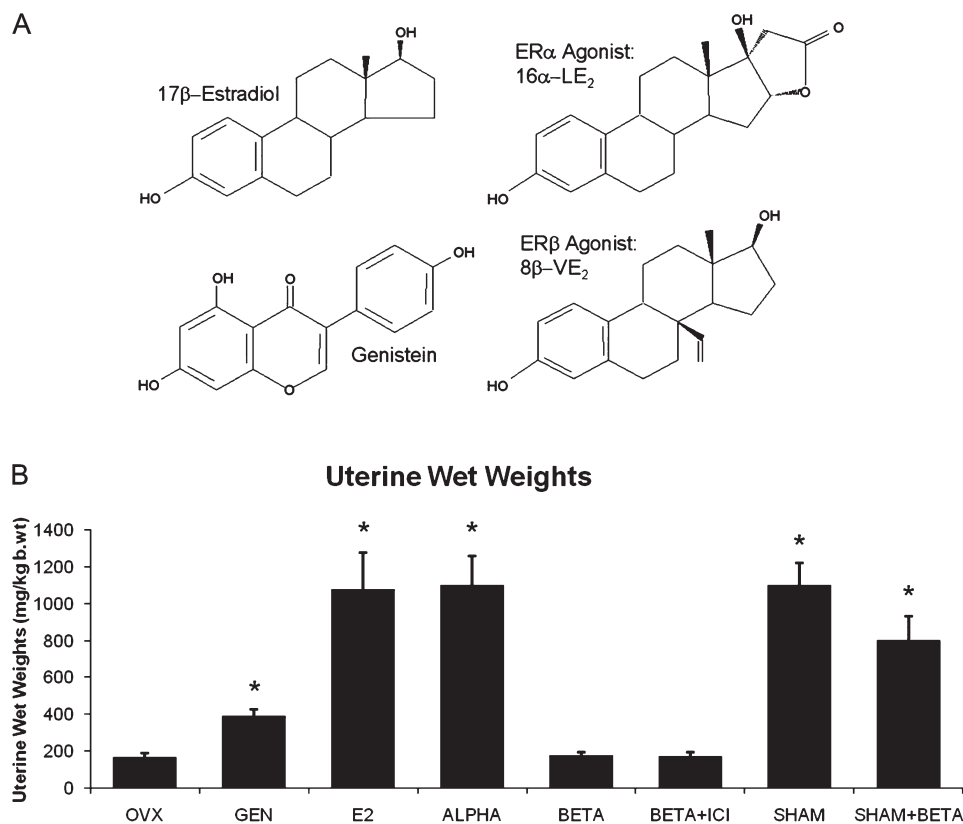


Fig. 1. Chemical structure of selected compounds and estrogenic potency. (A) ER subtype-specific agonists chemical structures of 17 β -estradiol (E2), GEN and the ER subtype-specific agonists: 16 α -LE2 (ALPHA), 8 β -VE₂ (BETA). (B) Uterine wet weight is significantly higher in E2 and ALPHA groups compared with OVX uterine wet weights of OVX rats after 3 weeks of hormonal treatment. Abbreviations: E2 = 17 β -estradiol-substituted group, ALPHA = 16 α -LE2-treated group, BETA = 8 β -VE2-treated group, BETA + ICI = 8 β -VE2 + ICI-treated group, OVX = ovariectomized group, GEN = group substituted with genistein. SHAM = sham-operated group, SHAM + BETA = sham-operated group treated with 8 β -VE2. *Denotes values significantly different from the OVX group, $P \leq 0.01$.

Methods

Substances

17 β -Estradiol [Estra-1,3,5(10)-trien-3,16 α ,17 β -diol] and GEN (4',5,7-trihydroxyisoflavone) were provided by Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Germany). The specific ER agonists ALPHA (16 α -LE2,3,17-dihydroxy-19-nor-17 α -pregna-1,3,5(10)-triene-21,16 α -lactone) and BETA (8 β -VE2,8-vinylestra-1,3,5(10)-triene-3,17 β -diol) (Figure 1A) were provided by the Bayer Schering Pharma AG (Berlin, Germany). The pure antiestrogen Fulvestrant (ICI 182780, Faslodex®) was delivered by AstraZeneca (Wedel, Germany). GEN was provided by LC Laboratories (Woburn, MA).

Diet

All rats had free access to a diet low in phytoestrogen content (ILD) (SSniff GmbH, Soest, Germany) and water *ad libitum*.

Animals

Adult female Wistar rats (200–220 g) were obtained from Janvier (Le Genest Saint Isle, France) and were maintained under controlled conditions of temperature (20°C $\pm$ 1, relative humidity 50–80%) and illumination (12 h light, 12 h dark). All animal experiments were approved by the Committee on Animal Care and complied with accepted veterinary medical practice.

Animal treatment and tissue preparation

Postpubertal animals were OVX at the age of 3 months weighing 200–220 g or sham operated. After 14 days of endogenous hormonal decline, the animals were treated with the test compounds or vehicle for 3 weeks. The animals were randomly allocated to treatment and vehicle groups ($n = 6$). E2 (4 μ g/kg body wt/day), GEN (10 mg/kg body wt/day), ALPHA (10 μ g/kg body wt/day),

BETA (100 μ g/kg body wt/day) and Fulvestrant (3 mg/kg body wt/day) were dissolved in dimethylsulfoxide (200 μ l/kg body wt/day) and corn oil (800 μ l/kg body wt/day) for subcutaneous administration. The treatment doses of the respective substances were chosen based on previous experiments (27). GEN has been demonstrated to be effective at a dose of 10 mg/kg body wt/day (28). For isotype-specific ER activation, we used the selective ER agonists ALPHA and BETA (Figure 1A). Because these compounds activate both receptors at higher concentrations (23), doses of 10 μ g/kg body wt/day (ALPHA) and 100 μ g/kg body wt/day (BETA), respectively, were chosen. For these doses, action through either ER α or ER β , respectively, can be anticipated (23,24). In order to antagonize ER-specific effects of BETA, OVX animals were cotreated with BETA (100 μ g/kg body wt/day) and Fulvestrant (ICI 3 mg/kg body wt/day). An additional antagonization experiment was performed to evaluate if the effects of E2 on p63 messenger RNA (mRNA) expression in the colon are ER mediated (Figure 6C).

Animals were killed by decapitation after light anesthesia with CO₂ inhalation. Uteri and intestinal tissues were prepared free of fat and were fixed in 4% formalin (for immunohistochemical analysis) and liquid nitrogen (for molecular biology). The uterine wet weights were determined.

Western blot analysis, apoptosis detection

We examined the expression of PCNA as a marker for proliferation and the activation of caspase-3 as a marker for apoptosis and cleaved cytokeratin-18 (M30) as marker for epithelial apoptosis by western blot analysis. The selection of proliferation and apoptosis markers was based on previous studies. PCNA (29), activated caspase-3 (30) and cleaved cytokeratin-18 (31) have been described as suitable markers for assessing proliferation and apoptosis in intestinal and colonic tissue.

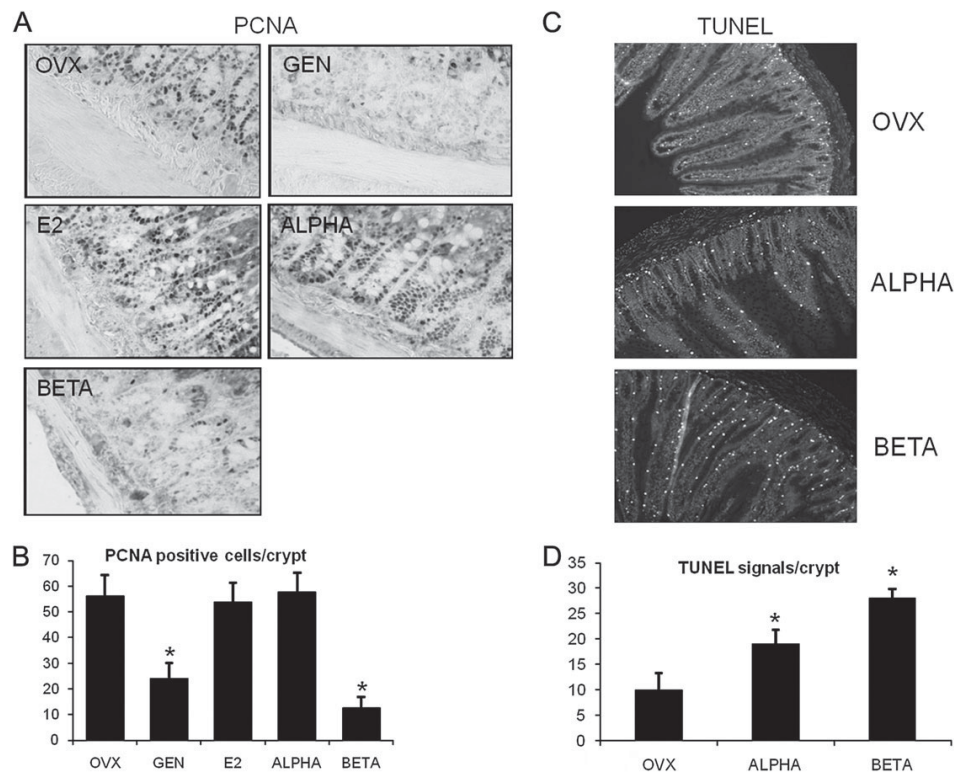


Fig. 2. Immunohistochemical staining of PCNA and TUNEL staining in the ileum. (A) Depicted are representative cross sections (magnification $\times 200$) of the ileum after immunohistochemical staining of PCNA-positive nuclei. (B) Semiquantitative analysis was performed in complete crypts. Brown nuclear staining was indicative of a positive PCNA signal. The number of proliferating nuclei is lower in GEN and BETA groups compared with OVX. *Denotes values significantly different from the OVX group, $P \leq 0.01$. (C) TUNEL staining (magnification $\times 10$) of the ileum: BETA and ALPHA enhance TUNEL-positive cells compared with OVX. Please note that colored signals are shown here in black/white. (D) Semiquantitative analysis of TUNEL staining. Analysis was performed in complete crypts. Staining was indicative of a positive TUNEL signal. *Denotes values significantly different from the OVX group, $P \leq 0.01$.

Ileal mucosa and colon were dissected from the animals and immediately stored in liquid nitrogen. Pooled frozen tissue ($n = 6$ animals per group) was powdered and homogenized in a buffer (623.5 mM Tris pH 8 ethylenediaminetetraacetic acid) containing enzyme inhibitors (5 mg/ml aprotinin, 5 mg/ml leupeptin, 1 mg/ml pepstatin-A, 5 mg/ml antipain and 100 mM pefac in 0.5 M ethylenediaminetetraacetic acid, pH 8). Protein concentrations were determined by the method of Lowry (Dc Protein Assay; Bio-Rad, Hercules, CA). Equal amounts of sample (40 μ g protein) were loaded on a Protean II ready Gel (Bio-Rad). After electrophoresis and separation, samples were transferred onto nitrocellulose membranes and blocked with 5% bovine serum albumin in phosphate (100 mM)-buffered saline solution (pH 7.4) at room temperature for 2 h. The immobilized proteins were quantitatively detected using specific antibodies for actin (A5060; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), PCNA Clone PC 10 (Dako, Glostrup, Denmark), active caspase-3 (557035, BD Pharmingen, Heidelberg, Germany) and cleaved cytokeratin-18, fragment 30, M30 CytoDEATH (1214032 001; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Polyclonal swine anti-rabbit immunoglobulins/horseradish peroxidase (HRP) and polyclonal rabbit anti-mouse immunoglobulins/HRP (P0217 and P0260; Dako) were used as species-specific HRP-conjugated secondary antibodies.

Blot signals were visualized by the chemiluminescent POD-Substrate (Lumi-Light Plus; Roche Diagnostics) and a Fluorchem Luminescent Imager (Alpha Innotech, Santa Clara, CA).

The protein bands were quantified by densitometry using ImageJ 1.38. To account for non-homogenous protein loading of the slots, we calculated the ratio of the reference protein (actin) to the target protein (PCNA, active caspase-3 and M30).

Immunohistochemistry

Formalin-fixed intestinal samples were embedded in paraffin and 7 μ m thin sections were prepared with a microtome. We have examined the proximal

7 mm of the ileum and the colon. After deparaffinization, antigen retrieval was performed in an incubator for 20 h at 60°C in 0.01 M citrate buffer pH 6.0. Subsequently, endogenous peroxidases were blocked for 20 min with 3% hydrogen peroxide and the slides were covered with a 0.25% Triton X-100 solution for 10 min.

The primary antibody, PCNA Clone PC10 (Dako) was applied at dilutions of 1:100, respectively. After 1 h incubation with the primary antibodies, samples were incubated with the secondary antibody, polyclonal goat anti-mouse immunoglobulins/biotinylated (Dako). Afterward, the sections were covered with Streptavidin-biotinylated HRP Complex (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) at a dilution of 1:400. The samples were developed with diaminobenzidine for 10 min. For negative controls, slides were immunostained in the absence of the primary antibody.

TUNEL stain was performed according the APO-Direct Kit (AD-1001), Pheonix Flow Systems, San Diego, CA.

Evaluation of staining results

Quantitative analysis was performed in complete crypts of normal mucosa. Brown nuclear staining was indicative of a positive PCNA signal. For a quantitative measurement, PCNA- or TUNEL-positive cells were counted per crypt. Ten different crypts per animal were counted and averaged.

Gene array analysis

Gene array analysis was performed using the Rat Apoptosis RT² Profiler™ PCR Array (SA Biosciences, Frederik, MD).

Real-time PCR

RNA was isolated from 100 mg of pooled frozen mucosa from the small intestine or the colon. Intestinal tissue was pulverized using mortar and pestle and homogenized with a hand held homogenizer in 1 ml of Trizol on ice. Total

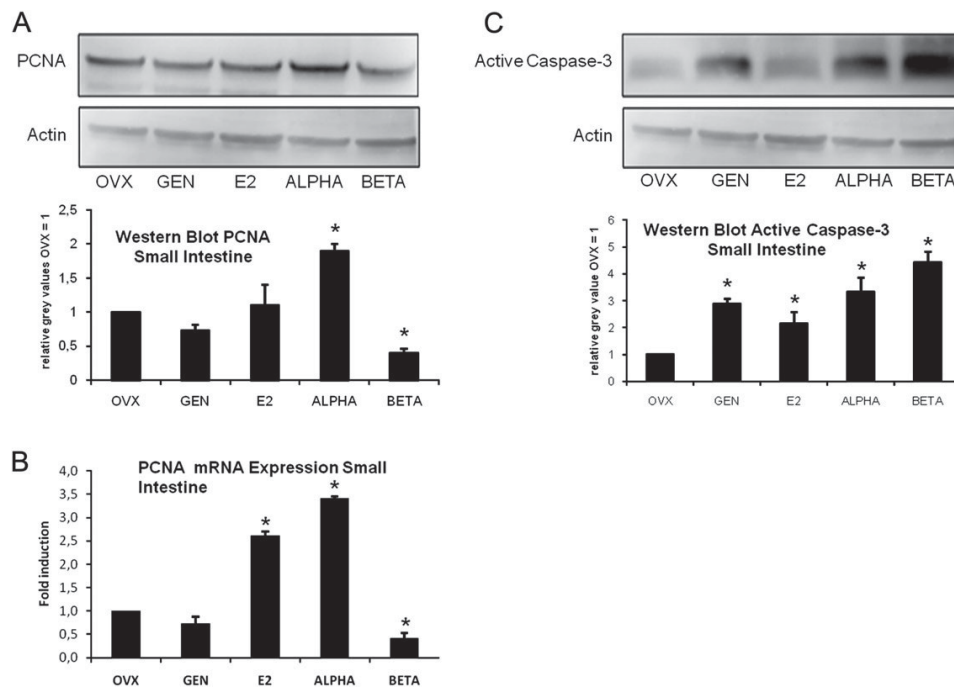


Fig. 3. Western blot and real-time PCR analysis of markers for proliferation (PCNA) and apoptosis (active caspase-3) in the ileum: BETA inhibits proliferation and induces apoptosis, whereas ALPHA induces both proliferation and apoptosis. (A) Depicted are representative western blots and the densitometric analysis of PCNA in the ileum. *Denotes values significantly different from the OVX group, $P \leq 0.01$. (B) Analysis of PCNA mRNA expression in the ileum. E2 and ALPHA increased PCNA expression, whereas BETA decreased PCNA mRNA expression. *Denotes values significantly different from the OVX group, $P \leq 0.01$. (C) Depicted are representative western blots and the densitometric analysis of activated caspase-3 in the small intestine. *Denotes values significantly different from the OVX group, $P \leq 0.01$.

RNA was isolated using a standard TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA) protocol followed by first-strand complementary DNA synthesis with the QuantiTect Rev. Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Real-time PCR was performed in a Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) real-time PCR cyclor. The protocol consisted of 40 cycles of 94, 60 and 72°C for 1 min each. Specific primers were designed with primer 3 software (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA) based on the complementary DNA sequences available at the EMBL database.

Primer sequences—p63: forward, 5'-ATCGTTACTCTGGAAACCAG-3'; reverse, 5'-CATGTGAGTGCCCATCATAG-3'. PCNA: forward, 5'-GAG-CAACTTGAATCCAGAACAGG-3'; reverse, 5'-CCAAGCTCCC-CACTGCAGAAAAC-3'.

All PCRs were run in triplicate for each sample and threshold cycles (CT) were measured. A Δ CT value was calculated for each sample by subtracting the CT value of the reference gene (1A) from the CT value of the gene of interest. To reduce interassay variation, all samples were normalized to the Δ CT value of a control sample (OVX, $\Delta\Delta$ CT). The relative expression levels of the genes of interest were calculated using the expression $2^{-\Delta\Delta$ CT and are reported as the fold induction.

Statistical analysis

All data are expressed as arithmetic means with their standard errors. Statistical significance of differences was calculated using one-way analysis of variance, following Tukey's honest significance test where it was appropriate. Significance was established at $P < 0.01$, $n = 6$.

Results

Uterus wet weight is stimulated by E2 and ALPHA

Treatment of OVX rats with E2 or ALPHA led to a strong stimulation of uterine wet weight, whereas application of GEN resulted only in a faint, although significant increase while BETA-treated animals showed no significant uterine stimulation (Figure 1B).

GEN and BETA reduce proliferation and stimulate apoptosis in the ileum

To investigate effects of the different estrogenic compounds on intestinal tissue homeostasis, protein expression of the proliferation marker PCNA was determined by immunohistochemistry, real-time PCR and western blot analysis. To analyze apoptosis, activation of caspase-3 (small intestine) and cleavage of cytokeratin-18 (colon) was determined by western blot, DNA cleavage was determined by TUNEL staining.

In the small intestine, immunostaining revealed that PCNA expression in OVX animals was slightly induced by administration of E2 and ALPHA (Figure 2A). Interestingly, treatment of OVX animals with BETA and GEN significantly reduced PCNA protein expression detected by immunohistochemistry (Figure 2A and B). This observation was supported by western blot analysis (Figure 3A) and real-time PCR (Figure 3B). The rate of apoptosis, indicated by the amount of activated caspase-3, was significantly increased after BETA, GEN, ALPHA and E2 treatment in ileal mucosa cells (Figure 3C). TUNEL staining in the ileum of ALPHA- and BETA-treated animals confirmed the results of the caspase-3 activation by showing that BETA treatment increased TUNEL-positive signals in the crypts relative to OVX (Figure 2C and D).

Effects of BETA on proliferation and apoptosis occur in intact animals and are mediated via ER β

To investigate whether the observed effects of BETA on proliferation and apoptosis also occur in intact animals and are ER mediated, an antagonization experiment was performed by coadministering BETA and the pure antiestrogen Fulvestrant to sham-operated (SHAM) animals. Administration of BETA induced apoptosis and inhibited

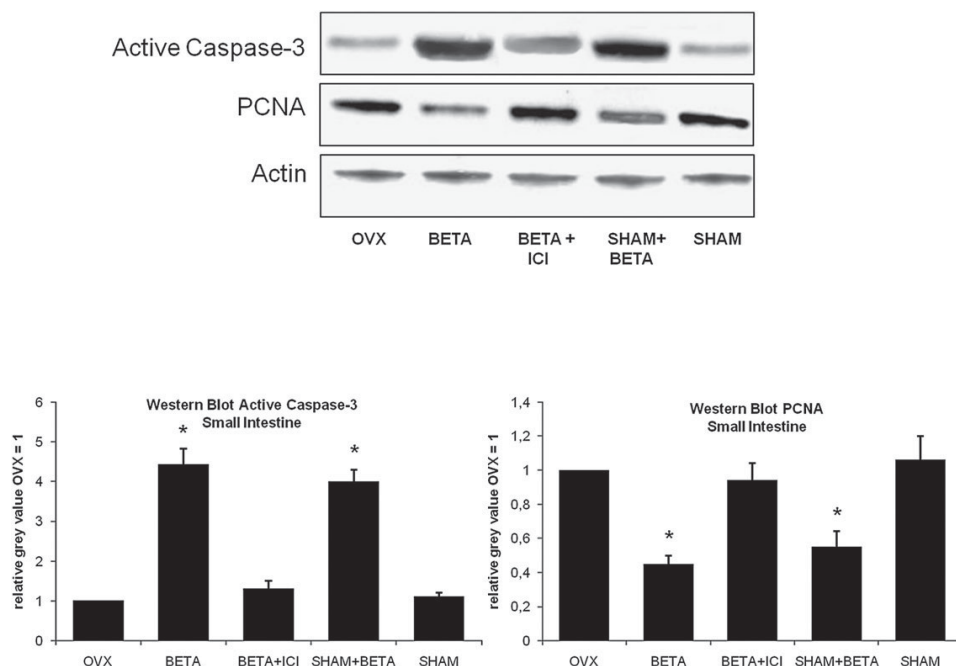


Fig. 4. Effects of BETA on proliferation and apoptosis in intact animals and in the presence of the pure antiestrogen Fulvestrant (ICI) in the ileum depicted are representative western blots and the densitometric analysis of PCNA and active caspase-3 in the ileum of OVX rats and SHAM rats. *Denotes values significantly different from the OVX group, $P \leq 0.01$.

proliferation in the ileum of SHAM rats (Figure 4). Coadministration of Fulvestrant resulted in an antagonization of the proapoptotic and antiproliferative effects of BETA (Figure 4).

GEN and BETA reduce proliferation and induce apoptosis in the colon

Intestinal tumors most often start to develop in the colon. It is therefore highly relevant to investigate whether activation of ER β also modulates the tissue homeostasis in this part of the gastrointestinal tract. As shown in Figure 5A and B, administration of BETA and GEN resulted also in the colon in a repression of proliferation and an induction of apoptosis indicated by the reduced PCNA expression and the increased expression of cleaved cytokeratin-18, M30.

E2, BETA and GEN reduce the expression of the oncogene p63

To identify molecular mechanisms involved in the regulation of tissue homeostasis in the intestine after activation of ER β , a PCR array analysis of apoptosis-related genes was performed using homogenized colon cells of BETA-treated animals. A variety of apoptosis related genes were shown to be significantly regulated by BETA (Figure 6A). The oncogene p63 turned out to be strongly suppressed. Real-time PCR analysis of p63 expression confirmed the array results by showing that p63 mRNA was downregulated in the colon after BETA, E2 and GEN administration (Figure 6B). Coadministration of the pure antiestrogen Fulvestrant resulted in an antagonization of the E2-mediated p63 suppression (Figure 6C).

Discussion

The intestinal adenoma–carcinoma sequence is known to be initialized by an accumulation of genetic alterations causing disorders in cellular proliferation, differentiation and apoptosis (32). Although cell proliferation changes have been extensively studied in the adenoma–carcinoma sequence (33), less is known about alteration in cellular

apoptosis patterns during CRC development and considerable controversy exists as to whether the apoptosis signaling increases or decreases during the adenoma–carcinoma sequence (34). Although pathophysiological changes that lead to CRC are still under investigation, recent studies describe the colon to be one of the tissues where ER β is known to influence homeostasis (16,35). Studies with ER β KOs indicate that this ER subtype is essential for maintenance of cellular homeostasis and for driving differentiation in the colon. ER β is therefore a possible target for modalities of prevention and medical treatment of CRC (15,16).

In this context, the results of the present study demonstrate that ER β -specific agonists and phytoestrogens that bind with a high affinity specifically to the ER β , such as GEN have an impact on the maintenance of tissue homeostasis in the normal non-malignant digestive tract of female rats. In contrast to E2 and the ER α -specific agonist (ALPHA), treatment with an ER β -specific agonist (BETA) led to a strong reduction of PCNA protein expression in the ileum (Figures 2A and B, 3A and 4) and colon (Figure 5A and B). BETA induced caspase-3 activation in the ileum (Figures 3C and 4) and a strong increase of cleaved cytokeratin-18 in the colon (Figure 5B). Moreover, BETA evoked a dramatic increase in TUNEL-positive cells in the ileum (Figure 2C and D). Together, the data show that the treatment with BETA reduces proliferation and induces apoptosis in the ileum and the colon.

As TUNEL staining (Figure 2C and D) and cleaved cytokeratin-18 (Figure 5B) show, the BETA-mediated apoptosis is predominantly located in the intestinal epithelium since cleaved cytokeratin-18 is recognized as a specific marker for epithelial apoptosis (31). The present results show that E2 enhances the mRNA expression of PCNA in the ileal mucosa significantly compared with OVX. This effect was also evident on the protein level of expression, although without significance. This might be explained by posttranslational modifications of PCNA through enzymes involved in acetylation, alkylation or oxidation and could be a cellular strategy to attenuate the proliferative

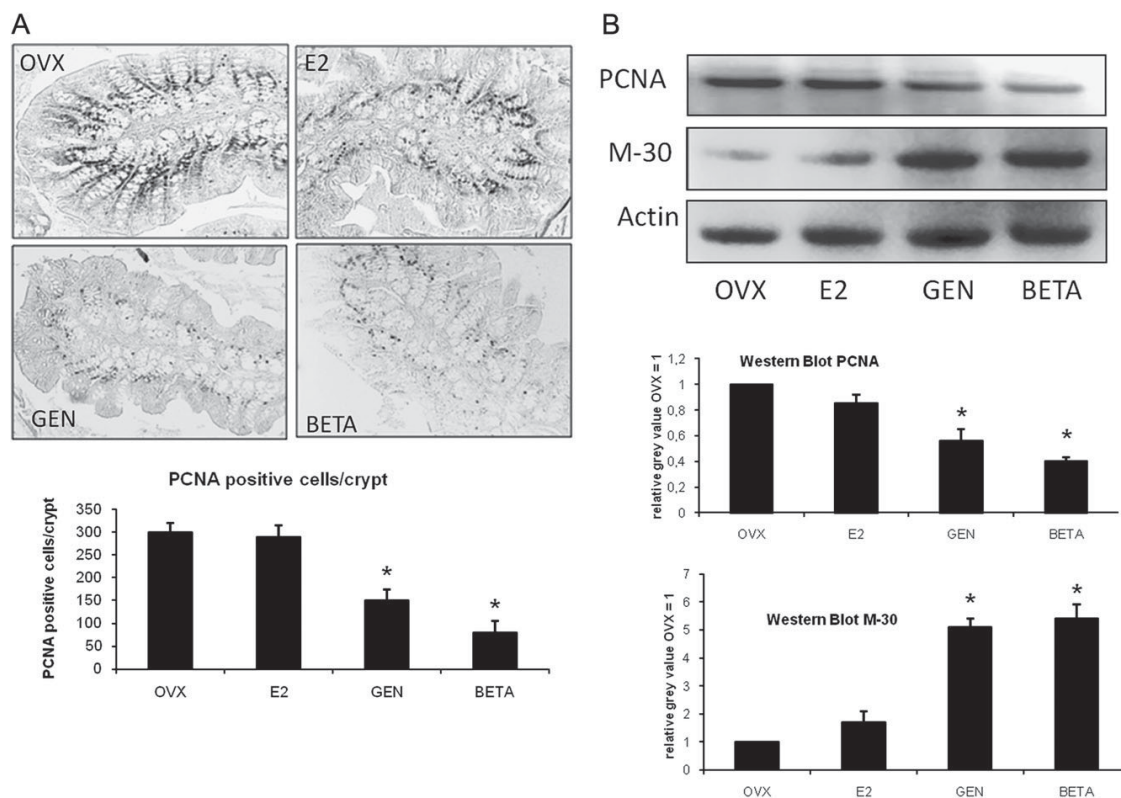


Fig. 5. Analysis of proliferation and apoptosis in the colon: BETA and GEN inhibit proliferation (PCNA) and induce apoptosis (M30). (A) Depicted are representative cross sections of the colon (magnification $\times 100$) after immunohistochemical staining of PCNA-positive nuclei. Semiquantitative analysis was performed in complete crypts. Brown nuclear staining was indicative of a positive PCNA signal. *Denotes values significantly different from the OVX group, $P \leq 0.01$. (B) Detection of proliferation and apoptosis in the colon. Western blot and densitometric analysis of PCNA and cleaved cytokeratin-18 (M30). *Denotes values significantly different from the OVX group, $P \leq 0.01$.

effects of E2 to achieve a homeostatic balance between proliferation and apoptosis of intestinal mucosa.

This result is in agreement with studies conducted in ER β KOs, where the number of colonic-proliferating cells is increased and caspase-3 cleavage is decreased in the absence of ER β (2,16). The described effects of BETA also occurred in intact animals (Figure 4). This indicates that selective activation of ER β also in the presence of endogenous, physiological levels of E2 resulted in a change of tissue homeostasis toward reduced proliferation rates and increased apoptosis. In our opinion, this can be taken as an indication that the effect is not gender specific and that treatment with ER β -selective ligands also in males may result in comparable effects. This hypothesis agrees with epidemiologic data demonstrating that a diet rich in GEN results in a reduced colon cancer risk also in males (19) but has to be confirmed in future investigations. Also in agreement with studies in ER β KO mice, our data demonstrates that the effects of BETA could be antagonized by the antiestrogen Fulvestrant, indicating that the effects of BETA regulating intestinal homeostasis are ER mediated (Figure 4).

PCR gene array analysis indicated that a variety of apoptosis-associated genes are regulated in the colon after treatment with BETA (Figure 6A). Expression of one of the identified genes, p63 was significantly downregulated by BETA in the colon (Figure 6A and B). p63 is a protein homolog of p53, a well-known tumor suppressor protein involved in preventing genome mutation. p63 is expressed in poorly differentiated epithelial cells and plays an important role in regulating epithelial proliferation and differentiation (36). It

has been described to be involved in tumorigenesis (37) and to be overexpressed in ovarian and epithelial tumors (38). The observation that p63 is downregulated by BETA supports our hypothesis that treatment with ER β -specific ligands may result in colon cancer prevention. This is also in agreement with the fact that activation of ER β inhibits proliferation in cellular systems by regulating the cell cycle machinery (39) and that activation of ER β and GEN decrease survival of cancer cells by impairing the G(2)/M checkpoint signaling (39,40). We believe that ER β -specific ligands induce a G(2)/M arrest partly through downregulation of p63.

Well-known defense mechanisms of the cryptal stem cells against colon cancer development are a slow cell cycle and high rate of apoptosis. A slow cell cycle produces less replication errors and consequently fewer mutations (41). Activation of ER β supports both defense mechanisms: in the large and small intestine, BETA decreased proliferation and increased apoptosis, which slows down the cell cycle and attenuates the risk of replication errors and subsequent DNA damage. This mechanism applies also to tumor cells in early stages of the disease as long as the genes for apoptosis are not altered and the tumor has not developed strategies against apoptosis. Moreover, it is well-known that colorectal carcinomas lose the ER β in advanced stages of the disease and in advanced Dukes stages (18), respectively; hence ER β -specific ligands cannot efficiently decelerate tumor growth in advanced colorectal carcinomas.

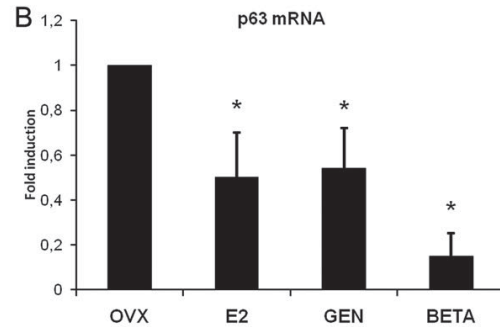
In the ileum, our results show that ALPHA induced opposite effects compared with BETA with respect to the expression of PCNA, which was upregulated by ALPHA but not by BETA (Figures 2A and B and

A

List of up (≥ 5 fold) or down (≤ 0.5) regulated genes in BETA groups colon (PCR apoptosis array)

Gene	Function	Fold induction
BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	BCL2L11 is a Bcl-2 family member. Bcl-2 family members are the main regulators of programmed cell death via the mitochondrial (intrinsic) apoptotic pathway.	23.59
Cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector A	Member of a novel family of proapoptotic proteins.	21.71
Prokineticin2	Promotes angiogenesis and induces strong gastrointestinal smooth muscle contraction.	47.18
B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1	Belongs to the BCL-2 protein family. BCL-2 act as anti- or pro-apoptotic regulators that are involved in a wide variety of cellular activities.	7.62
Transformation related protein 63	Member of the p53 family of transcription factors. Important regulator of proliferation and differentiation.	0.08
BH3 interacting domain death agonist	Pro-apoptotic member of the Bcl-2 protein family. Bcl-2 proteins act as anti- or pro-apoptotic regulators.	0.45
BCL2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3	Induces apoptosis and interacts with viral and cellular anti-apoptosis proteins.	0.17
DNA fragmentation factor, alpha subunit	DNA fragmentation factor is responsible for oligonucleosomal DNA fragmentation during apoptosis and plays an important role for maintaining genomic stability.	0.50
Fas apoptotic inhibitory molecule	Soluble cytosolic protein inhibitor of programmed cell death. Promotes neuronal differentiation.	0.40
Polymerase (DNA directed), beta	Subunit of DNA polymerase, an enzyme that catalyzes the polymerization of deoxyribonucleotides into a DNA strand.	0.16
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)	Receptors that bind TNF- α - a cytokine involved in systemic inflammation.	0.27
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 5	Receptors that bind TNF- α - a cytokine involved in systemic inflammation.	0.03
Transformation related protein 53 binding protein 2 (predicted)	Regulates apoptosis, cell cycle and oncogenesis.	0.47
Transformation related protein 73 (predicted)	Related to p53, tumor suppressor, induction of apoptosis.	0.27

B



C

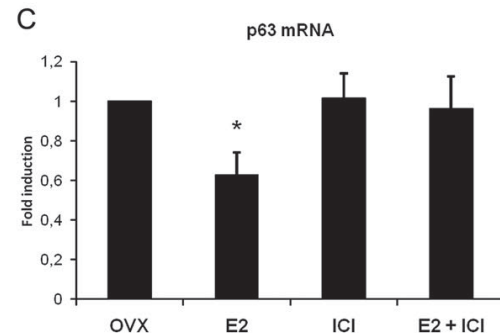


Fig. 6. Downregulation of p63 in the colon of E2-, GEN- and BETA-treated animals is ER mediated. (A) List of apoptosis associated ER β -regulated genes in the colon from a PCR apoptosis gene array. The listed genes were up (≥ 5 fold) or down (≤ 0.5) regulated in BETA-treated animals. (B) Transformation-related protein (p63) mRNA expression using real-time PCR analysis was reduced in the colon of E2-, GEN- and BETA-treated rats. *Denotes values significantly different from the OVX group, $P \leq 0.01$. (C) Antagonization of E2 effects on p63 mRNA expression by the pure antiestrogen Fulvestrant (ICI). *Denotes values significantly different from the OVX group, $P \leq 0.01$.

3A and B). With respect to the expression of activated caspase-3 (Figure 3C) and TUNEL staining (Figure 2C and D), ALPHA had proapoptotic effects even though weaker compared with BETA. In conclusion, ALPHA accelerated the cell turnover, whereas BETA decelerated the cell turnover in ileal and colonic epithelium. This may be explained by the intrinsic balance between proliferation and apoptosis in normal intestinal mucosa (32). Since intestinal crypt cells intend to maintain a homeostatic balance between proliferation, apoptosis and necrosis (42). BETA seems to be a powerful substance to slow down the cell cycle machinery, thereby reducing the risk of developing colorectal carcinomas, ALPHA seems to accelerate the cell cycle machinery, thereby increasing the risk of replication errors and DNA damage. This observation agrees with the literature, in that most studies have shown decreased ER β expression in estrogen-dependent cancer progression as compared with benign tumors or normal tissues, whereas ER α expression persists (43).

Controversy still exists about the correlation between proliferation and apoptosis in adenomas and carcinomas. Some studies report increased levels of both, apoptosis and proliferation in colorectal carcinomas (44,45), whereas others have not found a correlation (46,47).

In our study, we were able to show that proliferation is high in OVX, SHAM and E2 groups. However, on the mRNA level and in western blots, we could see that ALPHA strongly induces PCNA expression, while not in histological sections of the ileum. We think that this difference is attributable to the different methods used. For the histological slides, we have examined the proximal 7 mm of the ileum cut in 7 μ m thin sections, which are only very small parts of the whole organ. In contrast, for western blot analysis and PCR, we

have analyzed the total ileum. This means that we have different types of cells in the pooled mucosa, e.g. Peyer's patches, which are found normally in the lowest portion of the ileum, smooth muscle, epithelium and connective tissue. This could explain the different results. Besides, recent findings validate the presence of ERs associated with the cell surface membrane in the intestine, which interfere with cell proliferation and electrolyte homeostasis (48). It is conceivable that these ERs associated with the cell surface membrane have a different expression pattern in the intestinal tract. Further experiments are needed to elucidate this question. At present, little is known about estrogens and the intestinal tract since the intestinal tract has previously not been thought of as a sex-steroid targeted organ (48).

We were able to show that ALPHA increases apoptosis in the ileum by TUNEL staining (Figure 2C and D) and western blot analysis of activated caspase-3 (Figure 3C). E2 binds to ER α and ER β , whereas the binding affinity to ER α is almost twice the binding affinity to ER β (10). Therefore, E2 can also mediate ER β typical effects, which in turn can attenuate ER α effects. In contrast, ALPHA binds 250-fold stronger to ER α than to ER β (24) and BETA has a 183-fold selectivity for ER β (24). Therefore, in ALPHA-treated animals, we could see the full effects of activation of ER α with almost no activation of ER β . We think that ALPHA increases proliferation and apoptosis that is cell turnover through aberrant activation of Wnt signaling. We suggest that the aberrant activation of Wnt signaling by ALPHA induces apoptosis shown by TUNEL staining (Figure 2C and D) and western blot analysis of activated caspase-3 (Figure 3C). This result largely agrees with the literature. ER α

deficiency is associated with an accumulation of nuclear β -catenin, which is an indicator of activation of the Wnt- β -catenin-signaling pathway, known to play a critical role in intestinal cancers. In addition to this, ER α deficiency is associated with an increased expression of Wnt- β -catenin target genes (49). Furthermore, the Wnt pathway is in >85% of sporadic colon cancers activated (50). It is conceivable that ALPHA inhibits Wnt signaling pathways. Moreover, it is known that the cryptal cells and the paracrine interactions between stem cells and epithelial-mesenchymal cells in the crypt try to maintain the integrity of the intestinal epithelium (49). It is conceivable that these paracrine interactions adapt to the ER α triggered proliferation and secrete cytokines, which activate apoptotic pathways in the epithelial cells.

The data reported in Figure 4 indicates that ovariectomy does not influence at all both apoptosis and proliferation in the small intestine. We think that the intestinal crypt achieves a steady state despite varying levels of sex hormones. Higher levels of E2 activate both the ER α and ER β at a ratio of 2 to 1, whereas lower levels of E2 activate both the ER α and ER β at the same ratio (10). But there are still low levels of estrogens even in the OVX animal, albeit at lower concentrations, since in the fat tissue androgens from the adrenal cortex are converted to estrogens. From this perspective, the presence of both ERs seem to constitute a homeostatic equilibrium despite different levels of the physiological ligand E2. High plasma levels of E2 stimulate proliferation and these effects are buffered through ER β (51). In addition, crosstalk between intestinal stem cells and epithelial-mesenchymal cells, presumably adjusts to lower concentrations of sex hormones to regulate the intestinal homeostasis (49).

Based upon evaluation of ER subtype-specific effects on intestinal tissue homeostasis, this study was partly conducted to investigate effects of the phytoestrogen GEN. Our results indicate that in ileal and colonic mucosa cells, GEN acts as an ER β -specific agonist. GEN exerts antiproliferative and proapoptotic effects in the ileal mucosa (Figures 2 and 3) and in the colon (Figure 5). This observation is in agreement with the observation that GEN is bioactive in the small intestine of piglets, where oral application of this phytoestrogen results in reduced enterocyte proliferation and migration (52). In contrast, Booth *et al.* (53) did not detect changes in proliferation and apoptosis in the small intestine after *in vivo* administration of GEN. However, *in vitro* studies were able to demonstrate that GEN inhibits cell proliferation and promotes apoptosis in normal human intestinal (52,53) and colon carcinoma cell lines (54). The preferential binding affinity of GEN to ER β (10) and the observation that GEN acts on intestinal tissue homeostasis like an ER β subtype-specific agonist substantiate the theory that GEN also mediates its effects on intestinal tissue homeostasis via ER β (2,16).

Taken together, the results of this study imply that activation of ER β in OVX rats but also in intact rats by an ER β -specific agonist (BETA), results in a reduction of the number of proliferating cells and leads to an induction of apoptosis in the small intestine and colon. In addition, it was shown that ALPHA in contrast to BETA increases both, proliferation and apoptosis in the small intestine. Moreover, the provided data indicate that GEN influences tissue homeostasis in the small intestine and colon by exerting antiproliferative and proapoptotic effects via ER β . In conclusion, these observations support results for ER β KO studies, showing that ER β -specific signaling is involved in the maintenance of intestinal tissue homeostasis. The current data show that ER β -specific agonists and the phytoestrogen GEN affect the homeostasis of colonic epithelium and may contribute to the primary prevention of CRC. These observations are relevant with regard to the discussed role of estrogens in CRC.

Funding

DFG (716/10-3 and GK1427).

Conflict of Interest Statement: None declared.

References

- Javid,S.H. *et al.* (2005) Modulation of tumor formation and intestinal cell migration by estrogens in the Apc(Min/+) mouse model of colorectal cancer. *Carcinogenesis*, **26**, 587–595.
- Wada-Hiraike,O. *et al.* (2006) Role of estrogen receptor beta in colonic epithelium. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **103**, 2959–2964.
- Chlebowski,R.T. *et al.* (2004) Estrogen plus progestin and colorectal cancer in postmenopausal women. *N. Engl. J. Med.*, **350**, 991–1004.
- Farquhar,C.M. *et al.* (2005) Long term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women. *Cochrane Database Syst. Rev.*, **3**, CD004143.
- Dinger,J.C. *et al.* (2007) Colon cancer risk and different HRT formulations: a case-control study. *BMC Cancer*, **7**, 76.
- Korach,K.S. *et al.* (2003) Update on animal models developed for analyses of estrogen receptor biological activity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **86**, 387–391.
- Gustafsson,J.A. (2003) What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signalling. *Trends Pharmacol. Sci.*, **24**, 479–485.
- Carpenter,K.D. *et al.* (2006) Potential biological functions emerging from the different estrogen receptors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1092**, 361–373.
- Koehler,K.F. *et al.* (2005) Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta. *Endocr. Rev.*, **26**, 465–478.
- Kuiper,G.G. *et al.* (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, **138**, 863–870.
- Weihua,Z. *et al.* (2001) A role for estrogen receptor beta in the regulation of growth of the ventral prostate. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 6330–6335.
- Campbell-Thompson,M. *et al.* (2001) Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ERbeta isoforms in colon cancer. *Cancer Res.*, **61**, 632–640.
- Konstantinopoulos,P.A. *et al.* (2003) Oestrogen receptor beta (ERbeta) is abundantly expressed in normal colonic mucosa, but declines in colon adenocarcinoma paralleling the tumour's dedifferentiation. *Eur. J. Cancer*, **39**, 1251–1258.
- Harris,H.A. *et al.* (2003) Evaluation of an estrogen receptor-beta agonist in animal models of human disease. *Endocrinology*, **144**, 4241–4249.
- Wada-Hiraike,O. *et al.* (2006) New developments in oestrogen signalling in colonic epithelium. *Biochem. Soc. Trans.*, **34**, 1114–1116.
- Weige,C.C. *et al.* (2009) Estradiol alters cell growth in nonmalignant colonocytes and reduces the formation of preneoplastic lesions in the colon. *Cancer Res.*, **69**, 9118–9124.
- Martineti,V. *et al.* (2005) ERbeta is a potent inhibitor of cell proliferation in the HCT8 human colon cancer cell line through regulation of cell cycle components. *Endocr. Relat. Cancer*, **12**, 455–469.
- Jassam,N. *et al.* (2005) Loss of expression of oestrogen receptor beta in colon cancer and its association with Dukes' staging. *Oncol. Rep.*, **14**, 17–21.
- Lechner,D. *et al.* (2005) Phytoestrogens and colorectal cancer prevention. *Vitam. Horm.*, **70**, 169–198.
- de Vere White,R.W. *et al.* (2004) Effects of a genistein-rich extract on PSA levels in men with a history of prostate cancer. *Urology*, **63**, 259–263.
- Sarkar,F.H. *et al.* (2006) The role of genistein and synthetic derivatives of isoflavone in cancer prevention and therapy. *Mini Rev. Med. Chem.*, **6**, 401–407.
- Mak,P. *et al.* (2010) ERbeta impedes prostate cancer EMT by destabilizing HIF-1alpha and inhibiting VEGF-mediated snail nuclear localization: implications for Gleason grading. *Cancer Cell*, **17**, 319–332.
- Hegele-Hartung,C. *et al.* (2004) Impact of isotype-selective estrogen receptor agonists on ovarian function. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **101**, 5129–5134.
- Hillisch,A. *et al.* (2004) Dissecting physiological roles of estrogen receptor alpha and beta with potent selective ligands from structure-based design. *Mol. Endocrinol.*, **18**, 1599–1609.
- West,N.J. *et al.* (2009) Apoptosis in the colonic crypt, colorectal adenoma, and manipulation by chemoprevention. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **18**, 1680–1687.
- Gavrieli,Y. *et al.* (1992) Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.*, **119**, 493–501.
- Hertrampf,T. *et al.* (2008) Estrogen receptor subtype-specific effects on markers of bone homeostasis. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **291**, 104–108.
- Hertrampf,T. *et al.* (2005) Tissue-specific modulation of cyclooxygenase-2 (Cox-2) expression in the uterus and the v. cava by estrogens and phytoestrogens. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **243**, 51–57.
- Kubben,F.J. *et al.* (1994) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a new marker to study human colonic cell proliferation. *Gut*, **35**, 530–535.

30. Dvorakova, K. *et al.* (2005) Apoptosis resistance in Barrett's esophagus: *ex vivo* bioassay of live stressed tissues. *Am. J. Gastroenterol.*, **100**, 424–431.
31. Holubec, H. *et al.* (2005) Assessment of apoptosis by immunohistochemical markers compared to cellular morphology in *ex vivo*-stressed colonic mucosa. *J. Histochem. Cytochem.*, **53**, 229–235.
32. Koornstra, J.J. *et al.* (2003) Changes in apoptosis during the development of colorectal cancer: a systematic review of the literature. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **45**, 37–53.
33. Diebold, J. *et al.* (1992) Analysis of proliferative activity in colorectal mucosa by immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Methodological aspects and application to routine diagnostic material. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.*, **62**, 283–289.
34. Leonardos, L. *et al.* (1999) The activity of caspase-3-like proteases is elevated during the development of colorectal carcinoma. *Cancer Lett.*, **143**, 29–35.
35. Barone, M. *et al.* (2010) Dietary-induced ERbeta upregulation counteracts intestinal neoplasia development in intact male ApcMin/+ mice. *Carcinogenesis*, **31**, 269–274.
36. Suh, K.Y. *et al.* (2007) p63 in primary cutaneous carcinomas. *Am. J. Dermatopathol.*, **29**, 374–377.
37. Flores, E.R. (2007) The roles of p63 in cancer. *Cell Cycle*, **6**, 300–304.
38. Owens, S.R. *et al.* (2007) Immunohistochemical staining for p63 is useful in the diagnosis of anal squamous cell carcinomas. *Am. J. Surg. Pathol.*, **31**, 285–290.
39. Thomas, C.G. *et al.* (2010) Estrogen receptor beta decreases survival of p53-defective cancer cells after DNA damage by impairing G₂/M checkpoint signaling. *Breast Cancer Res. Treat.*, **127**, 417–427.
40. Park, J.H. *et al.* (2001) Synergistic effects of dexamethasone and genistein on the expression of Cdk inhibitor p21WAF1/CIP1 in human hepatocellular and colorectal carcinoma cells. *Int. J. Oncol.*, **18**, 997–1002.
41. Potten, C.S. *et al.* (1987) A comprehensive model of the crypts of the small intestine of the mouse provides insight into the mechanisms of cell migration and the proliferation hierarchy. *J. Theor. Biol.*, **127**, 381–391.
42. Marshman, E. *et al.* (2002) The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays*, **24**, 91–98.
43. Bardin, A. *et al.* (2004) Loss of ERbeta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocr. Relat. Cancer*, **11**, 537–551.
44. Hao, X. *et al.* (1998) Imbalance between proliferation and apoptosis in the development of colorectal carcinoma. *Virchows Arch.*, **433**, 523–527.
45. Carr, N.J. (2000) M30 expression demonstrates apoptotic cells, correlates with *in situ* end-labeling, and is associated with Ki-67 expression in large intestinal neoplasms. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **124**, 1768–1772.
46. Kikuchi, Y. *et al.* (1997) Proliferation and apoptosis in proliferative lesions of the colon and rectum. *Virchows Arch.*, **431**, 111–117.
47. Tanimoto, T. *et al.* (1998) Growth patterns in various macroscopic types of noninvasive intramucosal colorectal carcinoma with special reference to apoptosis and cell proliferation. *Dis. Colon Rectum*, **41**, 1376–1384.
48. O'Mahony, F. *et al.* (2009) Novel female sex-dependent actions of oestrogen in the intestine. *J. Physiol.*, **587**, 5039–5044.
49. Cleveland, A.G. *et al.* (2009) Disruption of estrogen receptor signaling enhances intestinal neoplasia in Apc(Min/+) mice. *Carcinogenesis*, **30**, 1581–1590.
50. Hope, C. *et al.* (2008) Low concentrations of resveratrol inhibit Wnt signal throughput in colon-derived cells: implications for colon cancer prevention. *Mol. Nutr. Food Res.*, **52** (suppl. 1), S52–S61.
51. Zhao, C. *et al.* (2010) Estrogen signaling via estrogen receptor {beta}. *J. Biol. Chem.*, **285**, 39575–39579.
52. Chen, A.C. *et al.* (2005) Genistein inhibits intestinal cell proliferation in piglets. *Pediatr. Res.*, **57**, 192–200.
53. Booth, C. *et al.* (1999) *In vivo* administration of genistein has no effect on small intestinal epithelial proliferation and apoptosis, but a modest effect on clonogen survival. *Cancer Lett.*, **144**, 169–175.
54. Gee, J.M. *et al.* (2000) Increased induction of aberrant crypt foci by 1,2-dimethylhydrazine in rats fed diets containing purified genistein or genistein-rich soya protein. *Carcinogenesis*, **21**, 2255–2259.

Received September 26, 2010; revised July 17, 2011; accepted July 23, 2011

2.3 Publikation 3: “Cadmium modulates expression of aryl hydrocarbon receptor associated genes in rat uterus by interaction with the estrogen receptor”

F. M. Kluxen, N. Höfer, G. Kretzschmar, G. H. Degen und P. Diel in *Archives of Toxicology*, 86(4):591–601, 2012. Eine Kopie von Publikation 3 findet sich ab Seite 45.

Zusammenfassung Östrogenähnliche Effekte des Schwermetalls Cd wurden sowohl in *in vitro* als auch in *in vivo* Studien berichtet — der genaue molekulare Wirkmechanismus ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Ein *Crosstalk* von Ah-Rezeptor und ER ist gut untersucht. Vor Kurzem wurde berichtet, dass 17 β -Östradiol die Expression von AHR und AhR-regulierenden Genen im Uterus von Ratten moduliert (Kretzschmar et al., Mol. Cell. Endocrinol. 321:253-257, 2010). Unsere Hypothese ist, dass Cd ebenfalls den AhR-Signalweg beeinflusst. Wir haben untersucht, ob Cd oder E₂ dem AhR-Signalweg-zugehörige Gene im Rattenuterus über den ER moduliert.

Ovariectomierte Wistar-Ratten wurde E₂ (0.5 mg/kg KG) oder CdCl₂ (0.05 und 2 mg/kg KG i.p.) allein und in Kombination mit dem reinen Antiöstrogen ZK191703 verabreicht. Auch wurde eine Gruppe mit E₂ und Cd 2 mg/kg KG gleichzeitig behandelt, um zu untersuchen, wie die Kombination wirkt. Uterusfeuchtgewicht, Uterusepithelhöhe, *complement* C3-mRNA und Progesteron-Rezeptor(PR)-Protein-Expression dienten als Östrogen-Antwortparameter, und die Expression von Mtl1a mRNA wurde als Cd-responsives Gen untersucht. Die Expression von AhR-Protein und AhR-Signalweg-zugehöriger Genexpression, *i. e.* Ahr, Arnt1, Arnt2, Cyp1a1 und Gsta2, wurden untersucht, um den Einfluss [der o. g. Wirkstoffe] auf die AhR-vermittelte Signaltransduktion zu analysieren.

Sowohl E₂ als auch Cd induzierten die C3- und PR-Expression, welche jeweils mit ZK191703 antagonisiert werden konnte. Die Mtl1a-mRNA Expression wurde deutlich von Cd induziert, aber von E₂ gegenüber den Kontrollen leicht reduziert. Uterine Ahr-, Arnt1-, Arnt2- und Cyp1a1-mRNA-Expression wurde von E₂ über den ER moduliert, da die durch E₂-induzierte Herunterregulierung der mRNA gegenüber der Kontrolle durch das Antiöstrogen verhindert wurde. Auch Cd moduliert die Cyp1a1-Expression über den ER. Darüberhinaus wurde die Cd-induzierte AhR-Protein-Expression durch E₂ antagonisiert, und die Antiöstrogen-induzierte Gsta2 mRNA Expression wurde von Cd antagonisiert. Zusammengefasst zeigen unsere Ergebnisse einen *Crosstalk* von ER und AhR im Uterus von Ratten.

Archives of Toxicology, Impact Factor (2012): 4.674; Eigenanteil 90 % – Planung der Experimente, Labortätigkeit, Auswertung der Ergebnisse, Erstellen des Draftes, 1. Autor

Cadmium modulates expression of aryl hydrocarbon receptor-associated genes in rat uterus by interaction with the estrogen receptor

Felix M. Kluxen · Nicola Höfer · Georg Kretzschmar ·
Gisela H. Degen · Patrick Diel

Received: 24 August 2011 / Accepted: 14 November 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract Estrogen-like effects of the heavy metal cadmium have been reported in both in vitro and in vivo studies. Yet, the molecular mechanisms involved in the hormonal activity of cadmium ions have not been fully elucidated. There are extensive data on cross-talk between aryl hydrocarbon receptor (AhR) and estrogen receptor (ER). Recently, 17 β -estradiol (E₂) was found to modulate the expression of AhR and AhR-regulated genes in rat uterus (Kretzschmar et al. in Mol Cell Endocrinol 321:253–257, 2010). Thus, we hypothesized that cadmium may also affect AhR signaling and examined whether cadmium or E₂ modulate AhR-associated genes via the ER in rat uterus. Ovariectomized Wistar rats received E₂ (0.5 mg/kg bw) or cadmium chloride (0.05 and 2 mg/kg bw i.p.) alone and in combination with the pure anti-estrogen ZK191703. We also co-treated a group with E₂ and cadmium 2 mg/kg bw to assess how they act in

concert. Uterus wet weight, uterus epithelial height, complement C3 mRNA, and progesterone receptor (PR) protein expression served as estrogen response parameters, and expression of *Mt1a* mRNA was analyzed as a cadmium responsive gene. The expression of AhR protein and AhR-associated gene expression, i.e., *Ahr*, *Arnt1*, *Arnt2*, *Cyp1a1*, and *Gsta2*, were analyzed to examine effects on AhR-mediated signaling pathways in the uterus of all groups. Both, E₂ and cadmium induced C3 and PR expression, and this was antagonized by ZK191703. *Mt1a* expression was clearly induced by cadmium but slightly reduced by E₂ compared to controls. Uterine *Ahr*, *Arnt1*, *Arnt2*, and *Cyp1a1* expression was modulated by E₂ via the ER since down-regulation by E₂ was reversed by anti-estrogen. Cadmium apparently also modulated *Cyp1a1* expression via the ER. Furthermore, cadmium-induced AhR was antagonized by E₂, and anti-estrogen-induced *Gsta2* expression was antagonized by cadmium. Together our findings provide evidence for cross-talk of ER and AhR in the rat uterus.

The work described here is part of the PhD thesis of Felix M. Kluxen. Some results have been presented at the 55th Conference of the DGPT: Kluxen et al. (2010).

F. M. Kluxen · N. Höfer · P. Diel
Institute of Cardiovascular Research and Sports Medicine,
Department of Molecular and Cellular Sports Medicine,
German Sports University Cologne, Am Sportpark Müngersdorf
6, 50933 Köln, Germany

F. M. Kluxen · N. Höfer · G. H. Degen (✉)
IfADo—Leibniz Research Centre for Working Environment
and Human Factors at the TU Dortmund, Ardeystr. 67,
44139 Dortmund, Germany
e-mail: degen@ifado.de

G. Kretzschmar
Molecular Cell Physiology & Endocrinology,
Institute of Zoology, Technische Universität Dresden,
Zellescher Weg 20, 01062 Dresden, Germany

Keywords Arylhydrocarbon receptor · Cadmium ·
Endocrine modulation · Estrogens

Abbreviations

AhR	Arylhydrocarbon receptor
ARE	Antioxidant response element
bw	Body weight
CdCl ₂	Cadmium chloride
DRE	Dioxin response element
E ₂	17 β -estradiol
ERalpha/beta	Estrogen receptor alpha/beta
ERE	Estrogen response element
i.p.	Intraperitoneal
Mt1a	Metallothionein 1a

OVX Ovariectomized
ZK ZK191703

Introduction

Cadmium is one of the most toxic heavy metals and an important environmental and industrial pollutant (Järup and Åkesson 2009). The toxicity of cadmium and its salts in humans and animals is well characterized and has been known for over a century (INCHEM 2007; Nordberg 2009). It is now also regarded as a potential endocrine disruptor, but the exact mechanisms by which the “metallohormone” may interfere with the endocrine system have not yet been elucidated (Byrne et al. 2009; Takiguchi and Yoshihara 2006). Estrogen-like effects of cadmium have been reported in both in vitro (Garcia-Morales et al. 1994; Stoica et al. 2000) and in vivo studies (Höfer et al. 2009; Höfer et al. 2010; Johnson et al. 2003). This raises new concerns, since exposure to substances mimicking the effects of estrogens may play a role in the development and progression of hormone-dependent diseases. In epidemiological studies, occupational and environmental cadmium exposure has been associated with an increased risk for breast and endometrial cancer (Åkesson et al. 2008; Cantor et al. 1995; McElroy et al. 2006).

Johnson et al. (2003) presented evidence that the cadmium-induced estrogenic response in rat uterus and breast is antagonized by an anti-estrogen. This indicates that its estrogenic effect is mediated via a direct interaction with the ER. However, Ali et al. (2010) recently proposed that estrogen-like effects of cadmium in vivo are mediated by non-classical pathways, based on their results in estrogen response element (ERE)-luciferase reporter mice. Interestingly, in vitro data show that extracellularly regulated kinases are modulated by cadmium and by steroid estrogens (Brama et al. 2007; Kato et al. 2000; Liu et al. 2008).

Moreover, we hypothesized that aside from ER signaling cadmium may affect aryl hydrocarbon receptor (AhR) signaling, based on various observations (see below and discussion) and since cross-talk has been observed among AhR and other nuclear receptors, in particular the ER. The AhR, a transcription factor of the bHLH/PAS family, is well known for mediating biochemical and toxic effects of dioxins, polycyclic hydrocarbons, and related compounds (e.g., Nebert et al. 2004). But the AhR is also activated by natural and endogenous ligands and involved in various cellular processes such as growth and differentiation (for recent reviews of its functions Abel and Haarmann-Stemmann 2010). Furthermore, there are extensive data on an intricate relationship (cross-talk) between AhR and ER (Gräns et al. 2010; Matthews and Gustafsson 2006). On the

one hand, AhR agonists such as 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-*p*-dioxin and 3-methyl-cholanthrene exert anti-estrogenic activity in vitro and in vivo, and this is most likely due to increased proteasomal degradation of the ER (Safe and Wormke 2003; Swedenborg and Pongratz 2010).

On the other hand, ER agonists can apparently modulate the activation of the AhR pathway in vitro and in vivo. For instance, estrogenic concentrations of E₂ and the phytoestrogens daidzein and genistein decreased CYP1A1 expression and activity in MCF-7 cells, and these effects were reversed by an ER antagonist (Wagner et al. 2008). In the human endometrium, AhR protein levels were found to vary within the menstrual cycle and peak at ovulation (Küchenhoff et al. 1999) suggesting that AhR expression is modulated by sex steroids. In line with this view, it was demonstrated that E₂ regulates AhR expression in rat uterus and modulates expression of AhR-regulated genes (Kretzschmar et al. 2010). Finally, several studies have examined the ability of metal contaminants including cadmium to affect AhR-regulated gene expression (i.e., an induction of CYP1A1 by AhR agonists) in hepatic cell lines and human hepatocyte cultures (Chao et al. 2009; Elbekai and El-Kadi 2004; Vakharia et al. 2001). But, to the best of our knowledge, this has not been studied in uterus so far.

The present study was aimed to further investigate the effects of steroid estrogens and cadmium on AhR and ER signaling in the uterus. Thus, ovariectomized female rats were treated with E₂, cadmium chloride (CdCl₂), and combinations. The applied CdCl₂ doses of 0.05 and 2 mg/kg bw were based on previous experiments in which cadmium showed an estrogen-like effect upon i.p. injection in Wistar rats (Höfer et al. 2009). Biological, histological, and molecular endpoints for estrogenicity were determined in the uterus. To investigate whether the ER is directly involved in these effects, antagonization experiments with the pure anti-estrogen ZK191703 (Zk) were included. Moreover, the expression of AhR and AhR-associated gene expression were analyzed to examine effects on AhR-mediated signaling pathways in the uterus of all groups.

Materials and methods

Animals and experimental treatments

All animal husbandry and handling conditions complied with the Institutional Animal Care and Use Committee guidelines, and legal permission to conduct the animal experiments was obtained from the local responsible authorities. Juvenile female Wistar rats of 4–5 weeks (101–125 g) were obtained from Janvier (Le-Genest St-Isle, France) and acclimatized for 1 week. Rats were

kept under controlled conditions (temperature, $20 \pm 1^\circ\text{C}$; humidity, 50–80%; illumination, 12L/12D) and had free access to tap water and a diet low in phytoestrogen content (R/M-H, from Ssniff GmbH, Germany). Prior to the experiments, animals were ovariectomized, and after 14 days of endogenous hormonal decline, rats were randomly allocated to vehicle or treatment groups ($n = 6$ animals per group).

The animals received either CdCl_2 alone, at single doses of 0.05 and 2 mg/kg bw i.p. (Cd 0.05 or Cd2) or in combination with the pure anti-estrogen Zk191703 (Zk, at 2.5 mg/kg bw, s.c. for 3 days); negative and positive control groups received solvent (OVX, water), E_2 (i.p. 0.5 mg/kg bw) alone or plus ER antagonist. We also co-treated a group with Cd 2 mg/kg bw i.p. and E_2 . After 3 days, the animals were sacrificed by decapitation.

CdCl_2 was dissolved in sterile water to achieve doses of 0.05 mg/kg bw or 2 mg/kg bw in a total application volume of 1 ml/kg bw. E_2 was dissolved in propanediol/ethanol (80:20, v:v) and injected at a dose level of 0.5 mg/kg bw. ZK191703 (11-fluoro-7-(14,14,15,15-penta-fluoro-6-methyl-10-thia-6-azapentadecyl)estra-1,3-5(10)-triene-3,17-diol) was dissolved in propanediol/ethanol (80:20, v:v) and injected at a dose level of 2.5 mg/kg bw. The compounds were purchased from Sigma–Aldrich (Taufkirchen, Germany).

Tissue collection and preparation

Body weights of the rats were determined prior to sacrifice. Freshly excised uteri were collected and snap frozen in liquid nitrogen for RNA and protein analysis. In addition, a

piece of the uterus was fixed in neutral buffered formaldehyde and later embedded in paraffin for histological analysis.

Histological analysis

Seven-micrometer tissue sections of paraffin-embedded uterine sections were mounted on slides pre-coated with polylysine (Menzel Glaser, Hilden, Germany), then cleared, hydrated, and stained with hematoxylin and eosin (Fischer et al. 2006). Sections were examined with a light microscope (Axiophot, Zeiss, Jena, Germany), and the height of the uterine epithelium was gauged according to standard procedures (Diel et al. 2002). We prepared at least 3 samples of 3 animals per group.

RNA isolation and real-time RT-PCR

Total RNA of the uteri was isolated from frozen tissue with TRIzol (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) according to the suppliers' instructions. First-strand cDNA synthesis was accomplished with QuantiTect® Kit (Qiagen, Hilden). Amplification of cDNA by real-time RT-PCR was performed in a MX3005P thermal cycler (Stratagene) or an iCycler (Bio-Rad). The protocol comprised 5 min at 95°C followed by 45 cycles of 94, 60, and 72°C for 1 min each. The data were normalized relative to the housekeeping gene subunit 1A of cytochrome c oxidase via the delta–delta C_T method (Pfaffl 2001). Primers are depicted in Table 1. We have performed at least three measurements from independently synthesized cDNA of the same pooled RNA samples.

Table 1 Primers used in real-time RT-PCR

mRNA		Primer (5'–3')	Published in
<i>1A</i>	fwd	CGT CAC AGC CCA TGC ATT CG	Höfer et al. 2009
	rev	CTG TTC ATC CTG TTC CAG CTC	
<i>C3</i>	fwd	CAG CCC GCA GAG TGC CAG TAG TC	Höfer et al. 2010
	rev	CCA TCC TCC TTT CCA TCA ACT GC	
<i>Mt1a</i>	fwd	TTA CAC CGT TGC TCC AGA TTC	Kretzschmar et al. 2010
	rev	CAG CAC TGT TCG TCA CTT CAG	
<i>Ahr</i>	fwd	CAA CCA AAC CAA ACA ACA GAG A	
	rev	ATC CAT CAT CTT TCA ACC CAT C	
<i>Arnt 1</i>	fwd	ACT GCT GCC TAC CCT ACT CTT C	
	rev	GCT ACT TGG TTG TGC TGA TGT T	
<i>Arnt 2</i>	fwd	TGA AAG AAG GAG AAG CCC AAT A	
	rev	CAT CAG AGT TAT GCC GAG ACA G	
<i>Cyp1a1</i>	fwd	TTA TGA CCA CGA TGA CCA AGA G	
	rev	GCC CTT CTC AAA TGA CCT GTA G	
<i>Gsta 2</i>	fwd	GCC AGC CTT CTG ACC TCT TT	
	rev	GCT CCG CTA AAA CTT GAA AAT C	

Western blot analysis

Pooled frozen uterus samples were homogenized and soaked in lysis buffer (50 mM Tris pH 8; 2 mM CaCl_2 , 80 mM NaCl, 1% Tx100) with protease enzyme inhibitor PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride, dissolved in isopropanol) at final concentration of 10 mM. The protein concentrations were determined using DC Protein Assay (Bio-Rad, München). Equal amounts of sample protein (20 μg), mixed with equal amounts of SDS-loading buffer (Laemmli 1970), were loaded on a NuPAGE Novex 4–12% Bis-Tris Midi Gel (Invitrogen, Karlsruhe), electrophoresed at 90 mA for 60 min, and blotted for 135 min at 120 mA onto nitrocellulose membranes (Hartenstein, Würzburg). The membranes were blocked with 5% dry milk powder in Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 (TBS-T) over night at 4°C. Primary antibodies were diluted in 1% dry milk powder in TBS-T: alpha-actin 1:5,000 (A 5060, Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany), aryl hydrocarbon receptor 1:1,000 (BML-SA210, Enzo Life Sciences, Lörrach, Germany), progesterone receptor 1:40 (IM1408, Beckmann Coulter, Krefeld, Germany). Membranes were incubated with primary antibody solution for 2 h at room

temperature and rinsed four times for 10 min each in TBS-T. Polyclonal Rabbit Anti-Mouse (P0260, Dako, Hamburg) was used as species-specific HRP-conjugated secondary antibody as well as Swine Anti-Rabbit (P0217, Dako). Membranes were again rinsed three times for 10 min each in TBS-T and then two times in TBS buffer. Blot signals were visualized by the chemoluminescent POD-Substrate (LumiLight Plus, Roche Diagnostics, Mannheim) and quantified by densitometry using the software Image J 1.41o (Rasband 1997–2011). The ratio of the reference protein (alpha-actin) to the target protein was calculated to account for protein loading. Each blotting procedure was repeated at least 5 times. We prepared pooled rat liver extract from 3 female, adult, sham-operated Wistar rats as positive control (PC) for the AhR antibody. One image of the successive blots was cropped and realigned to match with the group sequence in the graphs in Fig. 1 and also Fig. 3.

Evaluated response parameters

We determined uterus wet weight and height of the uterine epithelium (Fig. 1a, b), an established histological parameter for estrogenicity (Diel et al. 2002). As sensitive

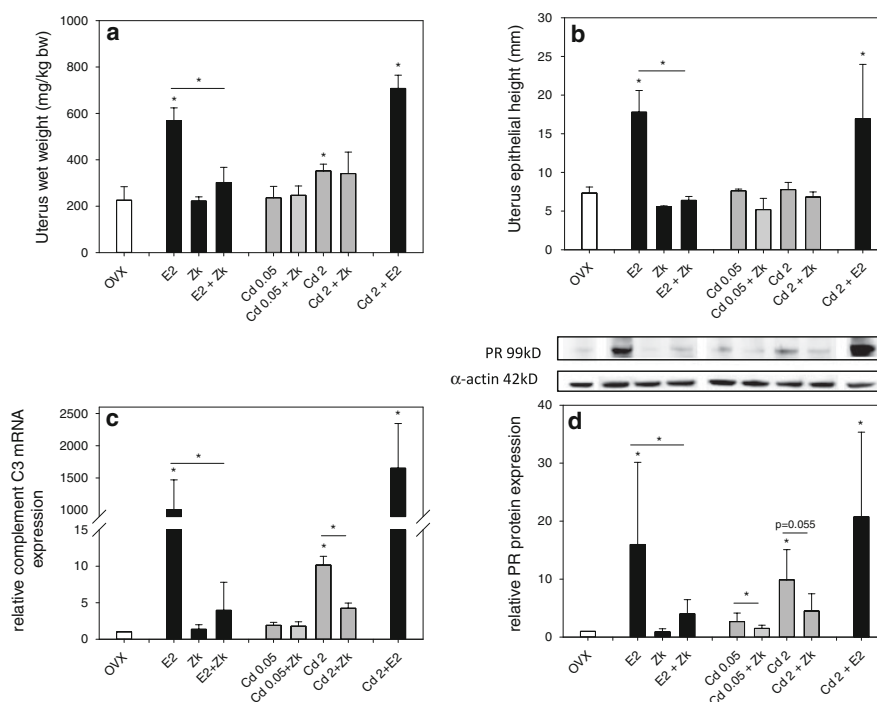


Fig. 1 Uterus wet weight (a), uterus epithelial height (b), relative complement C3 mRNA expression (c) in rats after a single i.p. (Cd, E2) or 3 days s.c. (Zk) injection or co-treatment as indicated and in controls (OVX). PR protein expression (d) in the uterus with representative Western blot analysis and associated densitometric

analysis from 6 consecutive blots. Mean values $\pm$ SD are given for $n = 6$ animals per dose group [$n = 3$ for uterus epithelial height]; (asterisk) marks values significantly different from the control (OVX) or as indicated by lines. * $P < 0.05$

Table 2 Body weight, liver, and kidney weight/kg bw upon a single i.p. (Cd, E2) or 3 days s.c. (Zk) injection

	Body weight		Leber		Kidney	
	g	SD	g/kg bw	SD	g/kg bw	SD
OVX	217.50	12.63	43.71	2.22	3.91	0.23
E2	213.00	15.95	42.50	2.47	4.12	0.23
ZK	213.40	12.62	45.21	0.84	4.03	0.13
E2 + ZK	212.67	6.89	43.16	4.20	4.54*	0.30
Cd 0.05	221.00	10.30	47.78*	2.64	3.94	0.25
Cd 0.05 + ZK	227.83	10.57	47.14*	2.71	3.95	0.34
Cd 2	197.83	27.21	45.13	3.31	4.26*	0.19
Cd 2 + ZK	205.50	13.13	45.90	2.78	4.40	0.29
E2 + Cd 2	188.67*	12.06	44.57	3.07	4.39*	0.34

Mean values $\pm$ SD are given for $n = 6$ animals per dose group. (*) marks values significantly different from the control (OVX)

* $P < 0.05$

molecular read out for estrogenicity, we measured relative complement C3 mRNA expression (Fig. 1c) and analyzed PR expression (Hertrampf et al. 2006; Kraus et al. 1993) by Western blot analysis (Fig. 1d). We determined the body, liver, and kidney weights (Table 2) and analyzed relative mRNA expression of metallothionein subtype 1a, *Mt1a* (Fig. 2), a classical response marker for cadmium (Jin et al. 1998; Ghoshal and Jacob 2001) used also in our previous study. According to Kretzschmar et al. (2010) who studied regulation of *AhR*, *Arnt1*, and *Arnt2* mRNAs by E₂ in the uterus, we now analyzed the effects of E₂, cadmium, and ER antagonist on mRNA and protein expression of these genes (Fig. 3), and the effects on two classic AhR target genes, namely *Cyp1a1* and *Gsta2* (Fig. 4).

Statistical analysis

All data are presented as mean $\pm$ standard deviation. We used Kruskal–Wallis one-way analysis of variance followed by pair-wise comparison of selected means with the Mann–Whitney U-test. Significance was set at * $P < 0.05$.

Results

A range of parameters was applied to examine the effects of cadmium and steroid estrogen exposure on ER-mediated responses and AhR signaling in the rat uterus.

Co-treatment with a pure antiestrogen (ZK191703) and the combined exposure to E₂ and CdCl₂ served to explore mechanisms and possible interactions.

Evaluation of estrogenicity

As expected, uterine wet weights were clearly (about threefold) increased by E₂ (Fig. 1a). This uterotrophic response was antagonized by co-treatment with the pure anti-estrogen. The higher dose of cadmium (Cd2) increased the uterine wet weight about 1.5-fold relative to OVX, but

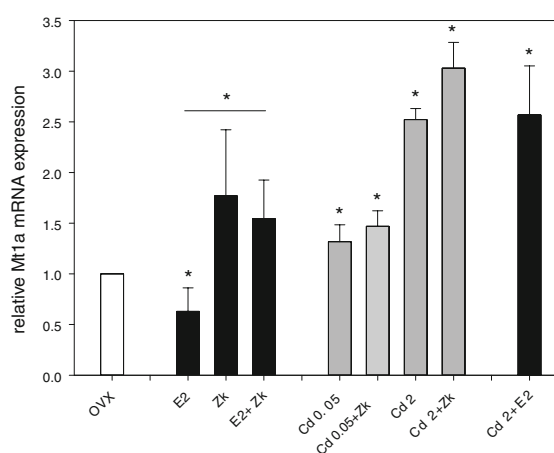


Fig. 2 *Mt1a* mRNA expression in the uterus after a single i.p. (Cd, E2) or 3 days s.c. (Zk) injection or co-treatment as indicated and in controls (OVX). Mean values $\pm$ SD are given for $n = 6$ animals per dose group; (asterisk) marks values significantly different from the control (OVX) or as indicated by lines. * $P < 0.05$

this effect was not antagonized by the anti-estrogen (Fig. 1a). Interestingly, co-treatment with Cd2 and E₂ resulted in a higher uterus wet weight than observed for the single compounds (Fig. 1a). The height of the uterine epithelium was clearly increased by E₂ and the combination with the metallohormone, while cadmium alone did not affect this parameter significantly in this study (Fig. 1b), but in a previous one (Höfer et al. 2009).

C3 and PR expression were induced by E₂, and this response was antagonized by Zk (Fig. 1c, d). Also cadmium (0.05 and 2 mg/kg bw) dose-dependently induced expression of C3 mRNA (twofold and tenfold) and PR protein expression (threefold and tenfold). The Cd2-induced C3 and PR expression and Cd0.05-induced PR expression were antagonized by the pure anti-estrogen (Fig. 1c, d). As observed for the uterine wet weight, the co-treatment with Cd2 and E₂ resulted in an additive effect on uterine C3 and PR expression.

Fig. 3 Uterine mRNA expression of *Ahr* (a), *Arnt1* (b), *Arnt2* (c), upon a single i.p. (Cd, E2) or 3 days s.c. (Zk) injection and in controls (OVX). Uterine AhR protein expression (d) with a representative Western blot and densitometric analysis of 5 consecutive blots. PC marks positive control, rat liver extract. Mean values $\pm$ SD are given for $n = 6$ animals per dose group; (asterisk) marks values significantly different from the control (OVX), from Cd + Zk (section sign), or as indicated by lines. * $P < 0.05$

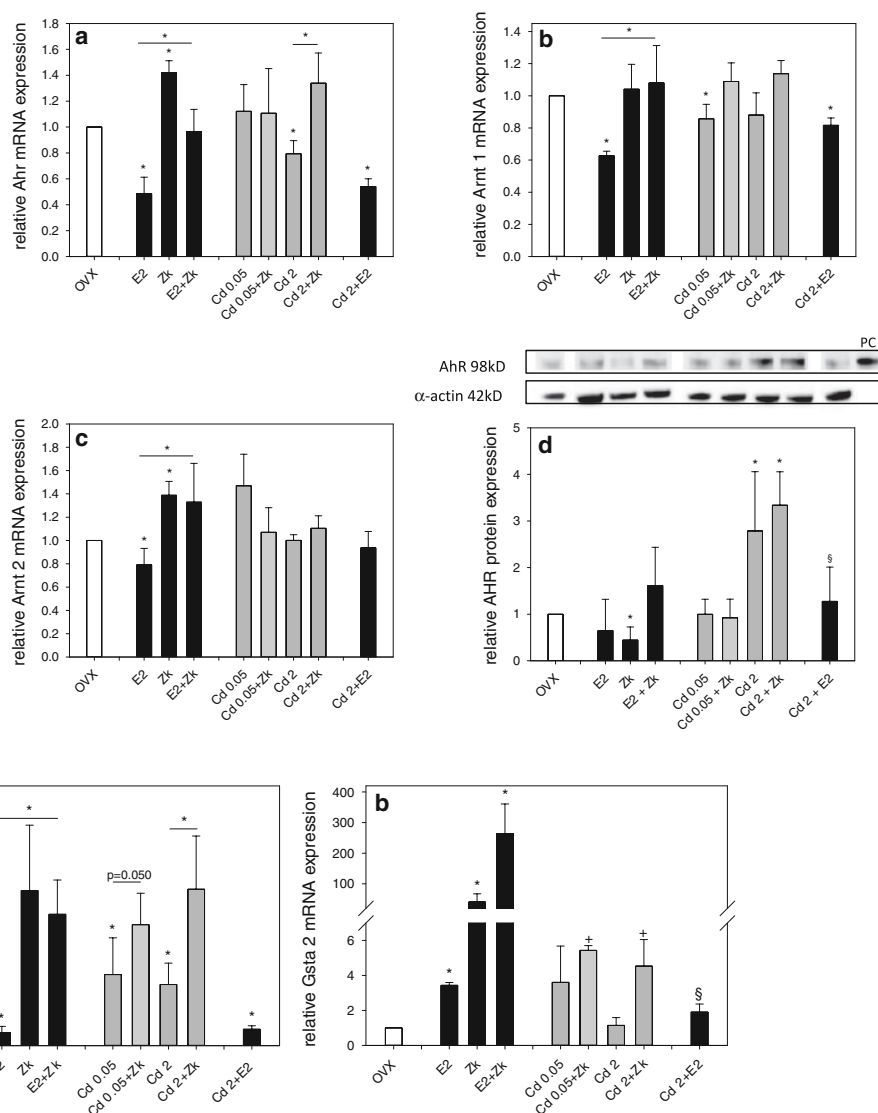


Fig. 4 Uterine mRNA expression of *Cyp1a1* (a) and *Gsta2* (b), after a single i.p. (Cd, E2) or 3 days s.c. (Zk) injection or co-treatment as indicated and in controls (OVX). Mean values $\pm$ SD are given for

$n = 6$ animals per dose group; (asterisk) marks values significantly different from the control (OVX), from Zk (plus) and from E2 (section sign), or as indicated by lines. * $P < 0.05$

Toxicity of cadmium and uterine MT1a expression

Treatment with cadmium led to increases in relative liver and kidney wet weights (Table 2). The body weight was not affected by E₂, whereas administration of cadmium resulted in a decreased body weight in the high dose group (Cd2). This effect was statistically significant in the group co-treated with E₂ and Cd2.

A significant, dose-dependent *Mt1a* mRNA induction was observed in uteri of cadmium treated rats, which was not antagonized by Zk (Fig. 2). Interestingly, treatment

with E₂ resulted in a reduced uterine *Mt1a* expression; this effect was reversed by the pure anti-estrogen (Fig. 2). But, the anti-estrogen alone also increased the uterine *Mt1a* mRNA level compared to OVX controls.

Evaluation of Ahr/Arnt expression

Treatment of OVX rats with E₂ resulted in down-regulation of mRNA for *Ahr* and its dimerization partners *Arnt1* and *Arnt2* in the uterus. This down-regulation was reversed by ER antagonist Zk (Fig. 3a–c). Treatment with the

anti-estrogen alone resulted in a significant induction of *Ahr* and *Arnt2* mRNA in the uterus (Fig. 3a, c).

Treatment with Cd2 resulted in a small, but significant decrease of *Ahr* mRNA expression, and again this effect was antagonized by the anti-estrogen (Fig. 3a). No significant effects for cadmium were observed on *Arnt1* (Fig. 3b) and *Arnt2* (Fig. 3c) expression.

Evaluation of uterine AhR protein expression by Western blot revealed no clear modulation by E₂ treatment, but a significant decrease by treatment with Zk (Fig. 3d). Treatment with Cd2 (not with Cd0.05) resulted in a significant increase of AhR protein expression. Interestingly, this effect was antagonized by co-treatment with E₂ (Fig. 3d), whereas co-treatment with Cd2 and Zk resulted in AhR protein levels similar to Cd2 treatment alone.

Effects on AhR target genes

Uterine *Cyp1a1* mRNA expression was strongly down-regulated by steroid estrogen and by combined treatment with E₂ and Cd (Fig. 4a). This was antagonized by Zk. Treatment with Cd0.05 and Cd2 resulted also in a significant decrease of *Cyp1a1* mRNA that was antagonized by Zk (Fig. 4a). Interestingly, the uterine *Gsta2* expression showed a different pattern (Fig. 4b): Treatment with cadmium alone resulted in no major change (except for a non-significant increase at the low dose), whereas E₂ induced *Gsta2* expression about threefold. The latter effect was not antagonized by Zk. On the contrary, Zk alone induced *Gsta2* about 30-fold and co-treatment with E₂ and Zk induced *Gsta2* about 260-fold. On the other hand, co-treatment with cadmium apparently antagonized the strong *Gsta2* mRNA increase induced by E₂ or by Zk alone (Fig. 4b).

Discussion

As outlined in the introduction, in vitro and in vivo studies provide evidence that cadmium exerts effects on estrogen signaling. Yet, the reported effects vary from clearly agonistic (Brama et al. 2007; Garcia-Morales et al. 1994; Höfer et al. 2009; Johnson et al. 2003; Stoica et al. 2000) to antagonistic (Höfer et al. 2009; Rider et al. 2009; Silva et al. 2006) in different systems, and it is not yet clear whether estrogen-like effects of cadmium are mediated via the classical ER transcriptional pathway or by non-genomic effects (Ali et al. 2010; Brama et al. 2007). To further elucidate the hormonal activity of cadmium in rat uterus, we designed a study where cadmium was applied in combination with the pure antiestrogen Zk and with E₂. As recent findings demonstrate regulation of uterine AhR expression by steroid estrogen (Kretzschmar

et al. 2010), we also investigated possible interactions between ER and AhR in the rat uterus, asking in particular whether cadmium modulates the AhR pathway similar to E₂.

We present two major findings in this study: Cadmium induces estrogenic gene expression via the ER in the uterus. Moreover, cadmium and E₂ modulate AhR target gene expression, i.e., *Cyp1a1*, via ER-AhR crosstalk in the uterus.

Estrogenicity of cadmium

Cadmium caused an increase in uterus wet weight, significant at 2 mg/kg bw, but less pronounced than E₂ (Table 2; Fig. 1a). This is in line with our previous findings (Höfer et al. 2009), and cadmium's uterotrophic effect in other studies (Johnson et al. 2003; Liu et al. 2010). The height of the uterine epithelium was not affected in the present study (Fig. 1b), but on the molecular level, a clear induction of C3 and PR expression was observed (Fig. 1c–d) and demonstrates an estrogenic activity of cadmium in this tissue. The antagonization experiment with the pure anti-estrogen Zk helped to further investigate whether the ER is involved in the estrogenic response of the uterus to cadmium. The findings were heterogeneous: Other than the uterotrophic response to steroid estrogen, the increase of uterine wet weight induced by cadmium was not antagonized by Zk. But, induction of uterine genes, i.e., C3 and PR expression, by cadmium or E₂ was clearly antagonized by pure antiestrogen (Fig. 1c–d). As EREs have been found in the promoter region of both C3 (Fan et al. 1996) and PR (Kraus et al. 1993), these genes are considered down-stream targets of the ER signaling cascade. Their regulation by cadmium is a major finding in our study, indicating that the metallohormone can interact with ER signaling on a functional level—albeit the effect is less pronounced than with the positive steroid estrogen control. In line with this view, co-treatment with cadmium and E₂ resulted in an additive effect for C3 and PR expression, and also for the uterus wet weight. The induction of uterine wet weight by cadmium is probably due to influx of water and not by stimulation of proliferation, since it is not antagonized by Zk and the height of the uterine epithelium is not affected. Also the estrogen-induced water influx into the uterus is a quick response of this tissue that is not mediated directly via the classical ER pathway (O'Brien et al. 2006). On the other hand, uterine gene expression by cadmium is apparently regulated by ER interaction, in accordance with studies on estrogenic effects of Cd in breast cancer cells (Garcia-Morales et al. 1994). The response pattern in rat uterus supports the conclusion that cadmium can activate some, but not all molecular mechanisms triggered by (potent) steroid estrogens (Ali et al. 2010; Liu et al. 2010).

Uterine metallothionein expression

As expected from our previous findings in liver and kidney (Höfer et al. 2010), cadmium dose-dependently induced *Mt1a* expression in the uterus (Fig. 2), and this response is consistent with the cadmium levels measured in this tissue (Höfer et al. 2009). In contrast to cadmium, treatment with E_2 resulted in a down-regulation of uterine *Mt1a* expression that was reversed by pure anti-estrogen Zk (Fig. 2). This observation suggests that *Mt1a* expression is regulated by E_2 via an ER-mediated mechanism. Previously, *Mt1a* expression was found to be modulated by steroid estrogens in the rat uterus, with an increase shortly (4 h) after E_2 , but a decrease compared to OVX controls at 24 h and later (Rivera-Gonzalez et al. 1998). On the other hand, co-treatment with E_2 did not affect the induction of *Mt1a* by cadmium (Cd2) in the uterus (Fig. 2). Metallothionein expression is induced by steroid estrogens (E_2 or EE) in liver, kidney, and small intestine (Höfer et al. 2010) indicating that it may be an estrogen regulated gene in these tissues. But, in light of the rather complex regulation of metallothionein expression (e.g., Coyle et al. 2002), possible tissue dependent differences in the response of the *Mt1a* gene to steroid estrogens and cadmium require further studies.

Modulation of uterine AhR/Arnt expression by cadmium and estradiol

Our results (Fig. 3a–c) confirm recent findings (Kretzschmar et al. 2010) that the uterine mRNA expression of *Ahr*, *Arnt1*, and *Arnt2* is down-regulated by E_2 . Moreover, our new data show that the E_2 -induced down-regulation of *Ahr* mRNA expression is antagonized by Zk and thus support an ER-mediated mechanism for this effect. In this study, we found no significant change of AhR protein levels in the E_2 group (Fig. 3d) whereas Kretzschmar et al. (2010) observed an increased AhR expression in the uterus of E_2 -treated rats. This difference observed for AhR protein expression may be related to the analysis techniques used (Western blot or immunohistochemistry) as well as dose and administration route for E_2 (single i.p. injection of 50 $\mu\text{g/kg}$ bw or s.c. injection of 4 $\mu\text{g/kg}$ bw on 3 days).

Moreover, cadmium (Cd2) also down-regulated *Ahr* mRNA expression, although less pronounced than E_2 , and this effect was also antagonized by pure anti-estrogen Zk (Fig. 3a). Interestingly, on the protein level, a strong increase of AhR was observed in the high dose cadmium groups (Fig. 3d). The decrease in *Ahr* mRNA, but observed increase in AhR protein levels, may be explained by cadmium stabilizing AhR protein and protecting it against degradation, analogous to its effects on the transcription factor Nrf-2 (Stewart et al. 2003). Effects of cadmium on

CYP1A1 protein expression have been investigated before (see below), but to our knowledge, we report for the first time a modulation of AhR protein by cadmium in vivo. The stimulation of AhR expression by the high dose of cadmium was antagonized by estradiol (Fig. 3d). Overall, the results indicate that steroid estrogen and cadmium modulate the expression of nuclear receptors other than the ER, possibly via interacting with ER-alpha in the uterus. Steroid estrogens and cadmium down-regulate ER-beta expression in mucosa (Höfer et al. 2010); it is thus of interest to investigate also in other tissues possible effects of the metallohormone on ER-alpha/ER-beta signaling.

Effects of cadmium and estradiol on AhR target genes

To assess a modulation of the AhR pathway by E_2 and cadmium in uterus, we analyzed the response of two long known target genes *Cyp1a1* (Bock 1994) and *Gsta2* (Baars et al. 1978). In accord with recent findings (Kretzschmar et al. 2010), the *Cyp1a1* mRNA expression in the rat uterus is down-regulated by E_2 , and this response is antagonized by co-treatment with Zk (Fig. 4a). This suggests an ER-mediated mechanism and cross-talk between the ER and AhR pathways. A down-regulation of CYP1A1 enzyme activity and mRNA expression by E_2 has been also demonstrated in MCF-7 breast cancer cells (Wagner et al. 2008) and was antagonized by the anti-estrogen fulvestrant (ICI 182.780).

Similar observations were made in MCF-7 cells where E_2 and the relatively potent mycoestrogen zearalenone reduced both basal and TCDD-induced activity and mRNA expression of CYP1A1 (Yu et al. 2004). There are also contradictory reports on the influence of E_2 co-treatment on AhR agonist-induced transcription: As reviewed elsewhere (Beischlag et al. 2008; Wihlén et al. 2009), the effects of ER on AhR signaling are influenced by cell culture conditions and exhibit cell and species specificity.

Similar to E_2 , treatment with cadmium also resulted in a down-regulation of uterine *Cyp1a1* expression (Fig. 4a). Since this effect was antagonized by anti-estrogen Zk, it is novel evidence for an ER-mediated mechanism of cadmium in the rat uterus. So far, modulation of *Cyp1a1* expression and activity by cadmium has mainly been studied in vitro and in other tissues. In murine Hepa 1c1c7 cells, cadmium induces *Cyp1a1* activity and mRNA expression; cadmium potentiated TCDD-induced *Cyp1a1* mRNA and protein expression, but it reduced TCDD-induced *Cyp1a1* activity (Elbekai and El-Kadi 2004). In human hepatoma Huh7 and Huh7-dioxin responsive element (DRE)-Luc cells, cadmium inhibits TCDD-induced CYP1A1 activity and TCDD-induced luciferase activity, respectively (Chao et al. 2009). We speculate that ER and AhR cross-talk and cell type specific receptor expression

may explain divergent response patterns between liver cells and uterus. Decreases in P450 enzymes by acute or chronic cadmium treatment have been reported in liver (Schnel et al. 1978), testis (Iskan et al. 2002), and kidney (Plewka et al. 2004) of male rats. But to the best of our knowledge, this is the first report on such an effect in uterus.

The expression of glutathione-S-transferase A2, another AhR-regulated gene, was induced (threefold) in the uterus by treatment with E₂ (Fig. 4b). This *Gsta2* response confirms previous results (Kretzschmar et al. 2010). Interestingly, in the present study, the anti-estrogen Zk was able to induce *Gsta2* much stronger (about 30-fold) than E₂, and a combination of E₂ and Zk resulted in a synergistic effect. Presently, we can only speculate why a combination of E₂ and anti-estrogen results in such a high *Gsta2* induction. Effects on involved cofactor binding could explain this exiting finding that needs to be analyzed in future studies. Previously, in breast cancer cells transfected with a GSTA2 reporter construct, anti-estrogen treatment caused a significant increase in transcriptional activity (Montano and Katzenellenbogen 1997).

However, it should be kept in mind that detoxifying enzymes such as *Gsta2*, with both DREs and AREs (antioxidant response element) in the promoter region, are not only induced by AhR agonists. Induction of phase II gene expression by phenolic antioxidants and by oxidative stress is primarily an ARE-mediated effect through activation of the transcription factor Nrf2. This pathway is ligand, ER-subtype, and cell specific (Ansell et al. 2004). Mediation of cadmium toxicity by oxidative stress is also well known (Liu et al. 2009). This implicates that *Gsta2* might not be an ideal target gene to analyze the influence of cadmium on AhR and ER cross-talk.

In our study, cadmium alone exerted no major effects on uterine *Gsta2* mRNA expression; but in combination, cadmium clearly antagonized the supposedly beneficial induction of *Gsta2* by Zk (Fig. 4b). This observation may be of importance with respect to carcinogenesis and deserves further investigations.

Conclusion

Together our findings provide evidence for cross-talk of AhR and ER in the rat uterus. Estradiol modulates AhR gene expression via the ER. Cadmium exerts estrogen-like effects, and it modulates also AhR expression and that of AhR target genes. Down-regulation of uterine *Cyp1a1* expression is observed at similar doses as induction of uterine C3 and PR by cadmium, and these responses are antagonized by pure anti-estrogen.

Acknowledgments Financial support by the Deutsche Forschungsgemeinschaft through DFG graduate college GRK1427 and a stipend to F.M.K. are gratefully acknowledged. We thank Ute Laudenbach-Leschowsky for animal handling and Jonas Hengevoß for uterine epithelial height analysis.

References

- Abel J, Haarmann-Stemmann T (2010) An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology. *Biol Chem* 391(11):1235–1248. doi:10.1515/BC.2010.128
- Akesson A, Julin B, Wolk A (2008) Long-term dietary cadmium intake and postmenopausal endometrial cancer incidence: a population-based prospective cohort study. *Cancer Res* 68(15): 6435–6441. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0329
- Ali I, Penttinen-Damdimopoulou PE, Makela SI, Berglund M, Stenius U, Akesson A, Hakansson H, Halldin K (2010) Estrogen-like effects of cadmium in vivo do not appear to be mediated via the classical estrogen receptor transcriptional pathway. *Environ Health Perspect* 118(10):1389–1394. doi:10.1289/ehp.1001967
- Ansell PJ, Espinosa-Nicholas C, Curran EM, Judy BM, Philips BJ, Hannink M, Lubahn DB (2004) In vitro and in vivo regulation of antioxidant response element-dependent gene expression by estrogens. *Endocrinology* 145(1):311–317. doi:10.1210/en.2003-0817en.2003-0817
- Baars AJ, Jansen M, Breimer DD (1978) The influence of phenobarbital, 3-methylcholanthrene and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on glutathione S-transferase activity of rat liver cytosol. *Biochem Pharmacol* 27(21):2487–2497. doi:0006-2952(78)90314-3
- Beischlag TV, Luis Morales J, Hollingshead BD, Perdew GH (2008) The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 18(3):207–250. doi:6f28b0540a5e6e63,5ec7b3e06964879d
- Bock KW (1994) Aryl hydrocarbon or dioxin receptor: biologic and toxic responses. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 125:1–42
- Brama M, Gnessi L, Basciani S, Cerulli N, Politi L, Speria G, Mariani S, Cherubini S, d'Abusco AS, Scandurra R, Migliaccio S (2007) Cadmium induces mitogenic signaling in breast cancer cell by an ERalpha-dependent mechanism. *Mol Cell Endocrinol* 264(1–2): 102–108. doi:10.1016/j.mce.2006.10.013
- Byrne C, Divekar SD, Storch GB, Parodi DA, Martin MB (2009) Cadmium—a metalloestrogen? *Toxicol Appl Pharmacol* 238(3): 266–271. doi:10.1016/j.taap.2009.03.025
- Cantor KP, Stewart PA, Brinton LA, Dosemeci M (1995) Occupational exposures and female breast cancer mortality in the United States. *J Occup Environ Med* 37(3):336–348
- Chao HR, Tsou TC, Chen HT, Chang EE, Tsai FY, Lin DY, Chen FA, Wang YF (2009) The inhibition effect of 2, 3, 7, 8-tetrachlorinated dibenzo-p-dioxin-induced aryl hydrocarbon receptor activation in human hepatoma cells with the treatment of cadmium chloride. *J Hazard Mater* 170(1):351–356. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.04.090
- Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM (2002) Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci* 59(4):627–647
- Diel P, Schmidt S, Vollmer G (2002) In vivo test systems for the quantitative and qualitative analysis of the biological activity of phytoestrogens. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 777(1–2):191–202. doi:S1570023202004944
- Elbekai RH, El-Kadi AO (2004) Modulation of aryl hydrocarbon receptor-regulated gene expression by arsenite, cadmium, and chromium. *Toxicology* 202(3):249–269. doi:10.1016/j.tox.2004.05.009S0300483X04002975

- Fan JD, Wagner BL, McDonnell DP (1996) Identification of the sequences within the human complement 3 promoter required for estrogen responsiveness provides insight into the mechanism of tamoxifen mixed agonist activity. *Mol Endocrinol* 10(12):1605–1616
- Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R (2006) Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. In: Spector DL, Goldman RD (eds) *Basic Methods in Microscopy*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Garcia-Morales P, Saceda M, Kenney N, Kim N, Salomon DS, Gottardis MM, Solomon HB, Sholler PF, Jordan VC, Martin MB (1994) Effect of cadmium on estrogen receptor levels and estrogen-induced responses in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 269(24):16896–16901
- Ghoshal K, Jacob ST (2001) Regulation of metallothionein gene expression. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 66:357–384
- Gräns J, Wassmur B, Celander MC (2010) One-way inhibiting cross-talk between arylhydrocarbon receptor (AhR) and estrogen receptor (ER) signaling in primary cultures of rainbow trout hepatocytes. *Aquat Toxicol* 100(3):263–270. doi:10.1016/j.aquatox2010.07.024
- Hertrampf T, Schmidt S, Seibel J, Laudenbach-Leschowsky U, Degen GH, Diel P (2006) Effects of genistein on the mammary gland proliferation of adult ovariectomized Wistar rats. *Planta Med* 72(4):304–310. doi:10.1055/s-2005-916229
- Höfer N, Diel P, Wittsiepe J, Wilhelm M, Degen GH (2009) Dose- and route-dependent hormonal activity of the metalloestrogen cadmium in the rat uterus. *Toxicol Lett* 191(2–3):123–131. doi:10.1016/j.toxlet2009.08.014
- Höfer N, Diel P, Wittsiepe J, Wilhelm M, Kluxen FM, Degen GH (2010) Investigations on the estrogenic activity of the metalloestrogen cadmium in the rat intestine. *Arch Toxicol* 84(7):541–552. doi:10.1007/s00204-010-0524-x
- INCHEM I (2007) International Chemical Safety Card (ICSC) of Cadmium (PIM 089). The international programme on chemical safety (IPCS)
- Iscan M, Ada AO, Coban T, Kapucuoglu N, Aydin A, Isimer A (2002) Combined effects of cadmium and nickel on testicular xenobiotic metabolizing enzymes in rats. *Biol Trace Elem Res* 89(2):177–190. doi:10.1385/BTER:89:2:177
- Järup L, Åkesson A (2009) Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicol Appl Pharmacol* 238(3):201–208
- Jin T, Lu J, Nordberg M (1998) Toxicokinetics and biochemistry of cadmium with special emphasis on the role of metallothionein. *Neurotoxicology* 19(4–5):529–535
- Johnson MD, Kenney N, Stoica A, Hilakivi-Clarke L, Singh B, Chepko G, Clarke R, Sholler PF, Lirio AA, Foss C, Reiter R, Trock B, Paik S, Martin MB (2003) Cadmium mimics the in vivo effects of estrogen in the uterus and mammary gland. *Nat Med* 9(8):1081–1084. doi:10.1038/nm902nm902
- Kato S, Masuhiro Y, Watanabe M, Kobayashi Y, Takeyama KI, Endoh H, Yanagisawa J (2000) Molecular mechanism of a cross-talk between oestrogen and growth factor signalling pathways. *Genes Cells* 5(8):593–601. doi:gtc354
- Kluxen et al. (2010) Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharm Toxicol 383, Suppl.1, 83 (P361)
- Kraus WL, Montano MM, Katzenellenbogen BS (1993) Cloning of the rat progesterone receptor gene 5'-region and identification of two functionally distinct promoters. *Mol Endocrinol* 7(12):1603–1616
- Kretzschmar G, Papke A, Zierau O, Moller FJ, Medjakovic S, Jungbauer A, Vollmer G (2010) Estradiol regulates aryl hydrocarbon receptor expression in the rat uterus. *Mol Cell Endocrinol* 321(2):253–257. doi:10.1016/j.mce2010.02.018
- Küchenhoff A, Seliger G, Klonisch T, Tscheudschilsuren G, Kaltwasser P, Seliger E, Buchmann J, Fischer B (1999) Arylhydrocarbon receptor expression in the human endometrium. *Fertil Steril* 71(2):354–360
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680–685
- Liu Z, Yu X, Shaikh ZA (2008) Rapid activation of ERK1/2 and AKT in human breast cancer cells by cadmium. *Toxicol Appl Pharmacol* 228(3):286–294. doi:10.1016/j.taap2007.12.017
- Liu J, Qu W, Kadiiska MB (2009) Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 238(3):209–214. doi:10.1016/j.taap2009.01.029
- Liu J, Huang H, Zhang W, Li H (2010) Cadmium-induced increase in uterine wet weight and its mechanism. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 89(1):43–49. doi:10.1002/bdrb.20233
- Matthews J, Gustafsson JA (2006) Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Nucl Recept Signal* 4:e016. doi:10.1621/nrs.04016
- McElroy JA, Shafer MM, Trentham-Dietz A, Hampton JM, Newcomb PA (2006) Cadmium exposure and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 98(12):869–873. doi:10.1093/jnci/djj233
- Montano MM, Katzenellenbogen BS (1997) The quinone reductase gene: a unique estrogen receptor-regulated gene that is activated by antiestrogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(6):2581–2586
- Nebert DW, Dalton TP, Okey AB, Gonzalez FJ (2004) Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J Biol Chem* 279(23):23847
- Nordberg GF (2009) Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicol Appl Pharmacol* 238(3):192–200
- O'Brien JE, Peterson TJ, Tong MH, Lee EJ, Pfaff LE, Hewitt SC, Korach KS, Weiss J, Jameson JL (2006) Estrogen-induced proliferation of uterine epithelial cells is independent of estrogen receptor alpha binding to classical estrogen response elements. *J Biol Chem* 281(36):26683–26692. doi:10.1074/jbc.M601522200
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9):e45
- Plewka A, Plewka D, Nowaczyk G, Brzóska MM, Kami ski M, Moniuszko-Jakoniuk J (2004) Effects of chronic exposure to cadmium on renal cytochrome P450-dependent monooxygenase system in rats. *Arch Toxicol* 78(4):194–200
- Rasband WS (1997–2011) ImageJ, US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. Website <http://rsbinfo.nih.gov/ij/> [accessed January 2011]
- Rider CV, Hartig PC, Cardon MC, Wilson VS (2009) Comparison of chemical binding to recombinant fathead minnow and human estrogen receptors alpha in whole cell and cell free binding assays. *Environ Toxicol Chem* 28(10):2175–2181
- Rivera-Gonzalez R, Petersen DN, Tkalcic G, Thompson DD, Brown TA (1998) Estrogen-induced genes in the uterus of ovariectomized rats and their regulation by droloxifene and tamoxifen. *J Steroid Biochem Mol Biol* 64(1–2):13–24. doi:S0960-0760(97)00142-8
- Safe S, Wormke M (2003) Inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor alpha cross-talk and mechanisms of action. *Chem Res Toxicol* 16(7):807–816. doi:10.1021/tx034036r
- Schnel R, Yuhas E, Pence D, Means J, Roberts S, Yau E, Miya T, Mennear J (1978) Effect of acute and chronic cadmium treatment on hepatic drug metabolism in male rats. *Arch Toxicol* 40(4):269–277
- Silva E, Lopez-Espinosa MJ, Molina-Molina JM, Fernandez M, Olea N, Kortenkamp A (2006) Lack of activity of cadmium in vitro estrogenicity assays. *Toxicol Appl Pharmacol* 216(1):20–28. doi:10.1016/j.taap2006.04.002

- Stewart D, Killeen E, Naquin R, Alam S, Alam J (2003) Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium. *J Biol Chem* 278(4):2396–2402. doi:[10.1074/jbc.M209195200](https://doi.org/10.1074/jbc.M209195200)
- Stoica A, Katzenellenbogen BS, Martin MB (2000) Activation of estrogen receptor- α by the heavy metal cadmium. *Mol Endocrinol* 14(4):545–553
- Swedenborg E, Pongratz I (2010) AhR and ARNT modulate ER signaling. *Toxicology* 268(3):132–138. doi:[10.1016/j.tox.2009.09.007](https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.09.007)
- Takiguchi M, Yoshihara S (2006) New aspects of cadmium as endocrine disruptor. *Environ Sci* 13(2):107
- Vakharia DD, Liu N, Pause R, Fasco M, Bessette E, Zhang QY, Kaminsky LS (2001) Effect of metals on polycyclic aromatic hydrocarbon induction of CYP1A1 and CYP1A2 in human hepatocyte cultures. *Toxicol Appl Pharmacol* 170(2):93–103
- Wagner J, Jiang L, Lehmann L (2008) Phytoestrogens modulate the expression of 17 α -estradiol metabolizing enzymes in cultured MCF-7 cells. *Adv Exp Med Biol* 617:625–632. doi:[10.1007/978-0-387-69080-3_65](https://doi.org/10.1007/978-0-387-69080-3_65)
- Wihlén B, Ahmed S, Inzunza J, Matthews J (2009) Estrogen receptor subtype- and promoter-specific modulation of aryl hydrocarbon receptor-dependent transcription. *Mol Cancer Res* 7(6):977
- Yu Z, Hu D, Li Y (2004) Effects of zearalenone on mRNA expression and activity of cytochrome P450 1A1 and 1B1 in MCF-7 cells. *Ecotoxicol Environ Saf* 58(2):187–193

2.4 Publikation 4: “The metalloestrogen cadmium modulates

AhR-associated gene expression in the small intestine of rats similar to ethinyl-estradiol” (*in press*)

F. M. Kluxen, P. Diel, N. Höfer, E. Becker und G. H. Degen in *Archives of Toxicology*: ATOX-D-12-00361. Eine Kopie von Publikation 4 findet sich ab Seite 58.

Zusammenfassung Cd beeinflusst die Expression von ER-Zielgenen im Rattenuterus und zeigt östrogenartige Aktivität *in vitro*. Wir haben gezeigt, dass Cd, wie 17 β -Östradiol, auch AhR-assoziierte Gene über den ER moduliert. Da die Aufnahme von Cd hauptsächlich über die Nahrung geschieht, ist der Dünndarm dem Schwermetall gegenüber direkt exponiert. Cd könnte die Wirkung von Östrogenen in diesem Gewebe sowohl nachahmen als auch stören. Die ER-Subtyp-Expression unterscheidet sich zwischen Uterus und Darm und bislang sind nur wenige östrogen-sensitive Gene im Darm bekannt. Deshalb haben wir den Effekt von Cd (2 mg/kg KG CdCl₂, Cd 2) und 17 α -Ethinylöstradiol (0.1 mg/kg KG, EE₂) auf die AhR-assoziierte Genexpression (*i. e.* Ahr, Cyp1a1, Gsta2, Nqo1) nach oraler Exposition (3 Tage per Gavage) im Dünndarm weiblicher, ovariectomierter Wistar-Ratten untersucht.

Die Tiere wurden auch mit Cd 2 und reinem Antiöstrogen (2.5 mg/kg KG ZK191703, ZK) oder Östrogen behandelt, um zu untersuchen, ob die Cd-induzierten Effekte ER-vermittelt sind. Eine Dosisabhängigkeit der Cd-induzierten Effekte auf die AhR-vermittelte Genexpression wurde in einem zweiten Tierversuch untersucht, in dem Cd für 28 Tage über das Trinkwasser verabreicht wurde (5 und 50 ppm CdCl₂ entspricht 0.4 und 4 mg/kg KG/d); mit EE₂ (0.08 mg/kg KG/d) als Östrogenreferenz. Zwei Kolonkrebszelllinien (HT-29 und CaCo-2) mit keiner oder einer geringen ER-Beta-Expression wurden für 5 Tage mit Cd (1 μ M) und/oder E₂ (0.01 μ M) behandelt, um die molekularen Mechanismen näher aufzuklären. Die mRNA-Expression von AhR-assoziierten Genen wurde mittels real time RT-PCR gemessen – Metallothionein (MT) Expression (Mt1a in Dünndarm, Mt2a *in vitro*) diente als klassischer Marker für eine Cd-Exposition.

Die Mt1a-Expression im Dünndarm war deutlich stärker in Cd 2- und EE₂-ko-behandelten Tieren als bei jenen, welche die Einzelsubstanzen bekommen haben. Die Cd 2-induzierte Herunterregulation der Expression von Cyp1a1, Gsta2 und Nqo1 wurde nicht durch ZK antagonisiert. Das ist anders als im Uterus: hier wurde die Cd-induzierte Herunterregulation von Cyp1a1 von ZK antagonisiert. Interessanterweise wurde die EE₂-induzierte Herunterregulation von Cyp1a1-, Gsta2- und Nqo1-mRNA *in vivo* von Cd 2 antagonisiert. Nach 28 Tagen oraler Cd-Exposition (Cd 0.4 und 4) wurde Mt1a dosisabhängig induziert, während Cd 0.4 Cyp1a1, Gsta2 und Nqo1 wie EE₂ und stärker als Cd 4 herunterregulierte.

In HT-29- und Caco-2-Zellen induzierte Cd eine starke Mt2a-mRNA-Expression, während Cyp1a1 von E₂ stärker als von Cd herunterreguliert wurde; Cd antagonisierte die E₂-induzierte Cyp1a1 Herunterregulierung *in vitro*.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen zeigen, dass Östrogene die AhR-assoziierte Genexpression im Darm und *in vitro* modulieren. Auch moduliert Cd die AhR-assoziierte Genexpression dosisabhängig und wie E₂ und EE₂. Unsere Hypothese ist, dass ER-unabhängige oder ER-Beta-vermittelte Effekte eine Rolle spielen, weil die Cd-induzierte Modulation von AhR-assoziierten Genen nicht von Antiöstrogenen antagonisiert wurde und auch in ER-negativen Zelllinien beobachtet wurde. Zusammenfassend zeigen die Daten, dass Cd mit der Signaltransduktion von ER und AhR im Darm interferieren kann.

Archives of Toxicology, Impact Factor (2012): 4.674; Eigenanteil 90 % – Planung der Experimente, Labortätigkeit, Auswertung der Ergebnisse, Erstellen des Draftes, 1. Autor

The metallo hormone cadmium modulates AhR-associated gene expression in the small intestine of rats similar to ethinyl-estradiol

Felix M. Kluxen · Patrick Diel · Nicola Höfer ·
Eugenia Becker · Gisela H. Degen

Received: 23 August 2012 / Accepted: 25 October 2012
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012

Abstract Cadmium (Cd) affects the expression of estrogen receptor (ER) and aryl hydrocarbon receptor (AhR)-associated genes in rat uterus and elicits estrogen-like activity in vitro. The small intestine is highly exposed to dietary Cd which may mimic or antagonize estrogen action in this tissue. We investigated the effects of Cd and 17- α -ethinylestradiol (EE₂) on AhR-associated gene expression after oral exposure of ovariectomized female Wistar rats, and metallothionein (Mt1a) expression as a typical metal-response marker. Mt1a in the small intestine was strongly induced by co-treatment with CdCl₂ at 2 mg/kg b.wt (Cd 2) and 0.1 mg/kg b.wt EE₂ than by the single compound (3-day gavage). The Cd 2-induced down-regulation of Cyp1a1, Gsta2, and Nqo1 mRNA was not antagonized by pure anti-estrogen (2.5 mg/kg b.wt ZK191703 s.c., ZK). Interestingly, the EE₂-induced down-regulation of Cyp1a1, Gsta2, and Nqo1 mRNA was antagonized by Cd 2 in vivo and in colon cancer cell lines (HT-29 and CaCo-2, treated 5 days with Cd 1 μ M and/or E₂ 0.01 μ M) with low or no ER-beta expression. Dose dependency was studied after

Cd exposure with drinking water (5 and 50 ppm CdCl₂ equivalent to 0.4 and 4 mg/kg b.wt; Cd 0.4, Cd 4) for 28 days and EE₂ as reference. Intestinal Mt1a expression was dose dependently induced, while AhR target genes were down-regulated by Cd 0.4 similar to EE₂ and more pronounced than by Cd 4. We propose that Cd modulates intestinal AhR-associated gene expression similar to estrogens, but (contrary to its effects in uterus) via ER-independent and/or ER-beta-mediated mechanisms. Our new data suggest interference of Cd with estrogen and AhR signaling in the small intestine.

Keywords Aryl hydrocarbon receptor · Cadmium · Endocrine modulation · Endocrine disruption · Estrogens

Abbreviations

AhR	Aryl hydrocarbon receptor
ARE	Antioxidant response element
b.wt	Body weight
Cd	Cadmium
CdCl ₂	Cadmium chloride
DRE	Dioxin response element
EE ₂	17 α -ethinylestradiol
ER alpha/beta	Estrogen receptor alpha/beta
ERE	Estrogen response element
FBS	Fetal bovine serum
GRE	Glucocorticoid response element
i.p.	Intraperitoneal
NRF2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (receptor)
OVX	Ovariectomized
s.c.	Subcutaneous
UEH	Uterus epithelial height
UWW	Uterus wet weight
ZK	ZK191703

The work described here is part of the PhD thesis of Felix M. Kluxen.

F. M. Kluxen (✉) · P. Diel · N. Höfer · E. Becker
Department of Molecular and Cellular Sports Medicine,
Institute of Cardiovascular Research and Sports Medicine,
German Sports University Cologne, Am Sportpark
Müngersdorf 6, 50933 Köln, Germany
e-mail: felix.kluxen@gmail.com

F. M. Kluxen · N. Höfer · G. H. Degen
IfADo—Leibniz Research Centre for Working Environment
and Human Factors at the TU Dortmund, Ardeystr. 67,
44139 Dortmund, Germany

Introduction

The nonessential, toxic heavy metal cadmium (Cd) is an important environmental contaminant and a recognized health hazard in occupational contexts (Godt et al. 2006; Järup and Akesson 2009). Cd is now also regarded as potential endocrine disruptor due to properties that led to its designation as metallohormone or metalloestrogen (Byrne et al. 2009; Silva et al. 2006; Takiguchi and Yoshihara 2006). Cd ions elicit estrogen-like activity in vitro (Garcia-Morales et al. 1994; Stoica et al. 2000) and modulate expression of estrogen receptor (ER) target genes in rat uterus (Höfer et al. 2009; Johnson et al. 2003; Kluxen et al. 2012). The underlying mechanisms of the estrogen-like effects of Cd are debated: Antagonization experiments with anti-estrogens suggest a direct interaction of Cd with the ER in the uterus (Johnson et al. 2003; Kluxen et al. 2012). However, steroid estrogens and also Cd can activate extracellular kinases in vitro (Brama et al. 2007; Kato et al. 2000; Liu et al. 2008) and thus signal through a nonclassical genomic pathway. A study with ERE-luciferase reporter mice where Cd exposure induced a limited spectrum of estrogenic responses supports the view that, in certain targets, the effects of Cd might not be mediated via classical ER-signaling through ERE-regulated genes (Ali et al. 2010).

We recently demonstrated that Cd mimics estrogen activity also with regard to other signaling cascades, i.e., AhR-associated gene expression in rat uterus apparently via the ER (Kluxen et al. 2012). So far, the estrogen-like effects of Cd have been mostly investigated with regard to the ER alpha (Byrne et al. 2009; Silva et al. 2012) that is expressed in classic estrogen target tissues such as uterus and mammary gland. In the non-smoking population, Cd exposure mainly occurs with foods and water (EFSA 2009), and the small intestine is highly exposed to the metal after oral Cd administration (Höfer et al. 2009). However, the intestine predominantly expresses ER beta (Campbell-Thompson et al. 2001). Therefore, the hormonal activity of the metalloestrogen Cd might be different in small intestine and in classic ER alpha expressing estrogen target tissues like uterus.

We previously reported estrogen-like activity (i.e., a down-regulation of PcnA and ER beta protein and Ps2/Tff-1 mRNA expression) of Cd in rat small intestine (Höfer et al. 2010), but it is unknown whether this effect is mediated via the ER beta. Cd-induced ER beta protein down-regulation has been reported for brain (Ishitobi et al. 2007), terminal end buds, lobules and ducts (Khan et al. 2007), and the small intestine (Höfer et al. 2010). In breast cancer cells that express only low amounts of ER beta (i.e., MCF-7), no modulation of ER beta protein by Cd was found (Brama et al. 2007). In MCF-7 cells and in SK-BR3 cells, Cd

affected rapid estrogenic signaling via ER alpha and GPR30, but not in MDA-MB-231 cells that express only ER beta (Liu et al. 2008). Cd-induced modulation of ER beta-mediated transcription was observed only in ER beta-transfected HeLa-ERE-luc cells (Martinez-Campa et al. 2006).

Substances that mimic estrogens raise the concern that they may interfere with hormone-dependent diseases, because estrogens play a major role in gut physiology and pathology, e.g., in inflammatory processes (Harnish et al. 2004) and homeostasis (Schleipen et al. 2011; Wada-Hiraike et al. 2006), probably via the ER beta. However, only a few estrogen-modulated target genes are known in the intestine. As a follow-up to our previous study in rat uterus (Kluxen et al. 2012), we now investigated whether AhR-associated gene expression (i.e., Ahr, Cyp1a1, Gsta2, Nqo1) in the small intestine is modulated by Cd or estrogen and whether ER-mediated processes are involved.

The AhR is a member of the bHLH/PAS family and mainly known for TCDD-mediated toxicity. Several food ingredients and contaminants modulate the AhR (Ashida et al. 2008). To the best of our knowledge, no data are available whether the metallohormone Cd or estrogens modulate AhR-associated gene expression in the small intestine. It is also unknown whether estrogen-induced AhR-ER-crosstalk (Gräns et al. 2010; Matthews and Gustafsson 2006) is affected by co-treatment with Cd in the small intestine after oral exposure.

We thus conducted the following experiments: Ovariectomized, female Wistar rats were treated for 3 days per gavage with CdCl₂, EE₂ alone, or in combination with anti-estrogen (ZK191703). Dose-dependency of the Cd-induced effect was subsequently evaluated in a 28-day sub-chronic animal study with oral administration by drinking water. The applied doses of CdCl₂, 2 mg/kg b.wt or 0.4 and 4 mg/kg b.wt, are based on previous studies where Cd showed an estrogen-like effect in the small intestine (Höfer et al. 2010). Cyp1a1 mRNA expression was also investigated in vitro in ER-negative adenocarcinoma cell lines, HT-29 and Caco-2, to elucidate the molecular mechanism further. The mRNA levels of AhR-associated genes were analyzed by real-time RT-PCR along with metallothionein (MT) expression (Mt1a in small intestine, Mt2a in vitro) as typical response marker for Cd exposure.

Materials and methods

Animals and experimental design

All animal husbandry and handling conditions complied with the Institutional Animal Care and Use Committee guidelines, and legal permission to conduct the animal

experiments was obtained from the local responsible authorities. Juvenile female Wistar rats of 4–5 weeks (101–125 g) were obtained from Janvier (Le-Genest St-Isle, France) and acclimatized for 1 week. Rats were kept under controlled conditions (temperature $20 \pm 1^\circ\text{C}$, humidity 50–80 %, illumination 12L/12D) and had free access to tap water and a diet low in phytoestrogen content (R/M-H, from Ssniff GmbH, Germany). Prior to the experiments, animals were ovariectomized, and after 14 days of endogenous hormonal decline, rats were randomly allocated to vehicle or treatment groups (gavage experiment: $n = 7$ [$n = 8$ for Cd 2]; drinking water experiment: $n = 6$ rats per group). The animals were killed by decapitation, in the short-term experiment on day 4 and in the long-term experiment after 28 days. In line with the 3 R principle (Russell and Burch 1992), new tissue samples of the animals of Höfer et al. (2009) and the ZK-treated and control animals of Kluxen et al. (2012) were prepared and analyzed.

Short-term experiment with gavage administration for 3 days

CdCl_2 was dissolved in 0.9 % NaCl solution to achieve a dose of 2 mg/kg b.wt in a total application volume of 5 ml/kg b.wt. EE_2 was dissolved in propanediol/ethanol (80:20, v:v) to achieve a dose level of 0.1 mg/kg b.wt in a total application volume of 5 ml/kg b.wt. For co-treatment, one part of a CdCl_2 solution in 0.9 % NaCl and one part of EE_2 dissolved in propanediol/ethanol (80:20, v:v) were combined to achieve the desired dose for the Cd 2 + EE_2 group in a total application volume of 5 ml/kg b.wt. Anti-estrogen ZK191703 (11-fluoro-7-(14,14,15,15-penta-fluoro-6-methyl-10-thia-6-azapentadecyl)estra-1,3-5(10)-triene-3,17-diol) was dissolved in propanediol/ethanol (80:20, v:v) and injected s.c. at a dose level of 2.5 mg/kg b.wt. ZK was supplied by Bayer Healthcare Pharmaceuticals. The other compounds were purchased from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany). Body weights of the rats were determined on day 4 prior to killing. Pieces of small intestine were collected and snap-frozen in liquid nitrogen for RNA preparation. Wet weight of freshly excised uteri were determined and organs snap-frozen in liquid nitrogen for RNA analysis. In addition, a piece of the uterus was fixed in neutral-buffered formaldehyde and later embedded in paraffin for histological analysis and measurements of uterine epithelial height (Diel et al. 2002).

Long-term experiment with drinking water administration for 28 days

EE_2 was dissolved in a small amount of ethanol and then filled up with tap water to a final concentration of 1 ppm.

CdCl_2 was dissolved in tap water to achieve concentrations of 5 and 50 ppm. Since rats consumed about 20 ml water per day, this corresponds to daily CdCl_2 dose levels of 0.4 and 4 and 0.08 mg/kg b.wt for EE_2 . The control (OVX) group received tap water only. Animals were killed by decapitation and pieces of small intestine were collected and snap-frozen in liquid nitrogen for RNA preparation.

Cell culture

The human colon carcinoma cell lines HT-29 (P29–P35) and Caco-2 (P45–P56) were maintained in DMEM supplemented with 10 % (HT-29) or 20 % (Caco2) FBS, 2 % penicillin/streptomycin, and 1 % L-glutamine at 37°C and 5 % CO_2 in culture flasks. At 70 % confluence, cells were passaged by trypsinization (0.5 % trypsin in 0.5 mM EDTA, Gibco BRL) by standard procedures.

Initially, cytotoxicity of CdCl_2 with CaCo-2 and HT-29 cells was assessed by neutral red uptake assays (according to Behm et al. 2009). Based on the results (IC_{50} values of 27 μM for CaCo-2 and 2.2 μM for HT-29 cells), a concentration of 1 μM CdCl_2 was chosen for subsequent experiments that is also comparable to previous in vitro studies with other cell types (Siewit et al. 2010; Stoica et al. 2000; Wilson et al. 2004).

To investigate steroid estrogen- and Cd-induced effects on AhR-associated gene expression, 75,000 cells per well were seeded in 6-well plates (Falcon, Franklin Lakes, NJ USA). After 24 h, the medium was changed and the cells were treated with a final concentration of 10^{-8} M E_2 , or 10^{-6} M CdCl_2 , or a combination of both agents (in 0.1 % DMSO) for 5 days.

RNA isolation and real-time RT-PCR

Total RNA of the uteri, mucosa of the small intestine, or cells was isolated from frozen tissue with 1 ml TRIzol (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) according to the suppliers instructions. First-strand cDNA synthesis was accomplished with QuantiTect[®] Kit (Qiagen, Hilden). Amplification of cDNA by real-time RT-PCR was performed in a MX3005P thermal cycler (Stratagene). The protocol comprised 5 min at 95°C followed by 45 cycles of 94, 60 $^\circ\text{C}$ (54 $^\circ\text{C}$ for Nqo1) and 72 $^\circ\text{C}$ for 1 min each. The data were normalized relative to the housekeeping gene subunit 1a of cytochrome c oxidase (1a) via the delta-delta C_T method (Pfaffl 2001). Used primers sequences in rat tissue were: For 1a, forward 5'-CGT CAC AGC CCA TGC ATT CG-3' and the reverse 5'-CTG TTC ATC CTG TTC CAG CTC-3'; for metallothionein subtype 1a (Mt1a), forward 5'-TTA CAC CGT TGC TCC AGA TTC-3' and the reverse 5'-CAG CAC TGT TCG TCA CTT CAG-3' (Höfer et al. 2009); for aryl hydrocarbon receptor (AhR),

forward 5'-CAA CCA AAC CAA ACA ACA GAG A-3' and the reverse 5'-ATC CAT CAT CTT TCA ACC CAT C-3'; for cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1 (Cyp1a1), forward 5'-TTA TGA CCA CGA TGA CCA AGA G-3' and the reverse 5'-GCC CTT CTC AAA TGA CCT GTA G-3'; for glutathione S-transferase alpha 2 (Gsta2), forward 5'-GCC AGC CTT CTG ACC TCT TT-3' and the reverse 5'-GCT CCG CTA AAA CTT GAA AAT C-3' (Kretzschmar et al. 2010); for NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1 (Nqo1), forward 5'-TGA ACG TCA TTC TCT GGC CAA-3' and the reverse 5'-ATT CAT ATC CCA GGC CAC CTG-3' (Soyalan et al. 2011).

Primers sequences that were used for the cell culture experiments (human cell lines): For 1a (subunit A of cytochrome c oxidase), forward 5'-CGT CAC AGC CCA TGC ATT TG-3' and the reverse 5'-GGT TAG GTC TAC GGA GGC TC-3' (Primer 3-designed, v0.4.0); for Cyp1a1, forward 5'-TCT TCC TTC GTC CCC TTT AC -3' and the reverse 5'-TGG TTG ATC TGC CAC TGG TT-3' (Beischlag and Perdew 2005); for Mt2a, forward 5'-CCG ACT CTA GCC GCC TCT T-3' and the reverse 5'-GTG GAA GTC GCG TTC TTT ACA-3' (Primer 3 designed). At least three measurements were performed from independently synthesized cDNA of the same pooled RNA samples.

Statistical analysis

All data are presented as mean $\pm$ standard deviation. We used Kruskal–Wallis one-way analysis of variance followed by pairwise comparison of selected means with the Mann–Whitney *U* test. Significance was set at $*p < 0.05$.

Results and discussion

The effect of oral Cd and steroid estrogen exposure on AhR-signaling in the small intestine of rats was investigated in two animal experiments and one in vitro study: Dose-dependency of Cd-induced modulation of AhR-associated gene expression (i.e., Ahr, Cyp1a1, Gsta2, Nqo1) was assessed by sub-chronic 28-day treatment with Cd or EE₂ via drinking water. Possible ER-mediated processes on AhR-associated gene transcription were characterized in a typical 3-day uterotrophic assay design with Cd, EE₂, or ZK alone or combinations. To elucidate the molecular mechanisms further, Cyp1a1 mRNA expression was also investigated in HT-29 and Caco-2 cells after Cd- or E₂-treatment alone or in combination.

Effects of Cd on uterus

To assess the effects of Cd and the other compounds and combinations after oral exposure, we determined uterus

wet weight (UWW) and uterine epithelium height (UEH) as established parameters for estrogenicity (Diel et al. 2002). EE₂ induced UWW (Fig. 1) and UEH (Table 1) as expected. Treatment with Cd 2 (mg/kg b.wt/d) in the short-term experiment had no effect on either parameter. Long-term treatment with Cd 0.4 and Cd 4 had also no effect on UWW and UEH (data not shown). This is in agreement with previous results after oral treatment (Höfer et al. 2009), and in contrast to uterotrophic effects seen after i.p. injection of Cd (Höfer et al. 2009; Johnson et al. 2003; Kluxen et al. 2012). However, one of the seven Cd 2-treated animals had a UWW (abs. 218 mg or rel. 897 mg/kg b.wt) similar to those of EE₂-treated animals. Outlying values for a uterotrophic response to Cd treatment have been reported before (Ali et al. 2010; Höfer et al. 2009), yet an explanation for this finding cannot be given.

Interestingly, oral co-treatment with Cd 2 + EE₂ resulted in a slightly lower UWW and also UEH compared with EE₂-treatment alone. This differs from our previous findings where co-treatment with Cd 2 and E₂, by i.p. injection resulted in a slightly higher UWW and UEH (non-significant) and non-significant elevations of molecular markers for estrogenicity (Kluxen et al. 2012). The divergent effects for combinations of Cd with steroid estrogen between oral and i.p. studies may be explained by major differences in internal Cd tissue concentrations: As shown before, three consecutive oral doses of Cd 2 mg/kg b.wt result in a 100-fold lower uterine Cd content than a single dose of Cd 2 mg/kg b.wt after i.p. injection (Höfer et al. 2009). This is also reflected in the strong dose- and route-dependency for estrogenic effects of Cd in the rat uterus. On the other hand, a bi-phasic regulation of the uterine complement C3 expression was observed over a wide range of Cd doses, with decreased levels at lower doses and induction at the highest dose (Höfer et al. 2009). Furthermore, Ali et al. reported a decreased luciferase activity in several tissues after three subcutaneous low doses of Cd (0.005 mg/kg b.wt) in ERE-luc reporter mice (Ali et al. 2010), indicative for anti-estrogenic effects of Cd.

From the above, it appears that Cd can exert estrogenic as well as anti-estrogenic activity in the uterus, either by competitive antagonist-like interaction with the ER or mediated by other signaling cascades or involved co-factors. However, except for the present and a previous study (Kluxen et al. 2012), combinatory effects of steroid estrogens and the metallothionein Cd have not been investigated in vivo so far. Future studies should also investigate Cd-induced modulation of endocrine parameters in intact female animals, taking into account possible interactions with hormonal circuits as indicated by a feeding-study in female pigs (Han et al. 2006).

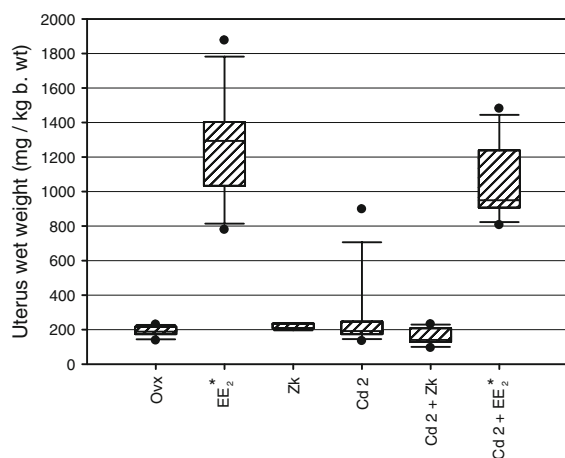


Fig. 1 Uterus wet weights in mg/kg b.wt after 3 days gavage (Cd 2 mg/kg b.wt, EE₂ 0.1 mg/kg b.wt) or 3 days s.c. (ZK 2.5 mg/kg b.wt). 10th, 25th, 75th, and 90th percentile plotted for $n = 7$ animals per dose group [$n = 8$ for Cd 2]—median is indicated by line and outliers by dots; asterisk, on x-axis legend, marks values significantly different from the control (OVX). $p < 0.05$. The uterus wet weight of the animals of the ZK group was published before (Kluxen et al. 2012), but was included in the figure for comparison. In the drinking water experiment, treatment with Cd had no effect on uterus wet weight see Höfer et al. 2009

Cd-induced modulation of Mt1a in small intestine

Mt1a mRNA expression was investigated as a marker for Cd exposure. In the small intestine, Cd 2 induced Mt1a expression as expected (Fig. 2a). Moreover, Cd induced Mt1a expression dose-dependently after long-term treatment (Fig. 2b). This is in line with our previous findings in uterus (Kluxen et al. 2012) and also in liver and kidney (Höfer et al. 2010). In the intestine, Cd 2 + ZK and ZK alone also induced Mt1a mRNA expression significantly (Fig. 2a). Interestingly, the combination Cd 2 + EE₂ potentiated Mt1a expression compared to the Mt1a induction of the single compounds (Fig. 2a). Presently, we can only speculate why the combination of Cd 2 and EE₂ resulted in a synergistic effect in this tissue and on the biological relevance (see below).

Metallothionein (MTs) are small, cysteine-rich proteins that contain zinc ions, but also bind other metals (Coyle et al. 2002). They are involved in zinc homeostasis, mediate resistance to Cd toxicity (e.g., reviewed by Klaassen et al. 2009; Nordberg 2009), and have been described to be regulated by estrogens (Rivera-Gonzalez et al. 1998). Induction of MTs involves binding of zinc to the metal transcription factor (MTF-1) that is also important in the regulation of genes that play a role in cellular response to various stressors (Coyle et al. 2002). The Cd-induced MT up-regulation may be mediated by replacing the MT-bound zinc ions, and interestingly Cd is

Table 1 Organ wet weights and uterus epithelial height (UEH) of ovariectomized female Wistar rats that were treated for 3 days per gavage (Cd 2 mg/kg b.wt, EE₂ 0.1 mg/kg b.wt) or 3 days s.c. (ZK 2.5 mg/kg b.wt)

	Body weight		Liver wet weight		Kidney wet weight		UEH	
	g	±SD	mg/kg b.wt	±SD	mg/kg b.wt	±SD	µm	±SD
OVX	246.00	16.04	39.65	2.11	3.31	0.25	10.81	1.93
EE ₂	236.29	10.29	41.67	2.13	3.59	0.38	32.90*	6.30
Cd 2	236.00	14.43	41.46	3.67	3.55	0.18	10.86	2.31
Cd 2 + ZK	242.43	26.54	38.65	5.32	3.18	0.28	12.81	1.02
Cd 2 + EE ₂	228.13	20.96	42.59	3.63	3.49	0.32	30.66*	5.97

Mean values ± SD are given for $n = 7$ animals per dose group [$n = 8$ for Cd 2]. Organ wet weights and UEW of the ZK-treated animals were published before (Kluxen et al. 2012) and were not affected by treatment. * (asterisk) marks values significantly different from the control (OVX)

* $p < 0.05$

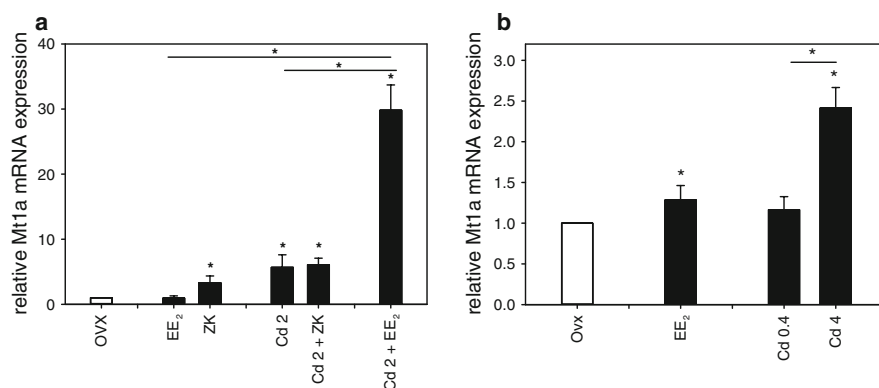


Fig. 2 Relative *Mt1a* mRNA expression in small intestine **a** after 3 days gavage (Cd 2 mg/kg b.wt, EE₂ 0.1 mg/kg b.wt) or 3 days s.c. (ZK 2.5 mg/kg b.wt) and **b** after 28 days via drinking water (Cd 0.4 or 4 mg/kg b.wt (5 or 50 ppm), EE₂ 0.08 mg/kg b.wt). Mean values (fold induction) $\pm$ SD are given for $n = 7$ animals per dose group

[$n = 8$ for Cd 2; $n = 7$ for ZK] in the gavage experiment and for $n = 6$ in the drinking water experiment; asterisk marks values significantly different from the control (OVX) or as indicated by lines. $p < 0.05$

reported to replace zinc in the ER (Predki and Sarkar 1994). Furthermore, metal depletion of the ER (a zinc finger protein) via MTs has been described (Cano-Gauci and Sarkar 1996), which might subsequently lead to reduced DNA binding of the ER. It is unknown whether zinc ions released upon binding of Cd to MTs may affect ER activity.

We reported that i.p. treatment of OVX rats with E₂ reduced *Mt1a* expression in the uterus and this effect was reversed by pure anti-estrogen ZK (Kluxen et al. 2012). On the other hand, E₂ in combination with Cd did not

affect the metal-induced uterine *Mt1a* expression. This differs from the findings in the small intestine where oral co-treatment (Cd 2 + EE₂) strongly increased *Mt1a* expression (Fig. 2a). It is unclear whether differences in Cd tissue concentration and/or ER-subtype expression might be involved in the tissue-specific regulation. Thus, further studies are of interest, how hormonal status influences MT expression, Cd-distribution, and biological effects of Cd.

Modulation of AhR-associated genes in uterus and small intestine by cadmium and steroid estrogens

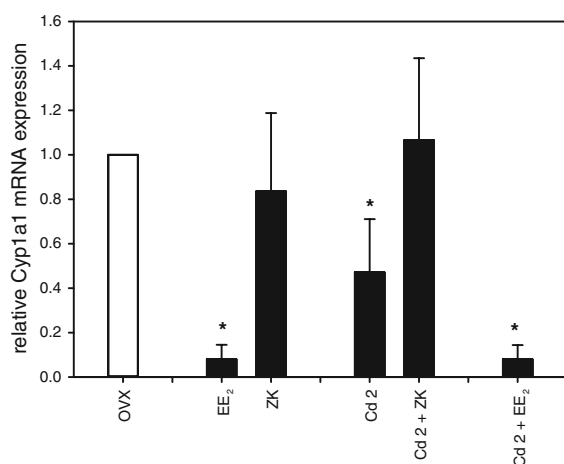


Fig. 3 Relative uterine *Cyp1a1* mRNA expression after 3 days gavage (Cd 2 mg/kg b.wt, EE₂ 0.1 mg/kg b.wt) or 3 days s.c. (ZK 2.5 mg/kg b.wt). Mean values (fold induction) $\pm$ SD are given for $n = 7$ animals per dose group [$n = 8$ for Cd 2; $n = 7$ for ZK]; asterisk marks values significantly different from the control (OVX) (section sign) marks values significantly different from EE₂ (plus) marks values significantly different from ZK. $p < 0.05$

Cyp1a1 mRNA expression in the uterus was analyzed to investigate whether Cd and steroid estrogen affect this response parameter similarly or differently in the small intestine. After oral treatment, both EE₂ and Cd down-regulated *Cyp1a1* mRNA expression in the uterus (Fig. 3). This has also been observed after i.p. injection of the compounds (Kluxen et al. 2012). Thus, *Cyp1a1* mRNA expression appears to be a suitable uterine marker of Cd and estrogen exposure. Down-regulation of uterine *Cyp1a1* mRNA after oral Cd exposure was antagonized by anti-estrogen ZK, while ZK treatment alone had no effect on its expression (Fig. 3). This result is in accord with previous data where co-treatment with ZK prevented the Cd- and estradiol-induced uterine *Cyp1a1* mRNA decrease (Kluxen et al. 2012). The findings support the view that down-regulation of *Cyp1a1* mRNA by Cd and estrogen in the uterus is mediated by the ER.

To assess the modulation of the AhR pathway by EE₂ and Cd in the small intestine after oral treatment, we analyzed *Ahr* mRNA expression and AhR target genes, *Cyp1a1* and *Gsta2*, that are modulated by 17 beta-estradiol

in the rat uterus (Kluxen et al. 2012; Kretschmar et al. 2010) and Nqo1 as another gene of the classic AhR gene battery (Abel and Haarmann-Stemann 2010; Ashida et al. 2008).

In the small intestine, Ahr mRNA expression was decreased only by Cd 2, but not significantly affected by EE₂ or other treatments (Fig. 4a). This differs from the pattern observed in rat uterus where Ahr mRNA was down-regulated by both Cd and steroid estrogen (Kluxen et al. 2012). Yet, the intestinal expression of Cyp1a1, Nqo1, and Gsta2, down-stream target genes of the AhR, is significantly down-regulated by steroid estrogen and to a lesser extent also by Cd (Fig. 4b–d). Cyp1a1 is considered as a prototypical AhR target gene due to the presence of XREs but it has also three glucocorticoid response elements in the first intron (Linder et al. 1999). Furthermore, Gsta2 and Nqo1 have also been associated with another nuclear receptor, Nrf2, and have (anti-)oxidant response elements (ARE) in the promoter region (reviewed in Abel and Haarmann-Stemann 2010; Anwar-Mohamed et al. 2009). Thus, it is interesting that all three genes are modulated similarly after EE₂ and Cd exposure in the small intestine (Fig. 4b–d).

Co-treatment with ZK reduced the Cd (and estrogen-) induced decreases in mRNA levels of Ahr, Gsta2, and Nqo1, while the Cd-induced down-regulation of Cyp1a1 was not antagonized (Fig. 4b). This differs from our findings in rat uterus (see Fig. 3 in this study and also Kluxen et al. 2012). Interestingly, the EE₂-induced down-regulation of Cyp1a1 and Nqo1 (and Gsta2 to a lesser extent) mRNA levels is antagonized by co-treatment with Cd in vivo (Fig. 4). Again, this differs from the combination effect observed for Cyp1a1 mRNA expression in rat uterus (see Fig. 3 in this study and also Kluxen et al. 2012).

ZK treatment alone had no effect on Ahr, Cyp1a1, and Nqo1 mRNA expression in the small intestine. But the anti-estrogen ZK significantly induced intestinal Gsta2 mRNA expression (Fig. 4c) that is in line with our previous finding in uterus (Kluxen et al. 2012). Montano and Katzenellenbogen (1997) suggested that antioxidant activity of anti-estrogens (trans-hydroxytamoxifen, tamoxifen, and ICI 182,780) in breast cancer cells may contribute to their anticancer action. Thus, it might be of concern that Cd antagonized the ZK-induced increase in Gsta2 mRNA expression (Fig. 4c, and Kluxen et al. 2012). Another interesting finding is that Gsta2 expression is differently

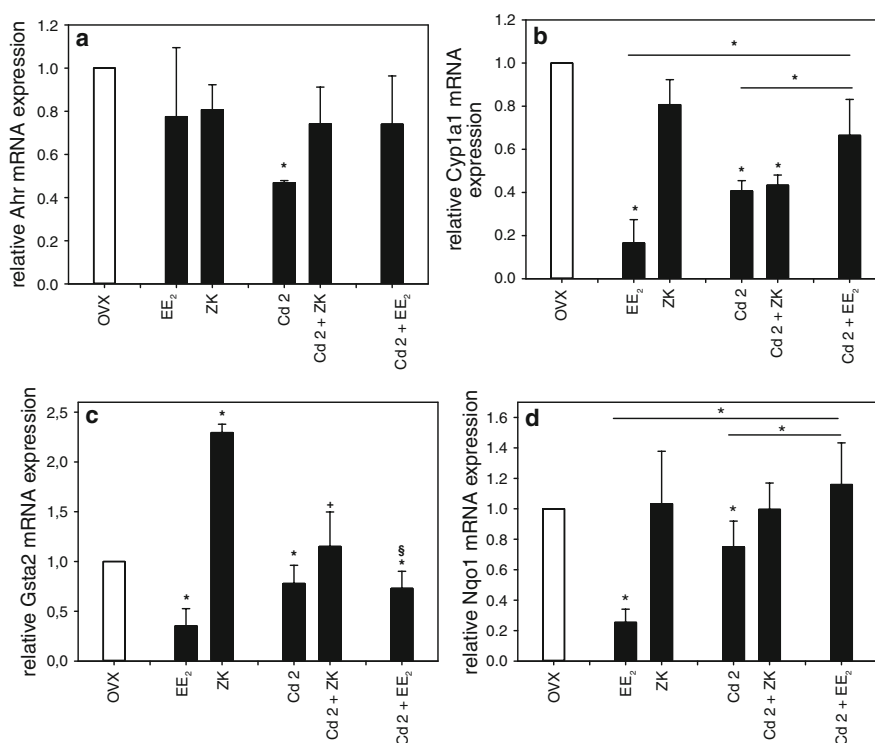


Fig. 4 Relative mRNA expression of **a** Ahr, **b** Cyp1a1, **c** Gsta2, and **d** Nqo1 in small intestine after 3 days gavage (Cd 2 mg/kg b.wt, EE₂ 0.1 mg/kg b.wt) or 3 days s.c. (ZK 2.5 mg/kg b.wt). Mean values

(fold induction) $\pm$ SD are given for $n = 7$ animals per dose group [$n = 8$ for Cd 2; $n = 7$ for ZK]; asterisk marks values significantly different from the control (OVX) or as indicated by lines. $p < 0.05$

affected by steroid estrogens and Cd in the two tissues studied, with a more or less pronounced down-regulation in the small intestine (Fig. 4c) and an up-regulation in the uterus (Kluxen et al. 2012; Kretzschmar et al. 2010). The tissue-specific responses of *Gsta2* may be related to differences in the expression of nuclear receptors and co-regulators.

In light of the rather complex regulation of the AhR and associated genes that can also involve cross-talk between the AhR with other nuclear receptors (Anwar-Mohamed et al. 2009) and what has been said earlier in this section, we can presently only speculate on the mechanisms involved in the observed effects of Cd and estrogen in the small intestine. A complex mix of competitive co-factor recruitment to ER beta or overlapping/contra-directional signal transduction might play a role as well as ER-independent mechanisms, e.g., modulation of extracellular kinases as reported in vitro (Brama et al. 2007; Kato et al. 2000; Liu et al. 2008). Also mechanisms responsible for the synergistic induction of MT1a in the small intestine after combined exposure to Cd and EE₂ are not yet understood. Nonetheless, this effect and the observed effects on AhR-associated genes for this combination may be taken as an indication for an interaction between Cd and estrogen-signaling.

Dose-dependent Cd-induced modulation of AhR-associated genes in small intestine

The results of the 28-day drinking water experiment (Fig. 5) confirm the modulation of AhR-associated genes in the small intestine observed with 3-day gavage administration of Cd and EE₂. The Cd doses chosen for our subchronic study of 0.4 and 4 mg/kg b.wt/d frame the Cd 2 mg/kg b.wt/d dose of the short-term study. The EE₂ doses were similar (0.08 or 0.1 mg/kg b.wt/d) in both studies. Except for *Ahr* mRNA expression that was slightly induced by EE₂, the AhR downstream target genes *Cyp1a1*, *Gsta2*, and *Nqo1* were down-regulated by the steroid estrogen (Fig. 5). While Cd 0.4 had no effect on AhR expression, mRNA levels were reduced by Cd 4, similarly as observed in the gavage study with Cd 2. However, the Cd 0.4 dose down-regulated *Cyp1a1*, *Gsta2*, and *Nqo1* mRNA level more efficiently than the Cd 4 dose (Fig. 5b–d). The inverse dose–response of Cd treatment on *Cyp1a1*, *Gsta2*, and *Nqo1* mRNA expression interestingly correlates with *Mt1a* expression in the small intestine after long-term oral administration (Fig. 2b). That intestinal *Mt1a* is induced by Cd 4 (but not by Cd 0.4) could affect the ratio of bound and ‘free’ Cd in this tissue. Thus, a possible link between Cd-induced MT modulation and Cd-induced effects on gene transcription should be investigated in future studies. Overall, the modulation of AhR-associated

genes by Cd is dependent on the administered dose, and to some extent also upon duration of exposure.

Cd-induced modulation of *Mt2a* and AhR-associated genes in HT-29 and Caco-2 cells

HT-29 and Caco-2 are cell lines derived from colorectal adenocarcinomas of a female and a male donor, respectively. Both cell lines are considered to be ER alpha negative. While ER beta expression has been reported before in HT-29 and Caco-2 (e.g., Campbell-Thompson et al. 2001; Gilad et al. 2005), other groups (Edvardsson et al. 2011; Paruthiyil et al. 2009) did not find detectable amounts of ER in these tumor cell lines. This is a major challenge for mechanistic in vitro studies, yet in line with the drop in ER beta levels observed during progression of several tumors, including colon cancer (Deroo and Buencaseso 2010).

Cyp1a1 mRNA expression was measured in HT-29 and Caco-2 cells after single and co-treatment with steroid estrogen and Cd to elucidate further whether ER-independent mechanisms play a role in AhR-associated gene transcription. Moreover, metallothionein (*Mt2a*) mRNA induction was measured as a marker for Cd exposure of Caco-2 and HT-29 and demonstrates a functional response to heavy metal treatment. The results are shown in Fig. 6.

Cd (1 μ M) induced *Mt2a* mRNA expression in both cell lines. Interestingly, the *Mt2a* induction by Cd was more pronounced in Caco-2 than in HT-29 cells (Fig. 6a, b). This may explain the higher resistance of Caco-2 to cytotoxicity of CdCl₂ (with an IC₅₀ value of 27 μ M for 24 h treatment in the neutral red uptake assay) compared to HT-29 (IC₅₀ value of 2.2 μ M). Co-treatment with Cd + E₂ had no effect on Cd-induced *Mt2a* induction, neither in HT-29 nor in Caco-2 cells. Treatment with E₂ alone resulted in a slight induction of *Mt2a* mRNA in HT-29 cells, but not in Caco-2 cells. While Cd effects in vitro resemble those seen in vivo (Fig. 2a), there is a difference in the effects of the metal-steroid estrogen combination that caused a much higher induction of metallothionein than Cd alone in the small intestine, but not in the ER-deficient colon cancer cell lines.

E₂ treatment (0.01 μ M) down-regulated *Cyp1a1* mRNA levels in both cell lines, with a stronger effect in Caco-2 than in HT-29 cells (Fig. 6c, d). In comparison, *Cyp1a1* mRNA down-regulation by Cd was less pronounced, but detectable in both cell lines (more in HT-29 than in Caco-2). However, in both Caco-2 and HT-29 cells, co-treatment with Cd antagonized the E₂-induced *Cyp1a1* mRNA down-regulation. This combination effect in vitro resembles our in vivo findings in the small intestine where oral administration of Cd 2 together with steroid estrogen also

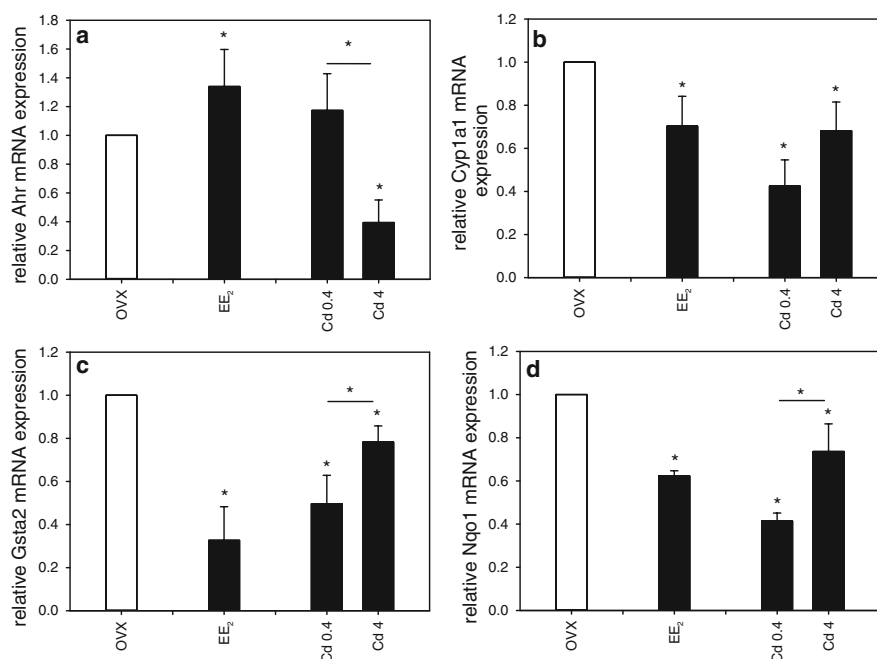
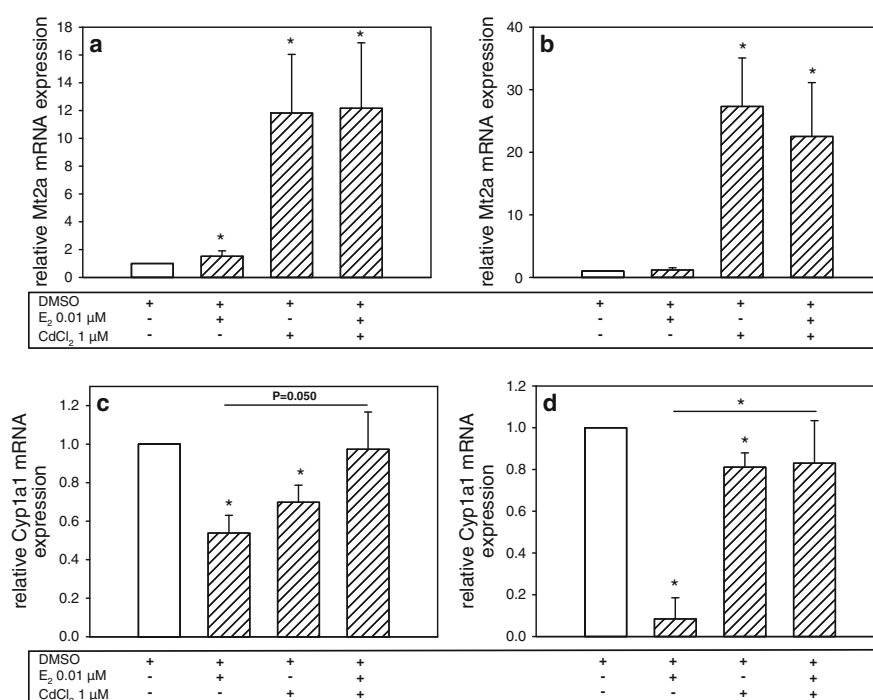


Fig. 5 Relative mRNA expression of **a** Ahr, **b** Cyp1a1, **c** Gsta2, and **d** Nqo1 in small intestine after 28 days via drinking water (Cd 0.4 or 4 mg/kg b.wt (5 or 50 ppm), EE₂ 0.08 mg/kg b.wt). Mean values

(fold induction) $\pm$ SD are given for $n = 6$ animals per dose group; asterisk marks values significantly different from the control (OVX) or as indicated by lines. $p < 0.05$

Fig. 6 Relative mRNA expression of Mt2a in **a** HT-29 cells and **b** Caco-2 cells and relative mRNA expression of Cyp1a1 in **c** HT-29 cells and in **d** Caco-2 cells after 5 days treatment with 0.01 μ M E₂ and/or 1 μ M CdCl₂ in 0.1 % DMSO. Mean values (fold induction) $\pm$ SD are given for three independent experiments; asterisk marks values significantly different from the control (DMSO) or as indicated by lines. $p < 0.05$



antagonized the EE₂-induced down-regulation of Cyp1a1 (Fig. 4b). Overall, this finding and the down-regulation of Cyp1a1 in HT-29 and CaCo-2 (Fig. 6c, d) suggest that the

modulation of AhR-associated gene expression by estrogen and/or Cd in the intestine is mediated by ER-independent mechanisms.

Conclusion

The new data show that estrogens modulate AhR-associated gene expression in the small intestine. Also the metalloestrogen Cd dose-dependently modulates AhR-associated gene expression similar to estrogens. We propose that ER-independent mechanisms might play a role since Cd-induced modulation of AhR target genes is not antagonized by anti-estrogen and also observed with estradiol in ER-negative cell lines. Our data further suggest interference of Cd with estrogen- and AhR-signaling in the small intestine.

Acknowledgments The authors wish to thank Dr. Claudia Behm for conducting the neutral red assays, Ute Laudenbach-Leschowsky for animal handling, and Jonas Hengevoss and Laura Happ for uterus epithelial height analysis. We also thank Verena Bamberger for assistance with the RNA preparation. Financial support by the Deutsche Forschungsgemeinschaft through DFG graduate college GRK1427 and a stipend to F.K. are gratefully acknowledged.

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

References

- Abel J, Haarmann-Stemmann T (2010) An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology. *Biol Chem* 391:1235–1248
- Ali I, Penttinen-Damdimopoulou PE, Makela SI et al (2010) Estrogen-like effects of cadmium in vivo do not appear to be mediated via the classical estrogen receptor transcriptional pathway. *Environ Health Perspect* 118:1389–1394
- Anwar-Mohamed A, Elbekai RH, El-Kadi AO (2009) Regulation of CYP1A1 by heavy metals and consequences for drug metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 5:501–521. doi:10.1517/17425250902918302
- Ashida H, Nishiumi S, Fukuda I (2008) An update on the dietary ligands of the AhR. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 4:1429–1447. doi:10.1517/17425255.4.11.1429
- Behm C, Degen GH, Föllmann W (2009) The Fusarium toxin enniatin B exerts no genotoxic activity, but pronounced cytotoxicity in vitro. *Mol Nutr Food Res* 53:423–430. doi:10.1002/mnfr.200800183
- Beischlag TV, Perdew GH (2005) ER alpha-AHR-ARNT protein-protein interactions mediate estradiol-dependent transrepression of dioxin-inducible gene transcription. *J Biol Chem* 280:21607–21611
- Brama M, Gnessi L, Basciani S et al (2007) Cadmium induces mitogenic signaling in breast cancer cell by an ER alpha-dependent mechanism. *Mol Cell Endocrinol* 264:102–108
- Byrne C, Divekar SD, Storch GB et al (2009) Cadmium—a metallohormone? *Toxicol Appl Pharmacol* 238:266–271
- Campbell-Thompson M, Lynch IJ, Bhardwaj B (2001) Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ER beta isoforms in colon cancer. *Cancer Res* 61:632–640
- Cano-Gauci DF, Sarkar B (1996) Reversible zinc exchange between metallothionein and the estrogen receptor zinc finger. *FEBS Lett* 386:1–4
- Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Roife AM (2002) Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci* 59:627–647
- Deroo BJ, Buensuceso AV (2010) Minireview: estrogen receptor beta: mechanistic insights from recent studies. *Mol Endocrinol* 24:1703–1714. doi:10.1210/me.2009-0288
- Diel P, Schmidt S, Vollmer G (2002) In vivo test systems for the quantitative and qualitative analysis of the biological activity of phytoestrogens. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 777:191–202
- Edvardsson K, Strom A, Jonsson P et al (2011) Estrogen receptor beta induces antiinflammatory and anti tumorigenic networks in colon cancer cells. *Mol Endocrinol* 25:969–979
- EFSA (2009) Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European commission on cadmium in food. *EFSA J* 980:1–139
- Garcia-Morales P, Saceda M, Kenney N et al (1994) Effect of cadmium on estrogen receptor levels and estrogen-induced responses in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 269:16896–16901
- Gilad LA, Bresler T, Gnainsky J et al (2005) Regulation of vitamin D receptor expression via estrogen-induced activation of the ERK 1/2 signaling pathway in colon and breast cancer cells. *J Endocrinol* 185:577–592
- Godt J, Scheidig F, Grosse-Siestrup C et al (2006) The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *J Occup Med Toxicol* 1:22. doi:10.1186/1745-6673-1-22
- Gräns J, Wassmur B, Celander MC (2010) One-way inhibiting cross-talk between aryl hydrocarbon receptor (AhR) and estrogen receptor (ER) signaling in primary cultures of rainbow trout hepatocytes. *Aquat Toxicol* 100:263–270
- Han X-Y, Xu Z-R, Wang Y-Z, Du W-L (2006) Effects of cadmium on serum sex hormone levels in pigs. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 90:380–384. doi:10.1111/j.1439-0396.2006.00607.x
- Harnish DC, Albert LM, Leathurby Y et al (2004) Beneficial effects of estrogen treatment in the HLA-B27 transgenic rat model of inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286:G118–G125
- Höfer N, Diel P, Wittsiepe J et al (2009) Dose- and route-dependent hormonal activity of the metalloestrogen cadmium in the rat uterus. *Toxicol Lett* 191:123–131
- Höfer N, Diel P, Wittsiepe J et al (2010) Investigations on the estrogenic activity of the metallohormone cadmium in the rat intestine. *Arch Toxicol* 84:541–552
- Ishitobi H, Mori K, Yoshida K, Watanabe C (2007) Effects of perinatal exposure to low-dose cadmium on thyroid hormone-related and sex hormone receptor gene expressions in brain of offspring. *Neurotoxicology* 28:790–797. doi:10.1016/j.neuro.2007.02.007
- Järup L, Akesson A (2009) Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicol Appl Pharmacol* 238:201–208. doi:10.1016/j.taap.2009.04.020
- Johnson MD, Kenney N, Stoica A et al (2003) Cadmium mimics the in vivo effects of estrogen in the uterus and mammary gland. *Nat Med* 9:1081–1084
- Kato S, Masuhiro Y, Watanabe M et al (2000) Molecular mechanism of a cross-talk between oestrogen and growth factor signalling pathways. *Genes Cells* 5:593–601
- Khan G, Penttinen P, Cabanes A et al (2007) Maternal flaxseed diet during pregnancy or lactation increases female rat offspring's susceptibility to carcinogen-induced mammary tumorigenesis. *Reprod Toxicol* 23:397–406. doi:10.1016/j.reprotox.2007.02.002
- Klaassen CD, Liu J, Diwan BA (2009) Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 238:215–220. doi:10.1016/j.taap.2009.03.026
- Kluxen FM, Höfer N, Kretzschmar G et al (2012) Cadmium modulates expression of aryl hydrocarbon receptor-associated genes in rat uterus by interaction with the estrogen receptor. *Arch Toxicol* 86:591–601. doi:10.1007/s00204-011-0787-x

- Kretzschmar G, Papke A, Zierau O et al (2010) Estradiol regulates aryl hydrocarbon receptor expression in the rat uterus. *Mol Cell Endocrinol* 321:253–257
- Linder MW, Falkner KC, Srinivasan G et al (1999) Role of canonical glucocorticoid response elements in modulating expression of genes regulated by the aryl hydrocarbon receptor. *Drug Metab Rev* 31:247–271. doi:10.1081/DMR-100101917
- Liu Z, Yu X, Shaikh ZA (2008) Rapid activation of ERK 1/2 and AKT in human breast cancer cells by cadmium. *Toxicol Appl Pharmacol* 228:286–294
- Martinez-Campa C, Alonso-Gonzalez C, Mediavilla MD et al (2006) Melatonin inhibits both ER alpha activation and breast cancer cell proliferation induced by a metalloestrogen, cadmium. *J Pineal Res* 40:291–296
- Matthews J, Gustafsson JA (2006) Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Nucl Recept Signal* 4:e016
- Montano MM, Katzenellenbogen BS (1997) The quinone reductase gene: a unique estrogen receptor-regulated gene that is activated by antiestrogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:2581–2586
- Nordberg GF (2009) Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicol Appl Pharmacol* 238:192–200. doi:10.1016/j.taap.2009.03.015
- Paruthiyil S, Cvorc A, Zhao X et al (2009) Drug and cell type-specific regulation of genes with different classes of estrogen receptor beta-selective agonists. *PLoS ONE* 4:e6271. doi:10.1371/journal.pone.0006271
- Predki PF, Sarkar B (1994) Metal replacement in “zinc finger” and its effect on DNA binding. *Environ Health Perspect* 102:195–198
- Rivera-Gonzalez R, Petersen DN, Tkalec G et al (1998) Estrogen-induced genes in the uterus of ovariectomized rats and their regulation by droloxifen and tamoxifen. *J Steroid Biochem Mol Biol* 64:13–24
- Russell WMS, Burch RL (1992) The principles of humane experimental technique. Universities Federation for Animal Welfare, South Mimms, Potters Bar, Herts, England
- Schleipen B, Hertrampf T, Fritzemeier K et al (2011) ERbeta-specific agonists and genistein inhibit proliferation and induce apoptosis in the large and small intestine. *Carcinogenesis* 32:1675–1683
- Siewit CL, Gengler B, Vegas E et al (2010) Cadmium promotes breast cancer cell proliferation by potentiating the interaction between ER alpha and c-Jun. *Mol Endocrinol* 24:981–992. doi:10.1210/me.2009-0410
- Silva E, Lopez-Espinosa MJ, Molina-Molina JM et al (2006) Lack of activity of cadmium in in vitro estrogenicity assays. *Toxicol Appl Pharmacol* 216:20–28
- Silva N, Peiris-John R, Wickremasinghe R et al (2012) Cadmium a metalloestrogen: are we convinced? *J Appl Toxicol* 32:318–332. doi:10.1002/jat.1771
- Soyalan B, Minn J, Schmitz HJ et al (2011) Apple juice intervention modulates expression of ARE-dependent genes in rat colon and liver. *Eur J Nutr* 50:135–143. doi:10.1007/s00394-010-0124-9
- Stoica A, Katzenellenbogen BS, Martin MB (2000) Activation of estrogen receptor-alpha by the heavy metal cadmium. *Mol Endocrinol* 14:545–553
- Tagiguchi M, Yoshihara S (2006) New aspects of cadmium as endocrine disruptor. *Environ Sci* 13:107–116
- Wada-Hiraike O, Warner M, Gustafsson JA (2006) New developments in oestrogen signalling in colonic epithelium. *Biochem Soc Trans* 34:1114–1116
- Wilson VS, Bobseine K, Gray LE (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. *Toxicol Sci* 81:69–77. doi:10.1093/toxsci/kfh180

3 Unveröffentlichte Daten

Nachfolgend finden sich bisher unveröffentlichte Ergebnisse verschiedener Versuche zur Aufklärung der molekularbiologischen Wirkung von Cd.

Um hormonartige Wirkungen von Cd im Darm besser zu charakterisieren, müssen zunächst östrogen-sensitive Signaltransduktionswege identifiziert und deren Modulation durch Cd im Darm charakterisiert werden. Mit diesem Ziel wurde eine Microarray-Analyse durchgeführt (siehe 3.1).

Weiterhin führte die Beobachtung, dass Cd die Wirkung endogener Östrogene modulieren kann (siehe 2.3 und 2.4) und die Toxizität von Cd offensichtlich vom vorliegenden Hormonstatus abhängt (Shimada et al., 2012) zu einer Reihe weiterer Versuche.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde dazu die Konzeption für zwei Masterarbeiten (Becker, 2011; Krüger, 2012) im Studiengang Toxikologie (an der Heinrich Heine-Universität Düsseldorf) entwickelt. Die im Labor der Deutschen Sporthochschule Köln durchgeführten experimentellen Arbeiten wurden unter Leitung von Prof. Diel von mir betreut. Einige wichtige Teilergebnisse aus Krüger 2012 sind in 3.3 dargestellt.¹

3.1 Analysen im Rattendarm – Microarray-Versuch

Eine Veröffentlichung dieses Versuches wird gerade vorbereitet – deshalb ist dieser Abschnitt in Englisch. Die Erkenntnis, dass Gene, die die Darmhomöostase modulieren von Cd und EE₂ beeinflusst werden, führte zu weiteren Untersuchungen in intakten weiblichen Wistar-Ratten zur Darmhomöostase (siehe 3.3).

¹Ein Teil der Ergebnisse (Zellversuche) aus Becker 2011 werden in Veröffentlichung 2.3 gezeigt.

Identification of estrogen- and cadmium-modulated genes in the rat-intestine by microarray analysis

Felix M. Kluxen^{1,2}, Patrick Diel¹, Nicola Höfer^{1,2}, Jan G. Hengstler², Gisela H. Degen²

¹ Institute of Cardiovascular Research and Sports Medicine, Department of Molecular and Cellular Sports Medicine, German Sports University Cologne, Am Sportpark Müngersdorf 6, D-50933 Köln, Germany

² IfADo – Leibniz Research Centre for Working Environment and Human Factors at the TU Dortmund, Ardeystr. 67, D-44139 Dortmund, Germany

Corresponding author:

Felix M. Kluxen

Institute of Cardiovascular Research and Sports Medicine, Department of Molecular and Cellular Sports Medicine, German Sports University Cologne, Am Sportpark Müngersdorf 6, D-50933 Köln, Germany

Phone ++49-221-4982-5860

Fax ++49-221-4982-8370

e-mail: felix.kluxen@gmail.com

Key words: aryl hydrocarbon receptor, cadmium, endocrine modulation, endocrine disruption, estrogens

Abbreviations: b.wt, body weight; Cd, cadmium; CdCl₂, cadmium chloride; EE₂, 17alpha-ethinylestradiol; ER alpha/beta, estrogen receptor alpha/beta; OVX, ovariectomized;

Abstract

Cadmium (Cd) is an environmental and food contaminant with pronounced toxicity, but also potential endocrine disrupting properties. An estrogen-like activity of Cd has been mostly described with regard to classic estrogen target tissues (i.e. uterus, breast) or in *in vitro* models that express estrogen receptor (ER) alpha. However, Cd also shows estrogenic activity in the small intestine, a tissue that predominantly expresses ER beta.

The major route of exposure to Cd is via food, and estrogens can modulate homeostasis and inflammatory responses in the small intestine. Thus, Cd may also affect estrogen-regulated gene expression in the intestine. But to date, only few estrogen-sensitive genes are known in this tissue. To identify estrogen- and Cd-modulated genes in duodenal mucosa of rats, we performed a microarray analysis (Affymetrix Gene Chip Rat Genome 230 2.0 Array) of tissue samples of the following *in vivo* study.

Female ovariectomized Wistar rats (n=12) were orally treated with either vehicle, 0.1 mg/kg b.wt 17alpha-ethinylestradiol (EE₂), 0.5 or 4 mg/kg b.wt CdCl₂ for three days. After sacrifice the total RNA of mucosa was isolated and cDNA synthesized.

In all treatment groups, a total of 129 genes were significantly modulated compared to controls (FC ≥ 2 or ≤ -2 and a p-value ≤ 0.05). Among these, 21 known and 5 unknown transcripts were significantly modulated by estrogen. A selection of genes was subsequently analyzed by real-time RT-PCR: Cd dose-dependently induced *Papss2*, *Reg1a*, *Akr1c11*, and *Slc37a2* similar to EE₂. Cd modulated the estrogen-sensitive genes *Bcl6*, *Fam55b*, *Fabp6*, and *Il-33*, but with a nonmonotonic dose-response relationship.

Together we this study gives evidence that Cd modulates estrogen-sensitive gene expression in the rat intestine and an overview of the most responsive genes.

Introduction

Cadmium (Cd) is an environmental and food contaminant. Occupational exposure to the metal is mainly via inhalation but the general population is exposed via diet (ATSDR 2008; ATSDR 2012; EFSA 2009; EFSA 2012; UNEP 2010). Classic Cd toxicity has been long known (since the mid-1800s) and well characterized (Järup and Åkesson 2009; Nordberg 2009). However, emerging evidence more recently suggests hormonal disruption by divalent Cd ions (see reviews by Byrne et al. 2009; Silva et al. 2012). Cd mimics estrogen *in vivo* and *in vitro*. However, Cd's estrogen-like activity has been mostly described with regard to classic estrogen target tissues, e.g. uterus (Höfer et al. 2009; Johnson et al. 2003; Kluxen et al. 2012b), or in *in vitro* models that express estrogen receptor (ER) alpha (Garcia-Morales et al. 1994; Stoica et al. 2000). On the other hand, Cd also shows estrogenic activity in the small intestine (Höfer et al. 2010; Kluxen et al. 2012a) – a tissue that predominantly expresses ER beta (Kuiper et al. 1997).

Estrogens modulate homeostasis (Schleipen et al. 2011) and inflammatory response (Harnish et al. 2004) of the small intestine via ER beta. Thus this tissue's exposure to Cd is of concern, since Cd may interfere with estrogenic signaling. However, only a few estrogen-sensitive intestinal genes are known.

To identify estrogen- and Cd-modulated genes in duodenal mucosa of rats, we performed a microarray analysis (Affymetrix Gene Chip Rat Genome 230 2.0 Array) of tissue samples from the following *in vivo* study. Female ovariectomized Wistar rats (n=12) were orally treated with vehicle, 0.1 mg/kg b.wt 17alpha-ethinylestradiol (EE₂), 0.5 or 4 mg/kg b.wt CdCl₂ for three days. We used the ordinary p-value of moderated t-score along with fold change (FC) value to determine the differentially expressed transcripts in the microarray data (p-value ≤ 0.05 and FC ≥ 2 or FC ≤ -2), because the data of the biological replicates did not escape false discovery rate (FDR) correction (see Material and Methods). A selection of co-regulated genes was subsequently analyzed by RT-PCR.

Material and Methods

Animals and experimental treatments

All animal husbandry and handling conditions were according to the Institutional Animal Care and Use Committee guidelines, and legal permission to conduct the animal experiments was obtained from the local responsible authorities. Juvenile female Wistar rats of 4–5 weeks (101–125 g) were obtained from Janvier (Le-Genest St-Isle, France) and acclimatized for one week. Rats were kept under controlled conditions (temperature 20 ± 1 °C, humidity 50–80 %, illumination 12L/12D) and had free access to tap water and a diet low in phytoestrogen content (R/M-H, from Ssniff GmbH, Germany). Prior to the experiments, ovaries of the rats were ectomized (OVX). After the endogenous hormonal decline within 14 days, the animals were randomly allocated to vehicle or treatment groups, n=3.

CdCl₂ was dissolved in tap water and administered at doses of 0.5 or 4 mg/kg b.wt on three consecutive days; the estrogen reference group received ethinylestradiol (EE₂, dissolved in propanediol/ethanol, 80:20) at a daily dose of 0.1 mg/kg b.wt.

Tissue collection

Freshly excised pieces of small intestine were collected and snap-frozen in liquid nitrogen for RNA preparations.

RNA preparation and cDNA syntheses

RNA was purified from mucosal tissue with RNeasy Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. The RNA was quantified by UV spectrophotometry (Nanodrop, Peqlab). Denaturing agarose gel electrophoresis was used for quality control: only RNA with intact ribosomal bands was used for gene chip analyses.

Microarray

The Affymetrix Gene Chip Rat Genome 230 2.0 Array (Genechip, Affymetrix, Santa Clara, CA) was used for gene expression profiling. RNA samples were handled according to the manufacturer's instructions. The arrays were tested for quality control and observed to be within bounds of optimal threshold values set. Transcripts that were detected to be present (MAS 5.0) were RMA-normalized and used for data analysis.

The normalized dataset was taken for the Principal Component Analysis. It was observed that the biological replicates (individual animals) of all the 4 groups were scattered (see supplementary material Fig. 1). However, correlating the transcriptional expression levels of the arrays showed a strong positive correlation (see supplementary material Fig. 2).

The fold change (FC) value for each transcript was calculated with the average values of the biological replicates of experimental group and reference group. $FC = \text{average of biological replicates of the experimental group} / \text{average of biological replicates of the reference group}$.

To assess the differential expression of the genes with Limma, a R and Bioconductor package, a linear model was employed. Moderated t-statistic calculation was used to determine the differentially expressed transcripts between the experimental and the reference groups. Because none of the transcripts from the comparison escaped false discovery rate (FDR)

correction (when p-values of moderated t-scores were adjusted with Benjamini-Hochsberg to have FDR controlled p-values), we used the ordinary p-value of moderated t-score along with the FC-value to determine the differentially expressed transcripts (p-value ≤ 0.05 and $FC \geq 2$ or ≤ -2).

Real-time RT-PCR

Amplification of cDNA by real-time RT-PCR was performed in a MX3005P thermal cycler (Stratagene). The protocol comprised 5 min at 95 °C followed by 45 cycles of 94, 60, and 72°C for 1 min each. The data were normalized relative to the housekeeping gene subunit 1A of cytochrome c oxidase via the delta delta CT method (Pfaffl 2001). Primers are depicted in Table 1. We have performed at least three measurements from independently synthesized cDNA of the same pooled RNA samples.

Results

To investigate estrogen and Cd-induced modulation of intestinal gene expression in ovariectomized Wistar rats after 3 day of treatment, we performed an explorative microarray experiment. 129 genes were modulated by treatment (Fig. 1). 26 transcripts were modulated by estrogen (Table 2), 58 genes were modulated by the low dose group of Cd (Table 3), and 68 gene by the high dose group (Table 4). Groups that are similarly modulated by two or three compounds are depicted in Table 5. The microarray expression of selected genes was subsequently controlled by real-time RT-PCR.

Mt2a mRNA expression was measured as marker for Cd exposure. Mt2a mRNA in the intestine was induced only in the highest dose group (Fig. 2).

Real-time RT-PCR confirmed the expression patterns of the microarray analysis. The expression pattern of the investigated genes can be divided into two groups: Estrogen-sensitive genes that are dose-dependently induced by Cd and genes that have a nonmonotonous dose-response relationship, as follows.

Cd dose-dependently induces Reg1a, Papss2, Ark1cl1, and Slc37a2 similar to EE₂ (Fig. 3). EE₂ induces Papss2 and Slc37a2 more than Cd 4. EE₂ and Cd 4 similarly induce Reg1a and Akr1cl1.

EE₂ and Cd 0.5 induce Bcl6 expression. Treatment with Cd 4 has no effect. EE₂ and Cd 0.4 strongly induced (40 and 60 fold respectively) Fam55b expression. Treatment with Cd4 induces Fam55b expression less (about 30 fold) than either EE₂ or Cd 0.5. Fabp6 is down-regulated by EE₂ and Cd 4. Interestingly Cd 0.5 induces Fabp6 expression about 50 fold. Il-33 is down-regulated by EE₂ and Cd 0.5. Treatment with Cd 4 has no effect on Il-33 expression (Fig. 4).

Discussion

We performed an explorative microarray experiment to investigate estrogen- and Cd-induced modulation of intestinal gene expression in ovariectomized Wistar rats after 3 day of treatment. Estrogens play a vital role in gut homeostasis and pathology but there is a lack of knowledge about estrogen-sensitive genes in the intestine. There is however an increased risk to be exposed to potential hormonally active compounds/potential endocrine disruptors via dietary exposure.

As outlined in *Material and Methods* we used the ordinary p-value of moderated t-score to determine differently expressed transcripts. This method might have a lower accuracy and reproducibility (Tibshirani 2007), therefore, a p-value ≤ 0.05 was applied and only FC-values ≥ 2 or ≤ -2 were reported. This reduced the number of transcripts to 129 (see Table 2–4).

To identify genes that are similarly regulated by both Cd and estrogen we measured mRNA expression of genes that appear in the intersections of the 3-way-venn diagram (Fig.1): $EE_2 \cap Cd$ $0.5 \cap Cd$ 4 and $EE_2 \cap Cd$ 4 (see Table 5).

Metallothionein response

We used metallothionein (Mt) expression as a marker for Cd exposure. MT isoforms Mt1a and Mt2a were dose-dependently induced by Cd and therefore show a functional response of the tissue to the heavy metal. Interestingly Mt2a expression seems to be more pronounced than Mt1a expression (Table 4), the isoform we analyzed in rat-intestine before (Höfer et al. 2010). We observed in real-time RT-PCR that Mt2a mRNA Expression was induced by Cd but not by EE_2 (Fig. 2) contrary to the results reported for Mt1a before. However, real-time RT-PCR confirmed the results reported for microarray expression.

Real-time RT-PCR of selected genes

Cd dose-dependently induced Papss2, Reg1a, Akr1c11, and Slc37a2 similar to EE_2 . Cd modulated the estrogen-sensitive genes Bcl6, Fam55b, Fabp6, and Il-33, but with a non-monotonic dose-response relationship. A non-monotonic dose-response has been reported repeatedly in other studies that investigated hormonally active compounds (Andrade et al. 2006; Narita et al. 2007; Takano et al. 2006; Welshons et al. 2003; Wetherill et al. 2002; Wozniak et al. 2005). We reported that high doses of Cd induce complement C3 mRNA expression, a classic ERE-containing, estrogen target gene, while lower doses repress its expression (Höfer et al. 2009). These effects create tremendous problems for risk assessment (Conolly and Lutz 2004), since low-dose toxicity is usually extrapolated from the toxicity of higher doses by assuming a monotonous dose response relationship. A complex mix of forming transcriptionally less efficient receptor dimers (Conolly and Lutz 2004), recruiting ineffective coactivators (Kohn and Melnick 2002) together with non-classic receptor activation/modulation and other signal transduction might be involved. However, at the moment no explanation can be given.

Cd and EE_2 induce genes associated with tumor progression

It is of concern that both estrogen and Cd induce genes that have been associated with tumor progression (Bcl6 and Reg1a). Especially Reg1a recently received increased attention.

Bcl6 is a repressive zinc finger transcription factor that is implicated in the pathogenesis of diffuse large B cell lymphoma (Pellicano and Holyoake 2011). Compared to adenocarcinoma, lymphoma in the intestine are relatively rare, but their prognosis is poor (Gustafsson et al. 2008). Expression of BCL6 protects B cell lines from DNA damage-induced apoptosis, probably by inactivation of p53 (Phan and Dalla-Favera 2004). It has not been described to be regulated by estrogens before.

Reg1a is a growth factor affecting pancreatic islet beta cells. It might be involved in the progression of various cancer types including those in the gastrointestinal tract. In patients whose pancreatic cancers express Reg1a, Reg1a serum levels and Reg1a levels in pancreatic juice have also been shown to be elevated compared to controls. Thus, Reg1a might be a potential tumor marker for pancreatic tumors (Park et al. 2011). High expression levels of Reg1a in tumors is an independent predictor of poor prognosis in patients with breast (Sasaki et al. 2008) or gastric cancers (Yamagishi et al. 2009). In colorectal cancer patients Reg1a is a predictor of disease-free survival and is already significantly raised in peritumoral normal tissue compared to mucosa from healthy individuals (Astrosini et al. 2008). Reg1a expression occurs also in inflammatory diseases of the intestine, as follows. Reg1a has been shown to be upregulated in ileum of children with Crohn's Disease compared to control (Sim et al. 2011). Reg1a expression differentiates neoplastic lesions from non-neoplastic ulcerative colitis tissues (Tanaka et al. 2011). It might serve as a biological mediator for immune cell-derived IL-22 in these tissues (Sekikawa et al. 2010). Interestingly Reg1a is also up-regulated in parasite-induced colitis, but the biological role in this is unclear – Peterson et al. proposed a possible protection from parasite-induced apoptosis (Peterson et al. 2011).

Estrogens modulate the homeostasis of the small intestine. Antiproliferative and proapoptotic effects are mediated via ER beta (Schleipen et al. 2011). The modulation of Bcl6 and Reg1a by estrogen and Cd has to be investigated in future mechanistic studies. And since, cancer in the small intestine is seldom compared to colon (Schottenfeld et al. 2009) those studies should also be conducted in colon tissue.

Together our data demonstrates that Cd-modulates estrogen-sensitive genes in the intestine. The newly identified estrogen-sensitive and Cd-modulated genes in the small intestine might provide a good basis for future studies.

Acknowledgements

Financial support by the Deutsche Forschungsgemeinschaft through DFG graduate college GRK1427 and a stipend to F.M.K. are gratefully acknowledged. We thank Ute Laudenbach-Leschowsky for animal handling. Special thanks to John Antonydas Gaspar and Agapios Sachinidis of the Center of Physiology and Pathophysiology in the Institute of Neurophysiology at the University of Cologne for conducting the microarray and statistical analysis.

References

- Andrade AJM, Grande SW, Talsness CE, et al. (2006) A dose–response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP): Non-monotonic dose–response and low dose effects on rat brain aromatase activity. *Toxicology* 227:185–192. doi: 10.1016/j.tox.2006.07.022
- Astrosini C, Roefzaad C, Dai Y-Y, et al. (2008) REG1A expression is a prognostic marker in colorectal cancer and associated with peritoneal carcinomatosis. *Int J Cancer* 123:409–413. doi: 10.1002/ijc.23466
- ATSDR (2008) CDC - National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. <http://www.cdc.gov/exposurereport/>. Accessed 17 Jul 2012
- ATSDR (2012) CDC - National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals - Updated Tables. <http://www.cdc.gov/exposurereport/>. Accessed 17 Jul 2012
- Byrne C, Divekar SD, Storch GB, et al. (2009) Cadmium—a metalloestrogen? *Toxicol Appl Pharmacol* 238:266–71.
- Conolly RB, Lutz WK (2004) Nonmonotonic Dose-Response Relationships: Mechanistic Basis, Kinetic Modeling, and Implications for Risk Assessment. *Toxicol Sci* 77:151–157. doi: 10.1093/toxsci/kfh007
- EFSA (2009) Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European commission on cadmium in food. *EFSA Journal* 980:1–139.
- EFSA (2012) Cadmium dietary exposure in the European population. *EFSA Journal* 10:2551 [37 pp.]. doi: 10.2903/j.efsa.2012.2551
- Garcia-Morales P, Saceda M, Kenney N, et al. (1994) Effect of cadmium on estrogen receptor levels and estrogen-induced responses in human breast cancer cells. *JBC* 269:16896–901.
- Gustafsson BI, Siddique L, Chan A, et al. (2008) Uncommon cancers of the small intestine, appendix and colon: an analysis of SEER 1973–2004, and current diagnosis and therapy. *Int J Oncol* 33:1121–1131.
- Harnish DC, Albert LM, Leathurby Y, et al. (2004) Beneficial effects of estrogen treatment in the HLA-B27 transgenic rat model of inflammatory bowel disease. *Am J Physiol-Gastr L* 286:G118–25.
- Höfer N, Diel P, Wittsiepe J, et al. (2009) Dose- and route-dependent hormonal activity of the metalloestrogen cadmium in the rat uterus. *Toxicol Lett* 191:123–31.
- Höfer N, Diel P, Wittsiepe J, et al. (2010) Investigations on the estrogenic activity of the metalloestrogen cadmium in the rat intestine. *Arch Toxicol* 84:541–52.
- Järup L, Åkesson A (2009) Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicol Appl Pharmacol* 238:201–208. doi: 10.1016/j.taap.2009.04.020
- Johnson MD, Kenney N, Stoica A, et al. (2003) Cadmium mimics the in vivo effects of estrogen in the uterus and mammary gland. *Nat Med* 9:1081–4.

- Kluxen FM, Diel P, Höfer N, et al. (2012a) The metallohormone cadmium modulates AhR-associated gene expression in the small intestine of rats similar to ethinyl-estradiol. *Arch Toxicol* 1–11. doi: 10.1007/s00204-012-0971-7
- Kluxen FM, Höfer N, Kretzschmar G, et al. (2012b) Cadmium modulates expression of aryl hydrocarbon receptor-associated genes in rat uterus by interaction with the estrogen receptor. *Arch Toxicol* 86:591–601. doi: 10.1007/s00204-011-0787-x
- Kohn MC, Melnick RL (2002) Biochemical origins of the non-monotonic receptor-mediated dose-response. *J Mol Endocrinol* 29:113–123. doi: 10.1677/jme.0.0290113
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, et al. (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138:863–70.
- Narita S, Goldblum RM, Watson CS, et al. (2007) Environmental estrogens induce mast cell degranulation and enhance IgE-mediated release of allergic mediators. *Environ Health Perspect* 115:48–52.
- Nordberg GF (2009) Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicol Appl Pharmacol* 238:192–200. doi: 10.1016/j.taap.2009.03.015
- Park JY, Kim S-A, Chung JW, et al. (2011) Proteomic analysis of pancreatic juice for the identification of biomarkers of pancreatic cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 137:1229–1238. doi: 10.1007/s00432-011-0992-2
- Pellicano F, Holyoake TL (2011) Assembling defenses against therapy-resistant leukemic stem cells: Bcl6 joins the ranks. *JEM* 208:2155 –2158. doi: 10.1084/jem.20112087
- Peterson KM, Guo X, Elkahouloun AG, et al. (2011) The expression of REG 1A and REG 1B is increased during acute amebic colitis. *Parasitol Int* 60:296–300. doi: 10.1016/j.parint.2011.04.005
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.
- Phan RT, Dalla-Favera R (2004) The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature* 432:635–639. doi: 10.1038/nature03147
- Sasaki Y, Minamiya Y, Takahashi N, et al. (2008) REG1A expression is an independent factor predictive of poor prognosis in patients with breast cancer. *Ann Surg Oncol* 15:3244–3251. doi: 10.1245/s10434-008-0137-2
- Schleipen B, Hertrampf T, Fritzemeier K, et al. (2011) ERbeta-specific agonists and genistein inhibit proliferation and induce apoptosis in the large and small intestine. *Carcinogenesis* 32:1675–1683.
- Schottenfeld D, Beebe-Dimmer JL, Vigneau FD (2009) The epidemiology and pathogenesis of neoplasia in the small intestine. *Ann Epidemiol* 19:58–69. doi: 10.1016/j.annepidem.2008.10.004
- Silva N, Peiris-John R, Wickremasinghe R, et al. (2012) Cadmium a metalloestrogen: are we convinced? *J Appl Toxicol* 32:318–332. doi: 10.1002/jat.1771
- Sim WH, Wagner J, Cameron DJ, et al. (2011) Expression profile of genes involved in pathogenesis of paediatric Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol*. doi: 10.1111/j.1440-1746.2011.06973.x

Stoica A, Katzenellenbogen BS, Martin MB (2000) Activation of estrogen receptor-alpha by the heavy metal cadmium. *Mol Endocrinol* 14:545–53.

Takano H, Yanagisawa R, Inoue K, et al. (2006) Di-(2-ethylhexyl) phthalate enhances atopic dermatitis-like skin lesions in mice. *Environ Health Perspect* 114:1266–1269.

Tanaka H, Fukui H, Fujii S, et al. (2011) Immunohistochemical analysis of REG Ia expression in ulcerative colitis-associated neoplastic lesions. *Digestion* 83:204–209. doi: 10.1159/000321808

Tibshirani R (2007) A comparison of fold-change and the t-statistic for microarray data analysis. *Analysis* 1–17.

UNEP (2010) Final review of scientific information on cadmium. United Nations Environment Programme

Welshons WV, Thayer KA, Judy BM, et al. (2003) Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environ Health Perspect* 111:994–1006.

Wetherill YB, Petre CE, Monk KR, et al. (2002) The Xenoestrogen Bisphenol A Induces Inappropriate Androgen Receptor Activation and Mitogenesis in Prostatic Adenocarcinoma Cells. *Mol Cancer Ther* 1:515–524.

Wozniak AL, Bulayeva NN, Watson CS (2005) Xenoestrogens at picomolar to nanomolar concentrations trigger membrane estrogen receptor-alpha-mediated Ca²⁺ fluxes and prolactin release in GH3/B6 pituitary tumor cells. *Environ Health Perspect* 113:431–439.

Yamagishi H, Fukui H, Sekikawa A, et al. (2009) Expression profile of REG family proteins REG I[alpha] and REG IV in advanced gastric cancer: comparison with mucin phenotype and prognostic markers. *Modern Pathol* 22:906–913. doi: 10.1038/modpathol.2009.41

Tables:

Table 1 Primers (designed in Primer3 0.4.0) used in control real-time RT-PCR of the genes that were modulated in the microarray by the indicated compounds with a p-value ≤ 0.05 and a FC ≥ 2 or ≤ -2 .

mRNA		Sequence 5'-3'
1A	fwd	CGTCACAGCCCATGCATTCTG
	rev	CTGTTTCATCCTGTTCCAGCTC
<i>Genes that were modulated by EE₂, Cd 0.5, and Cd 4</i>		
Bcl6	fwd	TAAAGAGCCATCTGCGCATC
	rev	AAGGGGCTGGAGAGAAAAAG
Fam55b	fwd	GGGCTTCCTTTTGGAGAGAG
	rev	TCATGGTGGTGTCTCTGTGC
Papss2	fwd	TGCCTCACCTGAGACAAAG
	rev	TCTGGGGGATCTTCTCCTTC
Reg 1a	fwd	TTCCAATCGTGGCTACTGTG
	rev	GGAAGAGGGGGTTGACTTTG
<i>Genes that were modulated by EE₂ and Cd 4</i>		
Slc37a2	fwd	CTGTCACGGCCATCATTGAC
	rev	TGGGTTAGGGCCAGACTAGAG
Akr1c1	fwd	TTGAATTGACCCAGAGGAC
	rev	GACAAGCACAAGGCAACAAG
<i>Genes that were modulated by either EE₂ or Cd 4</i>		
Il-33	fwd	ATGGGAAGAAGCTGATGGTG
	rev	ACCAGAGCCAGTTGGTTGTC
Fabp6	fwd	CACCATTGGCAAAGAATGTG
	rev	CAAGCCACCCTCTTGCTTAC

Table 2 Genes in rat-mucosa that are modulated after three days oral treatment with 0.1 mg/kg b.wt 17alpha-ethylestradiol.

Gene Title	Gene Symbol	Probe Set ID	Fold Change	p-value
family with sequence similarity 55, member B	Fam55b	1383833_at	19.00	0.033
Similar to Hypothetical protein MGC75664	RGD156155 1	1390691_at	5.54	0.017
solute carrier family 37 (glycerol-3-phosphate transporter), member 2	Slc37a2	1377058_at	4.13	0.011
3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2	Papss2	1395721_at	4.10	0.024
S100 calcium binding protein G	S100g	1368339_at	3.90	0.033
frizzled homolog 8 (Drosophila)	Fzd8	1383721_at	3.67	0.001
alkaline phosphatase 3, intestine, not Mn requiring	Akp3	1387758_at	3.67	0.021
---	---	1397423_at	3.63	0.007
3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2	Papss2	1376047_at	3.41	0.027
regenerating islet-derived 1 alpha	Reg1a	1368629_at	3.39	0.020
Forkhead box Q1	Foxq1	1385464_at	3.34	0.019

FK506 binding protein 5	Fkbp5	1388901_at	3.28	0.028
transmembrane 7 superfamily member 3	Tm7sf3	1389609_at	2.62	0.000
WDNM1 homolog	LOC360228	1393260_at	2.58	0.019
---	---	1381591_at	2.51	0.012
---	---	1373944_at	2.45	0.000
B-cell CLL/lymphoma 6	Bcl6	1379368_at	2.35	0.025
aldo-keto reductase family 1, member C-like 1	Akr1c11	1394681_at	2.10	0.044
metallothionein 1a	Mt1a	1371237_a_at	2.08	0.032
cathepsin Z	Ctsz	1370885_at	2.01	0.026

Genes with $-2 < FC < 2$ and/or p -values > 0.05 were excluded

---	---	1380669_at	-2.01	0.002
interleukin 33	Il33	1389581_at	-2.09	0.004
---	---	1389986_at	-2.21	0.002
Myotubularin related protein 11	Mtmr11	1383311_at	-2.66	0.045
stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	Scd	1367668_a_at	-2.90	0.016
similar to HTGN29 protein; keratinocytes associated transmembrane protein 2	RGD1310352	1380407_at	-3.05	0.010

Table 3 Genes in rat-mucosa that are modulated after three days oral treatment with 0.5 mg/kg b.wt CdCl₂.

Gene Title	Gene Symbol	Probe Set ID	Fold Change	p-value
family with sequence similarity 55, member B	Fam55b	1383833_at	20.54	0.03
immunoglobulin heavy chain 1a (serum IgG2a)	Igh-1a	1388272_at	8.57	0.01
TRAF-interacting protein with forkhead-associated domain	Tifa	1382311_at	4.06	0.01
---	---	1391106_at	3.74	0.00
---	---	1387902_a_at	3.73	0.04
3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2	Papss2	1395721_at	3.47	0.03
immunoglobulin joining chain	Igj	1383163_at	3.44	0.04
family with sequence similarity 43, member A	Fam43a	1390403_at	3.33	0.00
regenerating islet-derived 1 alpha	Reg1a	1368629_at	3.23	0.01
regenerating islet-derived 3 gamma	Reg3g	1370631_at	3.14	0.02
complement component 7 /// tubulin, beta 2c	C7 /// Tubb2c	1388557_at	3.14	0.00
3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2	Papss2	1376047_at	3.12	0.03
Tenascin C	Tnc	1373401_at	3.00	0.05
heme oxygenase (decycling) 1	Hmox1	1370080_at	2.94	0.00
frizzled homolog 8 (Drosophila)	Fzd8	1383721_at	2.91	0.01
ceruloplasmin	Cp	1368419_at	2.77	0.00
---	---	1386695_at	2.76	0.01
complement component 1, s subcomponent	C1s	1387893_at	2.76	0.03
adrenomedullin	Adm	1387219_at	2.64	0.00
MAX gene associated	Mga	1391600_at	2.61	0.00
membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 7	Ms4a7	1378193_at	2.57	0.01
similar to RIKEN cDNA 2010001M09	RGD1310251	1385813_at	2.56	0.04

Draft: Identification of estrogen- and cadmium-modulated genes in the rat-intestine by microarray analysis

---	---	1382702_at	2.54	0.00
vascular cell adhesion molecule 1	Vcam1	1368474_at	2.48	0.05
Cd5 molecule-like	Cd5l	1385635_at	2.45	0.00
cathepsin Z	Ctsz	1370885_at	2.42	0.02
matrix metalloproteinase 2	Mmp2	1370301_at	2.38	0.02
WDM1 homolog	LOC360228	1393260_at	2.38	0.04
CD3 molecule, gamma polypeptide	Cd3g	1384787_at	2.37	0.01
chemokine (C-C motif) ligand 2	Ccl2	1367973_at	2.34	0.00
---	---	1383211_at	2.32	0.01
clusterin	Clu	1367784_a_at	2.32	0.01
similar to paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha	LOC685020 /// Pilra	1376688_a_at	2.30	0.00
---	---	1382746_s_at	2.29	0.04
complement factor H	Cfh	1387029_at	2.28	0.04
legumain	Lgmn	1368430_at	2.27	0.01
periostin, osteoblast specific factor	Postn	1373911_at	2.27	0.03
plasminogen activator, tissue	Plat	1367800_at	2.23	0.03
chemokine (C-X-C motif) receptor 4	Cxcr4	1389244_x_at	2.22	0.01
B-cell CLL/lymphoma 6	Bcl6	1379368_at	2.20	0.02
receptor-interacting serine-threonine kinase 3	Ripk3	1370422_at	2.19	0.01
Fas apoptotic inhibitory molecule 3	Faim3	1382184_at	2.19	0.00
spondin 1, extracellular matrix protein	Spon1	1370312_at	2.15	0.03
guanylate binding protein 2	Gbp2	1368332_at	2.13	0.00
---	---	1385029_at	2.11	0.00
actin, alpha 1, skeletal muscle	Acta1	1369928_at	2.05	0.05
low density lipoprotein receptor-related protein 3	Lrp3	1378136_at	2.05	0.01
interleukin 22 receptor, alpha 2	Il22ra2	1391612_at	2.03	0.04
collectin sub-family member 12	Colec12	1372818_at	2.02	0.03

Genes with $-2 < FC < 2$ and/or p-values > 0.05 were excluded

---	---	1391757_at	-2.03	0.00
STEAP family member 3	Steap3	1370374_at	-2.05	0.01
epoxide hydrolase 1, microsomal	Ephx1	1387669_a_at	-2.14	0.05
---	---	1371775_at	-2.20	0.05
similar to Dehydrogenase/reductase SDR family member 7 precursor (Retinal short-chain dehydrogenase/reductase 4)	RGD1565002	1379420_at	-2.26	0.04
peroxisomal membrane protein 4	Pxmp4	1393421_at	-2.28	0.01
---	---	1380365_at	-2.52	0.00
peroxisomal membrane protein 4	Pxmp4	1383117_at	-3.75	0.01
pleckstrin homology domain containing, family H (with MyTH4 domain) member 1	Plekhh1	1395020_at	-4.71	0.05

Table 4 Genes in rat-mucosa that are modulated after three days oral treatment with 4 mg/kg b.wt CdCl₂.

Gene Title	Gene Symbol	Probe Set ID	Fold Change	p-value
family with sequence similarity 55, member B	Fam55b	1383833_at	17.38	0.039
metallothionein 2A	Mt2a	1388271_at	7.92	0.002
regenerating islet-derived 1 alpha	Reg1a	1368629_at	7.54	0.002
Similar to Hypothetical protein MGC75664	RGD1561551	1390691_at	7.39	0.011
3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2	Papss2	1395721_at	6.55	0.004
metallothionein 1a	Mt1a	1371237_a_at	4.53	0.001
3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2	Papss2	1376047_at	4.48	0.009
heme oxygenase (decycling) 1	Hmox1	1370080_at	4.17	0.003
---	---	1379739_at	4.07	0.049
cytochrome b reductase 1	Cybrd1	1377369_at	4.02	0.045
Forkhead box Q1	Foxq1	1385464_at	3.38	0.013
solute carrier family 37 (glycerol-3-phosphate transporter), member 2	Slc37a2	1377058_at	3.33	0.016
heat shock 70kD protein 1A /// heat shock 70kD protein 1B (mapped)	Hspa1a /// Hspa1b	1368247_at	3.15	0.002
tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13	Tnfsf13	1377353_a_at	3.00	0.037
serine peptidase inhibitor, Kazal type 4	Spink4	1393747_at	2.90	0.038
deleted in malignant brain tumors 1	Dmbt1	1368007_at	2.86	0.008
glutathione S-transferase, theta 3	Gstt3	1371942_at	2.82	0.016
---	---	1386695_at	2.80	0.027
regucalcin (senescence marker protein-30)	Rgn	1368627_at	2.76	0.013
B-cell CLL/lymphoma 6	Bcl6	1379368_at	2.63	0.017
HIV-1 tat interactive protein 2, homolog (human)	Htatip2	1390208_at	2.60	0.016
aldehyde dehydrogenase 7 family, member A1	Aldh7a1	1371567_at	2.56	0.000
solute carrier family 2 (facilitated glucose/fructose transporter), member 5	Slc2a5	1368460_at	2.54	0.014
aldo-keto reductase family 1, member C-like 1	Akr1c1	1394681_at	2.48	0.032
solute carrier family 30 (zinc transporter), member 2	Slc30a2	1378896_at	2.44	0.033
---	---	1381591_at	2.42	0.004
heat shock 70kD protein 1B (mapped)	Hspa1b	1370912_at	2.40	0.015
---	---	1382702_at	2.39	0.023
solute carrier family 30 (zinc transporter), member 2	Slc30a2	1398264_at	2.39	0.031
---	---	1379400_at	2.27	0.005
1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3	Agpat3	1382041_at	2.27	0.017
---	---	1383460_at	2.26	0.028
glutathione S-transferase Yc2 subunit	Yc2	1371089_at	2.24	0.040
forkhead box Q1	Foxq1	1368550_at	2.16	0.040
---	---	1372318_at	2.14	0.037
---	---	1377946_at	2.14	0.019
---	---	1381384_at	2.12	0.005
---	---	1380865_at	2.10	0.042
CD3 molecule, gamma polypeptide	Cd3g	1384787_at	2.06	0.033
putative GTP-binding protein	LOC293589	1372212_at	2.05	0.037
lactate dehydrogenase D	Ldhd	1382061_at	2.04	0.030
CD302 molecule	Cd302	1374061_at	2.04	0.005

similar to 9630058J23Rik protein	RGD1564833	1381390_at	2.04	0.005
cathepsin L1	Ctsl1	1370244_at	2.02	0.022
lactate dehydrogenase D	Ldhd	1376746_at	2.02	0.037
---	---	1384567_at	2.02	0.001

Genes with $-2 < FC < 2$ and/or $p\text{-values} > 0.05$ were excluded

v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian)	Ets1	1368851_at	-2.00	0.00
polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide K, 12.3 kDa	Polr3k	1398875_at	-2.01	0.00
Cd247 molecule	Cd247	1370621_at	-2.03	0.01
---	---	1376673_at	-2.04	0.01
Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 9	Serpinb9	1373672_at	-2.04	0.01
Cd53 molecule	Cd53	1368518_at	-2.05	0.03
acyl-CoA synthetase family member 3	Acsf3	1388969_at	-2.06	0.02
---	---	1377190_at	-2.06	0.02
histocompatibility 2, class II antigen E alpha	H2-Ea	1370883_at	-2.07	0.03
CD3 molecule, epsilon polypeptide	Cd3e	1379791_at	-2.08	0.01
ST6 beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltransferase 1	St6gal1	1370907_at	-2.11	0.01
CD3 molecule delta polypeptide	Cd3d	1387472_at	-2.17	0.01
RT1 class II, locus Db1	RT1-Db1	1370383_s_a t	-2.24	0.03
protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	Ptpcr	1390798_at	-2.27	0.01
RT1 class II, locus Ba	RT1-Ba	1370822_at	-2.32	0.02
chemokine (C-C motif) ligand 5	Ccl5	1369983_at	-2.34	0.02
RT1 class II, locus Db1	RT1-Db1	1370382_at	-2.90	0.04
serine peptidase inhibitor, Kazal type 3	Spink3	1368447_x_a t	-3.01	0.04
immunoglobulin heavy chain 6/similar to single chain Fv antibody fragment scFv 7-10A	Igh-6 /// LOC314509	1380366_at	-3.24	0.03
cytochrome P450 4F5	Cyp4f5	1388055_at	-4.22	0.03
phospholipase B	Phlfb	1370447_at	-8.52	0.01
fatty acid binding protein 6, ileal	Fabp6	1368697_at	-14.48	0.00

Table 5 Transcripts that are similarly regulated by two or three compounds.

$EE_2 \cap Cd\ 0.5$		$Cd\ 0.5 \cap Cd\ 4$		$EE_2 \cap Cd\ 4$		$EE_2 \cap Cd\ 0.5 \cap Cd\ 4$	
Probe set ID	Gene Symbol	Probe set ID	Gene Symbol	Probe set ID	Gene Symbol	Probe set ID	Gene Symbol
1383721_at	Fzd8	1370080_at	Hmox1	1390691_at	RGD1561551	1383833_at	Fam55b
1393260_at	LOC360228	1386695_at	---	1377058_at	Slc37a2	1395721_at	Papss2
1370885_at	Ctsz	1382702_at	---	1385464_at	Foxq1	1376047_at	Papss2
		1384787_at	Cd3g	1381591_at	---	1368629_at	Reg1a
				1394681_at	Akr1cl1	1379368_at	Bcl6
				1371237_a_at	Mt1a		

Figure legends

Fig. 1 129 genes are regulated in rat-mucosa after oral exposure with EE₂ or Cd (see Table 2-4). EE₂ modulated 21 known and 5 unknown transcripts. The sets of genes modulated by two of three compounds (unions) are depicted in Table 5.

Fig. 2 Relative mRNA expression of Mt2a expression after 3 days gavage (Cd 0.5 and 2 mg/kg b.wt, EE₂ 0.1 mg/kg b.wt). Mean values (fold induction) $\pm$ SD are given for n=7 animals per dose group; * (asterisk) marks values significantly different from the control (OVX) or as indicated by lines. $P < 0.05$

Fig. 3 Cd induces (a) Reg1a, (b) Papss2, (c) Akr1c1 and (d) Slc37a2 mRNA expression dose-dependently and similar to EE₂ after 3 days gavage (Cd 0.5 and 2 mg/kg b.wt, EE₂ 0.1 mg/kg b.wt). Mean values (fold induction) $\pm$ SD are given for n=7 animals per dose group; * (asterisk) marks values significantly different from the control (OVX) or as indicated by lines. $P < 0.05$

Fig. 4 (a) Bcl6, (b) Fam55b, (c) Fabp6, and (d) Il-33 mRNA expression is modulated by EE₂ and with a nonmonotonic dose-response by Cd after 3 days gavage (Cd 0.5 and 2 mg/kg b.wt, EE₂ 0.1 mg/kg b.wt). Mean values (fold induction) $\pm$ SD are given for n=7 animals per dose group; * (asterisk) marks values significantly different from the control (OVX) or as indicated by lines. $P < 0.05$

Figures

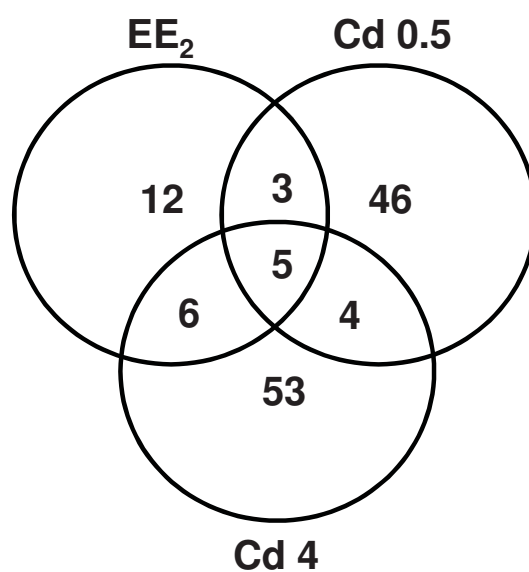


Fig. 1 129 genes are regulated in rat-mucosa after oral exposure with EE₂ or Cd (see Table 2-4). EE₂ modulated 21 known and 5 unknown transcripts. The sets of genes modulated by two of three compounds (unions) are depicted in Table 5.

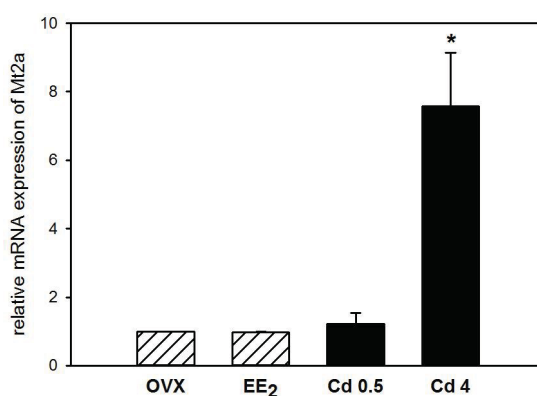


Fig. 2 Relative mRNA expression of Mt2a expression after 3 days gavage (Cd 0.5 and 2 mg/kg b.wt, EE₂ 0.1 mg/kg b.wt). Mean values (fold induction) $\pm$ SD are given for n=7 animals per dose group; * (asterisk) marks values significantly different from the control (OVX) or as indicated by lines. $P < 0.05$

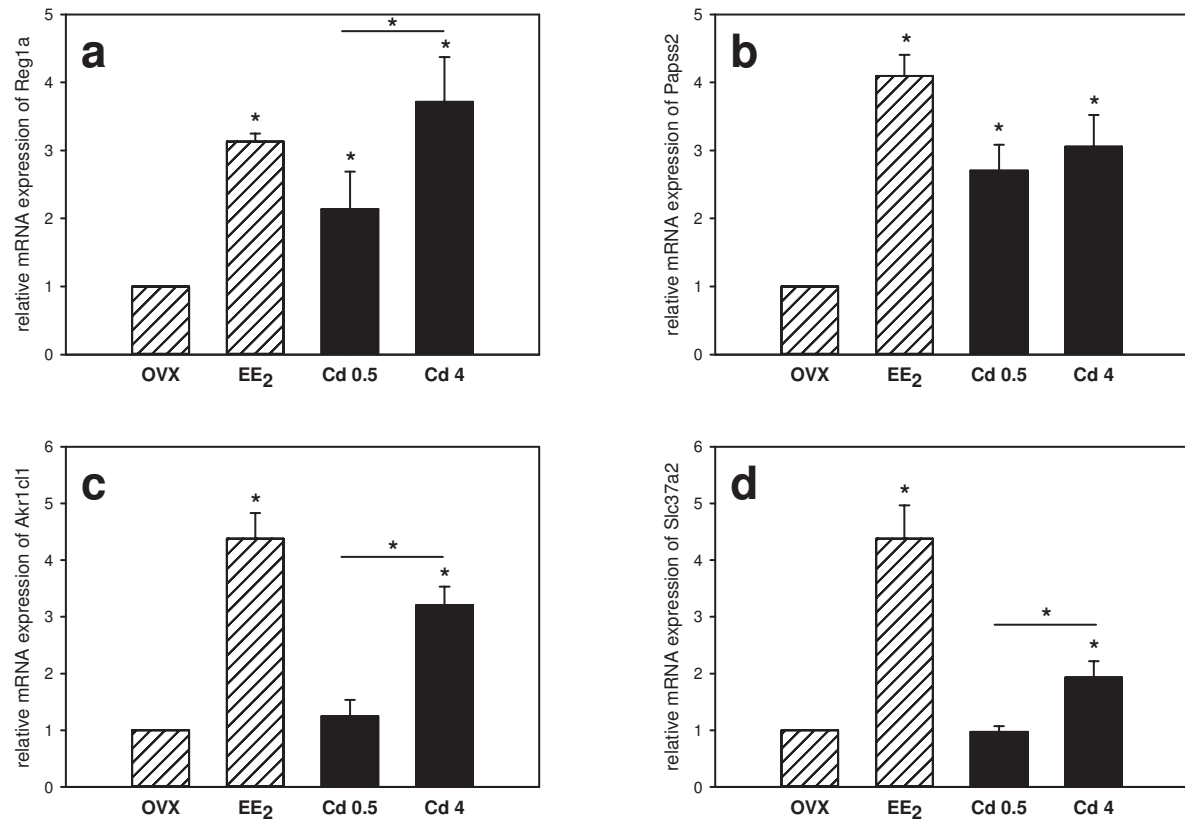


Fig. 3 Cd induces (a) Reg1a, (b) Papss2, (c) Akr1cl1 and (d) Slc37a2 mRNA expression dose-dependently and similar to EE₂ after 3 days gavage (Cd 0.5 and 2 mg/kg b.wt, EE₂ 0.1 mg/kg b.wt). Mean values (fold induction) $\pm$ SD are given for n=7 animals per dose group; * (asterisk) marks values significantly different from the control (OVX) or as indicated by lines. P < 0.05

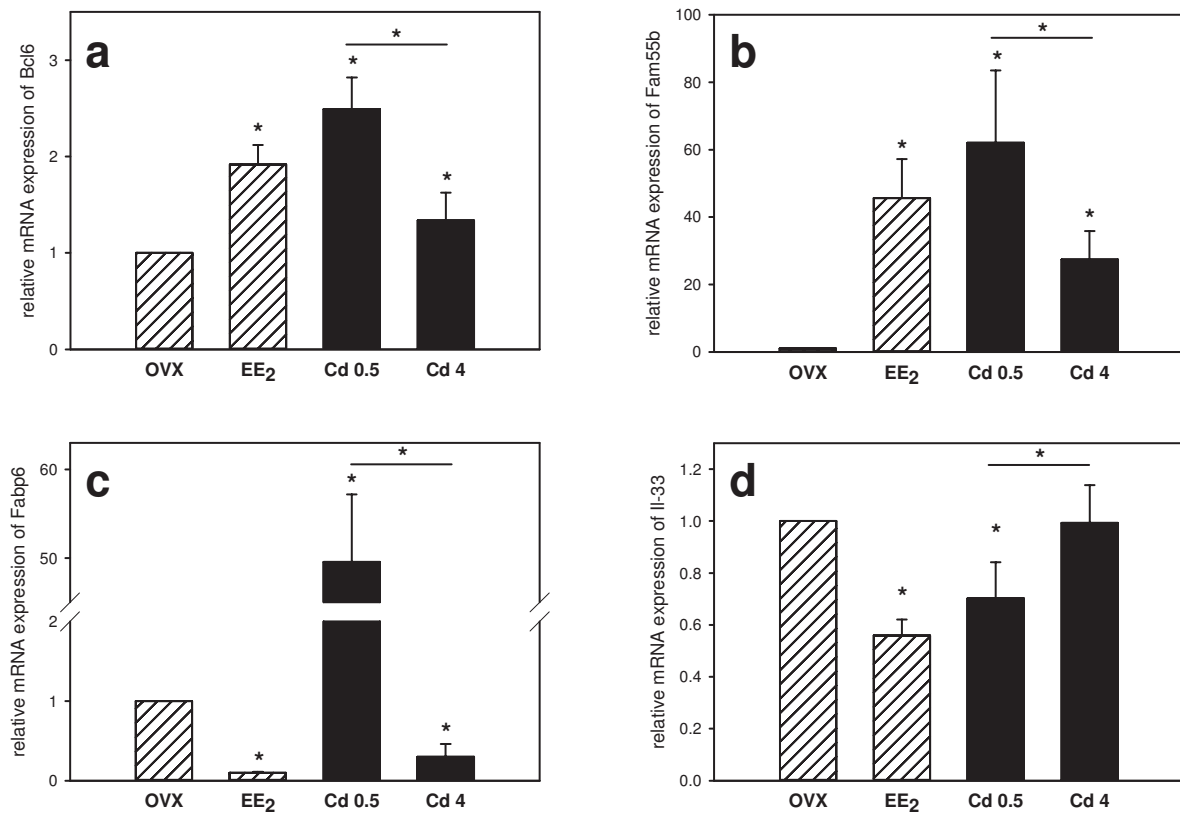


Fig. 4 (a) Bcl6, (b) Fam55b, (c) Fabp6, and (d) Il-33 mRNA expression is modulated by EE₂ and with a nonmonotonic dose-response by Cd after 3 days gavage (Cd 0.5 and 2 mg/kg b.wt, EE₂ 0.1 mg/kg b.wt). Mean values (fold induction) $\pm$ SD are given for n=7 animals per dose group; * (asterisk) marks values significantly different from the control (OVX) or as indicated by lines. P < 0.05

Supplementary material:

3 D graph of Principal Component Analysis

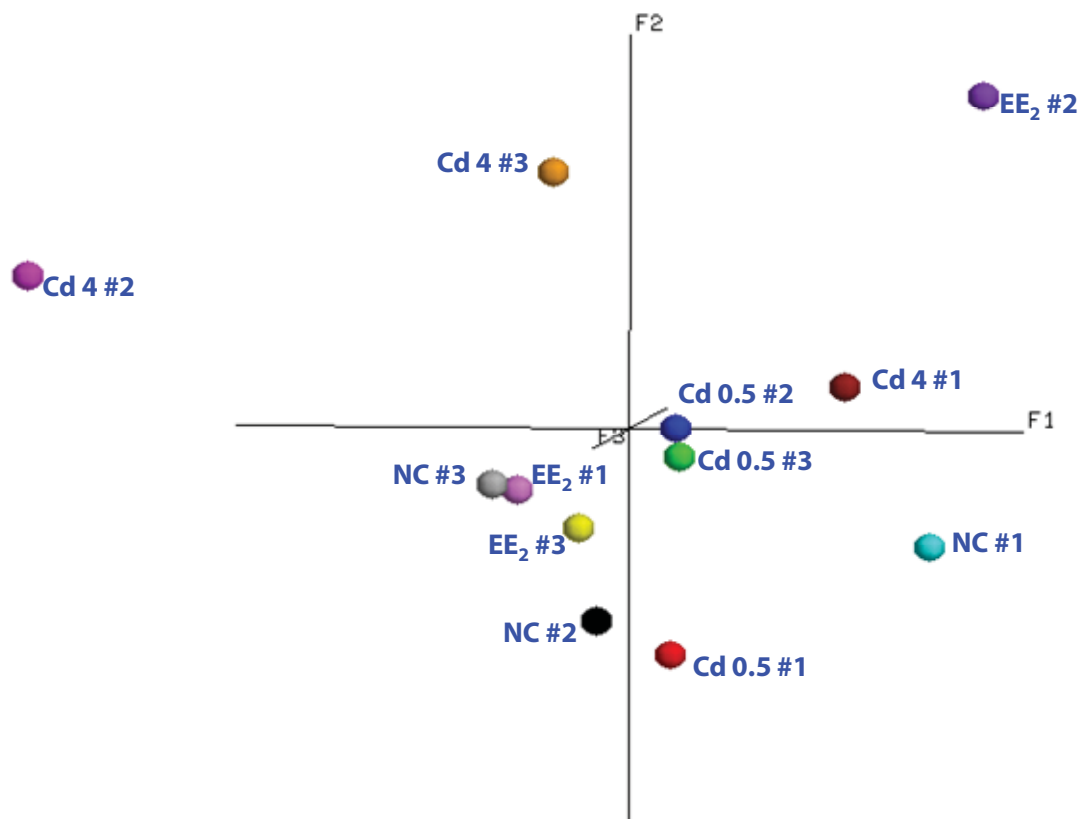


Fig 1 (supp.): Principal component analysis shows that the biological replicates are scattered.

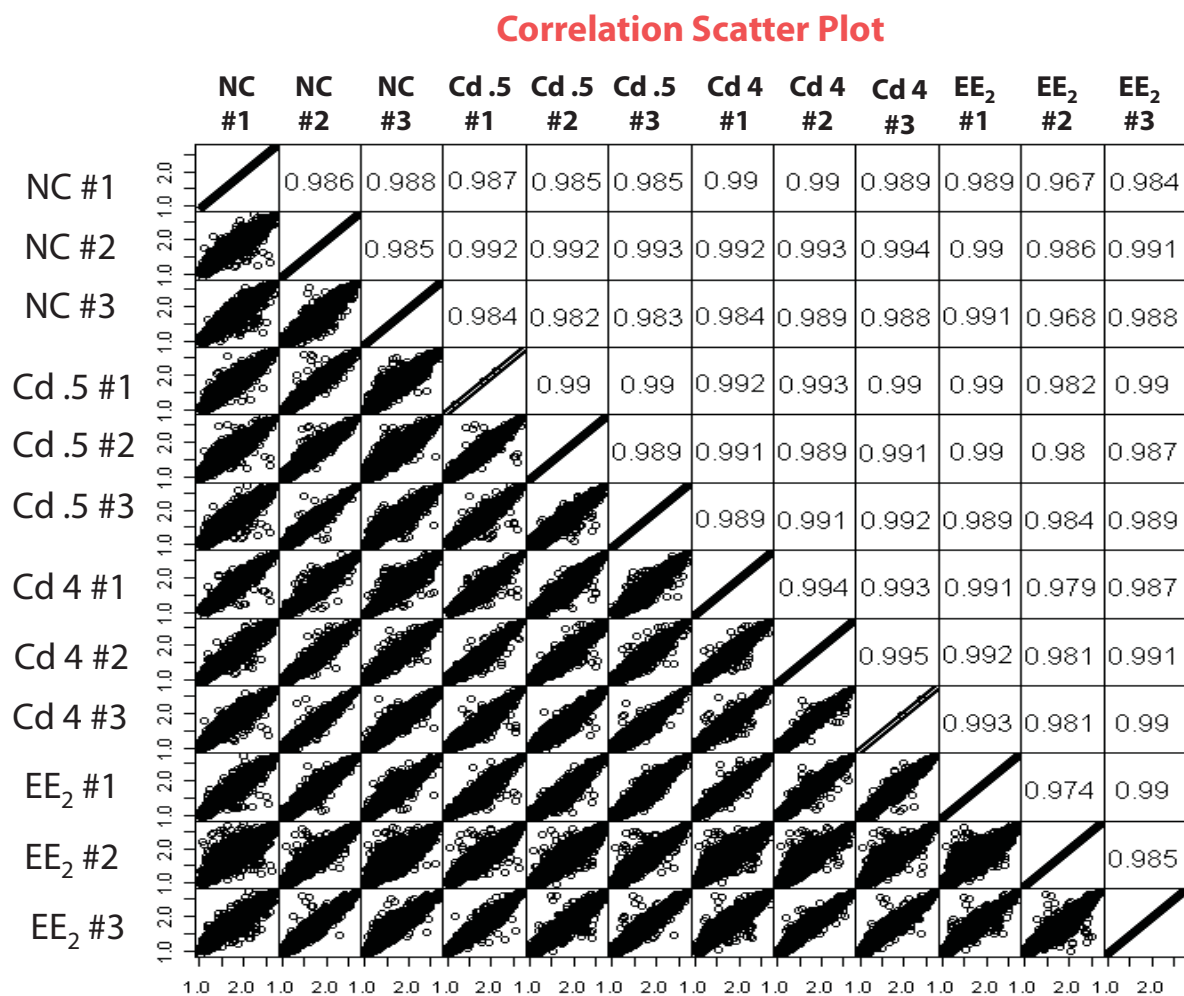


Fig 2 (supp.): Correlation on the transcriptional expression levels of the arrays shows a strong positive correlation.

3.2 Cadmium moduliert die östrogen-sensitive Genexpression im Uterus nach oraler Aufnahme

Bei den Tieren der Studie *The metallo hormone cadmium modulates AhR-associated gene expression in the small intestine of rats similar to ethinyl-estradiol* (siehe 2.4, ab Seite 56) wurde festgestellt, dass eine orale Behandlung mit 2 mg/kg KG CdCl₂ die Uterusfeuchtgewichtszunahme in ovariectomierten Wistar-Ratten beeinflusst: Das Uterusfeuchtgewicht der mit Cd und EE₂ behandelten Tiere war geringer als bei den allein mit EE₂ behandelten Tieren. Darüber hinaus führte eine Behandlung mit Cd alleine zu keiner Modulation des Uterusfeuchtgewichtes (siehe 3.7A). In unveröffentlichten Daten von Höfer *et al.* zeigte sich ebenfalls, dass eine Behandlung mit 2 mg/kg KG CdCl₂ zu keiner signifikanten Änderung der C3-mRNA-Expression führte – im Gegensatz zu geringeren (0.5 mg/kg KG) und höheren (4 mg/kg KG) Dosen (Höfer *et al.*, 2009). Dies führte zu der Hypothese, dass Cd eventuell die östrogen-induzierte Signaltransduktion nicht nur nachahmen kann, sondern in bestimmten Gewebekonzentrationen eventuell auch hemmt (wie auch in der Einleitung ausführlich dargestellt). Ein potentiell antiöstrogener Effekt (eine Herunterregulierung von C3-mRNA) von Cd wurde in Rattenuterus bei einer Gabe von < 0.05 mg/kg KG CdCl₂ i. p. beobachtet (Höfer *et al.*, 2009). Weiterhin führten geringe Dosen von Cd (5 µg/kg KG s.c.) zu einer geringeren Luziferaseaktivität in verschiedenen Geweben von ERE-luc-Mäusen (Ali *et al.*, 2010). *In vitro* sind ebenfalls antiöstrogene Effekte beobachtet worden (Fechner *et al.*, 2011; Guével *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2006; Vetillard, 2005).

Basierend auf diesen Beobachtungen wurde der Uterus der in Publikation 2.4 beschriebenen Tiere molekularbiologisch untersucht. Die mRNA-Expression des östrogen-sensitiven Gens C3 und die neu identifizierten östrogen-sensitiven Gene Ahr und Gsta2 (Kluxen *et al.*, 2012; Kretzschmar *et al.*, 2010) wurden bestimmt.

3.2.1 Ergebnisse

Aus dem Versuch ergeben sich drei wichtige Erkenntnisse. Erstens kann zum ersten Mal gezeigt werden, dass Östrogene und Cd nach oraler Applikation AhR-assoziierte Genexpression (Ahr und Gsta2) modulieren. Zweitens antagonisiert Cd die östrogen-induzierte Expression des klassischen, östrogen-sensitiven Gens C3 und beeinflusst auch die östrogen-induzierte Modulation Ahr-assoziiierter Gene.

C3 ist ein etablierter, molekularer Marker für Östrogenität (Hertrampf *et al.*, 2006) und wurde erwartungsgemäß von EE₂ induziert (Abb. 3.7B). Auch Cd kann eine C3-mRNA-Expression dosisabhängig (Höfer *et al.*, 2009) und ER-vermittelt induzieren (Johnson *et al.*, 2003; Kluxen *et al.*, 2012). Eine Dosis von 2 mg/kg KG CdCl₂ scheint allerdings keine Wirksamkeit zu haben. In Kombination mit EE₂ kommt es zu keiner Induktion von C3 bzw. wird eine EE₂-vermittelte C3-Induktion von Cd antagonisiert.

Um zu bestimmen, ob dieser antiöstrogene Effekt auch bei neu identifizierten, östrogen-sensitiven Genen, die dem AhR-Signaltransduktionsweg zugeordnet werden, auftritt, wurde die Expression von Ahr und Gsta2 untersucht (Abb. 3.7C,D). Es zeigt sich, dass EE₂ die Expression von Ahr-mRNA, wie zuvor beschrieben (Kluxen *et al.*, 2012; Kretzschmar *et al.*, 2010) herunterreguliert. Die dreimalige, perorale 2 mg/kg KG CdCl₂-Dosis scheint Ahr und Gsta2 genau so im Uterus zu modulieren, wie eine 2 mg/kg KG CdCl₂ via i.p.-Injektion (Kluxen *et al.*, 2012). Eine orale Gabe von Cd führt allerdings zu einer Herunterregulation

von Gsta2 – im Gegensatz zu einer i. p.-Injektion, welche zu einer östrogen-ähnlichen Zunahme von Gsta2 mRNA führt (Kluxen et al., 2012).

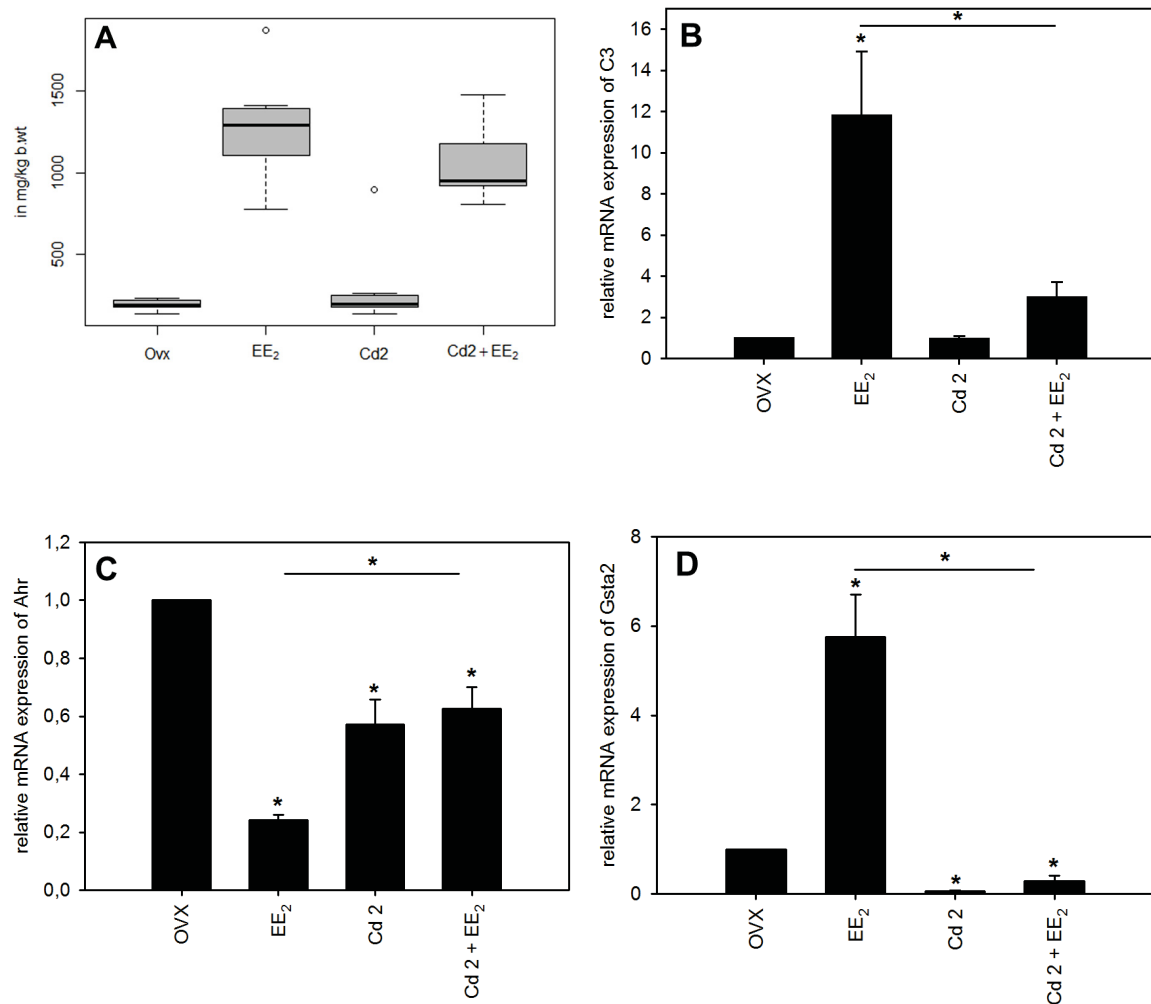


Abb. 3.7: Cd moduliert die EE₂-induzierte Modulation des Uterusfeuchtgewichts (A) und die relative mRNA Expression von (B) Complement c3, (C) Ahr und (D) Gsta2 in Rattenuterus. Analysen nach 3 Tagen oraler Behandlung mit 0.1 mg/kg b.wt EE₂, 2 mg/kg KG CdCl₂ oder beidem. * Werte, die sich signifikant ($P \leq 0.05$) von OVX-Kontrolle oder den mit Linien gekennzeichneten Gruppen unterscheiden.

3.3 Wirkung von Cd in intakten weiblichen Wistar-Ratten

Im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation wurde ein Tierversuch zur Untersuchung der Auswirkung geringer, sub-chronischen Dosen CdCl_2 auf physiologische Marker intakter, weiblicher Ratten durchgeführt und eine Masterarbeit (Krüger, 2012) mit dem Thema “Cadmium-induzierte Modulation molekularbiologischer Marker für Östrogenität und Gewebekomöostase in intakten weiblichen Ratten” vergeben und betreut. Die zu bearbeitende Fragestellung und ein Auszug der wichtigsten Ergebnisse sind hier dargestellt.

Moduliert die sub-chronische Gabe geringer Dosen Cd die Darmhomöostase im intakten Tier?

Kann Cd die Wirkung endogener Östrogene beeinflussen – werden östrogen-sensitive Endpunkte moduliert?

3.3.1 Ergebnisse Uterus

Da bei dem hier durchgeführten Experiment nicht-zyklussynchronisierte Tiere verwendet wurden, waren bei der histologischen Untersuchung des Uterus keine Unterschiede zu erwarten, sondern normalverteilte Werte der Uterusfeuchtgewichte in allen Gruppen. Nach der viermaligen Gabe von CdCl_2 i.p. zeigt sich eine deutliche Verteilungsabnahme der Uterusfeuchtgewichte der Cd-behandelten Tiere (Abb. 3.8, auf Seite 94). Auch die Vaginalepitheldicke als sensibler Marker für Östrogenität (Diel et al., 2002) wurde untersucht. Es zeigt sich das gleiche Muster wie auch beim Uterusfeuchtgewicht – die Verteilung der Vaginalepitheldicke der Cd-behandelten Tiere ist deutlich geringer als die der Kontrolltiere.

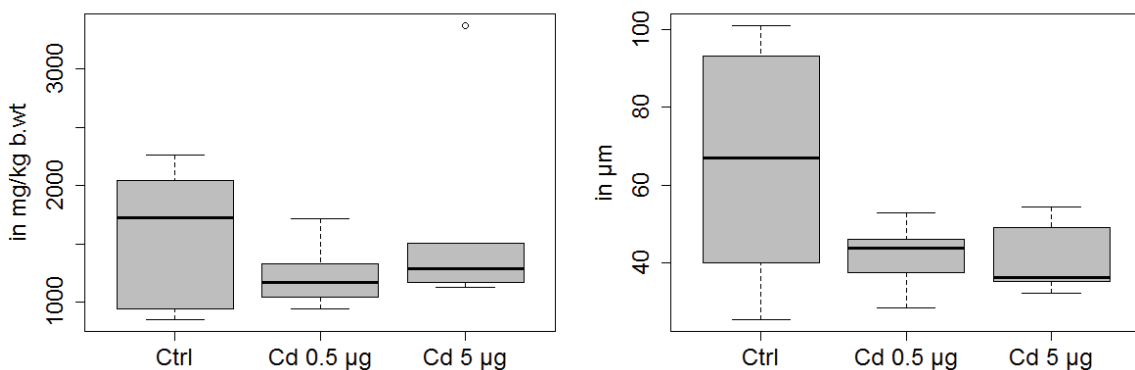


Abb. 3.8: Das relative Uterusfeuchtgewicht (Abb. links) und die Vaginalepithelhöhe (Abb. rechts) nach viermaliger Applikation von 0.5 oder 5 µg Cd in intakten, nicht-zyklussynchronisierter Wistar-Weibchen zeigen eine deutliche Abnahme der intraindividuellen Verteilung.

3.3.2 Ergebnisse Darm

Im Wesentlichen zeigen sich zwei Ergebnisse: erstens scheinen auch geringe Cd-Dosen die Genexpression in Dünndarm und Kolon nach i. p.-Injektion zu beeinflussen. Zweitens moduliert

Cd die Darmhomöostase.

Cd induziert die Expression von Pcn-mRNA und -Protein in Dünndarmmukosa dosisabhängig (siehe Abbildung 3.9 auf Seite 96). Im Kolon zeigte sich ebenfalls eine Modulation der Proliferation – allerdings interessanterweise mit umgekehrtem Muster: Cd reprimiert dosisabhängig die Expression von Pcn-mRNA und -Protein (siehe Abbildung 3.10 auf Seite 97).

Als Apoptosemarker wurden aktivierte Caspase 3 im Dünndarm und M30 im Kolon untersucht. Während Cd im Dünndarm aktivierte Caspase 3 dosisabhängig induzierte, kam es zu keiner Modulation vom M30 im Kolon (siehe Abbildung 3.11 auf Seite 98).

Gleichzeitig werden im Dünndarm Gene verstärkt exprimiert, die mit einer Tumorphysion assoziiert sind (*i.e.* Ps2 und Reg1a). Im Kolon wird die Expression dieser Gene allerdings herunterreguliert. In der Masterarbeit wird aufgrund verschiedener Beobachtungen in der Literatur die Hypothese formuliert, dass die geringere Modulation der beobachteten Marker im Kolon mit einer geringeren Cd-Gewebekonzentration zusammenhängen könnte (Krüger, 2012).

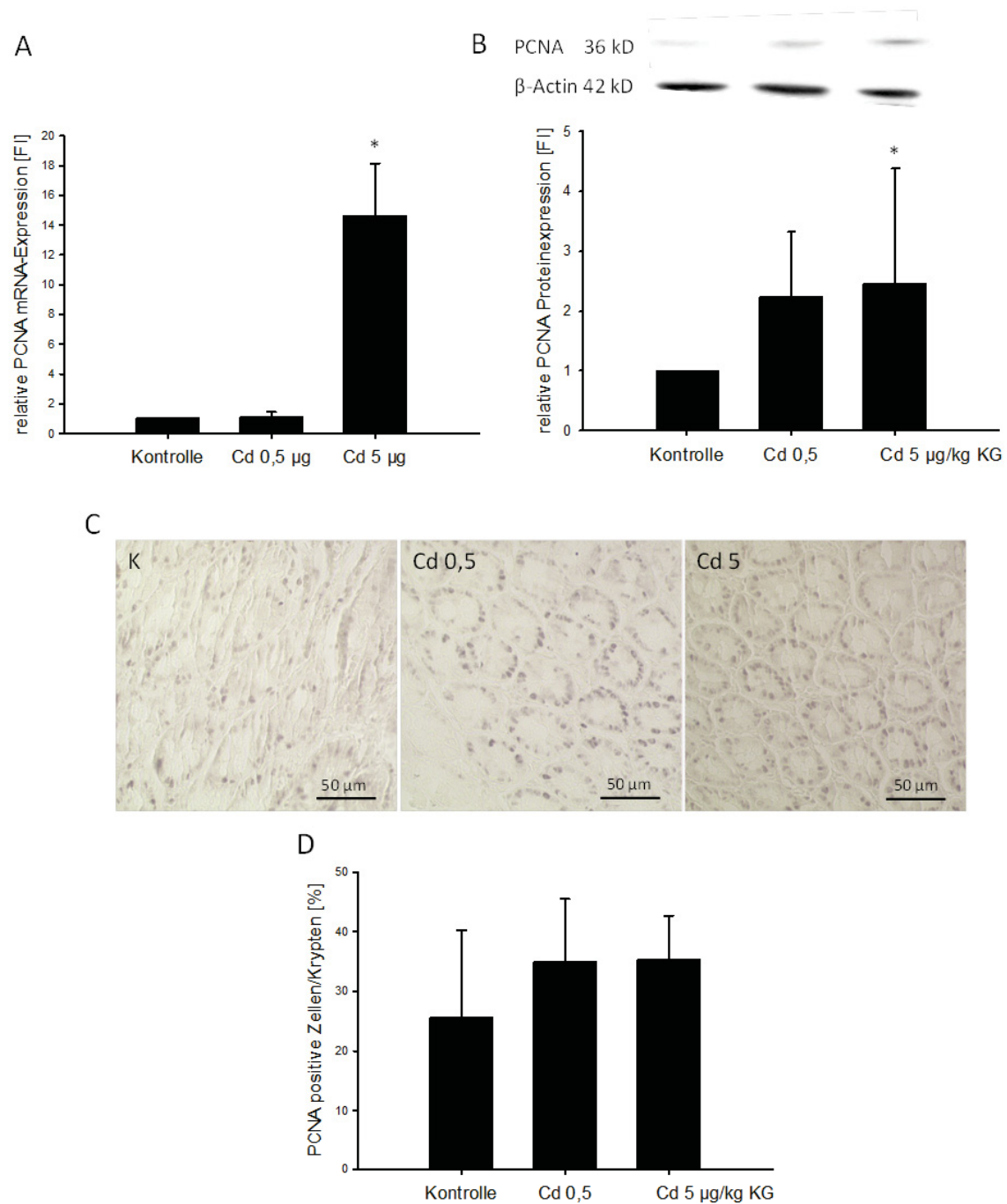


Abb. 3.9: Der Proliferationsmarker PCNA wird in **Dünndarm** intakter weiblicher Wistar-Ratten nach viermaliger i.p.-Injektion von CdCl_2 dosisabhängig induziert – (A) Relative mRNA-Expression (FI) und (B) densitometrische Auswertung der Proteinexpression, dargestellt relative Proteinexpression (FI) von PCNA. Kontrolle = 1. (C) Repräsentative Aufnahmen (20x) der DAB-Färbung von PCNA im Dünndarm (K = Kontrolle; Cd 0,5 = 0,5 µg Cd/kg KG; Cd 5 = 5 µg Cd/kg KG), (D) Auswertung der PCNA positiv gefärbten Zellen/Krypten (%) nach der IHC. Pro Tier wurden jeweils 20 Krypten ausgewertet. *= signifikant ($p \leq 0.05$) gegen Kontrolle

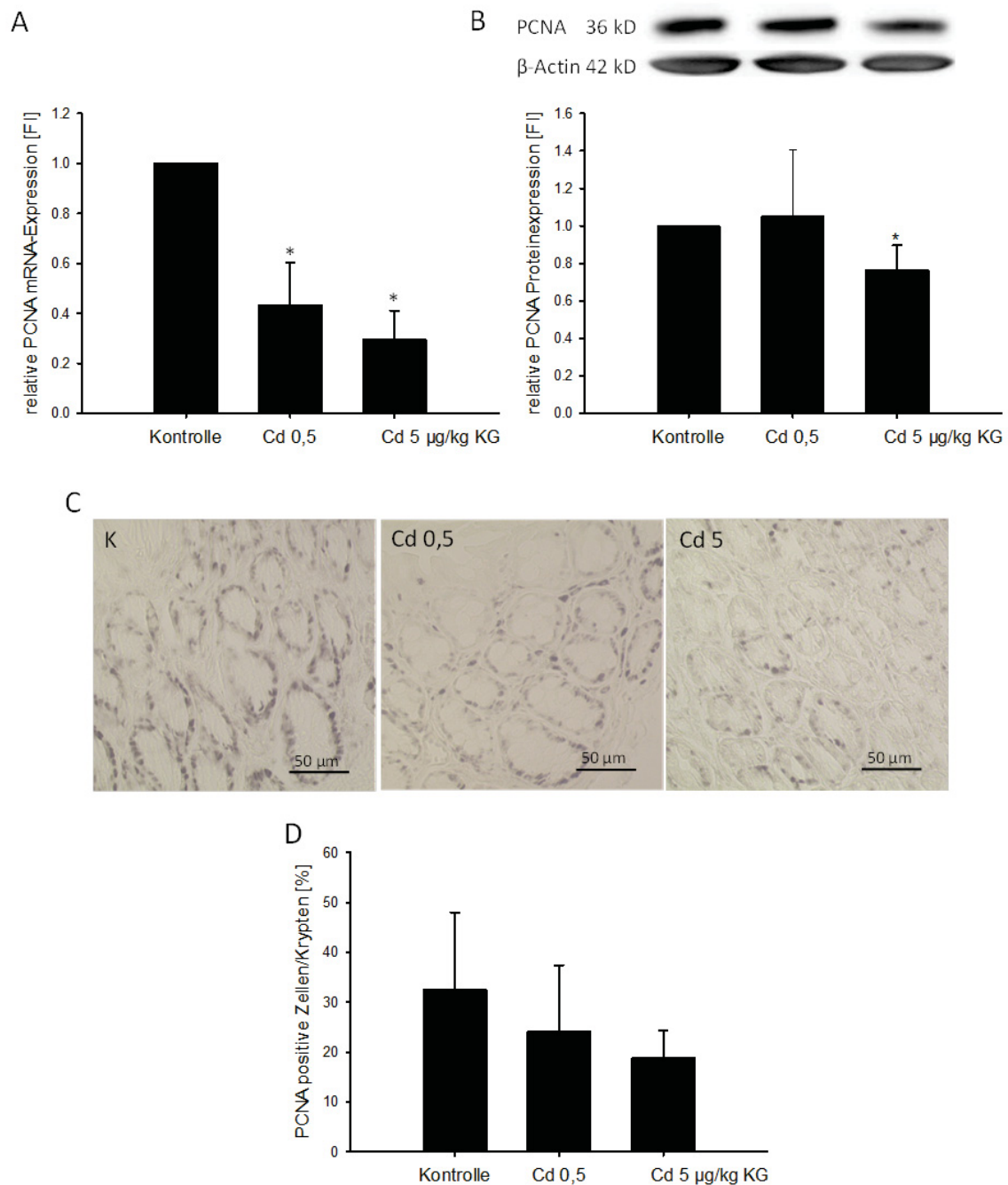


Abb. 3.10: Der Proliferationsmarker PCNA wird in **Kolon** intakter weiblicher Wistar Ratten nach viermaliger i.p.-Injektion von CdCl_2 dosisabhängig reprimiert — (A) Relative mRNA-Expression (FI) und (B) densitometrische Auswertung der Proteinexpression, dargestellt als relative Proteinexpression (FI) von PCNA. Kontrolle = 1. (C) Repräsentative Aufnahmen (20x) der DAB-Färbung von PCNA im Kolon (K = Kontrolle; Cd 0,5 = 0,5 µg Cd/kg KG; Cd 5 = 5 µg Cd/kg KG), (D) Auswertung der PCNA positiv gefärbten Zellen/Krypten (%) nach der IHC. Pro Tier wurden jeweils 20 Krypten ausgewertet. * = signifikant ($p \leq 0.05$) gegen Kontrolle

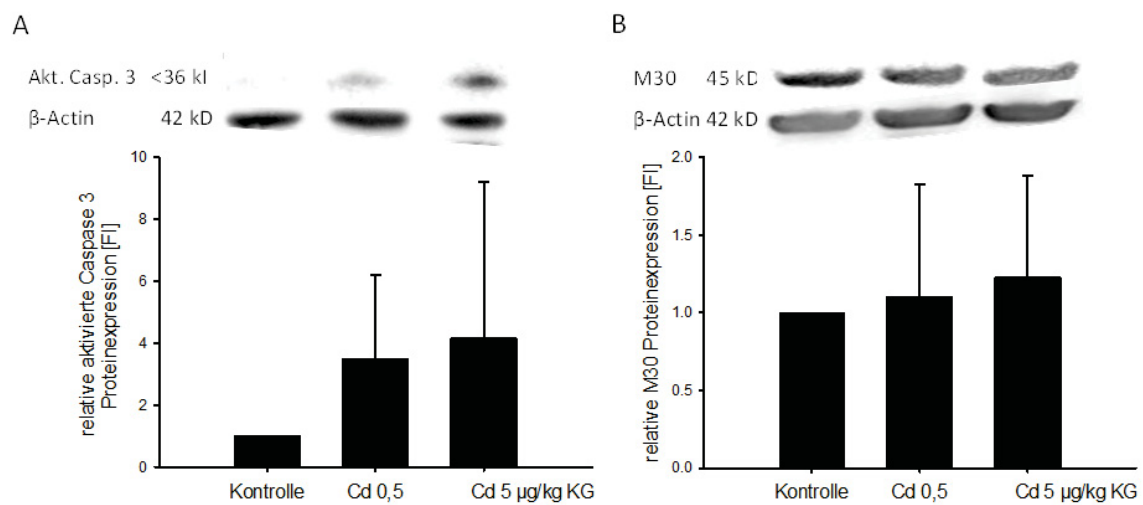


Abb. 3.11: Der Apoptosemarker (A) Caspase 3 wird in Dünndarm intakter weiblicher Wistar Ratten nach viermaliger i.p.-Injektion von CdCl_2 dosisabhängig induziert. (B) Die Expression des Apoptosemarkers M30 in Kolon wird durch eine Behandlung mit Cd nicht moduliert – densitometrische Auswertung der Proteinexpression, dargestellt als relative Proteinexpression (FI). Kontrolle = 1. (K = Kontrolle; Cd 0,5 = 0,5 μ g Cd/kg KG; Cd 5 = 5 μ g Cd/kg KG)

3.4 ER-Beta Expression in der immortalisierten Darmzelllinie HCEC

Wie unter 1.3.1 auf Seite 14 dargestellt, sind die bisherigen Untersuchungen zu der östrogenen Aktivität von Cd *in vitro* fast ausschließlich in vorwiegend ER-Alpha exprimierenden Zelllinien durchgeführt worden. Um die östrogene Aktivität von Cd in Darmgewebe mechanistisch genauer zu untersuchen, ist es allerdings erforderlich, natürlich ER-Beta exprimierende Zellen zu verwenden.

Human colon epithelial cells (HCEC) wurden mit 0.01 μ M E₂, DMSO-Kontrolle (0.1%, DMSO) oder nicht behandelt (Ko). Nach 5 Tagen wurde die ER-Beta-Protein Expression mittels Western Blot bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.12 dargestellt.

Einerseits konnte generell eine ER-Beta-Protein Expression festgestellt werden. Eine Behandlung mit E₂ führt aber darüberhinaus zu einer Herunterregulation der ER-Beta-Protein Expression, was darauf hindeutet, dass der ER-Beta auch funktionell aktiv ist. Im Darm ovariectomierter Wistar-Ratten führt eine Behandlung mit Östrogen (EE₂) ebenfalls zu einer Herunterregulation der ER-Beta-Protein Expression.

Ein großes Problem für mechanistische Untersuchungen der ER-Beta-Signaltransduktion scheint die verringerte Expression von ER-Beta oder eine nicht funktionelle Expression von ER-Beta in (Darm-)Krebszelllinien darzustellen (Zhao et al., 2010). Deshalb war von Interesse, wie die ER-Beta Expression in HCEC im Vergleich mit Krebszelllinien aussieht, die in unserem Labor verwendet werden. Wie in 2.4 beschrieben, gibt es unterschiedliche Berichte über die ER-Beta Expression von Darmkrebszelllinien.

In Abbildung 3.13a ist die Koexpression von ER-Alpha- und ER-Beta-mRNA dargestellt. Die HT-29 (P29–P35) Dickdarmkrebszellen exprimieren überraschenderweise nur ER-Alpha-mRNA, ähnlich wie die Brustkrebszelllinie MCF-7, die als positiv Kontrolle diente. HCEC scheinen genau wie auch die Dickdarmkrebszelllinie Caco-2 nur ER-Beta-mRNA zu exprimieren. Für Caco-2 Zellen wurde eine ER-Beta-mRNA- und Protein Expression zwar schon früher berichtet (Campbell-Thompson et al., 2001), aber es gibt auch eine Studie die keine ER-Beta-mRNA-Expression nachweisen konnte (Paruthiyil et al., 2009).

In Abbildung 3.13b ist die Expression von ER-Beta-Protein in HCEC und verschiedenen Dickdarmkrebszelllinien dargestellt. HCEC zeigten die stärkste Expression von ER-Beta-Protein (bei Einsatz gleicher Mengen Gesamtprotein) im Vergleich mit den anderen Darmkrebszellen. Allerdings exprimierten auch HCT-116 und etwas geringer auch Caco-2 ER-Beta-Protein.

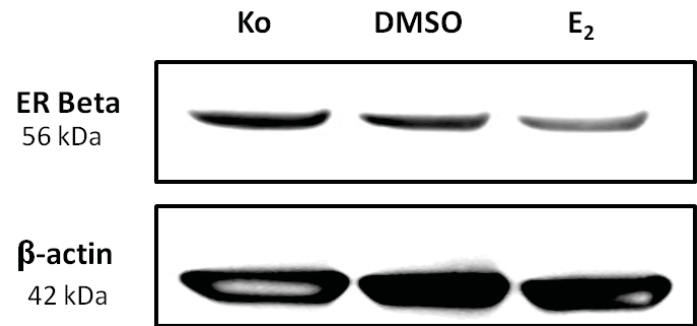


Abb. 3.12: ER-Beta-Protein Expression in HCEC nach 5 Tagen Behandlung mit H₂O, DMSO-Kontrolle oder 17beta-Östradiol (E₂, 10⁻⁸ M in 0.1% DMSO)

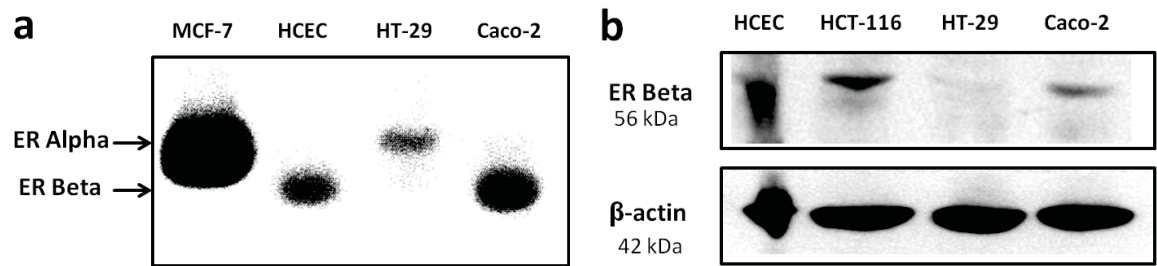


Abb. 3.13: ER-Alpha- und ER-Beta-mRNA in MCF-7, HCEC, HT-29 und Caco-2 (a) und ER-Beta-Protein-Expression in HCEC, HCT-116, HT-29 und Caco-2 nach 5 Tagen Behandlung mit DMSO-Kontrolle oder 17beta-Östradiol (E₂, 10⁻⁸ M in 0.1% DMSO)

4 Diskussion

Die zunehmende Exposition gegenüber biopersistenten Umweltschadstoffen wie Cd ist besorgniserregend. Wie einleitend dargestellt, zeigte sich zunächst in *in vitro*- und später in *in vivo*-Studien, dass Cd eine östrogene Wirkung zeigt oder mit der endogenen östrogenen Signaltransduktion interagieren kann. Da Östrogene eine Vielzahl von physiologischen und pathologischen Zuständen im Körper modulieren und Hormone in sehr niedrigen Dosen wirken, könnte sich z. B. die Frage stellen, ob die hormonartigen Effekte von Cd bei der Risikobewertung der Chemikalie berücksichtigt werden sollten.

4.1 Wesentliche Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, die potentiell östrogenartige Wirkung von Cd genauer zu charakterisieren. Es wurde untersucht, ob die östrogene Wirkung von Cd ER-vermittelt ist – denn es gibt widersprüchliche Daten in der Literatur. Daneben wurde untersucht, ob Cd auch im hoch-exponierten, nicht-klassischen östrogenen Zielgewebe Darm östrogene Wirkungen zeigt. Da Östrogene auch mit anderen nuklearen Rezeptoren interagieren, stellte sich die Frage, ob Cd und Östrogene diesen *Crosstalk* über den gleichen Mechanismus modulieren. Aus diesen Untersuchungen sind vier Veröffentlichungen entstanden, die in Kapitel 2 ab Seite 20 dargestellt worden sind.

Untersuchungen mit bisher unveröffentlichten Ergebnissen finden sich in Kapitel 3 ab Seite 69. Hier wurde mittels Microarray-Analyse die Wirkung von Cd mit der von EE₂ in duodenaler Mucosa verglichen. Die Wirkung von Cd vor dem Hintergrund körpereigener Östrogene wurde in ovariectomierten und intakten Tieren untersucht (siehe 2.4 ab Seite 56). Nachfolgend sind die wesentlichen Ergebnisse, die aus meinen Untersuchungen hervorgegangen sind, aufgeführt.

- Cd-induzierte östrogene Wirkung im Uterus ist ER-vermittelt
- Cd-induzierter *Crosstalk* im Uterus wird ebenfalls ER-vermittelt
- Cd moduliert östrogen-sensitive Parameter und den *Crosstalk* mit dem AhR im Darm vermutlich über ER-unabhängige Mechanismen
- Cd kann die Wirkung von Östrogenen im Uterus und im Darm hemmen bzw. ihre Wirkung auf transkriptioneller Ebene stören
- Cd moduliert bereits in niedrigen Dosen die Darmhomöostase in intakten Tieren

4.2 Interaktion von Endokrinen Disruptoren mit östrogenen Signaltransduktion

Wie in Abschnitt 1.2 ab Seite 7 dargestellt, üben Östrogene eine Vielzahl an biologischen Wirkungen aus. Auf der einen Seite gibt es viele östrogen-sensitive Gewebe (siehe 1.2.1).

Auf der anderen Seite ist der molekularbiologische Mechanismus östrogenen Wirkungen sehr komplex (vgl. 1.2.2 bis 1.2.3 ab Seite 8):

1. Die Gewebe- und Serumkonzentration von Östrogenen, und somit auch ihre biologische Wirkung, wird über die HHG-Achse gesteuert.
2. Es gibt zwei ER-Sybtypen, die gewebeabhängige Expressionsmuster zeigen und ihre Wirkung gegenseitig beeinflussen können.
3. Es gibt eine liganden-abhängige und eine liganden-unabhängige Aktivierung der ER.
4. Die Gewebeantwort einer Rezeptoraktivierung ist von den im Gewebe exprimierten ER-Kofaktoren abhängig.
5. Es gibt einen *Crosstalk* zwischen verschiedenen NR.

Es ist theoretisch möglich, dass all diese Mechanismen von potentiellen Endokrinen Disruptoren wie Cd moduliert werden – erste Hinweise dafür gibt es tatsächlich für alle aufgezählten Punkte in der Literatur. Darüberhinaus kann man über weitere Mechanismen spekulieren, die sich aus der physiologischen Situation ergeben.

Die Komplexität der Interaktion von Cd mit östrogenen Signaltransduktionswegen soll durch folgendes Beispiel verdeutlicht werden. In meinen Untersuchungen fiel auf, dass nicht nur Cd, sondern auch Östrogene die Expression von Metallothioneinen (MT) beeinflussen. MT sind zur Aufrechterhaltung der Zinkhomöostase notwendig. Ihre Expression wird direkt durch Zink induziert. Allerdings können auch Zn-ähnliche Metallionen oder oxidativer Stress an MT gebundenes Zn verdrängen und so MT indirekt induzieren. Freies Zn bindet an einen Transkriptionsfaktor, den *metal-responsive transcription factor* (MTF)-1, der über ein *metal response element* (MRE) die Expression von MT steuert (Günther et al., 2012). MT können deshalb als Marker für eine Cd-Exposition verwendet werden – Cd wird an Thiolgruppen gebunden und so entgiftet.

Im Uterus führt eine Behandlung mit E₂ zu einer (ER-vermittelten) Herunterregulation von MT-mRNA (siehe Veröffentlichung 2.3 ab Seite 44). Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass der ER Kofaktoren rekrutiert, die dann bei der Basaltranskription von MT-mRNA durch den MTF-1 fehlen (e.g. Sp-1 oder p300). Hierfür spricht, dass bereits eine inverse Korrelation von MT-Expression und ER-Alpha-Expression detektiert worden ist (Ioachim et al., 2000). Allerdings ist auch noch eine andere Art der Interaktion möglich: Da der ER ein Zinkfingerprotein ist, ist zur Aufrechterhaltung der Transkriptionsaktivität des ER eine gewisse Zinkkonzentration notwendig, welche von MT moduliert wird. Cano-Gucci et al. zeigten, dass Thioneine die Bindung von ER *in situ* an ERE verhindert (1996). Es ist nicht untersucht, ob eine Cd-induzierte Expression von MT die Aktivität des ER moduliert – was aber durchaus möglich wäre.

4.2.1 Wirkmechanismus des Metalloöstrogens Cadmium: Arbeitshypothese

Die bisher veröffentlichten Ergebnisse in der Literatur zusammen mit den in dieser Dissertation gezeigten Befunden weisen darauf hin, dass Cd im Uterus wie ein reiner Agonist am ER-Alpha wirken kann. Dabei bindet Cd anders an den Rezeptor als klassische Liganden, was zu “nicht-intuitiven” Kombinationseffekten führt.

Die Interaktion von Cd mit dem ER-Beta ist nicht abschließend geklärt – östrogene Wirkungen im Darm werden zwar beobachtet, können aber nicht eindeutig der ER-Beta-vermittelten Signaltransduktion zugeordnet werden.

4.3 ER-Alpha-vermittelte östrogene Wirkung von Cadmium

In meinen Untersuchungen habe ich mich hauptsächlich für eine direkte Interaktion von Cd mit dem ER interessiert und die anderen potentiellen Interaktionen als Diskussionsgrundlage verwendet. Auch ein *Crosstalk* von ER mit einem anderen nukleären Rezeptor, dem AhR, wurde näher untersucht. Allerdings wurde auch hier *a priori* von einer möglichen direkten Interaktion von Cd mit dem ER ausgegangen (Siehe Veröffentlichungen 2.3 und 2.4 auf den Seiten 44–56).

In Veröffentlichung 2.3 ist dargestellt, dass die dosisabhängige, Cd-induzierte C3-mRNA- und PR-Protein-Expression mittels einem Antiöstrogen antagonisiert werden kann. Zusätzlich verstärkt eine Kobehandlung mit Cd die E₂-induzierte Expression der Parameter. Dies ist ein guter Hinweis darauf, dass Cd im Rattenuterus (ein hauptsächlich ER-Alpha exprimierendes Gewebe) am ER(-Alpha) eine agonistische Wirkung nachahmen kann. Interessanterweise gilt das auch für den *Crosstalk* von ER und AhR: Cyp1a1 das prototypische Zielgen des AhR wird vermutlich via *tethering* mit dem ER herunterreguliert (siehe Abb. 4.1).

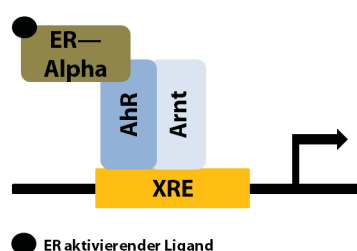


Abb. 4.1: Modulation der AhR-Signaltransduktion durch aktivierten ER-Alpha (*tethering*) nach Matthews and Gustafsson 2006

4.3.1 Wirkmechanismus der agonistischen Wirkung Cadmiums

Wie in Kapitel 1.3.1 ab Seite 14 schon ausführlich dargestellt, gibt es deutliche Hinweise darauf, dass Cd an den ER-Alpha binden und ihn auch aktivieren kann. Zwar ist der genaue Wirkmechanismus nicht aufgeklärt, aber Cd kann direkt mit Thiolen der Aminosäuren des Rezeptors (so wie z.B. mit denen in MTs) interagieren. Über diesen Mechanismus wäre es möglich, dass der Rezeptor in eine aktive Konformation umgeformt wird. Bisher ist nicht abschließend geklärt, welche Aminosäuren des Rezeptors an der Interaktion beteiligt sind. Je nach eingesetztem Modell sind unterschiedliche Ergebnisse publiziert worden.

Stoica *et al.* haben COS-1-Zellen mit verschiedenen ER-Alpha-Mutanten transfiziert. Diese Zellen wurden dann mit ¹⁰⁹CdCl₂ und/oder [³H]E₂ inkubiert. Aus der nachfolgend in den Zellen gemessenen Radioaktivität wurde die Bindung von Cd an die entsprechenden ER-Alpha-Mutanten abgeleitet. Aus den Ergebnissen schließen die Autoren, dass die Aminosäuren E523, H524 und D538 sowohl an der Bindung von Cd als auch der Induktion der Aktivität des Rezeptors durch Cd beteiligt sind, weil diese vermutlich in der Nähe eines Liganden in der

LBD liegen (Helices 11 und 12). Dagegen bewirkt eine Mutation der Cysteine C381 und C447 keine Änderung der Fähigkeit des Rezeptors Cd zu binden, verhindert aber die Aktivierung des Rezeptors durch Cd (Stoica et al., 2000).

Fechner *et al.* haben die Interaktion von Cd und humanem ER-Alpha mittels Reflektometrischer Interferenzspektroskopie (engl. *reflectometric interference spectroscopy*, RIfS) untersucht, um die unterschiedlichen Beobachtungen zur östrogenen Aktivität des Metalls zu erklären (2011).¹ Es wurden zwei Biosensoren hergestellt: Einer, an dem ein spezifischer Ligand für die LBD des ER-Alpha kovalent an die Oberfläche gebunden worden ist, und einer, an dem ein Ligand für die Agonistische Konformation der LBD des ER-Alpha aufgetragen wurde. Diese Sensoren wurden mit ER-Alpha und CdCl₂ inkubiert. Bei den Versuchen zur Bindung an den Liganden für die aktive Konformation zeigte sich keine Cd-induzierte Bindung der agonistischen Konformation an den Liganden, aber eine Inhibition der E₂-induzierten Konformationsänderung (bzw. Bindung an den dafür spezifischen Liganden).² Die Autoren kommen zu folgendem Schluss:

In summary, these results suggest that cadmium binds to hERα with high affinity in a non-competitive manner without inducing an agonist conformation, and that cadmium disrupts the agonist conformation induced by E₂. Based on these observations, it is more likely that cadmium would trigger antiestrogenic effects *in vivo* than estrogen agonist effects. (Fechner et al., 2011)

Weiterhin wurde untersucht, wie Cd mit der LBD interagiert, wenn die Cystein-Reste (innen und/oder außen liegend) maskiert werden. Aus den Ergebnissen leiten die Autoren ab, dass Cd nicht in der LBD des ER-Alpha bindet, sondern über äußere Cystein-Reste die Konformation des Rezeptors in einen aktivierten Zustand “zieht”. Und weil der ER posttranslational auch an diesen Cysteinresten modifiziert werden kann, wäre das eine mögliche Erklärung, warum verschiedene Systeme unterschiedliche Ergebnisse für eine Östrogenität von Cd liefern (Fechner et al., 2011). Es gibt also fundamentale Unterschiede zwischen dem molekularen Mechanismus der Wirkung von Cd und endogenem Östrogen. Im Wortlaut der Autoren:

[...] the results suggest fundamental differences in the binding mechanism between E₂ and cadmium. (Fechner et al., 2011)

Im klassischen uterotrophen Assay *in vivo* – sozusagen dem *Goldstandard* endokrinologischer Untersuchungen – gibt es deutliche Hinweise für eine ER-vermittelte östrogene Wirkung von Cd im Rattenuterus mit einem pharmakologischen Ansatz (siehe 2.3 und Johnson et al. 2003). Die Beobachtungen von Fechner *et al.* deuten darauf hin, dass der ER-Alpha je nach verwendetem Modell unterschiedlich posttranslational modifiziert werden könnte und somit eine qualitativ andere Reaktion auf “nicht-klassische” Liganden des ER (*i. e.* Cd) zeigt.³ Der ER ist der Struktur seiner aktivierenden Liganden gegenüber ausgesprochen tolerant. Allerdings können auch 17beta-Östradiol-Struktur-ähnliche Liganden zu einer etwas anderen Faltung des

¹Bei einer Änderung der Schichtdicke des Biosensors – die Bindung eines Liganden kann die darauf auftretende Interferenzänderung gemessen und ausgewertet werden. Ein Vorteil der Methode ist, dass kein Farbstoff verwendet werden muss um die Schichtdickenänderung zu detektieren (Fechner et al., 2009).

²Darüber hinaus wurde eine deutlich schwächere Dissoziationskonstante für Cd errechnet ($K_D = 6.1 \cdot 10^{-7}$ M), als bei Stoica et al. 2000 ($K_D = 4$ bis $5 \cdot 10^{-10}$ M).

³Wenn bei der Bindung posttranslational modifizierte Bindungsstellen beteiligt sind.

ER führen (als eine durch E_2 -induzierte), was die Bindung von Kofaktoren und somit die biologische Wirkung beeinflussen kann (z. B. die unvollständige Konformationsänderung der Helix 12 durch Genistein). Zweiwertige Cd-Ionen sind von der Struktur völlig anders als die unter Kapitel 1.2.3 beschriebenen Stoffe. Deshalb kann Cd vermutlich nicht wie klassische Agonisten des ER den Rezeptor aktivieren – jedoch wird diese Wirkung durchaus imitiert. Die negativen Ergebnisse in transgenen Tieren sollten auf einen möglichen *Feed-back*-Mechanismus hin untersucht werden, der sich theoretisch von dem der endogen-regulierten Gene unterscheiden könnte. Auch werden sich die Kofaktoren die bei der Aktivierung der transfizierten Gene von denen bei der Transkription der endogenen Gene vorhandenen unterscheiden (vgl. Abschnitt 1.2.3 auf Seite 10).

4.3.2 Nicht-monotone Dosis-Wirkungs-Beziehung

Die orale Exposition von 2 mg/kg KG Cd über 3 Tage führte zu keiner Modulation des Uterusfeuchtgewichtes (siehe Veröffentlichung 2.1 und 2.4) im Gegensatz zu einer i.p.-Injektion von 2 mg/kg KG (Einzeldosis, siehe 2.3). Eine nachfolgende Analyse verschiedener östrogen-sensitiver Gene (siehe Kapitel 3.2 ab Seite 92) zeigte ebenfalls keine Modulation des klassischen Östrogen-Zielgens C3. Bei einem Vergleich mit den in Höfer et al. 2009 untersuchten Tiere zeigte sich, dass es bei einer oralen Exposition mit der von mir eingesetzten Dosis Cd zu einer ähnlichen Uterusgewebekonzentration kommt wie nach einer geringeren Dosis nach i. p.-Injektion. Bei der geringeren i. p.-Dosis zeigte sich ebenfalls keine Steigerung des Uterusgewichtes, und die C3-mRNA-Expression war gegenüber Kontrolle sogar herunterreguliert (siehe Abb. 4.2 und Höfer et al. 2009). Meine Ergebnisse bestätigen die unveröffentlichten Daten von Nicola Höfer, in denen eine orale Behandlung mit 2 mg/kg KG Cd über 3 Tage ebenfalls zu keiner Modulation von C3 führte.

Da eine potentielle Interaktion von Cd mit Östrogenen ebenfalls untersucht werden sollte, wurden einige Tiere mit Cd und EE_2 kobehandelt. Dies führte überraschenderweise zu einer Antagonisierung des EE_2 -induzierten Effektes auf die C3-mRNA-Expression. Bei der nachfolgenden Untersuchung der neu identifizierten östrogen-sensitiven Gene Ahr und Gsta2 wurde dieser antagonistische Effekt von Cd ebenfalls beobachtet (siehe Kapitel 3.2 ab Seite 92). Es zeigten sich also bei gewissen Dosen potentiell antiöstrogene Effekte von Cd.

Nicht-monotone Dosis-Wirkungs-Beziehungen sind in verschiedensten Zusammenhängen bereits häufig beschrieben worden (Andrade et al., 2006; Narita et al., 2007; Takano et al., 2006; Welshons et al., 2003; Wetherill et al., 2002; Wozniak et al., 2005). Dies stellt ein Problem für die Risikobewertung dar (Conolly and Lutz, 2004), weil die Toxizität/Wirkung geringer Dosen einer Substanz häufig, unter der Annahme einer linearen Dosis-Wirkungs-Beziehung, von der Wirkung hoher Dosen aus extrapoliert wird. Für mechanistische Erklärungen werden verschiedene Thesen formuliert. Bereits beschrieben ist das Vorhandensein verschiedener Rezeptor-Subtypen (siehe Kapitel 1.2.2), das Verhältnis von Koaktivatoren zu Korepressoren in einer Zelle (siehe 1.2.3) – das dazu beiträgt, dass eine Substanz agonistisch oder antagonistisch wirkt – und nicht-genomische Effekte von Liganden (siehe Kapitel 1.2.2). Eine U-förmige Dosis-Wirkungs-Beziehung wird beobachtet, wenn gemischte Liganden-Rezeptor-Dimere, die transkriptionell inaktiv sind, auftreten (Conolly and Lutz, 2004). Dagegen zeigt sich eine inverse U-förmige Dosis-Wirkungs-Beziehung, wenn Rezeptoren nicht von den endogenen Liganden besetzt sind und xenobiotische Liganden ineffektiv Koaktivatoren rekrutieren (Kohn and Melnick, 2002).

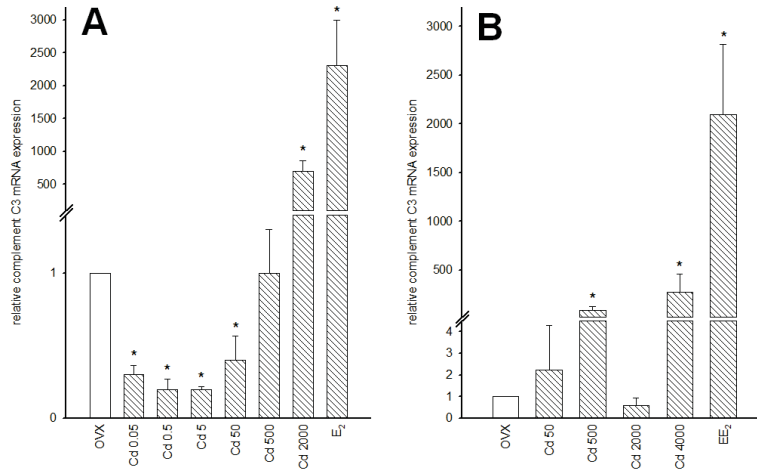


Abb. 4.2: Cd-induzierte Modulation von C3-mRNA in Rattenuterus nach (A) 3 Tagen i.p. oder (B) 3 Tagen gavage. Für beide Expositionswege zeigt sich eine nicht-monotone Dosis-Wirkung-Beziehung. Reproduziert aus den Originaldaten – teilweise dargestellt in Höfer et al. 2009. * markiert Werte signifikant unterschiedlich von OvX-Kontrolle, $P \leq 0.05$.

Interessanterweise zeigt sich in Computermodellen allein bei Annahme, dass der exogene Ligand X des Rezeptors R agonistisch wirksam ist, bei einem Vorhandensein eines endogenen Liganden L (bereits in niedriger Konzentration) eine nicht-monotone Dosis-Wirkung-Beziehung (Li et al. 2007 und Abb. 4.3). Darüber hinaus verhält sich X bei Annahme einer geringen Assoziationsraten-Konstante (d.h. die “Geschwindigkeit” aus Ligand-Rezeptor-Monomeren XR Dimere XRRX zu bilden) wie ein reiner Antagonist und nur bei einer hohen Assoziationsraten-Konstante wie ein Agonist – bei einer mittleren Assoziationsraten-Konstante zeigt sich wiederum einer U-förmige Dosis-Wirkung-Beziehung (Li et al., 2007).

Es ist möglich, dass Rezeptorheterodimere LRRX die Transkription anders regulieren als “endogene” Rezeptorhomodimere LRRL (vergleiche Conolly and Lutz 2004). Hierbei ist von Bedeutung, dass bei gleicher Affinität zu dem Rezeptor und gleichen Konzentrationen der Liganden L und X rein numerisch hauptsächlich Rezeptorheterodimere vorliegen. Denn



Bei einer geringeren Affinität von X zum Rezeptor könnte dies durch eine höhere Konzentration von X gegenüber L ausgeglichen werden. Demnach wäre bei $c(\text{LRRL}) \gg c(\text{LRRX})$ eine monotone Dosis-Wirkung-Beziehung zu erwarten, während bei $c(\text{LRRL}) \geq c(\text{LRRX})$ und $c(\text{LRRL}) \leq c(\text{LRRX})$ nicht-monotone Dosis-Wirkung-Beziehungen auftreten könnten.

Es ist nicht untersucht, wie sich die am Rezeptor vorliegende Konzentration von Cd auf die Assoziationsraten-Konstanten von ER-Dimeren oder Monomeren auswirkt, oder wie/ob die ER-Subtyp-Heterodimer-Bildung von Cd beeinflusst wird. Bei den hier vorliegenden Untersuchungen wurden zwar ovariectomierte Tiere verwendet, aber es könnten extraovariell produzierte endogene Östrogene in geringen Konzentrationen vorhanden sein. Deshalb können die in unseren Experimenten beobachteten Ergebnisse für die Cd-Wirkung (bei Annahme einer “reinen” agonistischen Wirkung) teilweise mit den theoretischen Überlegungen erklärt werden.

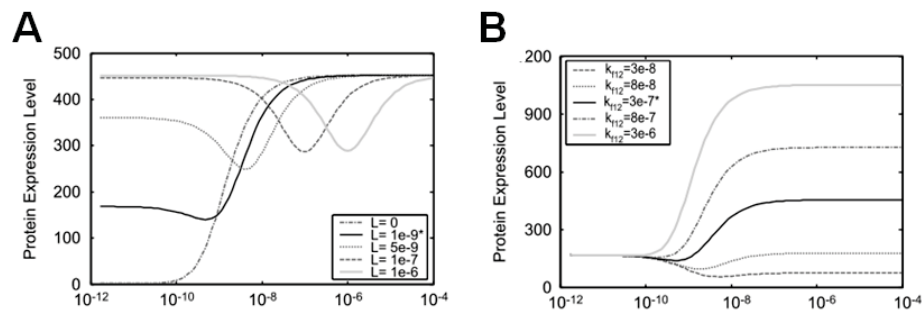


Abb. 4.3: Computermodele einer nicht-monotonen Dosis-Wirkung-Beziehung eines agonistisch wirkenden exogenen Liganden X am ER. Aufgetragen ist die theoretische Expression eines Ziel-Proteins des Rezeptors gegen die Konzentration von X. (A) Bei Annahme eines vorliegenden endogenen Liganden L. (B) Bei der Annahme einer geringen Assoziationsraten-Konstante von X, ER-Dimere zu bilden. Aus Li et al. 2007.

Pilot-Experiment in intakten Tieren

Um zu überprüfen, ob eine potentiell antiöstrogene Wirkung auch in einem physiologischen Modell nachzustellen ist, wurden intakte Weibchen (Wistar-Ratten) mit geringen Dosen Cd behandelt und das Uterusfeuchtgewicht bestimmt (siehe 3.3 ab Seite 94). Da die Tiere nicht zyklussynchronisiert waren, wurde erwartet, dass die Uterusfeuchtgewichte in allen Gruppen gleich normalverteilt sind. Allerdings wurde in den mit Cd behandelten Gruppen ein etwas geringeres und v.a. weniger stark verteiltes Uterusfeuchtgewicht beobachtet, was für eine potentiell antiöstrogene Wirkung spricht. Auch die Vaginalepitheldicken der Cd-behandelten Tiere waren geringer ausgeprägt und zeigten eine geringere Verteilung im Vergleich mit den Kontrolltieren.

Sowohl das Uterusfeuchtgewicht, als auch die Vaginalepitheldicke variieren mit dem Zyklus. Es gibt Hinweise darauf, dass Cd die Zykluslänge verändern könnte. In gesunden prämenopausalen Frauen korrelierten Cd-Serumkonzentrationen mit einer 21 % höheren E_2 -Konzentration in der follikulären Phase bei Raucherinnen. Dieser Unterschied betrug allerdings nur 9 % bei Frauen, die niemals geraucht haben – aber es zeigte sich ein geringer (nicht-signifikanter) Anstieg der Zykluslänge (Jackson et al., 2011). Auch scheint Cd die Ausschüttung von HHG-Achsenhormonen in Frauen (Pollack et al., 2011), humaner *whole ovary culture* (Paksy et al., 1997) und weiblichen Ratten (Pillai et al., 2003) zu beeinflussen.

Weiterhin führte die genauere molekulare Untersuchung des Uterus in den intakten Tieren zu dem Ergebnis, dass geringe Cd-Dosen AhR-assoziierte Gene, *i. e.* Ahr und Cyp1a1 (Abb. 4.4A,B), induzieren. Das ist anders als bei höheren Cd-Dosen in Ovx-Tieren, bei denen die Gene herunterreguliert werden (siehe Veröffentlichung 2.3). Rataj et al. berichteten (2012), dass der selektive ER-Alpha-Agonist und E_2 Ahr und Cyp1a1 im Uterus herunterregulieren, aber der selektive ER-Beta-Agonist 8beta-VE $_2$ die Expression der Gene steigert (siehe Abb. 4.4C). Dies kann als Hinweis dafür angesehen werden, dass Cd die Wirkung endogener Östrogene spezifisch am ER-Alpha antagonisiert.

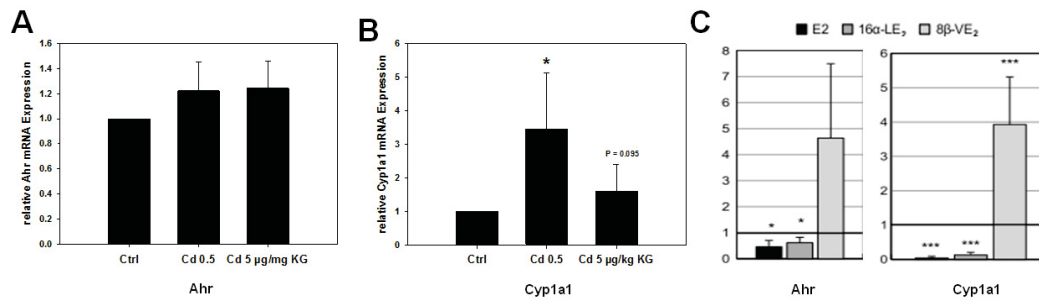


Abb. 4.4: Relative mRNA-Expression von Ahr und Cyp1a1. Geringe Dosen Cd induzieren beide Gene in intakten Wistar-Ratten-Weibchen wie der selektive ER-Beta Agonist 8beta-VE₂ in Ovx-Tieren. Vermutlich über eine Antagonisierung der Wirkung endogener Östrogene an ER-Alpha. (A, B) modifiziert aus Krüger 2012, (C) aus Rataj et al. 2012.

4.4 Die östrogene Wirkung von Cadmium in vorwiegend ER-Beta-exprimierendem Gewebe

Der Darm ist, wie einleitend dargestellt, ein nicht-klassisches Zielgewebe von Östrogenen. Die Wirkung von Östrogenen im Darm ist bis heute relativ schlecht charakterisiert und über eine Interaktion von Cd mit dem ER-Beta ist praktisch gar nichts bekannt. Zu Beginn dieser Dissertation konnte erstmalig gezeigt werden, dass Cd auch im Darm östrogene Wirkungen zeigt (siehe Veröffentlichung 2.1). Cd moduliert ER-Beta-, PCNA-mRNA- und -Protein- und Ps2-mRNA-Expression wie EE₂ in Dünndarmmukosa. Das ist insofern bedenklich, als dass im Darm relativ hohe Gewebekonzentrationen von Cd erreicht werden können. Cd kann also evtl. auch die ER-Beta-vermittelte Signaltransduktion stören. Um die östrogene Wirkung von Cd im Darm näher zu charakterisieren wurde ein Microarray-Versuch durchgeführt (mit EE₂ als positiv Kontrolle, siehe Kapitel 3.1), denn bisher sind nur wenige östrogen-sensitive Gene im Darm bekannt.

4.4.1 Microarray

Es wurden eine Reihe von Genen identifiziert, die in Zukunft bei der Untersuchung der Wirkungen von Östrogenen und Cd im Darm hilfreich sein werden. Allerdings überschneidet sich das Spektrum der von Cd im Microarray induzierten Gene nur teilweise mit dem von EE₂. Das kann damit erklärt werden, dass Cd bei den eingesetzten Dosen (3 Tage 0.5 u. 4 mg/kg KG/d per Gavage) eine Reihe an zellulären Reaktionen induziert. So interagiert es mit verschiedenen Signalwegen, Metalltransportern (siehe Einleitung) und induziert oxidativen Stress – ein Mechanismus über den auch die Kanzerogenität des Metalls erklärt wird (Cuyper et al., 2010; Henkler et al., 2010; Kitamura and Hiramatsu, 2010; Liu et al., 2009).

Die von Cd modulierten östrogen-sensitiven Gene können in zwei Gruppen eingeteilt werden: Gene, die dosis-abhängig von Cd induziert werden und Gene, die eine nicht monotone Dosis-Wirkung-Beziehung zeigen. Zur Aufklärung der östrogenen Wirkung Cds ist die Aufklärung der genauen Signaltransduktion der ersten Gruppe an Genen notwendig. Hierbei ist interessant, dass Gene, die mit der intestinalen Tumorentstehung assoziiert sind, von EE₂ und dosis-abhängig von Cd induziert werden (Bcl6, Reg1a).

4.4.2 ER-unabhängige Modulation AhR-assoziierter Gene im Darm

In Veröffentlichung 2.4 wurde die Modulation AhR-assoziierter Gene durch Cd im Darm untersucht. Es war bekannt, dass Cd bestimmte AhR-assozierte Gene im Uterus via ER-vermittelter Signaltransduktion moduliert (v. a. Cyp1a1 das klassische AhR-Zielgen, siehe Veröffentlichung 2.3 ab Seite 44). Nach oraler Exposition mit Cd zeigt sich im Rattenuterus ebenfalls eine ER-vermittelte Regulation der Cyp1a1 mRNA-Expression – was die Ergebnisse der vorhergehenden Experimente bestätigt. Im Darm regulieren sowohl EE₂ als auch Cd die mRNA-Expression der AhR-assozierten Gene Ahr, Cyp1a1, Gsta2 und Nqo1 herunter. Hier ist das Expressionsmuster also ähnlich zu dem im Uterus (Kluxen et al., 2012; Kretzschmar et al., 2010). Die Gsta2-mRNA-Expression ist gegenüber der Expression im Uterus jedoch entgegengesetzt: Die Gsta2-mRNA-Expression im Darm wird von EE₂ herunterreguliert und im Uterus induziert. Allerdings ist die Modulation der Gene durch EE₂ und Cd qualitativ gleich.

Um zu untersuchen, ob die Cd-induzierte Modulation der AhR-assozierten Genexpression im Darm ER-vermittelt ist, wurden Gruppen von Cd-behandelten Tieren mit einem Anti-östrogen oder EE₂ kobehandelt. Hier zeigte sich, dass die Cd-induzierte Herunterregulation der Ahr-, Cyp1a1-, Gsta2- und Nqo1-mRNA-Expression nicht von dem Antiöstrogen antagonisiert wurde, also wahrscheinlich nicht ER-vermittelt ist. Die Herunterregulation von Cyp1a1-mRNA wurde ebenfalls in gering oder nicht ER-Beta-exprimierende Darmkrebszelllinien beobachtet. Aus diesen Beobachtungen kann man schliessen, dass die Cd-induzierte Modulation der AhR-assozierten Genexpression im Darm vermutlich nicht ER-vermittelt ist.

Interaktion von Cd mit Östrogenen im Darm

Im Darm antagonisiert Cd die EE₂-induzierte Herunterregulation AhR-assoziierter Gene. Und auch bei Verwendung von Darmkrebszelllinien, die eine geringe oder keine Expression von ER-Beta zeigen, wird die EE₂-induzierte Herunterregulation der Cyp1a1-mRNA-Expression durch Cd antagonisiert (siehe Veröffentlichung 2.4 ab Seite 56). Das könnte bedeuten, dass Cd die Wirkung von Östrogenen im Darm beeinflussen kann. In Veröffentlichung 2.2 wurde gezeigt, dass eine selektive Aktivierung des ER-Beta anti-proliferativ und pro-apoptotisch wirkt. In Sham-Tieren scheinen niedrige Cd-Dosen eine ähnliche Wirkung wie ER-Alpha Agonisten im Darm zu haben, was zu den Beobachtungen im Uterus passt. Allerdings können Cd-induzierte östrogene Wirkungen im Darm, wie oben beschrieben, nicht antagonisiert werden. Diese Diskrepanz zwischen der Wirkung von Cd im Uterus und der im Darm muss in Zukunft mechanistisch mit Hinblick auf die exprimierten ER-Subtypen untersucht werden.

Verfügbarkeit von Testsystemen zur Aufklärung des molekularen Mechanismus der östrogenen Wirkung Cadmiums

Die bisherigen Untersuchungen zur östrogenen Aktivität von Cd sind in ausschließlich oder vorwiegend ER-Alpha exprimierenden Zelllinien durchgeführt worden. Im Darmgewebe, das Gewebe das in dieser Dissertation hauptsächlich untersucht wurde, wird aber vorwiegend ER-Beta exprimiert. Und wie unter Kapitel 1.2.2 dargestellt, ist die ER-vermittelte Wirkung der beiden ER-Subtypen durchaus unterschiedlich oder sogar gegensätzlich. Die Interaktion von Cd mit ER-Beta ist praktisch gar nicht untersucht. Ein generelles Problem in der ER-Beta Forschung ist die Verfügbarkeit geeigneter Zelllinien, was eine mechanistische Untersuchung

erschwert. Wie Zhao *et al.* zusammenfassen:

With regard to identification of genes regulated by ER beta, gene expression studies have been performed mainly in cancer cell lines stably expressing ER beta either alone or together with ER alpha. This is due to the lack of immortalized cell lines expressing high levels of endogenous ER beta. [...] Thus, the challenge now is to identify cell lines widely accepted to express endogenous ER beta also in the absence of ER alpha. (Zhao *et al.*, 2010)

Das wird noch deutlicher bei Verwendung von Darmkrebszelllinien, welche häufig gar keinen (funktionellen) ER-Beta exprimieren (vgl. Kapitel 1.2.2). In meinen eigenen Untersuchungen zur ER-Beta-Expression von verschiedenen Darmkrebszelllinien in Kapitel 3.4 zeigte sich zwar, dass auch HCT-116 und etwas geringer auch Caco-2 ER-Beta-Protein exprimieren. Allerdings gibt es keinen Hinweis auf eine funktionsfähige ER-Beta-vermittelte Signaltransduktion – es wird allerdings davon ausgegangen, dass diese in Krebszellen nicht funktioniert (Zhao *et al.*, 2010).

Erst zum Ende meiner Untersuchungen konnte ich den ER-Beta in einer immortalisierten Darmzelllinie identifizieren, was die mechanistische Untersuchung ER-Beta-induzierter Signaltransduktionswege im Darm in Zukunft erleichtern wird (siehe Kapitel 3.4).

4.5 Modulation der Darmhomöostase durch Cadmium

Östrogene spielen bei der Regulierung der Darmhomöostase eine wichtige Rolle. Wie in Veröffentlichung 2.2 dargestellt, steigert die selektive Aktivierung von ER-Alpha sowohl die Proliferation als auch die Apoptose im Dünndarm. Die selektive Aktivierung von ER-Beta führt jedoch zu einer verringerten Proliferation bei gesteigerter Apoptose. Während Cd im Darm ovariectomierter Wistar-Ratten die Proliferation hemmt (siehe Veröffentlichung 2.1), verhält sich Cd im Duodenum intakter Wistar-Ratten wie ein selektiver ER-Alpha-Agonist⁴ – Cd steigert die PcnA-mRNA- und -Protein-Expression bei gleichzeitiger Steigerung der aktivierten Caspase 3-Protein-Expression.

Cd gilt schon sehr lange als kanzerogene Substanz, wobei verschiedene Mechanismen für diese Wirkung diskutiert werden (Hartwig, 2010). Hierbei ist interessant, dass Cd in epidemiologischen Studien und auch in *in vitro* und in tierexperimentellen Untersuchungen mit Darmkrebs assoziiert wird. So scheint das Risiko an Kolon- oder Rektalkrebs zu erkranken bei Cd-exponierten Arbeitern⁵ tendenziell erhöht zu sein (Kjellström *et al.*, 1979). Auch kann die Kolonkrebs-assoziierte Mortalität mit der im Trinkwasser gefundenen Cd-Konzentration korrelieren (Berg and Burbank, 1972). Eine Studie mit Daten aus 28 Ländern weist ebenfalls auf einen Zusammenhang von Cd-Aufnahme und Darmkrebs-assoziiierter Mortalität hin (Schrauzer *et al.*, 1977).

Bei *in utero*-exponierten, 6-Wochen alten männlichen Nachkommen von schwangeren Wistar-Ratten-Weibchen, die mit Cd behandelt wurden, findet sich eine deutliche Erhöhung der DNA-Synthese (*thymidine labeling*) im Dünndarm (Konecki *et al.*, 2000). Hierbei ist interessant, dass in Patienten mit einer Familiengeschichte von erblicher Poliposis und Dickdarmkrebs ebenfalls einen erhöhten *thymidine labeling*-Index aufwiesen (Maskens and Deschner, 1977).

⁴ Also ähnlich zu der unter Kapitel 4.3.2 diskutierten agonistischen Wirkung an ER-Alpha im Uterus.

⁵ Arbeiter einer Nickel-Cd-Batterien-herstellenden Firma.

Die in dieser Dissertation vorgestellten Untersuchungen könnten darauf hindeuten, dass die potentielle kanzerogene Aktivität von Cd im Darm mit einer Cd-induzierten Störung der östrogenen Signaltransduktion zusammenhängen könnte. Allerdings ist der Mechanismus wahrscheinlich ein multifaktorieller Prozess: Cd-induzierter oxidativer Stress ist in vielen Geweben mit der Kanzerogenität des Metalls assoziiert (Hartwig, 2010). Darüber hinaus stört Cd im Darm den *mismatch repair*-vermittelten Zellzyklusarrest (Lützen et al., 2004), löst Entzündungsprozesse aus (Zhao et al., 2006)⁶ und steigert die Proteinsynthese im Darm (Mantha and Jumarie, 2010).

4.6 Ausblick

Die potentiell antagonistische Wirkung Cds im Rattenuterus könnte mittels Kombinationsversuchen mit selektiven ER-Alpha-Agonisten weiter untersucht werden. Nach der hier generierten Arbeitshypothese sollten sich ER-Alpha-vermittelte Effekte mit niedrigen Cd-Dosen antagonisieren lassen.

Zur weiteren Untersuchung der mechanistischen Wirkung Cds ist die Entwicklung immortalisierter Zellmodelle mit definierter ER-Subtyp-Expression notwendig. Bei Berücksichtigung des breiten Wirkspektrums von Östrogenen auf physiologische Prozesse wie die Gewebehomöostase ist die Verwendung von Krebszelllinien limitiert. So unterscheidet sich beispielsweise das Rezeptor-Expressionsmuster der Zellen je nach Labor, verwendeter Passage und eingesetztem Serum.

Experimente mit einer oralen Exposition gegenüber einem Schadstoff erleichtern die Festlegung von Grenzwerten in der Risikobewertung. Deshalb sollte in Zukunft die Wirkung von den per Ernährung erreichbaren niedrigen Cd-Dosen nach oraler Aufnahme auf die Gewebehomöostase im Darm untersucht werden. Dazu bietet sich ebenfalls an, den schon beschriebenen Sexualdimorphismus näher zu untersuchen. Es ist bedenklich, dass Frauen je nach Hormonstatus eine andere Empfindlichkeit gegenüber einer Cd-Intoxikation zu haben scheinen. Shimada et al. beschreiben eine höhere Sterblichkeit intakter Ratten gegenüber ovariectomierten Tieren nach einer Behandlung mit 5 mg/kg KG Cd (2012). Hier wäre es interessant zu untersuchen, ob in der Nahrung enthaltene Phytoöstrogene die Toxizität von Cd beeinflussen, weil eine Koexposition von Cd und anderen östrogenen Stoffen in der Umwelt wahrscheinlich ist. Dazu kommt, dass einer Koexposition auch Männer ausgesetzt sind.

Es ist zu klären, ob die von uns beobachtete Modulation des Fremdstoffmetabolismus über ER-AhR-*Crosstalk* durch Cd und Östrogene die Wirkung der in der Nahrung enthaltenen potentiell kanzerogenen Stoffe bzw. den Metabolismus anderer Stoffe generell beeinflusst.

Die Verwendung von "Schadensmodellen" erlaubt physiologische und/oder pathologische Endpunkte – über eine Transkriptionsregulation hinaus – zu identifizieren. Gut vorstellbar ist die Nutzung des 1,2-Dimethylhydrazin(DMH)-Dickdarmkrebsmodells in der Ratte, bei dem die Wirkung einer Behandlung mit Cd auf die Entwicklung DMH-induzierter Präneoplasien (d. h. *aberrant crypt foci*, ACFs) und/oder (bei längerer Exposition) von Tumoren untersucht werden kann.

Für relativ hohe Dosen von Cd sind entzündliche Effekte (Zhao et al., 2006) und Schädigungen im Darm durch Cd beobachtet worden (Berzina et al., 2007). Da Entzündungsprozesse

⁶Bei relativ hohen Dosen CdCl₂ (Einzeldosis, 25–100 mg/kg KG über das Trinkwasser) kommt es zu einer Entzündung im proximalen Teil des Duodenums.

bei der Entwicklung von Tumoren eine Rolle spielen können (Hanahan and Weinberg, 2011) und auch die AhR-assozierte Signaltransduktion (die die Immunantwort im Darm beeinflusst (Monteleone et al., 2012)) von Cd moduliert werden kann, sollte die Wirkung von Cd in Entzündungsmodellen untersucht werden. So wäre es möglich 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonsäure(TNBS)-induzierte Entzündungen im Kolon von Ratten (vgl. Seibel et al. 2009) die oral mit Cd behandelt wurden zu charakterisieren. In diesen Modellen kann auch der Einfluss von Hormonen oder der Ernährungssituation auf die Toxizität Cds analysiert werden.

4.7 Bedeutung der Ergebnisse

Die in dieser Dissertation gezeigten Ergebnisse bestätigen, dass Cd östrogene Wirkungen in klassischen und nicht-klassischen Zielgeweben von Östrogenen haben kann. Auch gibt es Hinweise darauf, dass Cd mit der Signaltransduktion von Östrogenen interferiert. In der Diskussion sind mögliche molekulare Mechanismen dafür aufgeführt worden. Ein solcher möglicher Sachverhalt sollte nach Überprüfung in Studien mit biologischen Endpunkten und mit oraler Cd Exposition, dann in der Risikobewertung des Metalls berücksichtigt werden.

A Material und Methoden

A.1 Unveröffentlichte Daten

A.1.1 Microarray

Siehe *Draft*.

A.1.2 Cadmium moduliert östrogen-sensitive Genexpression im Uterus nach oraler Aufnahme

Siehe 2.4.

A.1.3 Cd-induzierte Modulation der Darmhomöostase in intakten weiblichen Wistar-Ratten

Siehe Krüger 2012.

A.1.4 Zellversuch

HCEC-Zellen wurden von Nicole Brauer (AG Steinberg, Hannover) kultiviert. Die Zusammensetzung des Kulturmediums ist in Tabelle A.1 dargestellt. Eine 80 %-konfluente T75-Zellkulturflasche (Corning-Costar) wurde auf 10x T75-Zellkulturflaschen aufgeteilt und nach einem Tag mit 10^{-8} M E₂ in 0.1 % DMSO (4x) oder nur in 0.1 % DMSO (4x) oder nicht behandelt (2x). Die Zellproben wurden für die Aufarbeitung in Trizol (Invitrogen/Gibco) oder in PBS (mit complete Mini – No: 11835153001, Roche) auf Eis nach Köln geschickt und analysiert.

A.2 Eingesetzte Software

Der jeweils erste Entwurf der in der hier vorliegenden Arbeit dargestellten Veröffentlichungen und der des Manuskriptes 3.1 sind in Word 14.0 (Microsoft, Redmond WA, USA) erstellt

Tab. A.1: HCEC-Zellen wurden in “Basalem HCEC Zellkulturmedium” (PAN BIOTECH GmbH; Katalog-Nr.:SO-10500) mit folgenden Zusätzen kultiviert

Konzentration	Zusatz
2mM	L-Glutamin (Biochrom AG)
30 µg/ml	Rinderhypophysenextrakt (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
38 µg/ml	Ascorbinsäure (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
1 µM	Dexamethason (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
0,1 µM	Retinsäure (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)

worden.

Die in der vorliegenden Arbeit erstellten Diagramme sind vorwiegend mit Sigmaplot 14.0 (Systat Software Inc., Erkrath, Germany) erstellt, in Powerpoint 14.0 (Microsoft, Redmond WA, USA) exportiert und evtl. arrangiert und als *Portable Network Graphics* (PNG)-Datei gespeichert und verwendet worden. Ein Teil der Diagramme (v. a. Boxplots) ist mit R (Version 2.15.1, The R Foundation for Statistical Computing¹) in R-Studio (Version 0.95.265²) erstellt worden. Der hierbei verwendete einfache Code – beispielsweise für Abbildung 3.7A auf Seite 93 – ist unten abgebildet.

```
## R-Code
## Bei Verwendung eines Datensatzes (c4_ut.csv) nach dem Muster:
## group;ut ## Header
## a;220,8333333
## [...]
## d;940

attach(c4_ut)
boxplot(c4_ut$ut~c4_ut$group,
main="", ylab="in mg/kg b.wt",
names=c("Ovx", expression(EE[2]), "Cd2", expression(Cd2+EE[2])),
col="grey", cex.axis=1)
```

Die hier vorliegende Dissertation wurde mit der L^AT_EX-MiKTeX Distribution (Version 2.9, Christian Schenk³) mit dem Editor Texmaker (Version 3.3.2, Pascal Brachet⁴) erstellt.

¹<http://www.r-project.org/>

²<http://rstudio.org/>

³<http://miktex.org/>

⁴<http://www.xmlmath.net/texmaker/>

Zusammenfassung

Cadmium (Cd) ist eines der giftigsten Schwermetalle und eine ubiquitär verbreitete Umweltkontaminante. Als industrieller Schadstoff stellt es außerdem eine Gefahr in der Arbeitsumgebung dar. Die toxische Wirkung von Cd ist lange bekannt und gut charakterisiert. Heute wird Cd auch als potentiell in das Hormonsystem eingreifende Substanz (Endokriner Disruptor) angesehen. Divalente Cd-Ionen zeigen östrogene Wirkungen *in vitro* und im klassischen uterotrophen Bioassay. Da Hormone bereits in niedrigen Dosen wirken können, ist diese Stoffeigenschaft von Cd bedenklich: Die Entwicklung von hormonabhängigen Krankheiten könnte gefördert oder deren Progression verstärkt werden. Allerdings ist der genaue Wirkmechanismus der östrogenen Wirkung Cds ungeklärt. Für den hauptsächlich den Östrogen-Rezeptor(ER)-Alpha exprimierenden Uterus wurde bereits eine ER-vermittelte Wirkung beschrieben – allerdings gibt es auch Studien, die ER-unabhängige Mechanismen annehmen. Darüber hinaus ist unklar, ob Cd auch in “nicht-klassischen” östrogen-sensitiven Zielgeweben wie dem Darm, der v. a. ER-Beta exprimiert, eine hormonartige Wirkung zeigt. Das ist von Bedeutung, weil Östrogene hier eine wichtige Rolle zu spielen scheinen und das Gewebe durch die orale Aufnahme von Cd (dem primären Expositionspfad) stark belastet ist.

Die bereits veröffentlichten Ergebnisse der hier vorliegenden kumulativen Dissertation zeigen, dass Cd im Darm eine östrogene Wirkung nachahmen kann. Cd inhibiert auch nach oraler Applikation die Expression von Ps2-mRNA, ER-Beta-mRNA und -Protein und PCNA-Protein im Darm ovariectomierter Wistar-Ratten und zeigt damit vergleichbare Wirkungen wie 17alpha-Ethinylöstradiol.

Um die Wirkung von Östrogenen im Darm grundsätzlich besser zu verstehen, wurde der Einfluss selektiver ER-Subtyp-Agonisten auf die Darmhomöostase untersucht. Eine selektive Aktivierung des ER-Alpha führt sowohl zu einer Steigerung der Proliferations- als auch der Apoptoserate im Dünndarm und Kolon. Eine selektive Aktivierung des ER-Beta bewirkt eine Senkung der Proliferationsrate und eine Steigerung der Apoptoserate in beiden Darmabschnitten.

Auf diesen Ergebnissen bauen die nachfolgenden Untersuchungen auf. Zum einen wurde untersucht, ob die östrogenartige Wirkung von Cd im Uterus und Darm ER-vermittelt ist. Daneben wurde der Cd-induzierte ER-Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) *Crosstalk* im Uterus und Darm charakterisiert. Zwar wurde bereits gezeigt, dass eine Cd-induzierte Modulation des Uterusfeuchtgewichtes und der *complement* C3-mRNA Expression mittels ER-Antagonist verhindert werden kann, jedoch ohne hinreichende Befunde zur Pfad- und Dosisabhängigkeit. Meine Untersuchungen zeigen, dass Cd die C3-mRNA- und PR-Protein-Expression (beides etablierte Marker für Östrogenität) dosisabhängig induziert. Dieses wurde in Kombination mit einem ER-Antagonisten verhindert – ist also vermutlich ER-vermittelt. Auch zeigte sich, dass Cd die AhR-assoziierte Genexpression im Uterus via ER moduliert. Im Darm ist der Mechanismus der Modulation AhR-assoziiierter Gene wahrscheinlich anders: Hier scheinen ER-unabhängige Mechanismen eine Rolle zu spielen.

Die in dieser Arbeit ebenfalls gezeigten, bisher unveröffentlichten Ergebnisse weisen darauf

hin, dass Cd auch vormalig unbekannte oder nur vermutete anti-östrogene Effekte zeigt und auch mit der östrogenen Signaltransduktion interferiert. Die östrogen-induzierte Modulation verschiedener östrogen-sensitiver Parameter im Uterus und AhR-assoziierte Genexpression im Uterus und Darm werden in Kombination mit Cd antagonisiert. Diese Eigenschaft würde eine unterschiedliche Toxizität für exponierte Personen mit verschiedenem Hormonstatus bedeuten. Ein solcher möglicher Sachverhalt sollte nach Überprüfung in Schadensmodellen, z. B. dem 1,2-Dimethylhydrazin(DMH)-Dickdarmkrebsmodell mit oraler Cd Exposition, dann in der Risikobewertung des Metalls berücksichtigt werden.

Abstract

The toxic heavy metal cadmium (Cd) is an important environmental contaminant and a recognized health hazard in occupational contexts. Cd is now also regarded as potential endocrine disruptor due to properties that led to its designation as metalloestrogen. Cd ions elicit estrogen-like activity *in vitro* and in uterotrophic bioassays. This raises new concerns, because hormones are relatively potent at low doses and exposure to substances that mimic the effects of estrogens may play a role in the development and progression of hormone-dependent diseases. However, the underlying mechanisms of the estrogen-like effects of Cd are still debated: Cd-induced estrogen receptor(ER)-mediated effects have been described for the uterus that predominantly expresses ER-Alpha. But other studies proposed an ER-independent mechanism. Moreover, it has not been investigated whether Cd affects other estrogen-sensitive tissues such as the intestine that mainly expresses ER-Beta. Estrogens play a major role in gut physiology and pathology and the intestine is highly exposed to the metal because the main route of exposure is via food.

Already published data of this cumulative thesis show that Cd exerts estrogenic effects in the intestine. Cd inhibits Ps2 mRNA, ER-Beta mRNA and protein and PcnA protein expression in the intestine of female ovariectomized Wistar rats after i.p. injection and also oral exposure – similar to 17alpha-ethinylestradiol.

To characterize estrogen action in the intestine in more detail, the effects of selective estrogen agonists on intestinal homeostasis were investigated: Selective activation of ER-Alpha led to increased proliferation and apoptosis in ileum and colon of Wistar rats. Selective activation of ER-Beta down-regulated proliferation and induced apoptosis in both sections of the intestine.

In follow-up studies I then investigated whether Cd's estrogenic activity in uterus and intestine is mediated via the ER. Moreover, Cd-induced effects on aryl hydrocarbon receptor(AhR)-ER cross talk were characterized. Although previous studies indicated an ER-mediated mechanism for the modulation of uterus wet weight and C3 mRNA expression by Cd, there were only insufficient data on the dose- and route-dependency of Cd-induced estrogenic effects. In my studies, Cd dose-dependently induced expression of C3 mRNA and PR protein (established markers for estrogenicity) in the uterus. As this effect of Cd was antagonized by co-treatment with anti-estrogen, it is probably mediated via the ER. Likewise, a modulation of uterine AhR-associated genes by Cd appears to be mediated via ER(alpha). The mechanism of Cd-induced modulation of AhR-associated gene expression in the intestine is different – ER-independent mechanisms are supposedly involved.

Additional unpublished data presented also in this thesis are indicative of anti-estrogenic properties of Cd and its ability to interfere with estrogenic signalling: Estrogen-induced modulation of various estrogen-sensitive markers in uterus and AhR-associated gene expression in uterus and intestine are antagonized by Cd. This could mean that the toxicity of Cd depends on the hormonal status of exposed individuals. When this can be confirmed in animal models, e.g. the 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer model with an oral exposure to Cd, such

a finding should be taken into account in the risk assessment for the toxic metal.

Literaturverzeichnis

- Åkesson, A., Berglund, M., Schütz, A., Bjellerup, P., Bremme, K., and Vahter, M. (2002). Cadmium exposure in pregnancy and lactation in relation to iron status. *American Journal of Public Health*, 92(2):284–287.
- Alam, J., Shibahara, S., and Smith, A. (1989). Transcriptional activation of the heme oxygenase gene by heme and cadmium in mouse hepatoma cells. *The Journal of biological chemistry*, 264(11):6371–6375.
- Ali, I., Damdimopoulou, P., Stenius, U., Adamsson, A., Mäkelä, S. I., Åkesson, A., Berglund, M., Håkansson, H., and Halldin, K. (2012). Cadmium-induced effects on cellular signaling pathways in the liver of transgenic estrogen reporter mice. *Toxicological Sciences*, 127(1):66–75.
- Ali, I., Penttinen-Damdimopoulou, P. E., Mäkelä, S. I., Berglund, M., Stenius, U., Åkesson, A., Håkansson, H., and Halldin, K. (2010). Estrogen-like effects of cadmium in vivo do not appear to be mediated via the classical estrogen receptor transcriptional pathway. *Environmental Health Perspectives*, 118(10):1389–94.
- Alonso-Gonzalez, C., Gonzalez, A., Mazarrasa, O., Guezmes, A., Sanchez-Mateos, S., Martinez-Campa, C., Cos, S., Sanchez-Barcelo, E. J., and Mediavilla, M. D. (2007). Melatonin prevents the estrogenic effects of sub-chronic administration of cadmium on mice mammary glands and uterus. *Journal of Pineal Research*, 42(4):403–10.
- Andersen, O., Nielsen, J. B., Sorensen, J. A., and Scherrebeck, L. (1994). Experimental localization of intestinal uptake sites for metals (Cd, hg, zn, se) in vivo in mice. *Environmental Health Perspectives*, 102(Suppl 3):199–206.
- Andrade, A. J., Grande, S. W., Talsness, C. E., Grote, K., and Chahoud, I. (2006). A dose–response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP): non-monotonic dose–response and low dose effects on rat brain aromatase activity. *Toxicology*, 227(3):185–192.
- ATSDR (2012). CDC - national report on human exposure to environmental chemicals - updated tables. <http://www.cdc.gov/exposurereport/>.
- Baker, V. (2001). Endocrine disrupters - testing strategies to assess human hazard. *Toxicology in Vitro*, 15(4–5):413–419.
- Barnes, S. (2001). Oestrogens and their promiscuous receptors: confronting reality. *Biochemical Society Transactions*, 29(Pt 2):231–236.
- Becker, E. (2011). *Untersuchungen zu der Interaktion von Endogenen Steroiden und Potentiellen Endokrinen Disruptoren*. Masterarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

- Berg, J. W. and Burbank, F. (1972). Correlations between carcinogenic trace metals in water supplies and cancer mortality. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 199(1):249–264.
- Berglund, M., Åkesson, A., Bjellerup, P., and Vahter, M. (2000). Metal–bone interactions. *Toxicology Letters*, 112–113:219–225.
- Berglund, M., Åkesson, A., Nermell, B., and Vahter, M. (1994). Intestinal absorption of dietary cadmium in women depends on body iron stores and fiber intake. *Environmental Health Perspectives*, 102(12):1058–1066.
- Berzina, N., Markovs, J., Isajevs, S., Apsite, M., and Smirnova, G. (2007). Cadmium-induced enteropathy in domestic cocks: A biochemical and histological study after subchronic exposure. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 101(1):29–34.
- Bhattacharyya, M. H. (2009). Cadmium osteotoxicity in experimental animals: mechanisms and relationship to human exposures. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238(3):258–265.
- Björnström, L. and Sjöberg, M. (2004). Estrogen receptor-dependent activation of AP-1 via non-genomic signalling. *Nuclear Receptor*, 2(1):3.
- Blume, K. (2010). *Aufnahme von Umweltkontaminanten über Lebensmittel – Ergebnisse des Forschungsprojektes LExUKon*. BfR, Berlin.
- Brama, M., Gnessi, L., Basciani, S., Cerulli, N., Politi, L., Spera, G., Mariani, S., Cherubini, S., d’Abusco, A. S., Scandurra, R., and Migliaccio, S. (2007). Cadmium induces mitogenic signaling in breast cancer cell by an ERalpha-dependent mechanism. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 264(1-2):102–8.
- Brzozowski, A. M., Pike, A. C., Dauter, Z., Hubbard, R. E., Bonn, T., Engström, O., Ohman, L., Greene, G. L., Gustafsson, J. A., and Carlquist, M. (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*, 389(6652):753–758.
- Byrne, C., Divekar, S. D., Storch, G. B., Parodi, D. A., and Martin, M. B. (2009). Cadmium—a metalloestrogen? *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238(3):266–71.
- Campbell-Thompson, M., Lynch, I. J., and Bhardwaj, B. (2001). Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ERbeta isoforms in colon cancer. *Cancer Research*, 61(2):632–40.
- Campbell-Thompson, M. L. (1997). Estrogen receptor alpha and beta expression in upper gastrointestinal tract with regulation of trefoil factor family 2 mRNA levels in ovariectomized rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 240(2):478–483.
- Cano-Gauci, D. F. and Sarkar, B. (1996). Reversible zinc exchange between metallothionein and the estrogen receptor zinc finger. *FEBS Letters*, 386(1):1–4.
- Carreau, S., Bois, C., Zanatta, L., Silva, F. R. M. B., Bouraima-Lelong, H., and Delalande, C. (2011). Estrogen signaling in testicular cells. *Life Sciences*, 89(15-16):584–587.
- Cenni, B. and Picard, D. (1999). Ligand-independent activation of steroid receptors: new roles for old players. *Trends in endocrinology and metabolism*, 10(2):41–46.

- Chlebowski, R. T., Wactawski-Wende, J., Ritenbaugh, C., Hubbell, F. A., Ascensao, J., Rodabough, R. J., Rosenberg, C. A., Taylor, V. M., Harris, R., Chen, C., Adams-Campbell, L. L., and White, E. (2004). Estrogen plus progestin and colorectal cancer in postmenopausal women. *The New England Journal of Medicine*, 350(10):991–1004.
- Choe, S.-Y., Kim, S.-J., Kim, H.-G., Lee, J. H., Choi, Y., Lee, H., and Kim, Y. (2003). Evaluation of estrogenicity of major heavy metals. *Science of The Total Environment*, 312(1–3):15–21.
- Conolly, R. B. and Lutz, W. K. (2004). Nonmonotonic dose-response relationships: Mechanistic basis, kinetic modeling, and implications for risk assessment. *Toxicological Sciences*, 77(1):151–157.
- Couse, J. F. and Korach, K. S. (2004). Estrogen receptor- α mediates the detrimental effects of neonatal diethylstilbestrol (DES) exposure in the murine reproductive tract. *Toxicology*, 205(1–2):55–63.
- Coyle, P., Philcox, J. C., Carey, L. C., and Rofe, A. M. (2002). Metallothionein: the multi-purpose protein. *Cell Mol Life Sci*, 59(4):627–47.
- Cuyppers, A., Plusquin, M., Remans, T., Jozefczak, M., Keunen, E., Gielen, H., Opdenakker, K., Nair, A. R., Munters, E., Artois, T. J., Nawrot, T., Vangronsveld, J., and Smeets, K. (2010). Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals*, 23(5):927–40.
- Degen, G. (2004). Endokrine Disruptoren in Lebensmitteln. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 47(9):848–56.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.-P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., Zoeller, R. T., and Gore, A. C. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: An endocrine society scientific statement. *Endocrine Reviews*, 30(4):293–342.
- Diel, P. (2002). Tissue-specific estrogenic response and molecular mechanisms. *Toxicol Lett*, 127(1–3):217–24.
- Diel, P., Schmidt, S., and Vollmer, G. (2002). In vivo test systems for the quantitative and qualitative analysis of the biological activity of phytoestrogens. *Journal of Chromatography B*, 777(1–2):191–202.
- Duffus, J. H. (2002). "Heavy metals a meaningless term? (IUPAC technical report). *Pure and Applied Chemistry*, 74(5):793–807.
- EFSA (2009a). Meta-analysis of dose-effect relationship of cadmium for benchmark dose evaluation. *EFSA Journal*, 254:2–62.
- EFSA (2009b). Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the european commission on cadmium in food. *EFSA Journal*, 980:1–139.
- EFSA (2012). Cadmium dietary exposure in the european population. *EFSA Journal*, 10(1):2551 [37 pp.].

- Elisma, F. and Jumarie, C. (2001). Evidence for cadmium uptake through nramp2: metal speciation studies with caco-2 cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 285(3):662–668.
- Elsby, R., Ashby, J., Sumpter, J. P., Brooks, A. N., Pennie, W. D., Maggs, J. L., Lefevre, P. A., Odum, J., Beresford, N., Paton, D., and Park, B. K. (2000). Obstacles to the prediction of estrogenicity from chemical structure: assay-mediated metabolic transformation and the apparent promiscuous nature of the estrogen receptor. *Biochemical Pharmacology*, 60(10):1519–1530.
- Elsenhans, B., Strugala, G. J., and Schafer, S. G. (1997). Small-intestinal absorption of cadmium and the significance of mucosal metallothionein. *Human & Experimental Toxicology*, 16(8):429–34. Elsenhans, B Strugala, G J Schafer, S G Review England Human & experimental toxicology Hum Exp Toxicol. 1997 Aug;16(8):429-34.
- Enmark, E. and Gustafsson, J. A. (1999). Oestrogen receptors - an overview. *Journal of internal medicine*, 246(2):133–138.
- Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Grandien, K., Lagercrantz, S., Lagercrantz, J., Fried, G., Nordenskjöld, M., and Gustafsson, J.-Å. (1997). Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82(12):4258–4265.
- Fechner, P., Damdimopoulou, P., and Gauglitz, G. (2011). Biosensors paving the way to understanding the interaction between cadmium and the estrogen receptor alpha. *PLoS One*, 6(8):e23048.
- Fechner, P., Pröll, F., Carlquist, M., and Proll, G. (2009). An advanced biosensor for the prediction of estrogenic effects of endocrine-disrupting chemicals on the estrogen receptor alpha. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(6):1579–1585.
- Felley-Bosco, E. and Diezi, J. (1992). Dietary calcium restriction enhances cadmium-induced metallothionein synthesis in rats. *Toxicology letters*, 60(2):139–144.
- Ferguson, C. J., Wareing, M., Ward, D. T., Green, R., Smith, C. P., and Riccardi, D. (2001). Cellular localization of divalent metal transporter DMT-1 in rat kidney. *American journal of physiology. Renal physiology*, 280(5):F803–814.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669):806–811.
- Fishman, J. H. and Fishman, J. (1988). Copper and endogenous mediators of estradiol action. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 152(2):783–788.
- Garcia-Morales, P., Saceda, M., Kenney, N., Kim, N., Salomon, D. S., Gottardis, M. M., Solomon, H. B., Sholler, P. F., Jordan, V. C., and Martin, M. B. (1994). Effect of cadmium on estrogen receptor levels and estrogen-induced responses in human breast cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(24):16896–901.

- Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M., and Laudet, V. (2006). Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacological Reviews*, 58(4):685–704.
- Green, S., Kumar, V., Theulaz, I., Wahli, W., and Chambon, P. (1988). The n-terminal DNA-binding 'zinc finger' of the oestrogen and glucocorticoid receptors determines target gene specificity. *The EMBO Journal*, 7(10):3037–3044.
- Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J.-M., Argos, P., and Chambon, P. (1986). Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-a. , *Published online: 13 March 1986; / doi:10.1038/320134a0*, 320(6058):134–139.
- Greer, Lee F, r. and Szalay, A. A. (2002). Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review. *Luminescence: the journal of biological and chemical luminescence*, 17(1):43–74.
- Gronemeyer, H., Gustafsson, J.-A., and Laudet, V. (2004). Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 3(11):950–964.
- Groten, J. P., Koeman, J. H., van Nesselrooij, J. H., Luten, J. B., Fentener van Vlissingen, J. M., Stenhuis, W. S., and van Bladeren, P. J. (1994). Comparison of renal toxicity after long-term oral administration of cadmium chloride and cadmium-metallothionein in rats. *Fundamental and applied toxicology: official journal of the Society of Toxicology*, 23(4):544–552.
- Groten, J. P., Luten, J. B., and van Bladeren, P. J. (1992). Dietary iron lowers the intestinal uptake of cadmium-metallothionein in rats. *European journal of pharmacology*, 228(1):23–28.
- Gruber, C. J., Tschugguel, W., Schneeberger, C., and Huber, J. C. (2002). Production and actions of estrogens. *The New England Journal of Medicine*, 346(5):340–352.
- Guével, R. L., Petit, F. G., Goff, P. L., Métivier, R., Valotaire, Y., and Pakdel, F. (2000). Inhibition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) estrogen receptor activity by cadmium. *Biology of Reproduction*, 63(1):259–266.
- Gunn, S. A., Gould, T. C., and Anderson, W. a. D. (1965). Protective effect of estrogen against vascular damage to the testis caused by cadmium. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N. Y.)*, 119(3):901–905.
- Günther, V., Lindert, U., and Schaffner, W. (2012). The taste of heavy metals: gene regulation by MTF-1. *Biochimica et biophysica acta*, 1823(9):1416–1425.
- Gustafsson, J. A. (1998). Therapeutic potential of selective estrogen receptor modulators. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2(4):508–511.
- Gustafsson, J. A. (1999). Estrogen receptor beta—a new dimension in estrogen mechanism of action. *Journal of Endocrinology*, 163(3):379–383.
- Haberland, L. (1921). Über hormonale sterilisierung des weiblichen tierkörpers. *Münchner Medizinische Wochenschrift*, (49):1577.

- Hagino, N. and Kono, M. (1946). A study on the cause of itai-itai-disease. In *Proceedings of the 17th Meeting of the Japanese Society of Clinical Surgeons*, Tokyo.
- Han, X.-Y., Xu, Z.-R., Wang, Y.-Z., and Du, W.-L. (2006). Effects of cadmium on serum sex hormone levels in pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 90(9-10):380–384.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5):646–674.
- Hansson, S. A. (1963). *Waldemar Jungner och Jungnerackumulatorn*. Dædalus (Stockholm).
- Harnish, D. C., Albert, L. M., Leathurby, Y., Eckert, A. M., Ciarletta, A., Kasaian, M., and Keith, J. C., J. (2004). Beneficial effects of estrogen treatment in the HLA-B27 transgenic rat model of inflammatory bowel disease. *American Journal of Physiology – Gastrointestinal Liver Physiology*, 286(1):G118–25.
- Hartwig, A. (2010). Mechanisms in cadmium-induced carcinogenicity: recent insights. *Bio-metals*, 23(5):951–60.
- Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., Tujague, M., Ström, A., Treuter, E., Warner, M., and Gustafsson, J.-A. (2007). Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiological Reviews*, 87(3):905–931.
- Henkler, F., P, B., and A, L. (2010). The role of oxidative stress in carcinogenesis induced by metals and xenobiotics. *Cancers (Basel)*, 2:376–396.
- Henley, D. V. and Korach, K. S. (2010). Physiological effects and mechanisms of action of endocrine disrupting chemicals that alter estrogen signaling. *Hormones (Athens, Greece)*, 9(3):191–205.
- Hermann, C. S. (1818a). Entdeckung zweier neuen Metalle in Deutschland. *Annalen der Physik*, 59(5):95–108.
- Hermann, C. S. (1818b). Noch ein Schreiben über das neue Metall. *Annalen der Physik*, 59(5):113–116.
- Hertrampf, T., Schmidt, S., Seibel, J., Laudénbach-Leschowsky, U., Degen, G. H., and Diel, P. (2006). Effects of genistein on the mammary gland proliferation of adult ovariectomised wistar rats. *Planta Medica*, 72(4):304–10.
- Hoadley, J. E. and Cousins, R. J. (1985). Effects of dietary zinc depletion and food restriction on intestinal transport of cadmium in the rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 180(2):296–302.
- Hoadley, J. E. and Johnson, D. R. (1987). Effects of calcium on cadmium uptake and binding in the rat intestine. *Fundamental and applied toxicology: official journal of the Society of Toxicology*, 9(1):1–9.

- Höfer, N., Diel, P., Wittsiepe, J., Wilhelm, M., and Degen, G. H. (2009). Dose- and route-dependent hormonal activity of the metalloestrogen cadmium in the rat uterus. *Toxicology Letters*, 191(2-3):123–31.
- Höfer, N., Diel, P., Wittsiepe, J., Wilhelm, M., Kluxen, F. M., and Degen, G. H. (2010). Investigations on the estrogenic activity of the metalloestrogen cadmium in the rat intestine. *Archives of Toxicology*, 84(7):541–52.
- ICdA (2012). All the information on cadmium – patterns of consumption (2003). <http://www.cadmium.org>.
- Ioachim, E. E., Kitsiou, E., Carassavoglou, C., Stefanaki, S., and Agnantis, N. J. (2000). Immunohistochemical localization of metallothionein in endometrial lesions. *The Journal of Pathology*, 191(3):269–273.
- Jackson, L., Howards, P., Wactawski-Wende, J., and Schisterman, E. (2011). The association between cadmium, lead and mercury blood levels and reproductive hormones among healthy, premenopausal women. *Human Reproduction*, 26(10):2887–2895.
- Jain, M. P., Vaisheva, F., and Maysinger, D. (2012). Metalloestrogenic effects of quantum dots. *Nanomedicine*, 7(1):23–37.
- Järup, L., Berglund, M., Elinder, C. G., Nordberg, G., and Vahter, M. (1998). Health effects of cadmium exposure—a review of the literature and a risk estimate. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 24 Suppl 1:1–51.
- Jassam, N., Bell, S. M., Speirs, V., and Quirke, P. (2005). Loss of expression of oestrogen receptor beta in colon cancer and its association with dukes’ staging. *Oncology Reports*, 14(1):17–21.
- Jensen, E. V. (1962). On the mechanism of estrogen action. *Perspectives in Biology and Medicine*, 6:47–59.
- Johansson, L., Båvner, A., Thomsen, J. S., Färnegårdh, M., Gustafsson, J. A., and Treuter, E. (2000). The orphan nuclear receptor SHP utilizes conserved LXXLL-related motifs for interactions with ligand-activated estrogen receptors. *Molecular and cellular biology*, 20(4):1124–1133.
- Johnson, M. D., Kenney, N., Stoica, A., Hilakivi-Clarke, L., Singh, B., Chepko, G., Clarke, R., Sholler, P. F., Lirio, A. A., Foss, C., Reiter, R., Trock, B., Paik, S., and Martin, M. B. (2003). Cadmium mimics the in vivo effects of estrogen in the uterus and mammary gland. *Nature Medicine*, 9(8):1081–4.
- Kägi, J. H. R. and Vallee, B. L. (1960). Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. *Journal of Biological Chemistry*, 235(12):3460–3465.
- Katzenellenbogen, B. S., Choi, I., Delage-Mourroux, R., Ediger, T. R., Martini, P. G., Montano, M., Sun, J., Weis, K., and Katzenellenbogen, J. A. (2000). Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 74(5):279–285.

- Kean, S. (2010). *The disappearing spoon: and other true tales of madness, love, and the history of the world from the periodic table of the elements*. Little, Brown and Co., New York.
- Kitamura, M. and Hiramatsu, N. (2010). The oxidative stress: endoplasmic reticulum stress axis in cadmium toxicity. *Biometals*, 23(5):941–50.
- Kjellström, T. (1992). Mechanism and epidemiology of bone effects of cadmium. *IARC scientific publications*, (118):301–310.
- Kjellström, T., Friberg, L., and Rahnster, B. (1979). Mortality and cancer morbidity among cadmium-exposed workers. *Environmental Health Perspectives*, 28:199–204.
- Klaassen, C. D., Liu, J., and Diwan, B. A. (2009). Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238(3):215–20.
- Kluxen, F. M., Höfer, N., Kretzschmar, G., Degen, G. H., and Diel, P. (2012). Cadmium modulates expression of aryl hydrocarbon receptor-associated genes in rat uterus by interaction with the estrogen receptor. *Archives of Toxicology*, 86(4):591–601.
- Kohn, M. C. and Melnick, R. L. (2002). Biochemical origins of the non-monotonic receptor-mediated dose-response. *Journal of Molecular Endocrinology*, 29(1):113–123.
- Konecki, J., Błazejowski, J., Słowiński, J., and Helewski, K. (2000). Influence of chronic cadmium exposure during pregnancy on DNA synthesis in different organs of rat offspring. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 6(6):1077–1081.
- Konstantinopoulos, P., Kominea, A., Vondoros, G., Sykiotis, G., Andricopoulos, P., Varakis, I., Sotiropoulou-Bonikou, G., and Papavassiliou, A. (2003). Oestrogen receptor beta is abundantly expressed in normal colonic mucosa, but declines in colon adenocarcinoma paralleling the tumour's dedifferentiation. *European Journal of Cancer*, 39(9):1251–1258.
- Kretzschmar, G., Papke, A., Zierau, O., Moller, F. J., Medjakovic, S., Jungbauer, A., and Vollmer, G. (2010). Estradiol regulates aryl hydrocarbon receptor expression in the rat uterus. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 321(2):253–7.
- Krimsky, S. (2001). An epistemological inquiry into the endocrine disruptor thesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 948:130–142.
- Krüger, K. (2012). *Cadmium-induzierte Modulation molekularbiologischer Marker für Östrogenität und Gewebemöostase in intakten weiblichen Ratten*. Masterarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Krust, A., Green, S., Argos, P., Kumar, V., Walter, P., Bornert, J. M., and Chambon, P. (1986). The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *The EMBO journal*, 5(5):891–897.
- Kuiper, G. G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S., and Gustafsson, J. A. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, 138(3):863–70.

- Kuiper, G. G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., and Gustafsson, J. A. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(12):5925–5930.
- Langston, N. (2008). The retreat from precaution: Regulating diethylstilbestrol (DES), endocrine disruptors, and environmental health. *Environmental History*, 13(1):41–65.
- Laudet, V. (1997). Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *Journal of molecular endocrinology*, 19(3):207–226.
- Leazer, T. M., Liu, Y., and Klaassen, C. D. (2002). Cadmium absorption and its relationship to divalent metal transporter-1 in the pregnant rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 185(1):18–24.
- Lemke, T. L. and Williams, D. A. (2007). *Foye’s principles of medicinal chemistry*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.; London.
- Li, L., Andersen, M. E., Heber, S., and Zhang, Q. (2007). Non-monotonic dose–response relationship in steroid hormone receptor-mediated gene expression. *Journal of Molecular Endocrinology*, 38(5):569–585.
- Lindberg, M. K., Movérare, S., Skrtic, S., Gao, H., Dahlman-Wright, K., Gustafsson, J.-A., and Ohlsson, C. (2003). Estrogen receptor (ER)-beta reduces ERalpha-regulated gene transcription, supporting a ying-yang relationship between ER-alpha and ER-beta in mice. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 17(2):203–208.
- Liu, J., Huang, H., Zhang, W., and Li, H. (2010). Cadmium-induced increase in uterine wet weight and its mechanism. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 89(1):43–49.
- Liu, J., Qu, W., and Kadiiska, M. B. (2009). Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238(3):209–14.
- Lützen, A., Liberti, S. E., and Rasmussen, L. J. (2004). Cadmium inhibits human DNA mismatch repair in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 321(1):21–25.
- Mantha, M. and Jumarie, C. (2010). Cadmium-induced hormetic effect in differentiated caco-2 cells: ERK and p38 activation without cell proliferation stimulation. *Journal of Cellular Physiology*, 224(1):250–261.
- Margoshes, M. and Vallee, B. L. (1957). A cadmium protein from equine kidney cortex. *Journal of the American Chemical Society*, 79(17):4813–4814.
- Marquardt, H. and Schäfer, S. (2004). *Lehrbuch der Toxikologie*. Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart.
- Martin, M. B., Voeller, H. J., Gelmann, E. P., Lu, J., Stoica, E. G., Hebert, E. J., Reiter, R., Singh, B., Danielsen, M., Pentecost, E., and Stoica, A. (2002). Role of cadmium in the regulation of AR gene expression and activity. *Endocrinology*, 143(1):263–75.

- Martineti, V., Picariello, L., Tognarini, I., Carbonell Sala, S., Gozzini, A., Azzari, C., Mavilia, C., Tanini, A., Falchetti, A., Fiorelli, G., Tonelli, F., and Brandi, M. L. (2005). ERbeta is a potent inhibitor of cell proliferation in the HCT8 human colon cancer cell line through regulation of cell cycle components. *Endocrine-Related Cancer*, 12(2):455–469.
- Maskens, A. P. and Deschner, E. E. (1977). Tritiated thymidine incorporation into epithelial cells of normal-appearing colorectal mucosa of cancer patients. *Journal of the National Cancer Institute*, 58(5):1221–1224.
- Matthews, J. and Gustafsson, J.-A. (2003). Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Molecular Interventions*, 3(5):281–292.
- Matthews, J. and Gustafsson, J. A. (2006). Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Nuclear Receptor Signaling*, 4:e016.
- McCarthy, M. M. (2011). What can development teach us about menopause? *Brain research*, 1379:109–118.
- McInerney, E. M. and Katzenellenbogen, B. S. (1996). Different regions in activation function-1 of the human estrogen receptor required for antiestrogen- and estradiol-dependent transcription activation. *The Journal of biological chemistry*, 271(39):24172–24178.
- Melnick, S., Cole, P., Anderson, D., and Herbst, A. (1987). Rates and risks of diethylstilbestrol-related clear-cell adenocarcinoma of the vagina and cervix. an update. *The New England Journal of Medicine*, 316(9):514–516.
- Montano, M. M., Müller, V., Trobaugh, A., and Katzenellenbogen, B. S. (1995). The carboxy-terminal f domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 9(7):814–825.
- Monteleone, I., MacDonald, T. T., Pallone, F., and Monteleone, G. (2012). The aryl hydrocarbon receptor in inflammatory bowel disease: linking the environment to disease pathogenesis. *Current opinion in gastroenterology*, 28(4):310–313.
- Moore, W. J., Stara, J. F., Crocker, W. C., Malanchuk, M., and Iltis, R. (1973). Comparison of 115m cadmium retention in rats following different routes of administration. *Environmental research*, 6(4):473–478.
- Mueller, S. O., Simon, S., Chae, K., Metzler, M., and Korach, K. S. (2004). Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta in human cells. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 80(1):14–25.
- Nagy, L. and Schwabe, J. W. (2004). Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends in Biochemical Sciences*, 29(6):317–324.
- Narita, S.-i., Goldblum, R. M., Watson, C. S., Brooks, E. G., Estes, D. M., Curran, E. M., and Midoro-Horiuti, T. (2007). Environmental estrogens induce mast cell degranulation and enhance IgE-mediated release of allergic mediators. *Environmental health perspectives*, 115(1):48–52.

- Nemery, B. (1990). Metal toxicity and the respiratory tract. *The European Respiratory Journal: Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*, 3(2):202–219.
- Nilsson, S. and Gustafsson, J.-A. (2011). Estrogen receptors: Therapies targeted to receptor subtypes. *Clin Pharmacol Ther*, 89(1):44–55.
- Nilsson, S., Mäkelä, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M., and Gustafsson, J.-Å. (2001). Mechanisms of estrogen action. *Physiological Reviews*, 81(4):1535–1565.
- Nishijo, M., Satarug, S., Honda, R., Tsuritani, I., and Aoshima, K. (2004). The gender differences in health effects of environmental cadmium exposure and potential mechanisms. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 255(1):87–92.
- Nordberg, G. (2007). *Handbook on the toxicology of metals*. Academic Press, Amsterdam; Boston.
- Nordberg, G. F. (2009). Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicol Appl Pharmacol*, 238(3):192–200.
- Ogawa, T., Kobayashi, E., Okubo, Y., Suwazono, Y., Kido, T., and Nogawa, K. (2004). Relationship among prevalence of patients with itai-itai disease, prevalence of abnormal urinary findings, and cadmium concentrations in rice of individual hamlets in the jinzu river basin, toyama prefecture of japan. *International journal of environmental health research*, 14(4):243–252.
- Paech, K., Webb, P., Kuiper, G. G., Nilsson, S., Gustafsson, J., Kushner, P. J., and Scanlan, T. S. (1997). Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5331):1508–1510.
- Paksy, K., Rajczy, K., Forgács, Z., Lázár, P., Bernard, A., Gáti, I., and Kaáli, G. S. (1997). Effect of cadmium on morphology and steroidogenesis of cultured human ovarian granulosa cells. *Journal of Applied Toxicology*, 17(5):321–327.
- Paruthiyil, S., Cvorovic, A., Zhao, X., Wu, Z., Sui, Y., Staub, R. E., Baggett, S., Herber, C. B., Griffin, C., Tagliaferri, M., Harris, H. A., Cohen, I., Bjeldanes, L. F., Speed, T. P., Schaufele, F., and Leitman, D. C. (2009). Drug and cell type-specific regulation of genes with different classes of estrogen receptor beta-selective agonists. *PloS one*, 4(7):e6271.
- Pettersson, K., Delaunay, F., and Gustafsson, J. A. (2000). Estrogen receptor beta acts as a dominant regulator of estrogen signaling. *Oncogene*, 19(43):4970–4978.
- Pettersson, K., Grandien, K., Kuiper, G. G., and Gustafsson, J. A. (1997). Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 11(10):1486–1496.
- Piasek, M. and Laskey, J. W. (1994). Acute cadmium exposure and ovarian steroidogenesis in cycling and pregnant rats. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 8(6):495–507.

- Pillai, A., Priya, L., and Gupta, S. (2003). Effects of combined exposure to lead and cadmium on the hypothalamic–pituitary axis function in proestrous rats. *Food and Chemical Toxicology*, 41(3):379–384.
- Pillet, S., D’Elia, M., Bernier, J., Bouquegneau, J., Fournier, M., and Cyr, D. (2006). Immunomodulatory effects of estradiol and cadmium in adult female rats. *Toxicological Sciences*, 92(2):423–432.
- Pollack, A. Z., Schisterman, E. F., Goldman, L. R., Mumford, S. L., Albert, P. S., Jones, R. L., and Wactawski-Wende, J. (2011). Cadmium, lead, and mercury in relation to reproductive hormones and anovulation in premenopausal women. *Environmental Health Perspectives*, 119(8):1156–1161.
- Porter, W., Saville, B., Hoivik, D., and Safe, S. (1997). Functional synergy between the transcription factor sp1 and the estrogen receptor. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 11(11):1569–1580.
- Pratt, W. B. and Toft, D. O. (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocrine Reviews*, 18(3):306–360.
- Predki, P. F. and Sarkar, B. (1992). Effect of replacement of zinc finger zinc on estrogen receptor DNA interactions. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(9):5842–5846.
- Prozialeck, W. C. (2000). Evidence that e-cadherin may be a target for cadmium toxicity in epithelial cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 164(3):231–249.
- Ramachandran, B., Makela, S., Cravedi, J. P., Berglund, M., Hakansson, H., Damdimopoulou, P., and Maggi, A. (2011). Estrogen-like effects of diet-derived cadmium differ from those of orally administered CdCl₂ in the ERE-luc estrogen reporter mouse model. *Toxicology Letters*, 202(2):75–84.
- Rasenberger, H. (2009). *Vom süßen Anfang bis zum bitteren Ende : 110 Jahre Fahlberg-List in Magdeburg - mehr als eine Betriebsgeschichte*. Ziethen, Oschersleben (Bode).
- Rataj, F., Möller, F., Jähne, M., Zierau, O., Diel, P., Vollmer, G., and Kretzschmar, G. (2012). Regulation of uterine AHR battery gene expression by 17beta-estradiol is predominantly mediated by estrogen receptor alpha. *Archives of Toxicology*, 86(10):1603–12.
- Ricketts, M.-L., Moore, D. D., Banz, W. J., Mezei, O., and Shay, N. F. (2005). Molecular mechanisms of action of the soy isoflavones includes activation of promiscuous nuclear receptors. a review. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(6):321–330.
- Rolof, J. (1818). Wichtige Nachricht für Aerzte und Apotheker, Entdeckung eines Arsenikgehalts in der Zinkblume und des Zinkvitriols in Tartarus vitriolatus. *Hufeland’s journal der practischen Heilkunde*, pages 110–112.
- Roloff, D. (1822). Zur Geschichte des Kadmium. *Annalen der Physik*, 70(2):194–198.
- Satarug, S., Haswell-Elkins, M. R., and Moore, M. R. (2000). Safe levels of cadmium intake to prevent renal toxicity in human subjects. *The British journal of nutrition*, 84(6):791–802.

- Scerri, E. R. (2007). The chemical element: A historical perspective (Greenwood guides to great ideas in science) (Andrew ede). *Journal of Chemical Education*, 84(1):42.
- Schrauzer, G., White, D., and Schneider, C. (1977). Cancer mortality correlation studies-IV: associations with dietary intakes and blood levels of certain trace elements, notably se-antagonists. *Bioinorganic Chemistry*, 7(1):35–56.
- Schwartz, E. W. and Alsberg, C. L. (1923). Studies on the pharmacology of cadmium and zinc with particular reference to emesis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 21(1):1–22.
- Seibel, J., Molzberger, A. F., Hertrampf, T., Laudenbach-Leschowski, U., and Diel, P. (2009). Oral treatment with genistein reduces the expression of molecular and biochemical markers of inflammation in a rat model of chronic TNBS-induced colitis. *European Journal of Nutrition*, 48(4):213–20.
- Shannon, R. D. (1976). Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides. *Acta Crystallographica Section A*, 32(5):751–767.
- Shen, L.-j., Zhou, Y.-f., and Jin, T.-y. (2001). Experimental study on the estrogen-like effect of cadmium. *Journal of Labour Medicine*, 18(2):67–69.
- Shimada, H., Hashiguchi, T., Yasutake, A., Waalkes, M., and Imamura, Y. (2012). Sexual dimorphism of cadmium-induced toxicity in rats: involvement of sex hormones. *Archives of Toxicology*, pages 1–6.
- Siewit, C. L., Gengler, B., Vegas, E., Puckett, R., and Louie, M. C. (2010). Cadmium promotes breast cancer cell proliferation by potentiating the interaction between ERalpha and c-jun. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 24(5):981–992.
- Silva, E., Lopez-Espinosa, M. J., Molina-Molina, J. M., Fernandez, M., Olea, N., and Kortenkamp, A. (2006). Lack of activity of cadmium in in vitro estrogenicity assays. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 216(1):20–8.
- Silva, N., Peiris-John, R., Wickremasinghe, R., Senanayake, H., and Sathiakumar, N. (2012). Cadmium a metalloestrogen: are we convinced? *Journal of applied toxicology: JAT*, 32(5):318–332.
- Simons, S. S., Chakraborti, P. K., and Cavanaugh, A. H. (1990). Arsenite and cadmium(II) as probes of glucocorticoid receptor structure and function. *Journal of Biological Chemistry*, 265(4):1938 –1945.
- Smith, C. L., Nawaz, Z., and O'Malley, B. W. (1997). Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 11(6):657–666.
- Soto, A. M., Sonnenschein, C., Chung, K. L., Fernandez, M. F., Olea, N., and Serrano, F. O. (1995). The e-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives*, 103(Suppl 7):113–122.

- Sovet, U. (1858). Poisoning caused by powder used in the cleaning of silver. *Presse Medicale*, 9.
- Staessen, J. A., Roels, H. A., Emelianov, D., Kuznetsova, T., Thijs, L., Vangronsveld, J., and Fagard, R. (1999). Environmental exposure to cadmium, forearm bone density, and risk of fractures: prospective population study. *The Lancet*, 353(9159):1140–1144.
- Steinhilber, D., Roth, H. J., Schubert-Zsilavecz, M., and Steinhilber-Schubert-Zsilavecz-Roth .. (2005). *Medizinische Chemie : Targets und Arzneistoffe*. Dt. Apotheker-Verl., Stuttgart.
- Stoica, A., Katzenellenbogen, B. S., and Martin, M. B. (2000). Activation of estrogen receptor-alpha by the heavy metal cadmium. *Molecular Endocrinology*, 14(4):545–53.
- Stromeyer, F. (1819). Über das Kadmium. *Annalen der Physik*, 60:193–210.
- Sugawa, N., Sugawara, C., and Miyake, H. (1976). Effects of cadmium on intestinal brush border enzymes and calcium absorption. *Sangyo igaku. Japanese journal of industrial health*, 18(5):474–475.
- Takano, H., Yanagisawa, R., Inoue, K.-i., Ichinose, T., Sadakane, K., and Yoshikawa, T. (2006). Di-(2-ethylhexyl) phthalate enhances atopic dermatitis-like skin lesions in mice. *Environmental health perspectives*, 114(8):1266–1269.
- Takiguchi, M. and Yoshihara, S. (2006). New aspects of cadmium as endocrine disruptor. *Environmental Sciences: An International Journal of Environmental Physiology and Toxicology*, 13(2):107–116.
- Tallkvist, J., Bowlus, C. L., and Lönnerdal, B. (2001). DMT1 gene expression and cadmium absorption in human absorptive enterocytes. *Toxicology Letters*, 122(2):171–177.
- Tang, N. and Enger, M. D. (1991). Cadmium induces hypertrophy accompanied by increased myc mRNA accumulation in NRK-49F cells. *Cell biology and toxicology*, 7(4):401–411.
- ter Horst, G. J. (2010). Estrogen in the limbic system. *Vitamins and Hormones*, 82:319–338.
- Treuter, E., Albrechtsen, T., Johansson, L., Leers, J., and Gustafsson, J. A. (1998). A regulatory role for RIP140 in nuclear receptor activation. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 12(6):864–881.
- Umweltbundesamt (2011). Aktualisierung der Stoffmonographie Cadmium - Referenz- und Human-Biomonitoring(HBM)-Werte. Stellungnahme der Kommission Human-Biomonitoring des Umweltbundesamtes. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 54(8):981–996.
- UNEP (2010). Final review of scientific information on cadmium. information document UNEP/GC.26/INF/11/Add.2, United Nations Environment Programme.
- Vahter, M., Åkesson, A., Lidén, C., Ceccatelli, S., and Berglund, M. (2007). Gender differences in the disposition and toxicity of metals. *Environmental Research*, 104(1):85–95.
- Vahter, M., Berglund, M., Åkesson, A., and Lidén, C. (2002). Metals and women's health. *Environmental Research*, 88(3):145–155.

- Velders, M., Schleipen, B., Fritzemeier, K. H., Zierau, O., and Diel, P. (2012). Selective estrogen receptor-beta activation stimulates skeletal muscle growth and regeneration. *FA-SEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 26(5):1909–1920.
- Vetillard, A. (2005). Cadmium: An endocrine disrupter that affects gene expression in the liver and brain of juvenile rainbow trout. *Biology of Reproduction*, 72:119–126.
- Wada-Hiraike, O., Imamov, O., Hiraike, H., Hultenby, K., Schwend, T., Omoto, Y., Warner, M., and Gustafsson, J. A. (2006). Role of estrogen receptor beta in colonic epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(8):2959–64.
- Wagner, J., Jiang, L., and Lehmann, L. (2008). Phytoestrogens modulate the expression of 17alpha-estradiol metabolizing enzymes in cultured MCF-7 cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 617:625–32.
- Waters, L., Yue, B., Veverka, V., Renshaw, P., Bramham, J., Matsuda, S., Frenkiel, T., Kelly, G., Muskett, F., Carr, M., and Heery, D. M. (2006). Structural diversity in p160/CREB-binding protein coactivator complexes. *The Journal of biological chemistry*, 281(21):14787–14795.
- Wedepohl, H. (1995). The composition of the continental crust. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 59(7):1217–1232.
- Weige, C. C., Allred, K. F., and Allred, C. D. (2009). Estradiol alters cell growth in nonmalignant colonocytes and reduces the formation of preneoplastic lesions in the colon. *Cancer Res*, 69(23):9118–24.
- Weigt, C., Hertrampf, T., Zoth, N., Fritzemeier, K. H., and Diel, P. (2012). Impact of estradiol, ER subtype specific agonists and genistein on energy homeostasis in a rat model of nutrition induced obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 351(2):227–238.
- Welshons, W. V., Thayer, K. A., Judy, B. M., Taylor, J. A., Curran, E. M., and vom Saal, F. S. (2003). Large effects from small exposures. i. mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environmental Health Perspectives*, 111(8):994–1006.
- Wetherill, Y. B., Petre, C. E., Monk, K. R., Puga, A., and Knudsen, K. E. (2002). The xenoestrogen bisphenol a induces inappropriate androgen receptor activation and mitogenesis in prostatic adenocarcinoma cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1(7):515–524.
- Wilson, V. S., Bobseine, K., and Gray, L. E. (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. *The Journal of Toxicological Sciences*, 81(1):69–77.
- Wiseman, A. (2005). Oestrogen-receptors (ER) are likely to be promiscuous: wider role for oestrogens and mimics. *Medical Hypotheses*, 65(4):760–765.
- Wozniak, A. L., Bulayeva, N. N., and Watson, C. S. (2005). Xenoestrogens at picomolar to nanomolar concentrations trigger membrane estrogen receptor-alpha-mediated Ca^{2+} fluxes

- and prolactin release in GH3/B6 pituitary tumor cells. *Environmental health perspectives*, 113(4):431–439.
- Zalups, R. K. and Ahmad, S. (2003). Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicology and applied pharmacology*, 186(3):163–188.
- Zang, Y., Odwin-Dacosta, S., and Yager, J. D. (2009). Effects of cadmium on estrogen receptor mediated signaling and estrogen induced DNA synthesis in T47D human breast cancer cells. *Toxicology Letters*, 184(2):134–8.
- Zhang, W., Pang, F., Huang, Y., Yan, P., and Lin, W. (2008). Cadmium exerts toxic effects on ovarian steroid hormone release in rats. *Toxicology Letters*, 182(1–3):18–23.
- Zhang, W., Yang, J., Wang, J., Xia, P., Xu, Y., Jia, H., and Chen, Y. (2007). Comparative studies on the increase of uterine weight and related mechanisms of cadmium and p-nonylphenol. *Toxicology*, 241(1–2):84–91.
- Zhao, C., Dahlman-Wright, K., and Gustafsson, J.-Å. (2010). Estrogen signaling via estrogen receptor beta. *Journal of Biological Chemistry*, 285(51):39575–39579.
- Zhao, Z., Hyun, J. S., Satsu, H., Kakuta, S., and Shimizu, M. (2006). Oral exposure to cadmium chloride triggers an acute inflammatory response in the intestines of mice, initiated by the over-expression of tissue macrophage inflammatory protein-2 mRNA. *Toxicology Letters*, 164(2):144–54.