

**Aus dem Institut für Ernährungswissenschaft
der Justus-Liebig-Universität Gießen**
Biochemie der Ernährung des Menschen
Leitung: Prof. Dr. Katja Becker

angefertigt im

**Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin
der Deutschen Sporthochschule in Köln**
Prof. Dr. Dr. P. Diel

Leibniz-Institut für Arbeitsforschung an der TU Dortmund
Prof. Dr. Dr. G. H. Degen

***In vivo* und *in vitro* Untersuchungen zur estrogenen Aktivität des Schwermetalls Cadmium**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Dr. oec. troph.

im Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Nicola Höfer

Gießen 2010

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. G. Leithold

1. Gutachterin: Prof. Dr. K. Becker

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. P. Diel

Prüfer: Prof. Dr. M. Krawinkel

Prüferin: Prof. Dr. M. Neuhäuser-Berthold

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Juni 2010

„Was wir wissen, ist ein Tropfen; was wir nicht wissen, ein Ozean.“

Isaac Newton

Meinen Eltern und Mirko

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die meine Dissertation ermöglicht und tatkräftig unterstützt haben:

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen „Doktoreltern“ Frau Prof. Gisela H. Degen und Herrn Prof. Patrick Diel für die Bereitstellung des interessanten Themas bedanken. Beide haben mich auf wissenschaftlicher Ebene jederzeit tatkräftig betreut und beraten und mit ihrer individuellen fachlichen Sicht maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Frau Prof. Katja Becker danke ich für fachliche Begleitung während meiner Promotion und die Annahme meines Dissertationsthemas an der Universität Gießen.

Frau Ute Laudenbach-Leschowsky, die mich bei der Vorbereitung und Durchführung aller tierexperimentellen Studien maßgeblich unterstützt hat und Frau Anika Voß für ihre ständige Hilfsbereitschaft im Labor.

Allen ehemaligen und aktuellen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe danke ich für die gute Zusammenarbeit, die unverzichtbare Unterstützung bei den vielen Sektionen sowie für die wertvollen Diskussionen.

Bei Herrn Prof. Michael Wilhelm und Herrn Dr. Jürgen Wittsiepe möchte ich mich für die Analyse der Cadmium-Konzentrationen in den Organproben bedanken.

Ein besonderer Dank geht auch an Frau Martina Bennat im Sekretariat des Graduiertenkolleg 1427, die bei organisatorischen Problemen jederzeit erreichbar war und prompt eine Lösung parat hatte.

Mein Dank gilt nicht zuletzt meinem Vater, der mich bei jedem Weg den ich auch eingeschlagen habe immer unterstützt hat. Besonders möchte ich mich auch bei Mirko bedanken, der mir wann immer es nötig war den Rücken freigehalten hat und meine wissenschaftlichen Freud- und Zweifelphasen intensiv geteilt hat.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Cadmium – toxisches Schwermetall und potentieller Endokriner Disruptor	1
1.1.1 Expositionsquellen und Aufnahmemengen	1
1.1.2 Toxikokinetik von Cadmium	3
1.1.3 Toxische Wirkungen von Cadmium	5
1.1.4 Cadmium als Endokriner Disruptor	6
1.1.4.1 <i>In Vivo</i> Untersuchungen	7
1.1.4.2 <i>In Vitro</i> Untersuchungen	8
1.1.4.3 Mögliche estrogenische Wirkmechanismen von Cadmium	10
1.2 Estrogene und ihre Wirkmechanismen	12
1.2.1 Charakterisierung von Estrogenen	12
1.2.2 Struktureller Aufbau der Estrogenrezeptoren α und β	13
1.2.3 Genomische und nicht-genomische Signaltransduktion der ER	15
1.2.4 Transkriptionelle Kofaktoren	16
1.2.5 Gewebespezifische Verteilung der Estrogenrezeptoren	17
1.2.6 Interaktion zwischen Estrogenrezeptor α und β	18
1.2.7 Liganden der Estrogenrezeptoren	19
1.3 Zielsetzung	22
2. Publikationen	24
2.1 Publikation 1: Dose- and route-dependent hormonal activity of the metalloestrogen cadmium in the rat uterus	26

2.2 Publikation 2: Investigations on the estrogenic activity of the metallohormone cadmium in the rat intestine	27
3. Methoden.....	28
3.1 <i>In Vivo</i> Untersuchungen	28
3.2 Ablauf und Behandlung von Zellkulturen.....	29
3.2.1 Humane Zelllinien MCF-7, HCT-116 und HT-29	29
3.2.2 Kultivieren und Passagieren der Zellen.....	29
3.2.3 Ablauf und Behandlungsschema der Zellversuche	31
3.2.4 Genexpressionsanalysen.....	32
3.2.5 Statistische Auswertung.....	33
4. Ergebnisse.....	35
4.1 Wirkungen von Cadmium und Estradiol auf die Genexpression in Zellkulturen	35
4.1.1 mRNA Expression des Estrogenrezeptors α (ER α)	35
4.1.2 mRNA Expression des Estrogenrezeptors β (ER β)	36
4.1.3 mRNA Expression des Progesteronrezeptors (PR)	37
4.1.4 mRNA Expression des Vitamin-D-Rezeptors (VDR).....	38
4.1.5 mRNA Expression von Metallothionein 2a (MT2a).....	40
4.2 Kombinationen von Cadmium und Estradiol bzw. ER-Antagonist	41
4.2.1 PR mRNA Expression in MCF-7 Zellen	41
4.2.2 ER α und VDR mRNA Expression in HT-29 Zellen.....	42
5. Diskussion	45
5.1 Charakterisierung estrogener Wirkungen von Cadmium <i>in vivo</i>	45
5.1.1 Modulation Estrogen-sensitiver Parameter im Uterus von Ratten.....	46
5.1.2 Cadmium-Verteilung in Blut und Geweben	49
5.1.3 Hormonelle Aktivität von Cadmium im Intestinum von Ratten.....	50
5.2 Estrogene/Antiestrogene Wirkungen von Cadmium <i>in vitro</i>	52

5.2.1 Effekte von Cadmium in Brustkrebszellen (MCF-7)	52
5.2.2 Effekte von Cadmium in Darmkrebszellen (HT-29 und HCT-116).....	53
5.2.3 Erkenntnisse aus den <i>in vitro</i> Untersuchungen.....	54
5.3 Bedeutung der Ergebnisse und Ausblick.....	56
6. Zusammenfassung	59
7. Summary	62
8. Literatur	64
9. Publikationen und Vorträge	78
10. Curriculum Vitae	81

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Quellen humaner Exposition gegenüber Cadmium (EFSA 2009).....	2
Abb. 2 Strukturdomänen A-F der humanen Estrogenrezeptoren α und β mit der Start-Aminosäure 1 am N-terminalen Ende und der End-Aminosäure (595 bzw. 530). Die Linien unterhalb zeigen, welche Rezeptor-Regionen für spezifische Funktionen verantwortlich sind (Koehler et al. 2005).....	14
Abb. 3 Klassische Targetaktivierung durch ligandengebundene Estrogenrezeptoren (i). (ii): Aktivierung von ERs, die durch Adapter-Proteine (z.B. Caveolin-1) in oder an der Zellmembran gehalten werden, führt zur schnellen Veränderung intrazellulärer Signalmoleküle und zur Stimulation der Kinaseaktivität (iii): Membranassoziierte Estrogenbindungsproteine (EBPs) induzieren ebenfalls intrazelluläre Antworten (Deroo and Korach 2006)	16
Abb. 4 Gewebeverteilung von ER α u. β mRNA in der Ratte (Kuiper et al. 1997)....	18
Abb. 5 Natürliche Liganden der ER (Agonisten): Estradiol (A), Estron (B), Estriol (C) und das synthetische Steroid Ethinylestradiol (D).....	19
Abb. 6 Analyse der Estrogenität mittels kombinierter Untersuchungsmethoden.....	28
Abb. 7 Relative mRNA Expression des ER α in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit CdCl ₂ (10 – 0,0001 μ M) oder E2 (0,01 μ M). p** \leq 0,01 signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, ANOVA	35
Abb. 8 Basale mRNA Expression des ER α in MCF-7, HCT-116 und HT-29 Zellen .	36
Abb. 9 Relative mRNA Expression des ER α in HT-29 Zellen nach Behandlung mit CdCl ₂ (1 – 0,0001 μ M) oder E2 (0,01 μ M)	36
Abb. 10 Basale mRNA Expression des ER β in MCF-7, HCT-116 u. HT-29 Zellen..	37
Abb. 11 Relative mRNA Expression des PR in MCF-7-Zellen nach Behandlung mit CdCl ₂ (10 – 0,0001 μ M) oder E2 (0,01 μ M). p* \leq 0,05 und p** \leq 0,01 signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, ANOVA	37
Abb. 12 Basale mRNA Expression des PR in MCF-7, HCT-116 und HT-29 Zellen..	38
Abb. 13 Relative mRNA Expression des VDR in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit CdCl ₂ (1 – 0,0001 μ M) oder E2 (0,01 μ M). p* \leq 0,05 signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, ANOVA	38

- Abb. 14** Relative mRNA Expression des VDR in HCT-116 Zellen nach Behandlung mit CdCl₂ (1 – 0,0001 µM) oder E2 (0,01 µM). p*≤ 0,05, p**≤ 0,01 signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, ANOVA 39
- Abb. 15** Relative mRNA Expression des VDR in HT-29 Zellen nach Behandlung mit CdCl₂ (1 – 0,0001 µM) oder E2 (0,01 µM). p**≤ 0,01 signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, ANOVA 39
- Abb. 16** Relative mRNA Expression von MT2a in HCT-116 Zellen nach Behandlung mit CdCl₂ (1 – 0,0001 µM) oder E2 (0,01 µM). p**≤ 0,01 signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, ANOVA 40
- Abb. 17** Relative mRNA Expression von MT2a in HT-29 Zellen nach Behandlung mit CdCl₂ (1 – 0,0001 µM) oder E2 (0,01 µM). p***≤ 0,001 signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, ANOVA 40
- Abb. 18** Relative mRNA Expression des PR in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit CdCl₂ (1 µM), E2 (0,01 µM), CdCl₂ (1 µM) plus E2 (0,01 µM), CdCl₂ (0,01 µM) plus ZK 191703 (0,1 µM), E2 (0,01 µM) plus ZK 191703 (0,1 µM) und ZK 191703 (0,1 µM). p*≤ 0,05, p**≤ 0,01 signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, ANOVA 41
- Abb. 19** Relative mRNA Expression des ERα in HT-29 Zellen nach Behandlung mit CdCl₂ (0,1 µM), E2 (0,01 µM), CdCl₂ (0,1 µM) plus E2 (0,01 µM), CdCl₂ (0,01 µM) plus ZK 191703 (0,1 µM), E2 (0,01 µM) plus ZK 191703 (0,1 µM) und ZK 191703 (0,1 µM). p***≤ 0,001 signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, ANOVA 42
- Abb. 20** Relative mRNA Expression des VDR in HT-29 Zellen nach Behandlung mit CdCl₂ (1 µM), E2 (0,01 µM), CdCl₂ (1 µM) plus E2 (0,01 µM), CdCl₂ (0,01 µM) plus ZK 191703 (0,1 µM), E2 (0,01 µM) plus ZK 191703 (0,1 µM) und ZK 191703 (0,1 µM). p**≤ 0,01. p***≤ 0,001 signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, ANOVA 43
- Abb. 21** Uterusfeuchtgewichte (mg/kg KG) nach einmaliger intraperitonealer Injektion von CdCl₂ 0,05 mg/kg KG, CdCl₂ 0,05 plus ZK 2,5 mg/kg KG, CdCl₂ 2 mg/kg KG, CdCl₂ 2 + ZK 2,5 mg/kg KG, E2 0,5 mg/kg KG, ZK 2,5 mg/kg KG, E2 0,5 plus ZK 2,5 mg/kg KG, E2 0,5 plus CdCl₂ 2 mg/kg KG. Gezeigt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardabweichungen für n = 6 Tiere. p**≤ 0,01, p***≤ 0,001 signifikant unterschiedlich zu OVX, ANOVA (Kluxen et al. 2009)..... 47
- Abb. 22** Relative mRNA Expression von Complement Component 3 (C3) in Uteri von Ratten nach einmaliger intraperitonealer Injektion von CdCl₂ 0,05 mg/kg KG, CdCl₂ 0,05 plus ZK 2,5 mg/kg KG, CdCl₂ 2 mg/kg KG, CdCl₂ 2 + ZK 2,5

mg/kg KG, E2 0,5 mg/kg KG, ZK 2,5 mg/kg KG, E2 0,5 plus ZK 2,5 mg/kg KG und E2 0,5 plus CdCl₂ 2 mg/kg KG. Gezeigt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardabweichungen für n = 6 Tiere. p*≤ 0,05 signifikant unterschiedlich zu OVX, ANOVA (Kluxen et al. 2009) 48

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Namen, Sequenzen, Amplikongrößen und Annealing-Temperaturen der verwendeten Primer.....	33
Tab. 2 Tendenzen der Genexpression nach Behandlung von MCF-7 Zellen (A) und HT-29 Zellen (B) mit CdCl ₂ (1 µM), E2 (0,01 µM), CdCl ₂ (1 µM) plus E2 (0,01 µM). Estrogenrezeptor α (ERα), Estrogenrezeptor β (ERβ; weder in MCF-7 noch in HT-29/HCT-116 Zellen exprimiert), Progesteronrezeptor (PR; Expression nur in MCF-7 Zellen), Vitamin-D-Rezeptor (VDR), Metallothionein 2a (MT2a); ↑↑↑ = starke Induktion, ↑↑ = mittlere Induktion, ↑ = leichte Induktion, ↗ = tendenzielle Induktion; ↓↓ = mittlere Verminderung, ↓ = leichte Verminderung, ↘ = tendenzielle Verminderung, — = kein Effekt, n.b. = nicht bestimmt.....	44

Abkürzungsverzeichnis

cDNA	Complementary DNA (Komplementär-DNA)
Cd, CdCl ₂	Cadmium, Cadmiumchlorid
CCS	Charcoal-stripped calf serum Aktivkohle-behandeltes Kälberserum
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER α/β	Estrogenrezeptor α/β
ERE	Estrogen responsive Element
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EFSA	European Food Safety Agency Europ. Agentur für Lebensmittelsicherheit
FKS	Fötale Kälberserum
GSH	Glutathion
i.p.	Intraperitoneal
KG	Körpergewicht
MT	Metallothionein
OVX	Ovarektomiert
PBS	Phosphate-Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PR	Progesteronrezeptor
pS2/TFF1	pS2/Trefoil Factor 1
RAL	Raloxifen
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAM	Tamoxifen
(P)TWI	(Provisional) tolerable weekly intake (vorläufige tolerierbare wöchentliche Aufnahme)
VDR	Vitamin-D-Rezeptor

1. Einleitung

Das toxische Schwermetall Cadmium spielt im Gesundheits- und Verbraucherschutz eine große Rolle: Basierend auf der Analyse neuer Daten zur Nephrotoxizität hat die European Food Safety Agency (EFSA, 2009) erst kürzlich die tolerierbare wöchentliche Aufnahme (tolerable weekly intake, TWI) für Cadmium von 7 auf 2,5 µg/kg KG reduziert. Bei der Bewertung der toxikologischen Datenbasis sind auch hormonartige Wirkungen betrachtet, aber nicht in Grenzwertableitungen berücksichtigt worden, denn eine mögliche Bedeutung als „endokriner Disruptor“ (vgl. Kap. 1.1.4) und zugrunde liegende Mechanismen sind noch ungeklärt (EFSA 2009).

In der Einleitung ist daher zunächst der Stand der Kenntnis zu toxischen und estrogenen Wirkungen von Cadmium zusammengefasst und dann, was derzeit zu Estrogenen und deren Wirkmechanismus bekannt ist. Anschließend werden die Aufgabenstellung und Zielsetzung dieser Arbeit erläutert.

1.1 Cadmium – toxisches Schwermetall und potentieller Endokriner Disruptor

1.1.1 Expositionsquellen und Aufnahmemengen

Cadmium (Cd) ist eines der wichtigsten toxischen Schwermetalle und ein ubiquitär verbreiteter Schadstoff (IPCS 2007; Järup and Akesson 2009). Die Expositionsquellen für Cadmium wurden von der WHO wie folgt aufgelistet: Neben der Inhalation von Cadmium über Zigarettenrauch und der berufsbedingten Exposition (Verhüttung und Galvanisation) stellt die Nahrung die Hauptaufnahmequelle von Cadmium für die nichtrauchende Bevölkerung dar (s.a. Abb. 1) (WHO/IPCS 1992; IPCS 2007; ATSDR 2008). Natürliche und anthropogene Quellen wie Industrieemissionen, Düngemittel, Klärschlamm aus der Agrarwirtschaft sowie die Verbrennung fossiler Brennstoffe und die Ablagerung von Abfällen führen zu Kontaminationen von Böden, Gewässern und der Luft (ATSDR 2008). Daraus resultierend sind insbesondere natürlich gewachsene Feldfrüchte mit Cadmium kontaminiert. Das Schwermetall wird daher hauptsächlich über den Verzehr von Cerealien/-produkten, Gemüse, Nüssen,

Hülsenfrüchten und Fleischprodukten aufgenommen (EFSA 2009). Da Cadmium insbesondere in Leber und Niere akkumuliert, kann auch der Verzehr von Innereien eine wichtige Aufnahmequelle darstellen. Allein über den Verzehr von Pasta, Cerealien, Eisbergsalat und Kartoffeln können bereits 50 % der Gesamtaufnahme von Cadmium erreicht werden (Ryan et al. 2001).

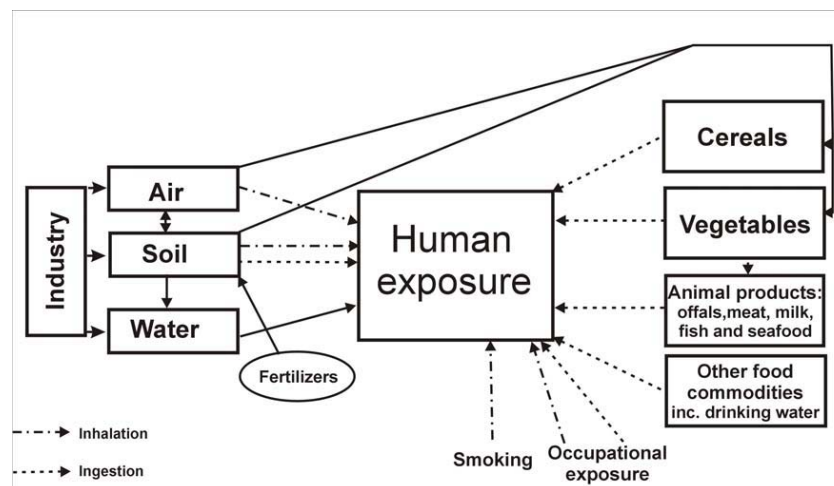


Abb. 1 Quellen humaner Exposition gegenüber Cadmium (EFSA 2009)

Die tägliche orale Aufnahme von Cadmium liegt nach verschiedenen Studien zwischen 0,12 und 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$ (also 0,84 bis 3,5 $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{Woche}$) (Järup et al. 1998; Müller et al. 1998; Ysart et al. 2000; Moschandreas et al. 2002). Wilhelm et al. (1995) und Schrey et al. (2000) ermittelten für deutsche Kinder eine wöchentliche Cadmium Aufnahme von 2,1 bzw. 2,7 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$. Vegetarier können aufgrund des hohen Verzehrs an Getreideprodukten, Gemüse und Obst noch höhere Werte von bis zu 5,4 $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{Woche}$ erreichen (EFSA 2009).

Der Konsum von Zigaretten stellt ebenfalls eine wichtige Expositionsquelle dar: Pro Schachtel werden inhalativ 2 - 4 μg Cadmium aufgenommen (IARC 1976). Als Resultat der relativ hohen Absorptionsrate in der Lunge kann Zigarettenrauch zu einer ähnlich hohen Cadmium-Exposition führen wie die Aufnahme mit der Nahrung (EFSA 2009). Ferner kann mucoziliäre Klärung des Rauch-Aerosols und anschließendes Abschlucken dazu beitragen: Moore et al. (1973) zeigten beispielsweise, dass mehr als 60 % eines Cadmium-haltigen inhalierten Aerosols durch Translokation in den Gastrointestinaltrakt von Ratten gelangten.

1.1.2 Toxikokinetik von Cadmium

Bei oraler Aufnahme von Cadmium liegt die gastrointestinale Resorption zwischen 3 und 8 %, wobei Cadmiumchlorid (CdCl_2) die chemische Form ist, die aufgrund ihrer hohen Wasserlöslichkeit hauptsächlich aufgenommen wird (ATSDR 2008). Das Schwermetall wird primär im Duodenum und den ersten Abschnitten des Jejunums resorbiert (Andersen et al. 1994). Cadmium reichert sich zunächst in der intestinalen Mucosa an; von dort gelangt es dann in die systemische Zirkulation (Eisenhans et al. 1997). Nachfolgend sind diese Prozesse genauer beschrieben.

Nahrungsinhaltsstoffe und andere Metalle, insbesondere Eisen (Fe), Zink (Zn) und Calcium (Ca), können die Aufnahme im Intestinaltrakt stark beeinflussen: Groten et al. (1991) zeigten, dass die intestinale Absorption von anorganischem Cd nach Supplementierung einer Nager-Diät mit Ca/Phosphor, Fe und Zink um 70-80% reduziert war. Dagegen kommt es bei niedrigen Fe-Speichern zu einer erhöhten intestinalen Cd-Absorption und Cd-Speicherung (Flanagan et al. 1978; Berglund et al. 1994; Schumann et al. 1996). Dies kann insbesondere für Risikogruppen wie Vegetarier oder anämische Frauen von Bedeutung sein (Berglund et al. 1994; Choudhury et al. 2001). Auch das Geschlecht bzw. der Hormonstatus nehmen Einfluss auf die Resorption von Cadmium: Z.B. kann Estradiol die Aufnahme von Cadmium beschleunigen (Shaikh and Smith 1980; Blazka and Shaikh 1991).

Eine wichtige Rolle für die Cd-Aufnahme aus dem Darmlumen spielt die chemische Form, die am Epithel präsent ist. So ist beispielsweise die Resorption von Cadmium, das an Protein gebunden ist, weniger hoch als von CdCl_2 (Groten et al. 1992). Als Konjugat, z.B. an Glutathion oder Cystein gebundenes Cadmium, kann vom Enterocyt über Aminosäure- oder Peptidtransporter aufgenommen werden (Ganapathy et al. 2001). Transporter, die eigentlich für andere Ionen zuständig sind, wie z.B. der hZTL1 (human, zinc-regulated, transporter of zinc expressed in the luminal membrane of enterocytes) oder der DMT1 (divalent metal transporter) können auch Cd transferieren (Elisma and Jumarie 2001; Tallkvist et al. 2001). Bei Ca-Mangelzuständen ist auch eine Aufnahme von Cd über Ca-Kanäle oder Ca-Bindungsproteine wie Calbindin-D möglich (Felley-Bosco and Diezi 1992; Zalups and Ahmad 2003). Cd-Metallothionein(MT)/Cd-Protein-Komplexe können vom Enterocyt

mittels Endocytose aufgenommen werden oder direkt über undichte Junctions zwischen benachbarten Zellen vom Lumen in das basolaterale Kompartiment gelangen (Zalups and Ahmad 2003).

Im Enterocyt induziert Cadmium die Expression von Metallothionein (MT) und über 60 % des Schwermetalls wird an dieses Protein gebunden lokal gespeichert (Phillpotts 1984; Lehman and Klaassen 1986). Cadmium, das über die Protein-Bindung nicht mehr komplexiert werden kann, gelangt einerseits über Exocytose, Aminosäure- und Metalltransporter oder über Ca-ATPasen in das Portalblut. Andererseits können hohe intrazelluläre Konzentrationen an freiem Cadmium zur Induktion von oxidativem Stress und einer Störung der mitochondrialen Atmungskette führen. Daraus resultierende Nekrose oder Apoptose führt zur luminalen und basolateralen Freisetzung von Cadmium (Zalups and Ahmad 2003).

Transporter für Cadmium im Blut sind wegen der hohen Plasmakonzentration und ihrer reduzierten Sulfhydrylgruppe primär Albumine (Brown and Shockley 1982; Nordberg and Nordberg 1987). Darüber hinaus transportieren auch Cystein, Glutathion, Metallothionein, Transferrin oder Hämoglobin das Schwermetall zu seinen Zielorganen (Nordberg et al. 1971; Rabenstein et al. 1983; Nordberg and Nordberg 1987; Godt et al. 2006). Nach oraler, pulmonaler oder parenteraler Exposition wird Cadmium überwiegend in Leber und Niere gespeichert, daneben aber auch in Muskeln, Haut oder Knochen (Kjellstrom and Nordberg 1978; Nordberg and Nordberg 1987; Liu et al. 2001; Bernard 2008; ATSDR 2008). Leber und Niere speichern 20 bis 30% des im Organismus vorhandenen Schwermetalls. Cadmium induziert in beiden Organen die Expression von Metallothionein und wird als Cd-MT-Komplex gespeichert (Nath et al. 1984; Waalkes and Goering 1990; Klaassen et al. 1999; Sato and Kondoh 2002; IPCS 2007). Bei chronischer Belastung können diese Komplexe aus nekrotischen Hepatozyten freigesetzt werden, über das Blut zur Niere gelangen und dort tubuläre Schäden induzieren (Dudley et al. 1985; Nomiya et al. 1998). Die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) für Cd im Organismus wird zwischen 10 und 30 Jahren geschätzt. Kjellström und Nordberg (1978) berechneten gewebsabhängig für Leber ($t_{1/2}$) von 4-19, für Niere ($t_{1/2}$) von 6-38 und für andere Gewebe ($t_{1/2}$) von 9-47 Jahren. Die Elimination von Cd ist sehr langsam; sie erfolgt hauptsächlich über Faeces und Urin (Kjellstrom and Nordberg 1978). Die Exkretion über die Niere ist proportional

zum Gesamtdepot im Körper (IPCS 2007; Järup and Akesson 2009). Cadmium in Faeces wurde entweder nicht resorbiert oder stammt aus nekrotischen oder apoptotischen Enterozyten. Cadmium gelangt aber auch nach parenteraler Exposition in den Darm: Hepatozyten konjugieren Cadmium mit dem reichlich verfügbaren Glutathion (GSH) und sezernieren diese Konjugate in die Galle. So gelangt Cadmium-GSH in den Darm und kann wieder resorbiert oder ausgeschieden werden (Cherian and Vostal 1977; Zalups 1997, 2000).

1.1.3 Toxische Wirkungen von Cadmium

Bei einer akuten, pulmonalen Intoxikation mit Cadmium treten im Rahmen einer Pneumonitis Symptome wie Kurzatmigkeit, Ödeme oder Destruktion der Schleimhäute auf (Seidal et al. 1993). Über stark kontaminierte Lebensmittel oder Wasser aufgenommenes Cadmium kann Erbrechen oder Diarrhoe auslösen (Nordberg 2004).

Nach einer Resorption geringer Dosen schützt normalerweise die Bindung von Cadmium an Metallothionein vor toxischen Schäden durch das Schwermetall (Lecoeur et al. 2002). Ist die Bindungskapazität des MT-Proteins jedoch überschritten oder es degradiert, treten toxische Schädigungen auf. Diese manifestieren sich häufig in der Leber bei akuter Exposition und in der Niere bei chronischer Exposition (Harstad and Klaassen 2002). In diesen beiden Organen reichert sich das Schwermetall stark an (s. Kap. 1.1.2). In der Leber kann Cadmium zur Depletion von GSH führen, die Funktion von Mitochondrien und rauhem endoplasmatischem Retikulum beeinträchtigen und Nekrose/Apoptose hervorrufen (Hoffmann et al. 1975; Dudley et al. 1984; Al-Nasser 2000). Kupffer-Zellen, die Makrophagen in der Leber, scheinen die Cd-induzierte Hepatotoxizität zu vermitteln: Sauer et al. (1997) und Yamano et al. (2000) zeigten, dass eine Suppression der Zellen die Hepatotoxizität von Cd signifikant vermindert.

In der Niere verursachen anorganisches Cd, aber auch Komplexe aus Cd und MT, tubuläre Schäden. Infolge dieser Schäden treten Verluste von Calcium, Enzymen, Proteinen oder auch Glucose auf, und es kann zum Nierenversagen kommen (Liu et al. 1998; Barbier et al. 2005; Järup and Akesson 2009; Nordberg 2009).

Im Knochen führt chronische Cd-Exposition indirekt zur Demineralisierung und Knochenerweichung (Ogoshi et al. 1989; Satarug and Moore 2004). Der Effekt ist auf die Cd-induzierte renale Dysfunktion zurückzuführen: Calcium und Phosphor werden verstärkt über den Urin ausgeschieden, und die Hydroxylierung von Vitamin D, die zur Synthese von Calbindin und damit zum Transport von Calcium benötigt wird, ist inhibiert (IPCS 2007). Die Knochentoxizität wurde im Fall der 1940 in Japan aufgetretenen Itai-Itai-Krankheit besonders publik: Eine chronische Cd-Vergiftung führte zu starker Osteomalazie und zu Nierenversagen (Nordberg 2004). Die Erkrankung manifestierte sich insbesondere bei Frauen, weil sie Cadmium stärker im Organismus anreichern als Männer (Vahter et al. 2007).

Cadmium kann auch das Immun-, Reproduktions- und kardiovaskuläre System schädigen (Fowler 2009; Satarug and Moore 2004; Thompson and Bannigan 2008). Es wirkt darüber hinaus als Teratogen und schwaches Mutagen (Webb et al. 1988; Beyersmann and Hechtenberg 1997; Beyersmann and Hartwig 2008). Die International Agency for Research on Cancer (IARC) hat Cadmium und seine Verbindungen bereits 1976 als humanes Karzinogen eingestuft (IARC 1976).

1.1.4 Cadmium als Endokriner Disruptor

Neben den bekannten und eingehend untersuchten toxischen Wirkungen von Cadmium (vgl. 1.1.3) wird das Schwermetall neuerdings auch als Metalloestrogen und sogenannter endokriner Disruptor betrachtet (Byrne et al. 2009; Takiguchi and Yoshihara 2006). Endokrine Disruptoren sind körperfremde Substanzen oder Gemische von solchen, welche die Funktion des endokrinen Systems verändern und nachfolgend gesundheitsschädliche Effekte auf den intakten Organismus, seine Nachkommen oder einzelne (Sub)Populationen hervorrufen (WHO/IPCS 2002). Gesundheitsschädliche (adverse) Effekte können Änderungen in Morphologie, Physiologie, Wachstum, Reproduktion, Entwicklung oder Lebensdauer eines Organismus umfassen, die im Folgenden die funktionelle Leistungsfähigkeit oder die Fähigkeit zusätzlichen Stress zu kompensieren, beeinträchtigen oder die Empfindlichkeit gegenüber anderen gesundheitsgefährdenden Umweltweinflüssen steigern (WHO/IPCS 2004).

Die Möglichkeit, dass Cadmium als Estrogen-aktiver Stoff adverse Wirkungen auf das endokrine System zeigt, hat Wissenschaftler alarmiert: Stephen Safe hat 2003 in einem Kommentar vorgeschlagen, die WHO Standards (provisional tolerable weekly intake, PTWI) für Cadmium zu ändern. Anlass war eine Nagerstudie, in der nach intraperitonealer Injektion vergleichsweise geringer Cadmium-Dosen, im Bereich des PTWI, estrogenartige Wirkungen auftraten (Johnson et al. 2003). Allerdings sind Pfad-abhängige Unterschiede in der Aufnahme des Schwermetalls dabei nicht berücksichtigt worden, und die Datenlage zur hormonellen Potenz war insgesamt nicht eindeutig.

Im Folgenden sind *in vivo* und *in vitro* Studien, in denen das Schwermetall im Hinblick auf eine estrogenische Wirkung untersucht worden ist, dargestellt.

1.1.4.1 *In Vivo* Untersuchungen

Um für eine Testsubstanz estrogenische Aktivität *in vivo* nachzuweisen, werden präpubertäre oder ovariectomisierte Versuchstiere (ohne endogene Estrogenproduktion, OVX) genutzt, behandelt und dann verschiedene molekulare und histologische Endpunkte im Zielorgan untersucht (vgl. Abb. 6 in Kapitel 3.1). Im Uterus haben sich das Feucht- bzw. Trockengewicht, die Anzahl der Drüsen, Zusammensetzung und Proliferation des Gewebes (Endometrium, Myometrium, Stroma) und die Uterusepithelhöhe als adäquate Parameter erwiesen. Auch das Gewicht und der Öffnungszeitpunkt der Vagina sowie die vaginale Epithelhöhe liefern Hinweise auf Estrogenität. In der Mammarydrüse weist die Verästelung der Milchgänge auf estrogenische Effekte hin. Ferner sind Analysen zur Expression Estrogen-regulierter Gene, z.B. des Progesteronrezeptors, Complement Component 3, pS2 oder der Estrogenrezeptoren α/β selbst, eine empfindliche Methode zum Nachweis einer estrogenischen Wirkung (Diel et al. 2002b; Degen and Owens 2008).

Nur wenige *in vivo* Studien haben bislang estrogenische Wirkungen von Cadmium untersucht. Obwohl Nahrung, also orale Aufnahme, für den Nichtraucher den Hauptaufnahmepfad für das Schwermetall darstellt (s. Kap. 1.1.1), ist seine estrogenische Aktivität in Nagern bisher ganz überwiegend nach intraperitonealer (*i.p.*) Verabreichung untersucht worden: Nach einmaliger Injektion von Cadmium (5 μg CdCl_2/kg KG) in die Bauchhöhle von OVX-Sprague-Dawley Ratten fanden sich

signifikant, um das 1,9-fache, erhöhte Uterusfeuchtgewichte und proliferative Effekte im Endometrium. Cadmium stimulierte auch Wachstum und Entwicklung des Mammagewebes und die Genexpression von Progesteronrezeptor und Complement Component 3. Bei paralleler Gabe von Cadmium und dem Antagonisten ICI 182780 konnten die Effekte aufgehoben werden. Eine Exposition schwangerer Ratten mit Cadmium ließ ebenfalls Estrogen-ähnliche Wirkungen erkennen: Die Nachkommen traten früher in die Pubertät ein und zeigten in der Mammarydrüse mehr terminale Endknospen mit stärker proliferierenden Epithelzellen (Johnson et al. 2003).

In einer weiteren Studie wurden OVX-Wistar-Ratten an 3 Tagen *i.p.* mit Cadmium (0,12 bzw. 1,20 mg CdCl₂/kg KG) behandelt (Zhang et al. 2007). In der höchsten Dosisgruppe waren die Uterusfeuchtgewichte signifikant, um das 1,86-fache, erhöht und gleichzeitig verdickte sich das Endometrium. Außerdem inhibierte Cadmium die Expression des Proliferationsmarkers PCNA und stimulierte die Phosphorylierung von ERK1/2. Diese Phosphorylierung begründet nach Ansicht der Autoren die Steigerung des Uterusfeuchtgewichtes.

Die einzige Studie mit oraler Cd-Gabe ist die von Pillet et al. (2006), die primär immunmodulatorische Effekte von Cadmium und Estradiol untersuchten. Sie verabreichten OVX-Sprague-Dawley-Ratten das Schwermetall für 28 Tage über das Trinkwasser (5 oder 25 ppm CdCl₂) und untersuchten u.a. auch den Uterus der Tiere: Es wurde keine messbare Veränderung des Uterusfeuchtgewichtes gegenüber den unbehandelten Kontrollen festgestellt.

FAZIT: Während sich also bei intraperitonealer Injektion von Cadmium klare Indizien für eine estrogene Wirkung finden (Johnson et al. 2003; Zhang et al. 2007), war nach oraler Verabreichung keine solche Aktivität nachweisbar (Pillet et al. 2006). Als Erklärung für die diskrepanten Ergebnisse kommen Pfad-abhängige Unterschiede in der Bioverfügbarkeit von Cadmium und damit seiner estrogenen Potenz infrage.

1.1.4.2 *In Vitro* Untersuchungen

Eine estrogene Aktivität von Cadmium wird in verschiedenen *in vitro* Studien beschrieben: In Kulturen von MCF-7 Brustkrebszellen stimulierte CdCl₂ ähnlich wie Estradiol (E2) deren Proliferation, allerdings in deutlich höheren Konzentrationen als das Steroidestrogen (Garcia-Morales et al. 1994; Choe et al. 2003; Brama et al.

2007). Garcia-Morales et al. (1994) zeigten, dass eine Cadmium Behandlung (1 μM CdCl_2) von MCF-7-Zellen die Expression des Estrogenrezeptors α ($\text{ER}\alpha$) ebenso vermindert wie eine Behandlung mit E2 (1 nM) oder die kombinierte Exposition der Zellen mit Cd und E2. Ausserdem wurden die Expression des Progesteronrezeptors und von pS2 nach Cd- und E2-Behandlung, sowie nach Kombinationsbehandlung, erhöht. Die Induktion von PR und pS2 konnte durch ein Antiestrogen geblockt werden.

Brama et al. (2007) beobachteten nach Behandlung von MCF-7 Zellen mit Cd und E2 eine verminderte Expression des $\text{ER}\alpha$, aber nicht des $\text{ER}\beta$. Zudem stimulierte Cd die Phosphorylierung von ERK1/2, AKT und PDGFR α . Die Stimulation durch Cd konnte mit ICI 182780 antagonisiert werden, was für einen $\text{ER}\alpha$ -abhängigen Mechanismus spricht. Bereits 2000 hatten Stoica et al. für Cadmium eine Aktivierung des $\text{ER}\alpha$ nachweisen können. In transient transfizierten COS-1-Nierenzellen zeigte die Arbeitsgruppe auch, dass die Aktivierung sowohl durch Cd (CdCl_2 1 μM) wie auch durch E2 (0,001 μM) über die Hormonbindungsdomäne vermittelt wird und beide durch ein Antiestrogen geblockt werden. Auch Choe et al. (2003) und Wilson et al. (2004) entwickelten spezielle Reporterassays (ein ERE-gekoppeltes Luciferase-Reporterassay) in MCF-7 und in T47D-Brustkrebszellen und in beiden Systemen zeigte sich eine ER-abhängige Induktion für Cadmium.

Neben diesen Studien, die eine estrogene Aktivität von Cadmium *in vitro* belegen, wurden jedoch auch konträre Ergebnisse beobachtet. Li et al. (2005) zeigten eine nur geringe Affinität von Cadmium zu Estrogenrezeptoren: Ein Zusatz von Cd zu Uteruscytosol hatte keinen Einfluss auf die Bindung von E2 an den Rezeptor, selbst nach Präinkubation der Rezeptorpräparation mit dem Schwermetall. Silva et al. (2006) untersuchten Cadmium in zwei Testsystemen für Estrogen-aktive Substanzen: Einem Assay mit Hefezellen, die mit dem humanen ER (hER) transfiziert sind (YES = yeast estrogen screen) und im MCF-7 Proliferationstest (E-Screen). Cadmium wurde in beiden *in vitro* Assays negativ auf estrogene Aktivität getestet. Wurden die Zellen mit Cd und E2 in Kombination behandelt, reduzierte das Metall aber die Effekte von E2. Auch Guevel et al. (2000) fanden in Tests an Hefezellen, die mit Estrogenrezeptoren aus der Regenbogenforelle oder hER transfiziert sind, keine estrogene Aktivität für Cadmium. Denier et al. (2008) nutzen

ebenfalls den YES-Test: Anders als Estradiol induzierte Cadmium allein keine ER-abhängige Wirkung. Wurde jedoch Cadmium mit Estradiol in Kombination eingesetzt, verstärkte sich die estrogene Antwort.

FAZIT: Insgesamt ergeben die *in vitro* Befunde ein uneinheitliches Bild für Cadmium mit einer agonistischen oder antagonistischen bzw. keiner Wirkung am Estrogenrezeptor.

1.1.4.3 Mögliche estrogene Wirkmechanismen von Cadmium

Zum Wirkmechanismus, wie Cadmium estrogene Effekte induzieren kann, ist aktuell noch nicht viel bekannt. *In vitro* Studien zeigen, dass Cadmium, ähnlich zum natürlichen Hormon Estradiol, eine hohe Affinität zum Estrogenrezeptor Subtyp α (ER α) besitzt und ihn über die Liganden-Bindungsdomäne aktivieren kann (vgl. 1.2.2). Cadmium (^{109}Cd) bindet mit einer Dissoziationskonstante von 4 bis 5×10^{-10} M an den ER α und kann die Bindung von Estradiol nicht-kompetitiv ($K_i=2,96 \times 10^{-10}$ M) hemmen (Stoica et al. 2000).

Cadmium kann mit einer großen Zahl verschiedener Aminosäuren Komplexe bilden (Rulisek and Vondrasek 1998). Mutationsanalysen identifizierten insbesondere Cysteine (cys381, cys447) aber auch Glutaminsäure (glu523), Histidin (his524) und Asparaginsäure (asp538) als mögliche Interaktionsstellen für Cadmium mit der Liganden-Bindungsdomäne des ER α (Pakdel and Katzenellenbogen 1992; Pakdel et al. 1993; Stoica et al. 2000; Nesatyy et al. 2005). Young et al. (1977) zeigten im Detail, dass Cadmium an Thiolgruppen (SH-Gruppen) der Cysteine bindet und damit die Bindung von Estradiol blockieren kann. Das Metall kann seine toxischen Wirkungen ebenfalls über die Bindung an SH-Gruppen vermitteln (Quig 1998).

Aminosäuren, die eine Rolle in der Aktivierung des ER α zu spielen scheinen, sind in der Liganden-Bindungsdomäne auf den Helices H4, H8, H11 sowie an Helix 12 lokalisiert: cys381 und cys447 liegen auf den Helices H4 und H8, glu523 und his524 auf H11, in der Nachbarschaft zum Liganden, und asp538 auf der H12-Schleife und ist damit ebenfalls nah am Liganden lokalisiert (Stoica et al. 2000). Obwohl der präzise Aktivierungsmechanismus von Cadmium nicht bekannt ist, scheint die Bindung des Schwermetalls an diese Aminosäuren strukturelle Veränderungen

nachzuahmen, die den Änderungen durch die Bindung von Estradiol entsprechen: Z.B. kann die Interaktion von Cd mit asp538 die Positionierung von H12 über der Liganden-Bindungstasche bewirken und die Bindung an glu523 auf H11 erleichtert die dauerhafte Anwinkelung zwischen den Helices H10 und H11. Die Interaktion zwischen Cd und cys381 auf H4 ermöglicht die Bildung der Ko-Aktivatoren-Bindungsstelle (Stoica et al. 2000; Byrne et al. 2009). Neben Interaktionen mit Aminosäuren ist ebenfalls eine Modulation von Signaltransduktionskaskaden möglich: Brama et al. (2007), Liu et al. (2007) und Zang et al. (2009) zeigten, dass sowohl Estradiol als auch Cadmium die Aktivierung von EKR1/2 und AKT induzieren können. Und eine Phosphorylierung von ERK1/2 kann für ein erhöhtes Uterusfeuchtgewicht verantwortlich sein.

Die Estrogenrezeptoren zählen neben den anderen Steroidrezeptoren zur Familie Zink-haltiger Transkriptionsfaktoren. Jeweils vier Cystein-Reste im Rezeptor koordinieren ein Zn^{2+} -Ion. Ein Austausch dieses Ions gegen Cd^{2+} ist möglich und wurde auch untersucht und bestätigt. Cadmium anstelle von Zink hatte allerdings nur einen geringen bzw. keinen Einfluss auf die Bindung der DNA-Bindungsdomäne (DBD) an Estrogen-responsive Elemente (EREs) (vgl. 1.2.2) (Predki and Sarkar 1992, 1994; Martin et al. 2003).

Neben dem ungeklärten hormonellen Wirkmechanismus von Cadmium stellt sich weiterhin die Frage, ob das Metall nicht nur mit dem ER α interagiert, sondern auch ER β -vermittelte Wirkungen zeigt. Der ER β ist die dominante Rezeptorform im Intestinaltrakt und ist in Inflamationsprozesse sowie Regulation der Zellhomöostase involviert, die offensichtlich durch Estrogene reguliert werden (Harris et al. 2003; Harnish 2006; Wada-Hiraike et al. 2006; Harris 2007; Seibel et al. 2008). Außerdem ist die intestinale Mucosa Nahrungsbestandteilen und Kontaminanten gegenüber direkt ausgesetzt. Eine Untersuchung der Wirkungsweise von Cadmium im Darm und möglicher ER β -vermittelter Effekte ist daher angezeigt.

1.2 Estrogene und ihre Wirkmechanismen

1.2.1 Charakterisierung von Estrogenen

Estrogene gehören zur Gruppe der Steroidhormone und werden hauptsächlich in den Ovarien synthetisiert. Ausgangspunkt für die Synthese ist Cholesterol, das von den hormonsynthetisierenden Zellen entweder aufgenommen wird oder von ihnen selbst aus Acetyl-CoA synthetisiert wird. Cholesterol wird zunächst über Pregnenolon zum Gestagen Progesteron umgewandelt. Über das Zwischenprodukt 17-Hydroxyprogesteron entsteht anschließend Androstendion. Die Reduktion der C-17-Keto-gruppe liefert das Androgen Testosteron. Zwei unabhängige Reaktionen, die aber jeweils durch Aromatasen am A-Ring katalysiert werden, bewirken die Bildung von Estron (E1) aus Androstendion und von 17 β -Estradiol (E2) aus Testosteron (Müller-Esterl 2004). E2 ist das wirkstärkste endogene Estrogen und besitzt die höchste Rezeptorbindungsaffinität. Estriol (E3) ist ein quantitativ wichtiger Metabolit von Estradiol und Estron mit allerdings nur schwacher Estrogenwirkung (Kuiper et al. 1997).

Im Blut werden Steroidestrogene überwiegend an sexualhormonbindende Globuline (SHBG) gebunden transportiert, sodass nur ein sehr geringer Anteil der zirkulierenden Estrogene frei vorliegt. Bedingt durch die ausgeprägte Lipophilie können Estrogene in den unterschiedlichen Zielgeweben sehr gut Zellmembranen überwinden. Anschließend binden sie mit hoher Affinität an ihre spezifischen Rezeptoren, wodurch sie transkriptionelle Kontrolle ausüben und letztendlich ihre physiologische Wirkung entfalten (Müller-Esterl 2004).

Estrogene sind für die Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale während der Pubertät verantwortlich und beeinflussen Wachstum, Differenzierung und Funktion des weiblichen Reproduktionssystems (Barkhem et al. 2004). Darüber hinaus üben sie auch in weiteren Geweben profunde Effekte aus, wie z.B. die Protektion von Knochen durch Inhibierung der Osteoclastenfunktion (Barkhem et al. 2004; Hertrampf et al. 2006). Des Weiteren werden antioxidative Effekte in Neuronen (Behl et al. 1995) und im Gefäßsystem beschrieben (Stice et al. 2009). Estrogene können auch vor kardiovaskulären Erkrankungen wie Arteriosklerose und Bluthoch-

druck schützen (Smolders et al. 2003; Stice et al. 2009; Vitale et al. 2009) sowie den Fettstoffwechsel beeinflussen (Srivastava et al. 1997, 2001).

1.2.2 Struktureller Aufbau der Estrogenrezeptoren α und β

Die meisten biologischen Effekte von Estrogenen werden über spezifische Rezeptorproteine, den sogenannten Estrogenrezeptoren vermittelt. Der erste Estrogenrezeptor wurde 1962 von Jensen und Jacobsen entdeckt und 1986 von zwei Arbeitsgruppen kloniert (Green et al. 1986; Greene et al. 1986). Mittlerweile wird er als Estrogenrezeptor α (ER α) bezeichnet, nachdem von Kuiper et al. (1996) ein zweiter Rezeptor entdeckt und kloniert wurde, der sogenannte Estrogenrezeptor β (ER β). Die beiden Rezeptoren sind keine Splicevarianten, denn die kodierenden Gene liegen auf unterschiedlichen Chromosomen: Das ER α -Gen auf Chromosom 6 und das ER β -Gen auf Chromosom 14 (Enmark and Gustafsson 1999). ER α und ER β sind nukleare, Liganden-aktivierte Rezeptoren, die zur Steroidhormon-Superfamilie gehören (Weigel 1996). Sie sind jedoch nicht nur im Zellkern lokalisiert, sondern auch in der Plasmamembran und in angrenzenden Zytoplasmabereichen (Deroo and Korach 2006). Beide Rezeptoren bestehen aus sechs funktionellen Domänen, die mit den Buchstaben A bis F bezeichnet werden (s.a. Abb. 2). Am N-terminalen Ende der Rezeptoren ist in der A/B Domäne die Aktivierungsfunktion AF-1 lokalisiert (Tora et al. 1989; McInerney and Katzenellenbogen 1996). Die Liganden-unabhängige AF-1 kann z.B. durch cAMP, Dopamin oder Wachstumsfaktoren (epidermal growth factor (EGF)/insulin-like growth factor (IGF)) aktiviert werden (Herynk and Fuqua 2004). Reporterassays zeigten, dass die AF-1 im ER α hoch aktiv, im ER β jedoch nur schwach aktiv ist (Nilsson et al. 2001). An die A/B-Domäne schließt sich die C- bzw. DNA-Bindungs-Domäne (DBD). Diese enthält zwei Zinkfinger motive, welche eine wichtige Rolle bei der Rezeptor-Dimerisierung (s. Kap. 1.2.3) und Bindung an spezifische DNA-Sequenzen, sogenannte „estrogen responsive elements“ (ERE), spielen (Beato 1989; Ribeiro et al. 1995). Die DBDs von ER α und ER β sind zu 97% homolog (Enmark et al. 1997). Beide verfügen über eine sogenannte P-Box, eine Sequenz, die für die Erkennung der Ziel-DNA nötig ist. Diese Sequenz ist in beiden Rezeptor-Subtypen identisch und ermöglicht die spezifische Bindung an die EREs

der Ziel-Gene (Vanacker et al. 1999; Nilsson et al. 2001). Durch Estrogene regulierte klassische Zielgene sind Complement Component 3 und der Progesteronrezeptor: Beide verfügen über EREs in der Promotorregion (Savouret et al. 1991; Fan et al. 1996). An die C- schließt sich die D-Domäne, auch „hinge“- (=Gelenk-) Region genannt: Sie fungiert als molekulares Scharnier, indem sie nach Ligandenbindung durch Konformationsveränderung variable Tertiärstrukturen ermöglicht. In der E-Domäne, nahe am Carboxy-Terminus des ER, ist die Liganden-Bindungs-Domäne (LBD) lokalisiert. Die LBD besteht aus 12 α -Helices, die eine keilförmige Struktur mit einer hydrophoben Bindungstasche bilden. Natürliche und synthetische Estrogene und auch Antiestrogene binden in dieser Tasche und können letztendlich Rezeptordimerisierung, Translokation in den Nukleus und die Transaktivierung der Zielgene bedingen oder verhindern (Fritsch et al. 1992; Beekman et al. 1993).

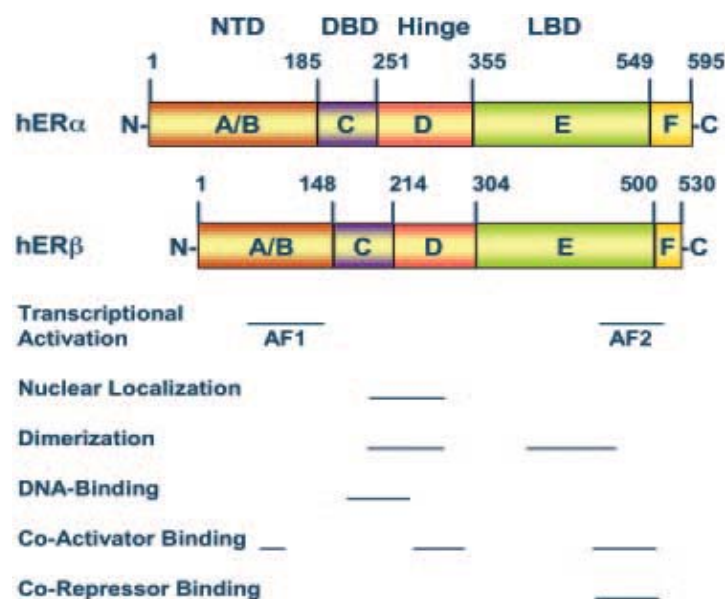


Abb. 2 Strukturdomänen A-F der humanen Estrogenrezeptoren α und β mit der Start-Aminosäure 1 am N-terminalen Ende und der End-Aminosäure (595 bzw. 530). Die Linien unterhalb zeigen, welche Rezeptor-Regionen für spezifische Funktionen verantwortlich sind (Koehler et al. 2005).

Die LBD beherbergt auf Helix 12 die Liganden-abhängige Aktivierungsfunktion 2 (AF-2). Nach Bindung eines Agonisten positioniert sich Helix 12 wie ein Deckel über der Tasche. Nur diese Konfiguration ermöglicht die Bindung von Koregulatoren (s. Kap. 1.2.4) und ist der Schlüssel zur Diskriminierung zwischen agonistischen und antagonistischen Liganden (Shiau et al. 1998; Nilsson et al. 2001). Am carboxyl-

terminalen Ende der ER befindet sich die F-Domäne: Sie moduliert die Wirksamkeit der an die LBD gebundenen Liganden sowie die transkriptionelle Aktivität der ER (Montano et al. 1995).

1.2.3 Genomische und nicht-genomische Signaltransduktion der ER

Steroidestrogene diffundieren aufgrund ihrer Lipophilie leicht durch die Zellmembran in die Zielzelle. Im Zellkern bewirkt die Bindung der Hormone an ER α und/oder β eine allosterische Veränderung der Rezeptor-Proteine, die als Komplex mit anderen, sogenannten Hitzeschock-Proteinen (hsp: heat shock proteins) vorliegen. Hsp90 diffundiert ab, und nach mehreren Phosphorylierungen verschiedener Serine in der A/B-Domäne und in der LBD (Arnold et al. 1994, 1995) können sich die Liganden-besetzten Rezeptoren zu Homo- oder Heterodimeren (ER α /ER α , ER β /ER β , ER α /ER β) verbinden. Nach Anlagerung der Koregulatoren in der AF-2 binden die Dimere über die DBD an die EREs in den Promotoren der Zielgene und modulieren damit die Transkription. Dieser Signalweg (s.a. Abb. 3i) stellt die klassische, „genomische“ Regulation Estrogen-sensitiver Gene dar (Pettersson et al. 1997; Enmark and Gustafsson 1999; Deroo and Korach 2006).

Die Transkription Estrogen-sensitiver Gene durch Liganden-aktivierte ERs ist auch ohne eine direkte Bindung an die Ziel-DNA möglich. Ein Beispiel ist die Interaktion vom ER α mit der c-rel-Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF κ B: Sie verhindert die Bindung des Transkriptionsfaktors an den Promotor des IL-6-Gens. Auf diese Weise inhibiert E2 die Expression von IL-6 (Galien and Garcia 1997). Weitere, indirekte DNA-Effekte sind auch für die Transkriptionsfaktoren Sp1 oder fos/jun beschrieben (Porter et al. 1997; Webb et al. 1999). Estrogenrezeptoren können auch in Abwesenheit spezifischer Liganden aktiviert werden, zum Beispiel über Phosphorylierungen (Nilsson et al. 2001; Pettersson and Gustafsson 2001). MAP-Kinase vermittelte Phosphorylierungen von Serinen resultieren in der Liganden-unabhängigen Rekrutierung von Koregulatoren und transkriptioneller Aktivierung (Yamnik and Holz 2010). Die Phosphorylierung von Tyrosin 537 kontrolliert die Estrogenrezeptor-Dimerisierung und die DNA-Bindungsfähigkeit (Arnold et al. 1995, 1997).

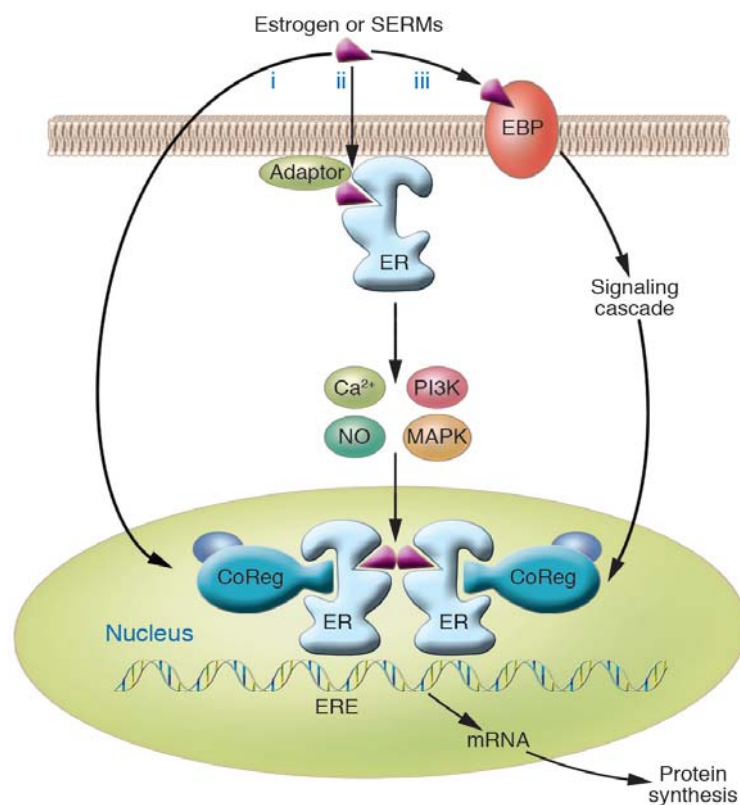


Abb. 3 Klassische Genaktivierung durch ligandengebundene Estrogen-Rezeptoren (i). (ii): Die Aktivierung von ERs, die durch Adapter-Proteine (z.B. Caveolin-1) in oder an der Zellmembran gehalten werden, führt zur schnellen Veränderung intrazellulärer Signalmoleküle und zur Stimulation der Kinaseaktivität. (iii): Membranassoziierte Estrogenbindungsproteine (EBPs) induzieren ebenfalls intrazelluläre Antworten (Deroo and Korach 2006)

1.2.4 Transkriptionelle Kofaktoren

Estrogenrezeptoren existieren in Multiprotein-Komplexen mit sogenannten Kofaktoren bzw. koregulatorischen Faktoren. Basierend auf ihrer Fähigkeit die Transkription zu stimulieren oder zu inhibieren, werden solche Kofaktoren in Koaktivatoren und Korepressoren eingeteilt (Cheskis et al. 2007). Viele Koregulatoren tragen die Konsensaminosäuresequenz LXXLL (L = Leu, X = beliebige Aminosäure), über die sie mit der LBD der nukleären Rezeptoren interagieren (Pike 2006).

Zu den Koaktivatoren, die für die stimulierende Funktion der Estrogenrezeptoren relevant sind, gehört die p160/SRC-Familie (Steroidrezeptor-Coaktivatoren), das CREB-bindende Protein ((CBP)/p300) sowie der TRAP/DRIP-Komplex

(Thyroidhormonrezeptor-assoziiertes Protein/Vitamin-D-Rezeptor interagierendes Protein) (Nilsson et al. 2001). Die Rekrutierung der Koaktivatoren ist dabei Estrogenrezeptor-Subtyp spezifisch. Der ER α interagiert beispielsweise stärker mit SRC-3 als der ER β (Klinge 2000). Auf der anderen Seite interagiert der ER β stärker mit dem TRAP/DRIP-Komplex als der ER α (Warnmark et al. 2001).

Korepressoren umfassen den N-CoR (Nuklearrezeptor-Korepressor), den SMRT (Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid Hormone Receptor) sowie die AF-2 interagierenden Proteine RIP140 (rezeptorinteragierendes Protein 140) und SHP (short heterodimerization partner). SHP hemmt zum Beispiel die E2-abhängige Aktivierung des ER α auf ein Fünftel. Am ER β hingegen wirkt SHP Liganden-unabhängig und reduziert die Aktivität des Rezeptors nur um die Hälfte (Klinge 2000; Nilsson et al. 2001).

1.2.5 Gewebespezifische Verteilung der Estrogenrezeptoren

Estrogenrezeptoren werden nicht nur in Reproduktions-relevanten Organen von Frauen und auch Männern exprimiert, sondern in allen Geweben des Körpers (Kuiper et al. 1997; Dechering et al. 2000). Da die Verteilung von ER α und β gewebeabhängig sehr stark variiert (s.a. Abb. 4), werden den Rezeptoren je nach Expressionsmuster unterschiedliche Funktionen zugeschrieben (Dechering et al. 2000). Hypophyse, Vagina und Uterus exprimieren hohe Mengen von ER α . Der ER β ist überwiegend in Ovarien und Prostata zu finden, aber auch in Blase, Lunge, Knochen und dem Gastrointestinaltrakt. Transkripte für beide Rezeptoren konnten in Hypophyse, Hypothalamus, Thymus, Gefäßsystem, Uterus, Ovarien und Brust nachgewiesen werden (Kuiper et al. 1997; Setchell and Cassidy 1999; Dechering et al. 2000; Taylor and Al-Azzawi 2000).

In den klassischen Zielgeweben, wie Reproduktionsorganen, sind ER α und β für Zellwachstum und -differenzierung verantwortlich, ferner für die neuroendokrine Kontrolle (Barkhem et al. 2004). Estrogenen und Estrogenrezeptoren wird bezüglich kardiovaskulärer Erkrankungen eine protektive Rolle zugesprochen (Tolbert and Oparil 2001; Mendelsohn 2009). So wird beispielsweise nach Gefäßverletzungen der ER β stärker exprimiert (Lindner et al. 1998). Eine verminderte Expression des ER α

kann zu koronaren Herzerkrankungen führen (Losordo et al. 1994). Im Knochen spielt der ER β eine wichtige Rolle, da über ihn das Verschließen der Epiphysenfuge reguliert wird (Simm et al. 2008). Generell modulieren Estrogene über beide Rezeptoren Resorption und Einbau von Calcium in den Knochen und fördern die Knochenreifung (Balasch 2003).

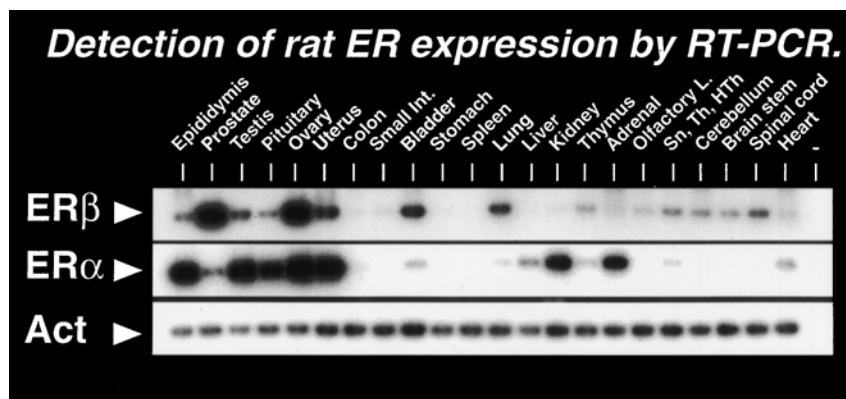


Abb. 4 Gewebeverteilung von ER α und β mRNA in der Ratte (Kuiper et al. 1997)

1.2.6 Interaktion zwischen Estrogenrezeptor α und β

In Organen mit reproduktiver Funktion wie Mamma, Ovarien oder Uterus sind die Estrogenrezeptoren zahlreich vertreten. In diesen Zielorganen sind die Rezeptoren α und β die Mediatoren für die Estrogen-abhängige Zellentwicklung, -proliferation und -differenzierung. Proliferative Effekte werden dabei insbesondere über den ER α vermittelt (Gustafsson 1999; Katzenellenbogen 2000; Diel et al. 2002a; Koehler et al. 2005) - der ER β antagonisiert hingegen diese Wirkung (Pettersson et al. 2000; Lindberg et al. 2003). Die beiden Rezeptoren spielen in der transkriptionellen Regulation somit eine gegensätzliche Rolle. Besonders deutlich zeigt sich dieser Effekt in Nagerstudien mit ER β - Knock out -Tieren: Solche Tiere weisen stark proliferierende Zellen auf, teilweise begleitet von großen Variationen in der Zellkerngröße und vielschichtigen Epithelzellen (Gustafsson 1999; Couse and Korach 2004; Gould et al. 2007). In Brustkrebszellen, die noch beide Rezeptorsubtypen exprimieren, ist die ER α -vermittelte proliferative Wirkung geringer (Jarvinen et al. 2000; Roger et al. 2001; Helguero et al. 2005; Powell and Xu 2008).

Ferner ist die biologische Aggressivität eines ER β -positiven Tumors geringer als bei solchen, die nur den ER α exprimieren, und die Prognose daher günstiger (Omoto et al. 2001). Möglicherweise kann der ER β in gesunden Zellen seine negative, regulatorische Funktion über die Bildung von Rezeptor-Heterodimeren mit dem ER α ausüben (Pettersson et al. 2000). Das Verhältnis von ER α und ER β kann somit für die weitere Entwicklung einer Estrogen-abhängigen Krebserkrankung relevant sein (Gustafsson 1999). Im Colon - hier ist der ER β die dominante Rezeptorform - wurde in Tumoren eine verminderte Proteinexpression des ER β bis hin zum kompletten Verlust des Rezeptorsubtyps beobachtet (Foley et al. 2000; Konstantinopoulos et al. 2003; Jassam et al. 2005; Castiglione et al. 2008). Daraus resultieren Hyperproliferation, Differenzierungsverluste und verringerte Apoptose in den Tumoren (Campbell-Thompson et al. 2001; Wada-Hiraike et al. 2006).

1.2.7 Liganden der Estrogenrezeptoren

Der wirksamste, natürliche Ligand der Estrogenrezeptoren ist das 17 β -Estradiol (E2). Beide Rezeptoren besitzen eine ähnlich hohe Affinität zu Estradiol (Kuiper et al. 1997; Diel 2002a). Neben Estradiol binden auch die natürlichen Liganden Estron und Estriol an die Estrogenrezeptoren. Grundlegend für die Bindung an die Rezeptoren ist die sehr ähnliche Struktur der drei Liganden (s. Abb. 5). Der synthetische Agonist 17 α -Ethinylestradiol verfügt über eine Ethinylgruppe und ist daher auch oral wirksam (Fotherby 1996). Es existieren viele weitere Liganden, die die Wirkung von Estrogenen imitieren können, und als Agonisten wirken. Liganden, die bei Bindung an den Rezeptor Estrogenwirkungen hemmen, sind Antagonisten (Degen and Owens 2008).

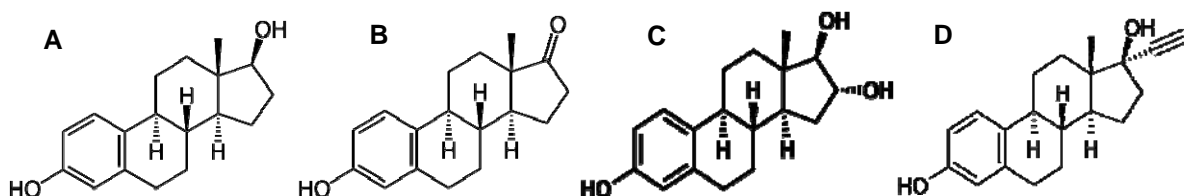


Abb. 5 Natürliche Liganden der ER (Agonisten): Estradiol (A), Estron (B), Estriol (C) und das synthetische Steroid Ethinylestradiol (D)

Ein Estrogenrezeptor-Ligand kann allerdings nicht immer eindeutig als Agonist oder Antagonist bezeichnet werden. So gibt es Substanzen, die in manchen Geweben agonistische, in anderen Geweben aber antagonistische Wirkungen entfalten (Gustafsson 1998). Diese Liganden werden als „selektive Estrogenrezeptor-Modulatoren“ (SERM) bezeichnet (Katzenellenbogen et al. 2000; Katzenellenbogen and Katzenellenbogen 2000; Diel 2002a; Frasor et al. 2004). Die gewebe selektive Wirkung ist von besonderem Nutzen: Einerseits können positive Eigenschaften von Estrogenen, wie z.B. der Erhalt der Knochendichte in und nach der Menopause, nachgeahmt werden. Auf der anderen Seite ist es essentiell, bei Estrogen-abhängigen Tumorerkrankungen, wie z.B. Mamma- oder Endometriumskarzinomen, stimulatorische Hormoneffekte zu unterbinden. Zwei der am besten charakterisierten SERMs sind Tamoxifen und Raloxifen: Tamoxifen (TAM) antagonisiert den stimulatorischen Effekt von Estradiol in Brustkrebszellen und ist schon lang zur Therapie bei Brustkrebspatientinnen zugelassen (Heel et al. 1978; Frasor et al. 2004). Allerdings zeigt TAM eine agonistische Aktivität in anderen Geweben wie dem Uterus (Love et al. 1991; Gielen et al. 2005). Daher besteht die Möglichkeit, dass der Gebrauch von TAM das Risiko von Sekundärerkrankungen, wie dem Endometriumskarzinom, erhöht (Assikis et al. 1996). Raloxifen (RAL) wirkt wie TAM ebenfalls als Antagonist in Mamma (Cummings et al. 1999) und Uterus, aber agonistisch im Knochen (Black et al. 1994).

Als reine Antagonisten sind ICI 182780, auch als Faslodex bekannt, und ZK 191703 anzusehen: Diese Substanzen binden mit hoher Affinität an beide ERs und wirken in allen Geweben antiestrogen. Weder *in vivo* noch *in vitro* sind für ICI agonistische Effekte nachgewiesen worden. ICI und ZK besitzen eine sehr lange, lipophile Seitenkette, die den Verschluss der Bindungstasche am ER durch Helix 12 verhindert (Hermenegildo and Cano 2000; Pike et al. 2001).

Mittlerweile wurden ER-subtypspezifische Agonisten synthetisiert, die primär an einen der beiden ER binden und ihn transaktivieren: Dazu gehören der ER α -Agonist 16 α -LE2 und der ER β -Agonist 8 β -VE2. Ihnen ist eine Phenolgruppe gemein, die für die Aktivierung des Rezeptors notwendig ist (Hillisch et al. 2004, Harris 2007).

Phytoestrogene, zu denen Flavonoide, Coumestane und Lignane gehören, können ebenfalls an Estrogenrezeptoren binden. Phytoestrogene verfügen, wie auch

Estrogene, über zwei Hydroxylgruppen sowie einen Phenolring – wichtige Strukturen für eine Bindung an die Estrogenrezeptoren (Limer and Speirs 2004). Phytoestrogene können – je nach Kontext – agonistische und antagonistische Wirkungen entfalten (Nilsson et al. 2001). Insbesondere dem Isoflavonoid Genistein wurden gesundheitsfördernde Effekte zugesprochen, wie verminderte Proliferation bei Mammakarzinomen (Lamartiniere et al. 1995), Erhalt der Knochendichte bei vermindertem Estrogen-Status (Hertrampf et al. 2007), antiproliferative Effekte sowie antiinflammatorische Eigenschaften (Verdrengh et al. 2003). Auch eine verminderte Colonkarzinom-Inzidenz in Personen mit hoher Aufnahme an Genistein und weiteren Isoflavonen wird diskutiert (Chen et al. 2005; Adlercreutz and Mazur 1997).

Das Schwermetall Cadmium ist ein chemisches Element, das in Verbindungen immer als zweiwertiges Kation vorliegt. Es unterscheidet sich damit grundlegend von den oben genannten Steroidestrogenen, synthetischen Agonisten oder Phytoestrogenen, die gewisse strukturelle Gemeinsamkeiten zeigen. Wie in Kapitel 1.1.4 ausgeführt, können Cadmium-Ionen dennoch estrogenartig wirken. Cadmium wird daher als Metalloestrogen bezeichnet, und auch als potentieller endokriner Disruptor angesehen (Degen 2004).

1.3 Zielsetzung

Wie in Kapitel 1.1.1 dargestellt, ist die Bevölkerung dem Schwermetall Cadmium über kontaminierte Lebensmittel oder Trinkwasser ausgesetzt, wobei Grenzwertsetzungen (z.B. ein TWI) die orale Exposition gering halten sollen. Cadmium reichert sich nach Resorption vor allem in Leber und Niere an und besitzt eine lange Halbwertszeit im Organismus. Neben der schon seit langem bekannten Toxizität für Niere und weitere Organe wird Cadmium inzwischen auch als Metalloestrogen und potentieller endokriner Disruptor betrachtet. Die vorliegende Arbeit untersucht und charakterisiert estrogenartige Wirkungen von Cadmium *in vivo* und *in vitro*.

Ziel war es, folgende Fragestellungen zu bearbeiten:

1. Wie verteilt sich Cadmium im Organismus von Ratten nach intraperitonealer (*i.p.*) und nach oraler Applikation? Welche Pfad- und Dosis-abhängigen Unterschiede findet man für die Cadmium-Konzentrationen in Zielorganen für toxische und für hormonelle Wirkungen?
2. Wie stark estrogen wirkt Cadmium in Abhängigkeit vom Expositionspfad? Welche Effekte induziert Cadmium im Uterus, einem klassischen Estrogen-regulierten Zielorgan? Treten auch im Gastrointestinaltrakt, einem Gewebe, das Estrogenrezeptoren exprimiert und das nach oraler Aufnahme dem Metall exponiert ist, hormonartige Cd-Effekte auf?
3. Welche Effekte induziert Cadmium *in vitro* in Zellen aus klassisch Estrogen-regulierten Geweben wie Mamma und in Zelllinien des Gastrointestinaltrakts?

Die Untersuchung der Fragestellungen erfolgte einerseits *in vivo* am Modell der ovariectomierten Ratte (OVX). Zur Abschätzung der hormonellen Aktivität wurden Wistar-Ratten sowohl intraperitoneal als auch oral *per gavage* (3 Tage) und via Trinkwasser (4 Wochen) mit abgestuften Dosen an Cadmium behandelt. Alle Methoden und Ergebnisse zur *in vivo* Untersuchung estrogenener Effekte auf histologischer und molekularer Ebene sind in den Publikationen in Kapitel 2 dargestellt.

In Vitro wurde die estrogenere Aktivität von Cadmium anhand der Expression

Estrogen-sensitiver Markergene in der Brustkrebszelllinie MCF-7 und in den Darmkrebszelllinien HT-29 und HCT-116 untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der vorliegenden Arbeit beschrieben.

2. Publikationen

Die *in vivo* Studien mit Cadmium in ovariectomierten Ratten sind ausführlich in zwei Originalarbeiten dargestellt, die den Inhalt der vorliegenden Dissertation maßgeblich vervollständigen.

In der ersten Veröffentlichung „*Dose- and route-dependent hormonal activity of the metalloestrogen cadmium in the rat uterus*“ (Kapitel 2.1) wird die hormonelle Potenz von Cadmium in ovariectomierten Ratten charakterisiert und zwar nach einmaliger intraperitonealer Injektion sowie nach oraler Kurz- und Langzeit-Applikation *per gavage* bzw. über das Trinkwasser. In dieser Arbeit steht die Untersuchung des Uterus als klassisch Estrogen-sensitivem Gewebe im Vordergrund. Estrogenartige Wirkungen wurden mittels Bestimmung des Uterusfeuchtgewichtes, der Uterusepithelhöhe sowie der Modulation des Estrogen-responsiven Gens Complement Component 3 (C3) ermittelt. Die als Endpunkte für Estrogenität im uterotrophen Assay etablierten Parameter zeigten in Abhängigkeit von der verabreichten Dosis und dem Applikationsweg folgende Veränderungen: Intraperitoneale Injektion von Cadmium erhöhte signifikant das Uterusfeuchtgewicht, die Uterusepithelhöhe und die Genexpression von C3. Die orale Gabe von Cadmium induzierte ebenfalls signifikant C3, hatte aber keinen Effekt auf das Uterusgewicht und die Uterusepithelhöhe.

In dieser und in der zweiten Publikation sind auch die pfadabhängige Verteilung von Cadmium im Blut sowie den Organen Leber, Niere, Uterus und Dünndarm der Ratten ermittelt und dargestellt worden, die in die Interpretation von Daten zur Wirkstärke einbezogen worden sind.

Die zweite Publikation mit dem Titel „*Investigations on the estrogenic activity of the metalloestrogen cadmium in the rat intestine*“ (Kapitel 2.2) beschreibt weitere Untersuchungen zur biologischen Aktivität von Cadmium im Dünndarm, in denen die Expression der Estrogen-regulierten Gene pS2/TFF1 (trefoil factor 1), VDR (Vitamin-D-Rezeptor) und der Estrogenrezeptoren α und β zur Abschätzung einer hormonellen Wirksamkeit herangezogen wurde. Zusätzlich sind proliferative Auswirkungen nach Cadmium-Applikation im Darm anhand von RealTime RT-PCR und eines immunhistochemischen Nachweises von PCNA (proliferation cell nuclear antigen) untersucht sowie zelluläre Wirkungen von Cadmium auf die Expression von

Metallothionein (MT) analysiert worden. Die Daten dieser Studie zeigen zum ersten Mal, dass nach oraler Administration von Cadmium die Estrogen-responsiven Gene pS2/TFF1 und ER β im Dünndarm signifikant herunter reguliert werden. Das Schwermetall induzierte MT in Niere und Darm signifikant nach intraperitonealer Injektion und noch stärker nach oraler Behandlung. PCNA wurde nach Langzeit-Administration von Cadmium und Ethinylestradiol vermindert exprimiert.

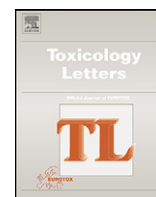
Im Abschnitt 5.1 werden diese neuen Befunde und ihre Bedeutung im Kontext anderer Arbeiten diskutiert.

2.1 Publikation 1: Dose- and route-dependent hormonal activity of the metalloestrogen cadmium in the rat uterus



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxlet

Dose- and route-dependent hormonal activity of the metalloestrogen cadmium in the rat uterus[☆]

Nicola Höfer^{a,b}, Patrick Diel^a, Jürgen Wittsiepe^c, Michael Wilhelm^c, Gisela H. Degen^{b,*}

^a 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

^b IfAdo, Leibniz Research Centre for Working Environment and Human Factors at the TU Dortmund, Ardeystr. 67, D-44139 Dortmund, Germany

^c Department of Hygiene, Social- and Environmental Medicine, Ruhr-University Bochum, Universitätsstr. 150, D-44801 Bochum, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 June 2009

Received in revised form 14 August 2009

Accepted 16 August 2009

Available online 22 August 2009

Keywords:

Cadmium

Endocrine disruption

Estrogenic potency

Route of exposure

ABSTRACT

The toxic heavy metal cadmium (Cd) is regarded as a potential endocrine disruptor, since Cd exerts estrogen-like activity *in vitro* and can elicit some typical estrogenic responses in rodents upon intraperitoneal (*i.p.*) injection. But estrogenic effects have not been documented *in vivo* with other more relevant routes of exposure, although it is known that Cd absorption and distribution in the body is strongly affected by the application route. Therefore, we investigated its hormonal activity in ovariectomized Wistar rats after oral administration of CdCl₂ (0.05–4 mg/kg b.w. on 3 days *by gavage* and 0.4–9 mg/kg b.w. for 4 weeks in drinking water) in comparison with *i.p.* injection of CdCl₂ (0.00005–2 mg/kg b.w.). Uterus wet weight, height of uterine epithelium, and modulation of estrogen-regulated gene expression, *i.e.* uterine complement component 3 (C3), were determined, and also Cd-levels in uterus and liver were measured by atomic absorption spectrometry. The analysis revealed pronounced differences in Cd tissue levels and hormonal potency for the two routes of administration: a single *i.p.* injection of Cd increased dose-dependently uterine wet weight and thickness of the uterine epithelium. Interestingly, C3 mRNA expression in the uterus was down regulated at low doses of CdCl₂ (0.00005–0.05 mg/kg b.w.), but strongly stimulated at the highest dose of 2 mg/kg b.w. Other than *i.p.* injection, oral treatment with Cd, *by gavage* or in drinking water, did neither increase uterine wet weights nor epithelial thickness. But, both 3-day- and 4-week oral Cd administration resulted in a dose-dependent stimulation of C3 expression in the uterus, significant at and above 0.5 mg/kg b.w. In summary, our data demonstrate an estrogenic effect in the uterus upon *i.p.* injection of Cd, but considerably lower hormonal potency with oral administration: short and long-term oral treatment with Cd did not affect uterus weight or histology, whilst on the molecular level, an induction of estrogen sensitive uterine gene expression was observed, albeit at dose levels far exceeding those of dietary exposure in humans.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Cadmium is an important environmental and industrial pollutant, and one of the most toxic heavy metals (IPCS, 2007; Järup and Åkesson, 2009). Cadmium can adversely affect human health, primarily acting on kidneys, but also on bone and lung (DFG, 2004; Godt et al., 2006; Bernard, 2008; Nordberg, 2009). In addition to its well-known toxic effects, cadmium is now

also regarded as potential endocrine disruptor (Takiguchi and Yoshihara, 2006; Iavicoli et al., 2009). The exact mechanisms by which cadmium may interfere with the endocrine system remain to be elucidated. But, *in vitro* studies have shown that it can activate the estrogen-receptor α (ER α) *via* high-affinity interaction with the hormone-binding domain (Stoica et al., 2000), and cadmium triggered estrogenic effects in MCF-7 breast cancer cells that are typical for 17 β -estradiol, *e.g.* increases in progesterone receptor mRNA levels (Garcia-Morales et al., 1994), and stimulation of cell proliferation (Brama et al., 2007). Studies in rats and mice have shown that intraperitoneal (*i.p.*) injection of cadmium (CdCl₂) increased uterine wet weights and promoted the growth and development of mammary glands (Johnson et al., 2003; Alonso-González et al., 2007). But, so far estrogenic effects have not been documented *in vivo* with other more relevant routes of exposure, although it is known that Cd absorption and distribution in the body is strongly affected by the application route

Abbreviations: AAS, atomic absorption spectrometry; b.w., body weight; C3, complement component 3; CdCl₂, cadmium chloride; E₂, 17 β -estradiol; EE, 17 α -ethinylestradiol; ER α / β , estrogen-receptor alpha/beta; *i.p.*, intraperitoneal; OVX, ovariectomized; PTWI, provisional tolerable weekly intake.

[☆] Part of this work has been presented at the 50th Conference of the DGPT: Höfer et al. (2009) Naunyn-Schiedeberg's Arch. Pharm. Toxicol. 379 (Suppl. 1), 70 (#344).

* Corresponding author. Tel.: +49 0 231 1084 351; fax: +49 0 231 1084 403.

E-mail address: degen@ifado.de (G.H. Degen).

(WHO/IPCS, 1992; Elsenhans et al., 1994b; Järup and Åkesson, 2009).

It may be argued that *i.p.* administration is a worst case scenario resembling cadmium exposure by inhalation of tobacco smoke or in occupational settings with exposure to Cd-containing fumes. But, for non-smokers in the general population, oral exposure to cadmium with food and beverages is more important. The dietary daily cadmium intake assessed in several countries, e.g. in diet duplicate studies (ATSDR, 2008; Ryan et al., 2001; Wilhelm et al., 2002; Ysart et al., 2004), can be rather high compared to the provisional tolerable weekly intake (PTWI) of 7 µg/kg b.w. per week as still recommended by JECFA (FAO/WHO, 2006).

This study in ovariectomized Wistar rats investigated estrogenic activity of cadmium chloride (CdCl₂) after oral short- and long-term exposure at several dose levels, and also after an *i.p.* injection, since this route of administration was used in previous rodent studies with cadmium (Johnson et al., 2003; Alonso-González et al., 2007; Zhang et al., 2008). As in other uterotrophic assays with xenoestrogens, the uterine wet weights, height of uterine epithelium and expression of estrogen-regulated complement component C3 served as biomarkers for estrogenicity (Diel et al., 2002, 2004; Schmidt et al., 2006). To better understand route- and dose-dependent differences in the estrogenic activity of cadmium, its concentrations were analyzed by atomic absorption spectrometry (Wilhelm et al., 1995, 2002) in blood, uterus and liver of all groups.

2. Materials and methods

2.1. Animals and experimental treatments

Female Wistar rats (101–125 g) were obtained from Janvier (Le-Genest St-Isle, France) and acclimatized for 1 week before they were ovariectomized (OVX). Then 14 days after the endogenous hormonal decline the animals were treated with the test compounds (see below). 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, Soest, Germany).

The OVX rats were randomly allocated to treatment or vehicle groups (*i.p.* and drinking water experiment: *n* = 6 animals per group; gavage experiment: *n* = 8 animals per group). The doses of CdCl₂ were based on a pilot study with gavage and *i.p.* administration; those of 17β-estradiol (E₂) and 17α-ethinylestradiol (EE) were based on previous experiments with E₂ and EE as reference estrogens (Diel et al., 2002, 2004). The compounds were purchased from Sigma–Aldrich (Taufkirchen, Germany).

2.1.1. Uterotrophic assay—intraperitoneal injection

CdCl₂ was dissolved in sterile water to achieve doses of 0.00005 mg/kg, 0.0005 mg/kg, 0.005 mg/kg, 0.05 mg/kg, 0.5 mg/kg, or 2 mg/kg body weight (b.w.) in a total application volume of 1 ml/kg b.w. Animals of the negative control group (OVX) were injected with the vehicle water. E₂ was dissolved in propanediol/ethanol (80:20, v:v) and injected at a dose level of 0.5 mg/kg b.w.

2.1.2. Uterotrophic assay—short-term oral administration

CdCl₂ was dissolved in tap water and administered by gavage at doses of 0.05 mg/kg, 0.5 mg/kg, 2 mg/kg, or 4 mg/kg b.w. on 3 consecutive days. OVX controls received the vehicle water. The reference estrogen (EE dissolved in propanediol/ethanol, 80:20) was given at a dose of 0.1 mg/kg b.w. on 3 days by gavage.

2.1.3. Subchronic (28 days) oral administration with 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 drinking water at concentrations of 5 mg per liter, 50 mg per liter or 150 mg per liter (*i.e.* 5 ppm, 50 ppm, or 150 ppm). The OVX group received tap water. Since rats consumed about 20 ml water per day this corresponds to CdCl₂ dose levels of 0.4 mg/kg, 4 mg/kg, or 9 mg/kg b.w. × day and 0.08 mg/kg b.w. × day for EE.

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.

2.2. Tissue collection and preparation

At the end of the experiments body weights of the rats were determined and the animals were sacrificed by decapitation. Blood samples were collected and frozen in liquid nitrogen. The wet weights of freshly excised liver and uterus were determined, and pieces of liver and uterus were snap-frozen for mRNA preparations and analysis

(see below). In addition, a piece of uterus was fixed in 4% formaldehyde and later embedded in paraffin for histological analysis.

2.3. Histological analysis

Seven micrometer tissue sections of paraffin-embedded uterine sections were mounted on slides precoated with polylysine (Menzel Gläser, 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 Diel et al. (2002, 2004).

2.4. RNA isolation and real-time RT-PCR

RNA was isolated from frozen tissues by the method of Chomczynski and Sacchi (1987). TRIzol® (Invitrogen), a solution of phenol and guanidine for the isolation of total RNA from cells and tissues, was used followed by first-strand cDNA synthesis with SuperScript® Kit (Invitrogen). Real-time RT-PCR was performed in a MX3005P thermal cycler (Stratagene) or in 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'-CGTACAGCCCATGATCCG-3' and the reverse 5'-CTGTTTCATCTGTTCCAGTCC-3' and for complement C3 we used forward primer 5'-CAGCCCGCAGAGTCCAGTAGTC-3' and as reverse primer 5'-CCATCTCTTTCCATCAACTGC-3'. The data were relatively normalized for 1A expression via the delta-delta method of Pfaffl (2001), whereas subunit 1A of cytochrome c oxidase served as reference gene.

2.5. Cadmium measurements

The Cd-content in tissue and blood samples was analyzed by atomic absorption spectrometry (AAS) after appropriate sample preparation. Blood samples were diluted 1:4 with HNO₃ (65%, puriss. p.a., Fluka, Buchs, Switzerland) to decompose the proteins. After centrifugation for 5 min with 3 g the supernatant (or an adequate dilution) was taken for the Cd measurements by atomic absorption spectrometry. The detection limit was 0.4 µg/L reference material ClinChek Level 1 #8840 Lot 545 (Recipe, Munich, Germany) was used for quality control.

Tissues were dried in a Speed Vac RC 1022 Jouan (Thermo Scientific) for 4 h at 60 °C. The lyophilized organ samples (uterus about 25–120 mg, liver about 220–620 mg and kidney about 80–190 mg) were weighed in 90 ml PTFE-tubes. After addition of 3.0 ml HNO₃ (65%, puriss. p.a., Fluka, Buchs, Switzerland), the samples were digested with a high performance microwave system (MLS 1200 mega from MLS GmbH, Leutkirch, Germany) using the following temperature program: 200 W (2 min), 0 W (1 min), 300 W (2 min), 0 W (1 min), 530 W (2 min), 0 W (1 min), 680 W (2 min). The digested sample was filled up to 5.0 ml with bidistilled water in a polypropylene tube. This solution or an adequate dilution of it was used for determination of cadmium by atomic absorption spectrometry. The detection limit was 5.0 µg/kg dry weight when using 100 mg lyophilisate. 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.

2.6. Atomic absorption spectrometry

Concentrations of Cd were determined by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS) using a PerkinElmer model SIMAA 6000 or SIMAA 6100 spectrometer equipped with an autosampler AS-72 or AS-800, respectively. Matrix modifiers were 0.1% Mg(NO₃)₂ and 0.15% Pd(NO₃)₂ (Merck, Darmstadt, Germany). Instrument conditions were: electrodeless discharge lamp at 450 mA, wavelength 228.8 nm, spectral slit width 0.7 nm, transverse-heated graphite tubes with integrated platform, gas flow rate 250 ml/min and 0 ml/min during atomization, Zeeman background correction and 20 µL sample volume. The temperature program (temperature [°C], time ramp [s]/hold [s]) was: 110, 1/15; 130, 10/40; 700, 10/15; 1800 (atomization), 0/6; 2450, 1/3. Calibration standards ranged between 0.1 and 2.5 µg Cd/L.

2.7. Statistical analysis

Data on body-, liver-, uterine weight, uterine epithelium height and cadmium content in blood and organs were expressed as mean ± SD. We used two-way analysis of variance followed by pair-wise comparison of selected means with the Mann–Whitney *U*-test. Differences in uterine 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.

3. Results

The estrogenic response to cadmium and reference substances was assessed in two 3-day uterotrophic assays (with intraperitoneal and oral administration) and after subchronic oral Cd

administration by drinking water. In the first experiment ovariectomized (OVX) female Wistar rats received a single intraperitoneal injection of CdCl₂ at doses between 0.00005 and 2 mg/kg b.w. For the second bioassay, CdCl₂ was administered by gavage at doses of 0.05, 0.5, 2, and 4 mg/kg b.w. per day for 3 days. In the third bioassay CdCl₂ was given for 4 weeks in drinking water (5, 50 and 150 ppm) which provided daily oral doses of 0.4, 4 and 9 mg/kg b.w. At termination of all three experiments the body and organ (liver, kidney) weights were determined as indicators of cadmium toxicity, and uteri were excised for the assessment of estrogenic/uterotrophic effects.

Body and liver wet weights were not affected in the short-term bioassays with *i.p.* or gavage administration of cadmium (Table 1). But, in the drinking water experiment, rats that had received the top dose of 9 mg/kg b.w. per day showed a significant reduction in liver wet weights. Kidney weights did not show remarkable changes compared to the OVX controls, except for a significant increase in the 28-day drinking water group at the top dose (Table 1) and slight elevations in groups treated with steroid estrogens. In the estrogen treated reference groups, liver weights were not affected, but body weights were reduced by 10%, 8.4% and 16%, respectively (Table 1).

Uterine wet weights were increased after *i.p.* injection of CdCl₂ at the highest doses of 0.5 and 2 mg/kg b.w. per day, with a 1.2- and 1.4-fold increase, respectively (Fig. 1A), and an increase at the lowest dose which did not reach statistical significance, although 2 of 6 animals had uterus wet weights (326.7 and 364.4 mg) higher than the control. By contrast, oral cadmium administration by gavage for 3 days (at doses which were effective in the *i.p.* experiment) did not elicit an uterotrophic response (Fig. 1B). Also long-term exposure to cadmium with drinking water did not result in notable changes of uterine wet weights (Fig. 1C). As expected, strong uterotrophic responses were seen in all three reference-estrogen treated groups.

Histochemical analysis of uterine tissues was performed since the height of uterine epithelium is an additional well established endpoint for estrogenicity (Diel et al., 2002). Representative uterine sections from the *i.p.* and gavage experiment are shown in Fig. 2, along with epithelial heights measurements. Single *i.p.* administration resulted in an increased height of uterine epithelium, significant at cadmium doses of 0.05 and 2 mg/kg b.w. (Fig. 2A

and B). In contrast, oral short-term administration of similar CdCl₂ doses (0.5 and 4 mg/kg b.w.) did not alter the height of uterine epithelium (Fig. 2C and D).

Furthermore, mRNA expression of complement component 3 (C3) in the uterus was determined by real-time RT-PCR, since uterine C3 expression is regulated by estrogens (Sundstrom et al., 1989). The results from this analysis are depicted in Fig. 3. Injection of single CdCl₂ doses between 0.00005 and 2 mg/kg b.w. resulted in a u-shaped dose-effect curve for C3 expression (Fig. 3A). Interestingly, low doses of 0.00005–0.05 CdCl₂/kg b.w. led to a down-regulation whereas injection of 2 mg CdCl₂/kg b.w. strongly increased the expression of C3 (more than 500-fold). Oral short-term cadmium administration stimulated C3 expression, with significant inductions (about 55- and 280-fold) at 0.5 and 4 mg/kg b.w. (Fig. 3B). Also oral long-term exposure to drinking water with 50 ppm CdCl₂ (3.93 mg CdCl₂/kg b.w. × d) resulted in a notable (13-fold) induction of C3 expression (Fig. 3C), and smaller increases at the highest dose level. This exposure condition was associated with some toxicity based on liver weight decreases and increased kidney weight (Table 1).

To investigate the distribution of the heavy metal after *i.p.* and oral short-/long-term administration, cadmium content in blood (except for long-term), liver and uterus was measured by atomic absorption spectrometry. Cadmium blood levels in animals treated intraperitoneally with 0.00005–0.005 mg CdCl₂/kg b.w. did not exceed the mean levels (0.4 µg/L) of OVX and E₂ animals (Fig. 4A); blood levels of rats treated with higher *i.p.* doses (0.05, 0.5 and 2 mg CdCl₂/kg b.w.) increased dose-dependently, with mean values of 2.1, 38.3 and 110.2 µg Cd/L (Fig. 4A). Gavage administration of 0.05 mg/kg b.w. led to Cd-levels of about 0.4 µg/L, not significantly different from cadmium blood levels of OVX and EE controls (Fig. 4B) whilst *per os* administration of higher doses (0.5, 2 and 4 mg CdCl₂/kg b.w.) resulted in elevated mean values of 0.9, 3.2 and 6.5 µg Cd/L blood, respectively. Thus, not only doses, but, also the route of administration strongly affected cadmium levels in the blood (Figs. 4A and B). For example, rats treated *i.p.* with a single dose of 2 mg CdCl₂/kg b.w. showed 33-fold higher cadmium blood levels than animals after *per os* administration of this dose by gavage on 3 days.

Table 1

Body, liver and kidney weights after a single *i.p.* injection of CdCl₂ or E₂ and after oral short-term (3 days, by gavage) and long-term (4 weeks, by drinking water) administration of CdCl₂ or EE. Mean values ± 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.

Application	Dose (mg/kg b.w.)	Body weights		Liver weights		Kidney weights	
		g	S.D.	g/kg b.w.	S.D.	g/kg b.w.	S.D.
<i>i.p.</i>	OVX	259.8	±15.9	45.0	±2.9	3.7	±0.2
	Cd 0.00005	246.8	±8.7	43.4	±4.8	3.4	±0.9
	Cd 0.0005	250.0	±12.8	44.2	±3.1	3.9	±0.2
	Cd 0.005	242.7	±14.9	43.0	±1.7	3.9	±0.2
	Cd 0.05	250.0	±23.5	45.5	±2.3	3.9	±0.5
	Cd 0.5	247.5	±20.5	46.7	±3.0	3.8	±0.4
	Cd 2	239.2	±16.8	46.4	±4.1	3.9	±0.4
	E ₂ 0.5	234.8*	±16.7	44.7	±4.4	4.1*	±0.2
Gavage	OVX	229.1	±8.2	47.4	±2.4	4.0	±0.3
	Cd 0.05	230.2	±12.3	46.6	±3.1	4.0	±0.3
	Cd 0.5	221.9	±6.9	48.1	±2.9	4.0	±0.3
	Cd 2	225.5	±18.8	45.5	±2.8	4.0	±0.3
	Cd 4	228.3	±12.8	44.3	±5.5	4.1	±0.2
	EE 0.1	209.9**	±13.1	46.7	±2.8	4.1	±0.3
Drinking water	OVX	337.4	±23.6	35.6	±1.8	3.2	±0.1
	Cd 0.4	319.7	±18.7	34.0	±2.3	n.d.	n.d.
	Cd 4	341.0	±16.3	35.6	±2.3	n.d.	n.d.
	Cd 9	371.3	±23.1	28.2**	±3.0	5.1**	±0.3
	EE 0.08	283.7*	±22.9	30.8	±5.0	3.7*	±0.7

n.d. = not determined.

* *P* ≤ 0.05, significantly different from the control group (OVX), Mann–Whitney *U*-test.

** *P* ≤ 0.01, significantly different from the control group (OVX), Mann–Whitney *U*-test.

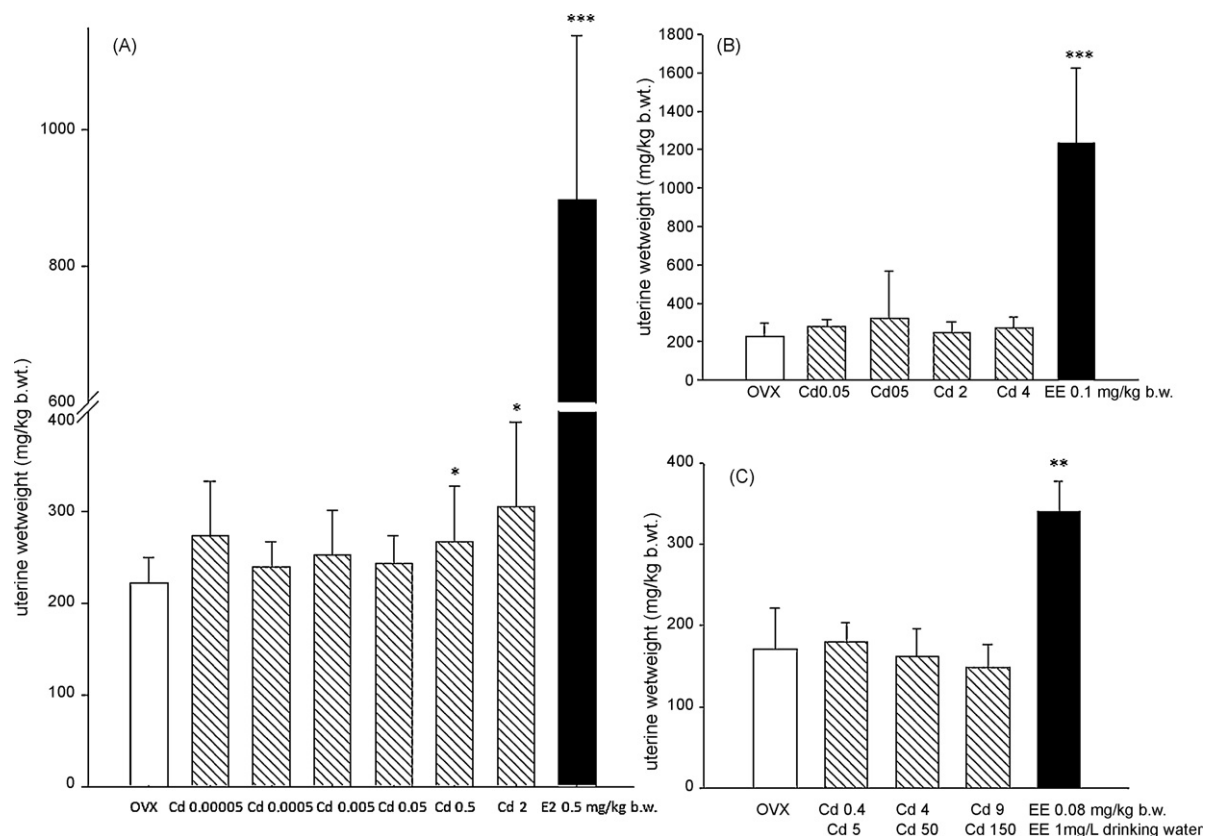


Fig. 1. Uterus weights (mg/kg b.w.) after a single *i.p.* injection of CdCl₂ and E2 (A) and after oral short-term (3 days, by gavage, B) and long-term (4 weeks, by drinking water, C) administration of CdCl₂ or EE. Mean values \pm S.D. are given for $n=6$ animals per dose group in the *i.p.* and drinking water experiment and for $n=8$ animals in the gavage experiment. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ significantly different from the control group (OVX), Mann–Whitney *U*-test.

Pronounced route-dependent differences in cadmium content were also found in other organs: in liver of rats with *i.p.* injection of CdCl₂ (up to 2 mg/kg b.w.), the concentrations ranged between 19 and 42014 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dry weight (Fig. 5A). A dose-dependent increase in liver Cd-content was also seen after 3-day gavage administration: here doses of 0.05–4 mg/kg b.w. led to concentrations between 25 and 3965 $\mu\text{g}/\text{kg}$ liver dry weight. The subchronic administration of 0.4–9 mg CdCl₂/kg b.w. per day by drinking water resulted in Cd-levels clearly exceeding those of the control groups (OVX and EE), but somewhat lower than the levels measured in liver after short-term gavage administration of similar Cd-doses (Fig. 5B and C).

The analysis of Cd-concentrations in uteri revealed by and large the same picture as in liver although in higher dose groups, the tissue values (compared on a dry weight) in uterus were much lower than in liver. The data (Fig. 6) demonstrate an internal exposure of the estrogen target organ uterus to Cd that is both dose- and route-dependent. Again, single *i.p.* injection of 0.00005–2 mg CdCl₂/kg b.w. resulted in a clear dose-dependent increase of heavy metal concentrations (ranging from 56 to 18000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ uterine dry weight). Elevated tissue concentrations were also detected upon gavage administration or subchronic exposure to CdCl₂ by drinking water (at daily doses between 0.4 and 9 mg/kg b.w.), but the levels (ranging from 17 to 180 μg Cd/kg uterine dry weight) were considerably lower after *per os* administration than upon *i.p.* injection (Fig. 6A–C). Remarkably, Cd-levels in the uteri of rats treated *i.p.* with 2 mg CdCl₂/kg b.w. were more than two orders of magnitude (>100-fold) higher than in animals after *per os* administration of this dose.

Taken together, both biological endpoints of estrogenicity (uterine wet weight, uterine epithelial height, C3 expression;

Figs. 1–3) and analysis of cadmium content in several organs (Figs. 4–6) displayed a strong dependency of the route of administration.

4. Discussion

The major aim of this study in female ovariectomized Wistar rats was to compare the estrogenic activity of cadmium after different routes of administration (*per os* and *i.p.*) for a range of dose levels. To obtain also indications of toxic effects of Cd in our experiments, body and liver weights were determined (Table 1). No significant changes were observed, with the exception of the highest dose level in the drinking water experiment (150 ppm Cd in water; *i.e.* 9 mg Cd/kg b.w. per day for 4 weeks) which led to a significant decrease in liver weight and a significant increase in kidney weight indicative of toxicity. Previously, clear evidence of kidney toxicity was found in rats of both sexes chronically exposed to Cd in drinking water (5, 12.6 and 31.5 ppm) and in male rats with up to 24 weeks exposure to cadmium in drinking water at 5 ppm or 50 ppm (Fingerle et al., 1982; Brzoska et al., 2003). In male rats exposed to 5 mg Cd/L, first symptoms of kidney injury were noted after 12 weeks. On exposure to 50 mg Cd/L damage to kidney was already evident after 6 weeks (Brzoska et al., 2003). Shorter (10 days) exposure to cadmium in drinking solutions containing 13–323 ppm resulted in dose-dependent decreases in body and liver weights in male Sprague–Dawley rats, yet, no significant compound-related effects in female rats except for lower liver weights (Borzelleca et al., 1989). Decreases in liver weights of male growing Wistar rats kept for 6 weeks on a diet with 6 ppm, 11 ppm or 24 ppm Cd (providing doses of 0.46, 1.07 and 1.97 mg/kg b.w. per day) were reported by Kozłowska et al. (1993). From other data, reviewed by WHO/IPCS

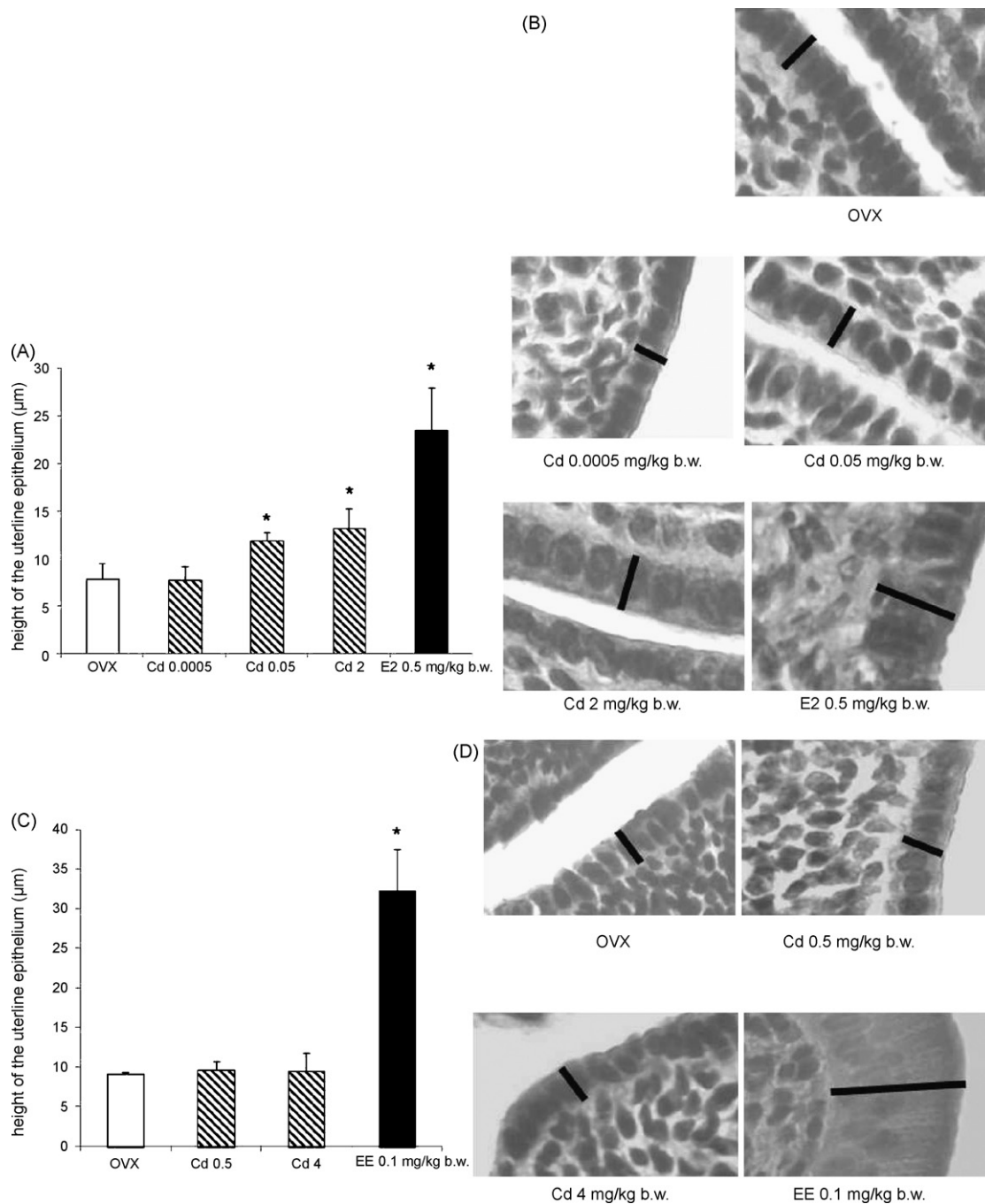


Fig. 2. Height of uterine epithelium (µm) after a single *i.p.* administration of 0.0005, 0.05 and 2 mg CdCl₂/kg b.w. or E₂ (A: quantitative determination of uterine epithelial height and B: representative pictures of sections), and after oral short-term administration of 0.5 and 4 mg CdCl₂/kg b.w. or EE (C: quantitative determination of uterine epithelial height and D: representative pictures of sections) (40×); black bars representing epithelial thickness; **P* ≤ 0.05, significantly different from the control group (OVX), Mann–Whitney *U*-test.

(1992), Nordberg (1998), and Vahter et al. (2007) it appears that Cd-toxicity is more pronounced in female than in male rats.

The uterotrophic assay is the most widely used test for the detection of estrogenic properties of chemicals (Owens and Ashby, 2002). This bioassay has been used in our lab for a number of studies on xeno- and phytoestrogens (Diel et al., 2000, 2001, 2002, 2004; Geis et al., 2005; Hertrampf et al., 2005; Schmidt et al., 2006). In these studies, estrogenic responses were characterized by uterus wet weight and additional histological and molecular parameters. This approach was now applied to investigate an estrogenic response to cadmium treatment by different administration routes. An *i.p.* injection of 0.5 and 2 mg CdCl₂/kg b.w. significantly increased the

uterine wet weight of OVX Wistar rats, about 1.2- and 1.4-fold, respectively, and also a notable increase at 0.0005 mg/kg b.w. (Fig. 1). Previously, Johnson et al. (2003) observed a 1.9-fold stimulation of the uterus weight in OVX Sprague–Dawley rats after *i.p.* injection of 0.005 mg CdCl₂/kg b.w. (no other doses were studied). In our experiments single *i.p.* injection of this dose did not result in a significant uterotrophic response, although 2 of 6 animals had uterus wet weights (326.7 and 364.4 mg/kg b.w.) higher than the controls (mean 231.4 mg/kg b.w.). Interestingly, also in the higher *i.p.* dose groups, not all animals showed a uterotrophic response: at 0.5 mg/kg and at 2 mg/kg clearly elevated uterus weights were noted in 4 of 6 animals. When average uterus weights of only the

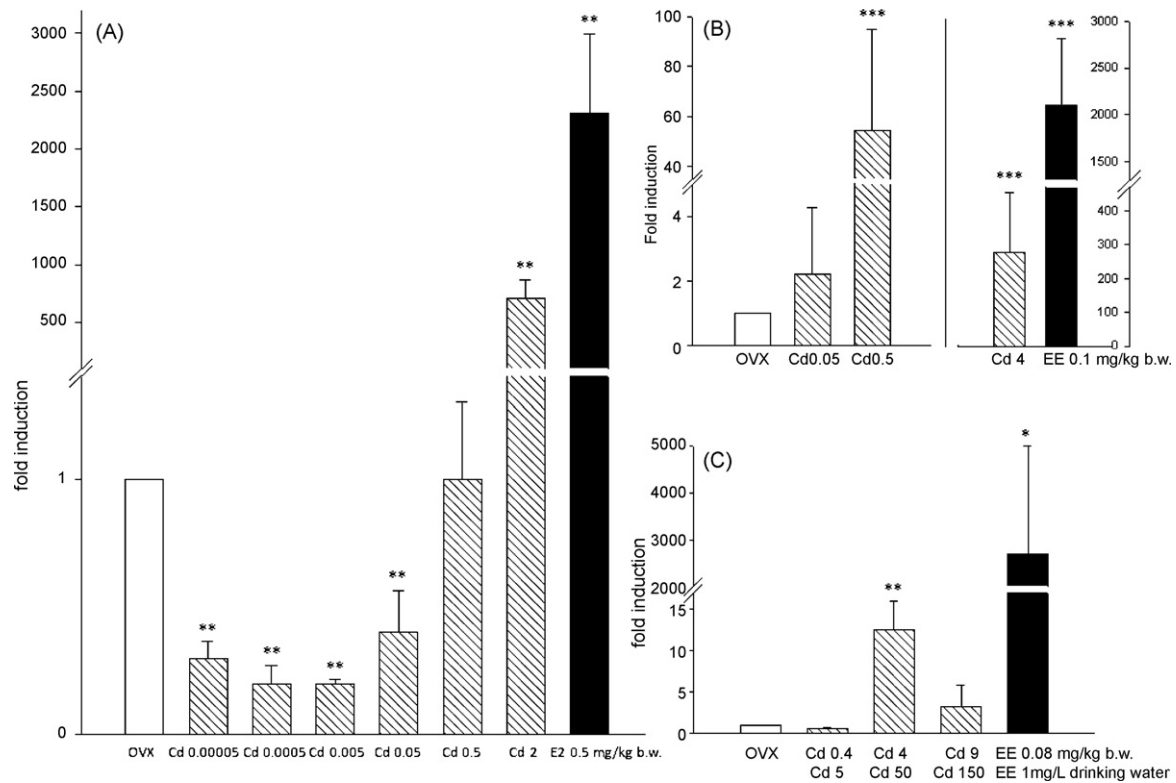


Fig. 3. Relative mRNA expression of C3 after a single *i.p.* injection of CdCl₂ or E₂ (A), and after oral short-term (3 days, by gavage, B) and long-term (4 weeks, by drinking water, C) administration of CdCl₂ or EE. Mean values ± S.D. are given for n = 6 animals per dose group in the *i.p.* and drinking water experiment and for n = 8 animals in the gavage experiment. *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001 significantly different from the control group (OVX), ANOVA.

“responders” are compared to those of OVX controls, the relative increase is 1.5- and 1.7-fold. Since Johnson et al. (2003) did not study other doses in SD rats, it is difficult to pinpoint whether this discordance is due to strain sensitivity or other differences in experimental design. Yet, in principle their data and ours show that Cd can elicit a uterotrophic response upon *i.p.* administration. This is also reflected in histological data that show a significant increase in uterine epithelium height after single *i.p.* injections of 0.05 and 2 mg CdCl₂/kg b.w. (Fig. 2A).

In contrast to *i.p.* administration, oral short- and long-term administration of cadmium does not result in a significant change of the uterine wet weight (Fig. 1). Also analysis of the uterine epithelium height revealed no changes in this parameter of estrogenicity upon dosing of 0.5 and 4 mg/kg b.w. CdCl₂ by gavage for 3 days

(Fig. 2). There is only one other published study with *per os* administration of Cd: OVX Sprague-Dawley rats exposed to drinking water with 5 ppm or 25 ppm (mg/kg) for 28 days showed no changes in the uterine weights (Pillet et al., 2006). This is in accord with the lack of uterotrophic responses in our drinking water study at even higher dose levels (50 and 150 ppm) in OVX Wistar rats (Fig. 1C).

In addition to uterine wet weight and height of the uterine epithelium, expression of the C3 gene was examined in the uterus of Cd-exposed rats. C3 protein is known to be one of the most sensitive markers for estrogen action in this target tissue (Sundstrom et al., 1989; Li et al., 2002). C3 is present in the luminal epithelial cells of the endometrium and its enhanced expression is an indirect, but very specific and sensitive parameter for epithelial cell proliferation. We investigated C3 expression in the uterus by real-

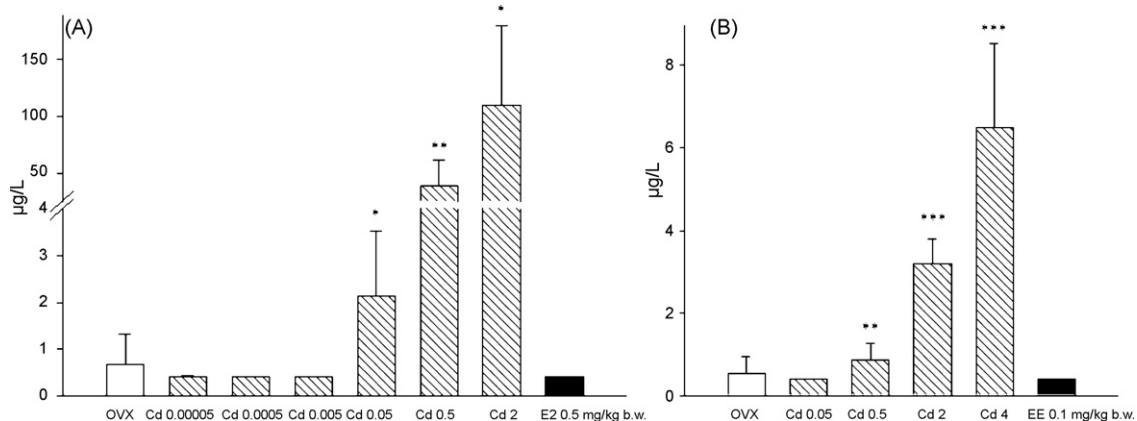


Fig. 4. Cadmium content in the blood (µg/L) after a single *i.p.* injection of CdCl₂ or E₂ (A), and after oral short-term (3 days) gavage administration (B) of CdCl₂ or EE. The detection limit was 0.4 µg/L. Please note the different scales of the y-axes. Mean values ± S.D. are given for n = 6 animals per dose group in the *i.p.* experiment, and for n = 8 animals in the gavage experiment. *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001, significantly different from the control group (OVX) by Mann-Whitney U-test.

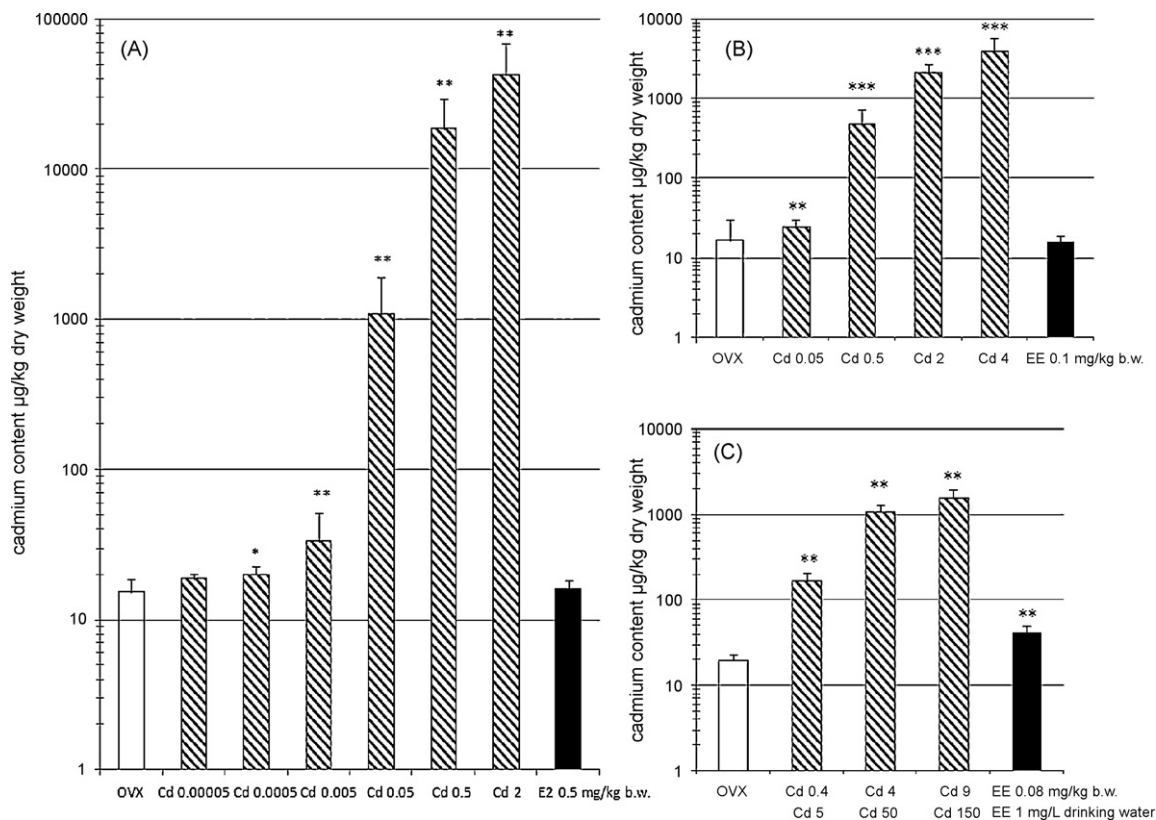


Fig. 5. Cadmium content ($\mu\text{g}/\text{kg}$ dry weight) in the liver after a single *i.p.* injection of CdCl₂ or E2 (A) and after oral short-term (3 days by gavage, B) and long-term (4 weeks by drinking water, C) administration of CdCl₂ or EE. Mean values \pm S.D. are given for $n=6$ animals per dose group in the *i.p.* and drinking water experiment and for $n=8$ animals in the gavage experiment. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, significantly different from the control group (OVX), Mann–Whitney *U*-test.

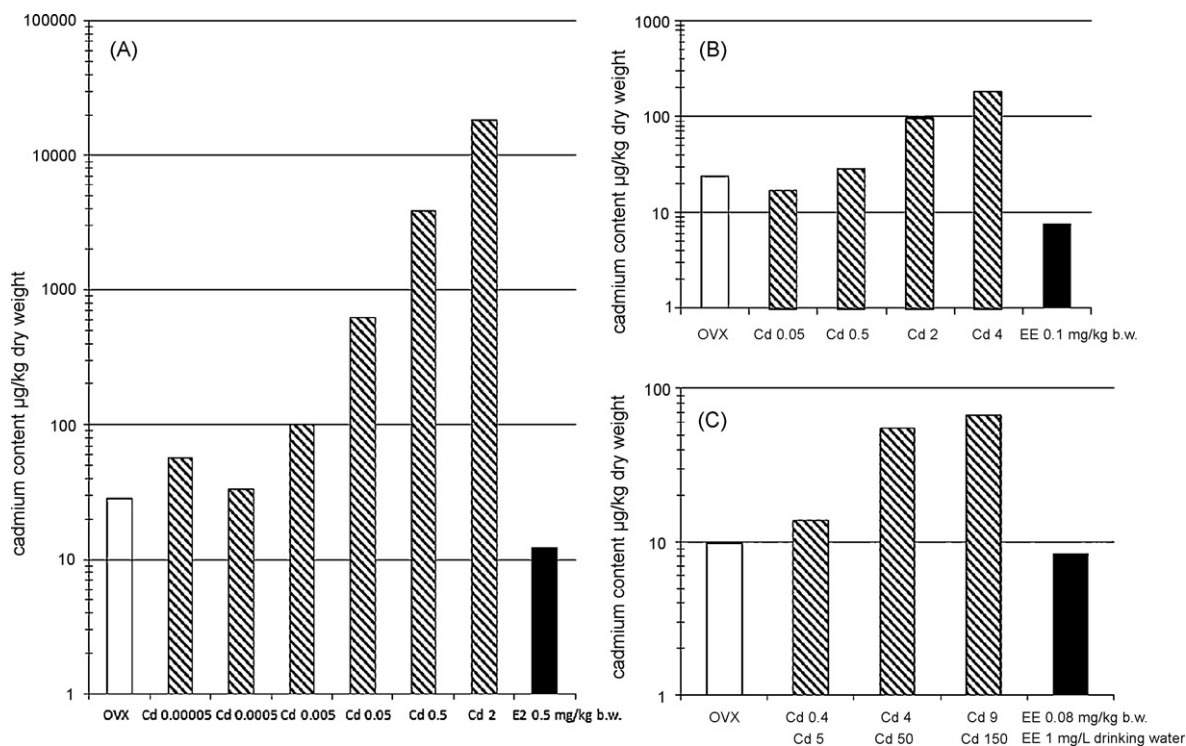


Fig. 6. Cadmium content ($\mu\text{g}/\text{kg}$ dry weight) in the uterus after a single *i.p.* injection of CdCl₂ or E2 (A), after oral short-term (3 days by gavage, B), and long-term (4 weeks by drinking water, C) administration of CdCl₂ or EE. Bars represent the average Cd-content in pooled uteri from one dose group.

time RT-PCR: whilst *i.p.* dosing of 0.00005 up to 0.05 mg CdCl₂/kg b.w. resulted in a down-regulation of C3, the highest dose (2 mg/kg b.w.) increased expression of C3 about 700-fold. The apparently u-shaped dose-response curve (Fig. 3) points to a weak antiestrogenic effect of cadmium and an estrogenic action in the uterus at higher doses. Whilst Johnson et al. (2003) reported a 12-fold increase in C3 mRNA expression in Sprague-Dawley rats upon *i.p.* injection of 5 µg/kg b.w., we observed a clear decrease in C3 mRNA expression in Wistar rats treated with the same dose. Whether this is possibly related to different Cd-levels in the uteri of the two rat strains, cannot be stated firmly since Cd-concentrations in this target tissue were not reported in the Johnson et al. (2003) study.

Other than classical parameters such as uterine wet weights and uterine epithelium height (Figs. 1 and 2) that did not respond to oral cadmium administration, the molecular analysis of C3 expression was clearly indicative of an estrogenic activity of Cd in the uterus: short-term gavage administration stimulated C3 expression at 0.5 and 4 mg CdCl₂/kg b.w. per day with a 54-fold and 276-fold increase, respectively (Fig. 3B), and also longer oral exposure to 4 mg CdCl₂/kg b.w. resulted in a modest 12-fold increase of C3 (Fig. 3C). That induction of C3 was less pronounced upon 28-day exposure compared to gavage administration of 4 mg/kg b.w. per day may be explained by differences in absorption and/or bioavailability of the metal ion: in accord with reports that cadmium absorption declines within long-term administration (Matsuno et al., 1991), and does not accumulate in the uterus (Rummeler et al., 1989), we have detected 2- to 3.2-fold higher Cd-levels in the uteri with 3-day gavage administration than after 4-week exposure by drinking water. However, the Cd-levels in uteri of rats treated *i.p.* with 2 mg CdCl₂/kg b.w. were even more than two orders of magnitude (> 100-fold) higher than in animals after *per os* administration of this dose (Fig. 6).

Also Cd-contents of liver (Fig. 5) and in blood (Fig. 4) reflect the strong impact of the route of administration: rats treated *i.p.* with a single dose of 2 mg CdCl₂/kg b.w. had 33-fold higher cadmium blood levels than animals after gavage administration of this dose on 3 days. Concentrations in the liver of rats treated *i.p.* with 2 mg/kg b.w. were about 20-fold higher than in animals after *per os* administration of this dose (42014 versus 2188 µg/kg dry weight) and about 40-fold higher at the two lower dose levels. These results and pronounced differences noted in the Cd-contents of uteri (Fig. 6) and kidneys (data not shown) are in accord with the well known fact that the exposure route can strongly influence the uptake of cadmium in the body (WHO/IPCS, 1992; Elsenhans et al., 1994b). Intestinal Cd uptake is affected by diet composition, *i.e.* crude fibers and trace metals, especially iron (Andersen et al., 2004; Park et al., 2002; Kim et al., 2007). Moreover metallothioneins are known to play a crucial role in the toxicokinetics and toxicodynamics of the heavy metal (Andersen et al., 2004; Nordberg, 2009; Klaassen et al., 1999). The Cd-binding protein metallothionein is induced in various organs upon *per os* administration of cadmium (Groten et al., 1991; Elsenhans et al., 1994a; Wang et al., 2009), but probably not after single *i.p.* injection. Thus, *i.p.* injection will result in much higher tissue levels of the unbound toxic metal than (repeated) *per os* administration. Simply equating external Cd-doses by these two routes (Johnson et al., 2003; Safe, 2003) is therefore misleading and unfounded.

In summary, our data in ovariectomized rats clearly demonstrate that Cd can affect mechanisms of estrogenicity after *i.p.* injection, and also after oral administration. However, the route of administration plays a crucial role for the potency of this metalloestrogen: oral short- and long-term Cd administration did not affect classical histological parameters of estrogenicity, but was shown to elicit an induction of estrogen-regulated C3 gene. It is important to point out that this molecular effect occurred at daily Cd-doses far exceeding those of an average oral exposure in humans (Ryan

et al., 2001; Wilhelm et al., 2002; Ysart et al., 2004). Nonetheless, our data clearly indicate that in principal molecular mechanisms of estrogenicity can be affected by administration of cadmium: binding of Cd to the estrogen receptor can result in an activation and agonistic effects (Figs. 1–3), but Cd was also found to exert antagonistic effects on the uterine expression of complement C3 (Fig. 3). Further studies are indicated to elucidate possible endocrine effects of Cd at low doses, and with relevant routes of exposure. Such studies should apply sensitive molecular endpoints of estrogen activity and include analysis of additional markers, *e.g.* cofactor activation or phosphorylation of ER subtype specific amino acids. Moreover, hormonal effects of cadmium should be investigated in other nonclassical target tissues, for example the small intestine, as it is directly exposed to cadmium upon oral administration, and since estrogen receptors are known to be expressed in this tissue (Campbell-Thompson, 1997; Konstantinopoulos et al., 2003).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

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. is gratefully acknowledged. The authors wish to thank Ute Laudenbach-Leschowski for expert technical assistance in the conduct of the animal studies and Felix Kluxen for valuable help in the histological analysis.

References

- ATSDR, 2008. Draft Toxicological Profile for Cadmium. Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 450 pp.
- Alonso-González, C., González, A., Mazarrasa, O., Güezmes, A., Sánchez-Mateos, S., Martínez-Campa, C., Cos, S., Sánchez-Barceló, E.J., Mediavilla, M.D., 2007. Melatonin prevents the estrogenic effects of subchronic administration of cadmium on mice mammary glands. *J. Pineal Res.* 42, 403–410.
- Andersen, O., Nielsen, J.B., Nordberg, G.F., 2004. Nutritional interactions in intestinal cadmium uptake—possibilities for risk reduction. *Biometals* 17 (5), 543–547.
- Bernard, A., 2008. Cadmium & its adverse effects on human health. *Indian J. Med. Res.* 128 (4), 557–564.
- Borzelleca, J.F., Clarke, E.C., Condie, L.W., 1989. Short-term toxicity (1 and 10 days) of cadmium chloride in male and female rats: gavage and drinking water. *Intern. J. Toxicol.* (formerly: *J. Am. Coll. Toxicol.*) 8, 377–404.
- Brama, M., Gnessi, I., Basciani, S., Cerulli, N., Politi, L., Spera, G., Mariani, S., Cherubini, S., Scotto d'Abusco, A., 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.
- Brzoska, M.M., Kaminski, M., Supernak-Bobko, D., Zwierz, K., Moniuszko-Jakoniak, J., 2003. Changes in the structure and function of the kidney of rats chronically exposed to cadmium. I. Biochemical and histopathological studies. *Arch. Toxicol.* 77, 344–352.
- 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. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240, 478–483.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162 (1), 156–159.
- DFG, 2004. Cadmium und seine anorganischen Verbindungen. Arbeitsmedizinisch-toxikologische Begründungen von MAK-Werten, 39. Lieferung, Wiley-VCH, Weinheim.
- Diel, P., Schulz, T., Smolnikar, K., Strunck, E., Vollmer, G., Michna, H., 2000. Ability of xeno- and phytoestrogens to modulate expression of estrogen-sensitive genes in rat uterus: estrogenicity profiles and uterotrophic activity. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 73 (1–2), 1–10.
- Diel, P., Smolnikar, K., Schulz, T., Laudenbach-Leschowski, U., Michna, H., Vollmer, G., 2001. Phytoestrogens and carcinogenesis-differential effects of genistein in experimental models of normal and malignant rat endometrium. *Hum. Reprod.* 16 (5), 997–1006.
- 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.
- Diel, P., Schmidt, S., Vollmer, G., Janning, P., Upmeyer, A., Michna, H., Bolt, H.M., Degen, G.H., 2004. Comparative responses of three rat strains (DA/Han.

- Sprague–Dawley and Wistar) to treatment with environmental estrogens. *Arch. Toxicol.* 78, 183–193.
- Eisenhans, B., Kolb, K., Schümann, K., Forth, W., 1994a. 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.
- Eisenhans, B., Schüller, N., Schümann, K., Forth, W., 1994b. Oral and subcutaneous administration of cadmium chloride and the distribution of metallothionein and cadmium along the villus-crypt axis in rat jejunum. *Biol. Trace Elem. Res.* 42 (3), 179–190.
- FAO/WHO, 2006. Evaluation of certain food contaminants: 64th report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives; WHO Technical Report Series 930, Genf 2006. http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_930_eng.pdf [accessed December 9, 2008].
- Fingerle, H., Fischer, G., Classen, H.G., 1982. Failure to produce hypertension in rats by chronic exposure to cadmium. *Food Chem. Toxicol.* 20 (3), 301–306.
- Fischer, A.H., Jacobson, K.A., Rose, J., Zeller, R., 2006. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. In: Spector, D.L., Goldman, R.D. (Eds.), *Basic Methods in Microscopy*, Chapter 4: Preparation of Cells and Tissues for Fluorescence Microscopy. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- García-Morales, P., Saceda, M., Kenney, N., Kim, N., Salomon, D.S., Gottardis, M.M., Solomon, H.B., Sholler, P.F., Jordan, V.C., Martin, M.B., 1994. Effect of cadmium on estrogen receptor levels and estrogen-induced responses in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 269 (24), 16896–16901.
- Geis, R.B., Diel, P., Degen, G.H., Vollmer, G., 2005. Effects of genistein on the expression of hepatic genes in two rat strains (Sprague–Dawley and Wistar). *Toxicol. Lett.* 16 (157 (1)), 21–29.
- Godt, J., Scheidig, F., Grosse-Siestrup, C., Esche, V., Brandenburg, P., Reich, A., Groneberg, D.A., 2006. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *J. Occup. Med. Toxicol.* 1 (22), 1–6, doi:10.1186/1745-6673-1-22.
- Groten, J.P., Sinkeldam, E.J., Luten, J.B., van Bladeren, P.J., 1991. Cadmium-accumulation and metallothionein concentrations after 4-week dietary exposure to cadmium chloride or cadmium-metlothionein in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 111 (3), 504–513.
- Hertrampf, T., Schmidt, S., Laudenbach-Leschowsky, U., Seibel, J., Diel, P., 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 (1–2), 51–57.
- Iavicoli, I., Fontana, L., Bergamaschi, A., 2009. The effects of metals as endocrine disruptors. *J. Toxicol. Environ. Health B: Crit. Rev.* 12 (3), 206–223.
- IPCS INCHEM, 2007. International Chemical Safety Card (ICSC) of Cadmium (PIM 089). The International Programme on Chemical Safety (IPCS).
- Järup, L., Åkesson, A., 2009. Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, 201–208.
- Johnson, M.D., Kenney, N., Stoica, A., Hilakivi-Clarke, L., Singh, B., Chepko, G., Clarke, R., Scholler, P.F., A Lirio, A., Foss, C., Reiter, R., Trock, B., Paik, S., Martin, M.N., 2003. Cadmium mimics the in vivo effects of estrogen in the uterus and mammary gland. *Nat. Med.* 9 (8), 1081–1084.
- Kim, D.W., Kim, K.Y., Choi, B.S., Youn, P., Ryu, D.Y., Klaassen, C.D., Park, J.D., 2007. Regulation of metal transporters by dietary iron, and the relationship between body iron levels and cadmium uptake. *Arch. Toxicol.* 81, 327–334.
- Klaassen, C.D., Liu, J., Choudhuri, S., 1999. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 267–294.
- Konstantinopoulos, P.A., Kominea, A., Vantoros, G., Sykiotis, G.P., Andricopoulos, P., Varakis, I., Sotiropoulou-Bonikou, G., Papavassiliou, A.G., 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.
- Kozłowska, K., Brzozowska, A., Sulkowska, J., Roszkowski, W., 1993. The effect of cadmium on iron metabolism in rats. *Nutr. Res.* 13, 1163–1172.
- Li, S.H., Huang, H.L., Chen, Y.H., 2002. Ovarian steroid-regulated synthesis and secretion of complement C3 and factor B in mouse endometrium during the natural estrous cycle and pregnancy period. *Biol. Reprod.* 66 (2), 322–332.
- Matsuno, K., Kodama, Y., Kawamoto, T., Kayama, F., Tsuchiya, K., 1991. Absorption of cadmium after a long-term oral administration of cadmium to dogs. *Biol. Trace Elem. Res.* 28 (2), 99–108.
- Nordberg, M., 1998. Metallothioneins: historical review and state of the knowledge. *Talanta* 46, 243–254.
- Nordberg, G.F., 2009. Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* [Epub ahead of print].
- Owens, J.W., Ashby, J., 2002. Critical review and evaluation of the uterotrophic bioassay for the identification of possible estrogen agonists and antagonists: in support of the validation of the OECD uterotrophic protocols for the laboratory rodent. Organisation for Economic Co-operation and Development. *Crit. Rev. Toxicol.* 32 (6), 445–520.
- Park, J.D., Cherrington, N.J., Klaassen, C.D., 2002. Intestinal absorption of cadmium is associated with divalent metal transporter 1 in rats. *Toxicol. Sci.* 68 (2), 288–294.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29 (9), 2002–2007.
- Pillet, S., D'Elia, M., Bernier, J., Bouquegneau, J.M., Fournier, M., Cyr, D.G., 2006. Immunomodulatory effects of estradiol and cadmium in adult female rats. *Toxicol. Sci.* 92 (2), 423–432.
- Rummler, H.G., Classen, H.G., Schimatschek, H.F., Thöni, H., Schumacher, E., Schenkel, H., Vormann, J., Günther, T., 1989. Age-dependent accumulation of cadmium in rats exposed to contaminated drinking water; interactions with zinc and copper and subcellular Cd distribution in kidney cells. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 3 (4), 217–223.
- Ryan, P.B., Scanlon, K.A., MacIntosh, D.L., 2001. Analysis of dietary intake of selected metals in the NHEXAS-Maryland investigation. *Environ. Health Perspect.* 109 (2), 121–128.
- Safe, S., 2003. Cadmium's disguise dupes the estrogen receptor. *Nat. Med.* 9 (8), 1000–1001.
- Schmidt, S., Degen, G.H., Seibel, J., Hertrampf, T., Vollmer, G., Diel, P., 2006. Hormonal activity of combinations of genistein, bisphenol A and 17 β -estradiol in the female Wistar rat. *Arch. Toxicol.* 80, 839–845.
- Stoica, A., Katzenellenbogen, B.S., Martin, M.B., 2000. Activation of estrogen receptor-alpha by the heavy metal cadmium. *Mol. Endocrinol.* 14 (4), 545–553.
- Sundstrom, S.A., Komm, B.S., Ponce-de-Leon, H., Yi, Z., Teuscher, C., Lyttle, C.R., 1989. Estrogen regulation of tissue-specific expression of complement C3. *J. Biol. Chem.* 264 (28), 16941–16947.
- Takiguchi, M., Yoshihara, S., 2006. New aspects of cadmium as endocrine disruptor. *Environ. Sci.* 13, 107–116.
- Vahter, M., Åkesson, A., Ceccatelli, S., Berglund, M., 2007. Gender differences in disposition and toxicity of metals. *Environ. Res.* 104, 85–95.
- Wang, L., Chen, D., Wang, H., Liu, Z., 2009. Effects of lead and/or cadmium on the expression of metallothionein in the kidney of rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 129 (1–3), 190–199.
- WHO/IPCS, 1992. Cadmium. In: Environmental Health Criteria Document 134 IPCS. WHO, Geneva, pp. 1–280.
- Wilhelm, M., Lombeck, I., Kourou, B., Wuthe, J., Ohnesorge, F.K., 1995. Duplicate study on the dietary intake of some metals/metalloids by German children. Part II. Aluminium, cadmium and lead. *Zbl. Hyg. (now: Int. J. Hyg. Environ. Health)* 197, 357–369 [in German].
- Wilhelm, M., Wittsiepe, J., Schrey, P., Budde, U., Idel, H., 2002. Dietary intake of cadmium by children and adults from Germany using duplicate portion sampling. *Sci. Total Environ.* 285 (1–3), 11–19.
- Ysart, G., Miller, P., Croasdale, M., Crews, H., Robb, P., Baxter, M., de L'Argy, C., Harrison, N., 2004. 1997 UK Total Diet Study—dietary exposures to aluminium, arsenic, cadmium, chromium, copper, lead, mercury, nickel, selenium, tin and zinc. *Food Addit. Contam.* 17, 775–786.
- Zhang, W., Pang, F., Huang, Y., Yan, P., Lin, W., 2008. Cadmium exerts toxic effects on ovarian steroid hormone release in rats. *Toxicol. Lett.* 182 (1–3), 18–23.

2.2 Publikation 2: Investigations on the estrogenic activity of the metallohormone cadmium in the rat intestine

Investigations on the estrogenic activity of the metallo hormone 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 (0.0005–2 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 ovariectomized (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'-CAGCACTGTTTCGT CACTTCAG-3', for pS2 the forward primer 5'-GGAAA AGGGTTGCTGTTTTG-3' and as reverse primer 5'-ACA GGTGTGTATGAAGCAGGTG-3' and for ER β we used forward primer 5'-CTACAGAGAGATGGTCAAAGTG GA-3' and as reverse primer 5'-GGGCAAGGAGACAGA

AAGTAAGT-3', for PCNA we used forward primer 5'-GAGCAACTTGAATCCCAGAACAGG-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).

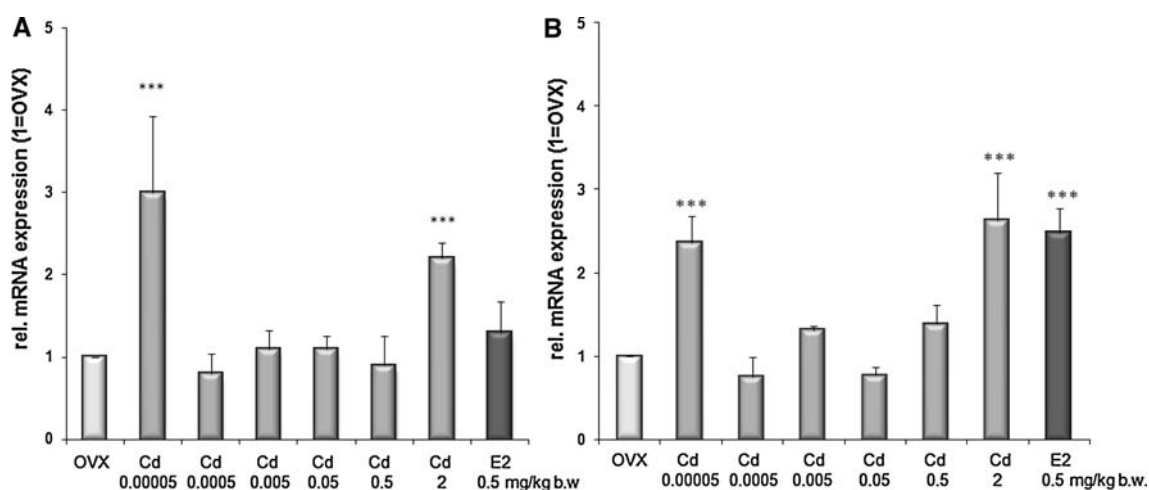


Fig. 1 Relative mRNA expression of metallothionein 1a (MT1a) in the mucosa of the small intestine (a) and in the kidney (b) after a single i.p. injection of CdCl₂ or E2. Mean values ± S.D. are given for

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

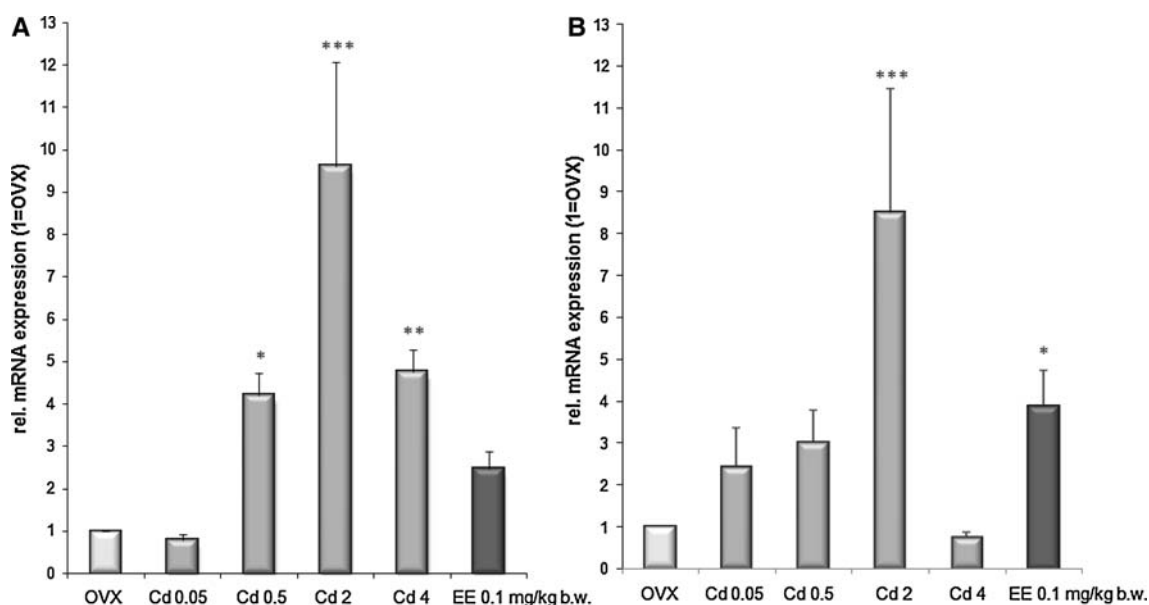


Fig. 2 Relative mRNA expression of metallothionein 1a (MT1a) in the mucosa of the small intestine (a) and in the kidney (b) after oral short-term administration of CdCl₂ or EE (3 days by gavage). Mean

values ± 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

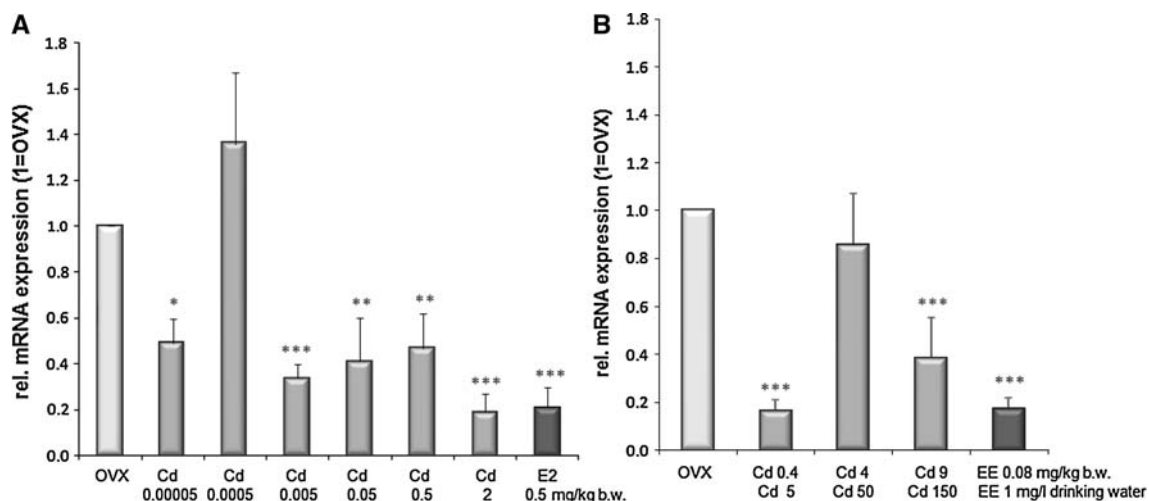


Fig. 3 Relative mRNA expression of pS2/TFF1 in the mucosa of the small intestine after **a** a single i.p. injection of CdCl₂ or E2, **b** after long-term administration of CdCl₂ or EE (4 weeks, by drinking

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

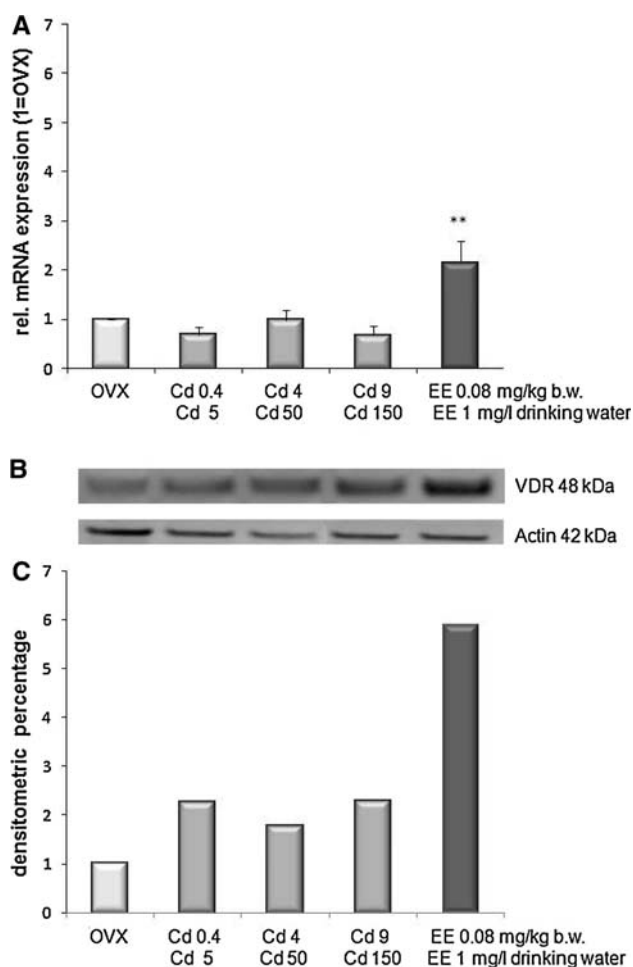


Fig. 4 Relative mRNA expression of vitamin D receptor (VDR) (a) and (b) Western blot analysis with associated densitometric analysis (c) of VDR protein expression in mucosa from control (OVX), Cd-(longterm, 28 days) and EE-treated rats. **a** Mean values \pm S.D. are given for $n = 6$ animals per dose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

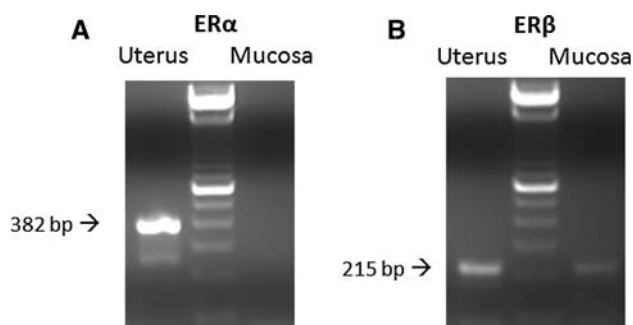


Fig. 5 ER α (a) and β (b) expression in the uterus and mucosa of the small intestine of OVX Wistar rats

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

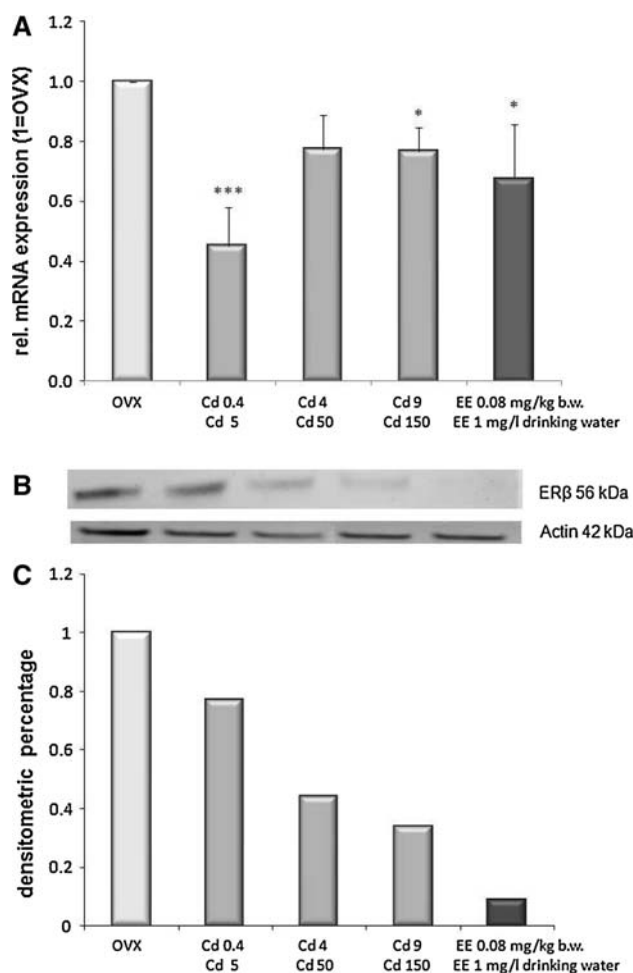
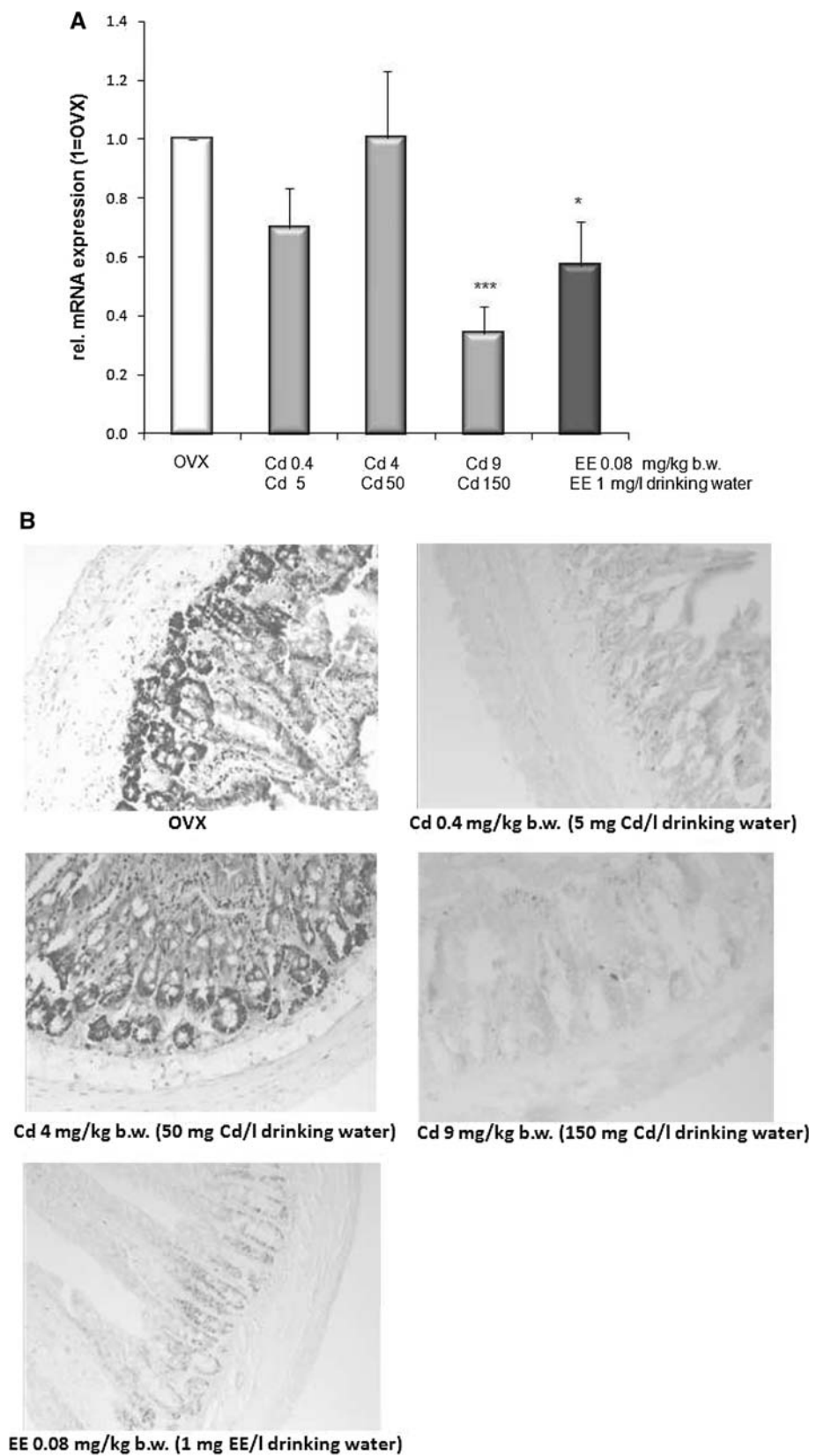


Fig. 6 Expression of estrogen receptor beta (ER β): Analysis of mRNA (a), and Western blot analysis (b) with associated densitometric analysis (c) of ER β protein in the mucosa of the small intestine of rats treated with CdCl₂ and EE by drinking water for 28 days (longterm-experiment). **a** Mean values \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

the EE treated group, whereas the 4-week oral administration of 0.4, 4 and 9 mg CdCl₂/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 17 β -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. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 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; Martineti 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, Güzemes 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 ERbeta 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-alpha 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, Laudenschlager U, Friedel A, Voss A, Roussel J (2005) Pulsed estradiol exposure has a limited ability to induce uterine proliferation in ovariectomized 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
- Fritzsche 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 Investig* 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, VANDOROS G, SYKIOTIS GP, ANDRICHOPOULOS 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
- Martineti 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, Bouquegneau 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, Tkalcevic 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, Laudenbach-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, Poulosom 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, Hultenby 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

3. Methoden

3.1 *In Vivo* Untersuchungen

Die für *in vivo* Studien zur Charakterisierung hormoneller Wirkungen genutzten Methoden sind in den Publikationen in Kapitel 2 ausführlich dargestellt. Die Beschreibung umfasst die Auswahl der Tiere sowie deren Haltungsbedingungen, die Versuchsdesigns, die Probengewinnung aus Geweben sowie weitere Analysen. Dazu zählen Methoden wie Immunhistochemie und histologische Untersuchungen mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Die molekulare Analyse der Gen- bzw. Proteinexpression erfolgte mittels RealTime RT-PCR und Western Blot. Cadmium-Konzentrationen in Geweben wurden mittels Atomabsorptionsspektrometrie bestimmt. Abbildung 6 zeigt eine Übersicht der eingesetzten Untersuchungsmethoden.

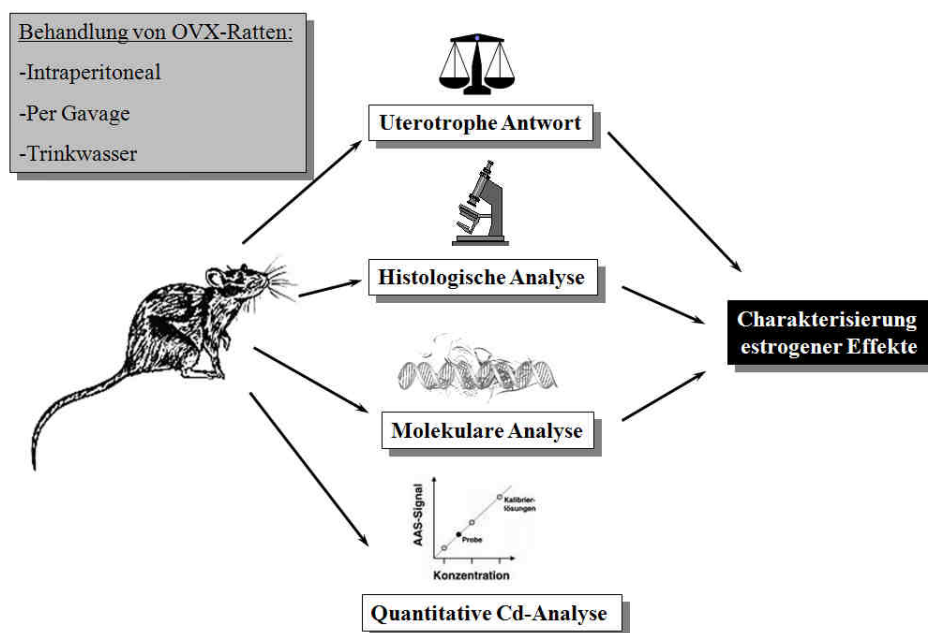


Abb. 6 Analyse der Estrogenität mittels kombinierter Untersuchungsmethoden

In einem zusätzlichen Versuch zur Wirkung von Kombinationen wurden OVX Wistar-Ratten entweder mit Estradiol (0,05 mg/kg KG i.p.), mit Cadmium (0,05 oder 2 mg CdCl₂/kg KG i.p.), dem Antagonist ZK 191703 (2,5 mg/kg KG s.c.) oder binären Kombinationen dieser Stoffe behandelt (Kluxen et al. 2009).

3.2 Ablauf und Behandlung von Zellkulturen

Da die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten aus Versuchen mit Zellkulturen noch nicht publiziert sind, werden die dabei genutzten Methoden im Folgenden kurz dargestellt. Sie umfassen Kultivierung der Zellen, die Versuchsdurchführung und Analysemethoden für die *in vitro* Versuche.

3.2.1 Humane Zelllinien MCF-7, HCT-116 und HT-29

Im *in vitro* Teil der vorliegenden Arbeit sind humane Mammakarzinomzellen der Linie MCF-7 eingesetzt worden. Dabei handelt es sich um epitheliale Adenokarzinomzellen, die nach Literaturangaben Estrogenrezeptor-positiv sind (Soule et al. 1973). Die Zellen wurden 1970 aus dem Pleuraerguss einer 69-jährigen kaukasischen Frau mit metastasierendem Mammakarzinom etabliert. MCF-7 Zellen wachsen als Monolayer adhärent in Zellkulturflaschen. Die Zellen wurden freundlicherweise von der Bayer Schering Pharma AG (Berlin) zur Verfügung gestellt. Außerdem wurden zwei Colonkarzinomzelllinien eingesetzt: Zum einen HCT-116 Zellen, die aus einem primären Colonkarzinom eines erwachsenen Mannes stammen und in der Kulturflasche ebenfalls als Monolayer adhärent wachsen (Brattain et al. 1981; Brattain et al. 1982). Die Zellen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) bezogen. Bei der zweiten Colonkarzinomzelllinie handelt es sich um HT-29 Zellen. Diese wurden 1964 aus einem primären Adenokarzinom einer 44 Jahre alten kaukasischen Frau isoliert. Sie wachsen ebenfalls einschichtig und adhärent und besitzen eine Verdopplungszeit von ca. 24 h (Fogh und Trempe 1975). HT-29 wurden ebenfalls von der Bayer Schering Pharma AG (Berlin) bereitgestellt.

3.2.2 Kultivieren und Passagieren der Zellen

Kulturbedingungen

Alle Zelllinien wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen mit 20 ml Vollmedium bei 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5% im Brutschrank kultiviert. Für die MCF-7-Zellen wurde RPMI 1640 – Medium, versetzt mit 10% Serum (FKS), 2% Penicillin-

Streptomycin, 1% L-Glutamin sowie 0,25% Insulin, verwendet. Das Vollmedium für die HCT-116- und die HT-29-Zellen setzte sich wie folgt zusammen: DMEM-Medium (high glucose), 10% FKS, 2% Penicillin-Streptomycin und 1% Glutamin (alle Invitrogen, Karlsruhe). Das FKS wurde für 30 Min. bei 56°C erhitzt, um das Komplementsystem zu inaktivieren. Ein Mediumswechsel erfolgte zwei- bis dreimal pro Woche im Rahmen des Passagierens der Zellen. Alle Arbeiten mit den Zellen wurden unter einer Sterilbank durchgeführt.

Passagieren der Zellen

Beide Colonkarzinomzelllinien wurden alle drei bis vier Tage, MCF-7 Zellen alle fünf bis sechs Tage, gesplittet, um ein dauerhaftes, einschichtiges Wachstum zu gewährleisten. Das Kulturmedium, Trypsin (0,05%)-EDTA und PBS (beide Invitrogen, Karlsruhe) wurden vor Arbeitsbeginn im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die Kulturflasche wurde zunächst makro- sowie mikroskopisch auf pathogene Mikroorganismen oder sonstige Verunreinigungen untersucht. Anschließend wurde das Medium mit einer Glaspipette vom Zellrasen abgesaugt und die Zellkultur mit 5 ml PBS gewaschen. Nach Zugabe von 2-3 ml Trypsin (0,05%)-EDTA erfolgte ein Inkubationsschritt von max. 5 Min. bei 37°C im Brutschrank, um die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche abzulösen. Zur Beendigung der Trypsination wurde Kulturmedium zugesetzt, der Flaschenboden damit mehrmals gespült und die gesamte Zellsuspension in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und dann bei 700 rpm und 20°C für 4 Min. zentrifugiert (Megafuge 3.0R, Heraeus, Osterode). Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in 5 ml Vollmedium resuspendiert und eine definierte Zellzahl in eine neue Zellkulturflasche mit 20 ml Vollmedium gegeben.

Auftauen und Einfrieren der Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wurde das Trypsinat einer zu etwa 90% konfluent gewachsenen Zellkulturflasche bei 700 rpm und 20°C für 4 Min. zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Resuspendierung der Zellen erfolgte mit Gefriermedium, bestehend aus Vollmedium mit 10% DMSO versetzt. DMSO dient dabei als Gefrierschutz zur Vermeidung der Eiskristallbildung. Von dieser Zellsuspension wurde 1 ml in ein Kryoröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) überführt. Zum stufenweisen Einfrieren

der Zellen wurde der NALGENE Cryo 1°C Freezing Container (Nalgene/VWR, Langenfeld) verwendet, der eine Kühlung um -1°C pro Minute ermöglicht. Nach Halten der Kryoröhrchen von ca. 24 h bis zu max. drei Tagen im Gefrierschrank bis zu einer Temperatur von -80°C konnten die Zellen langfristig in flüssigem Stickstoff bei -180°C gelagert werden.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen unter Schwenken langsam im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Zellsuspension wurde anschließend zügig in einen 15 ml Röhrchen (Falcon) überführt, das bereits 9 ml warmes Vollmedium enthielt. Im Anschluss wurden die Zellen bei 700 rpm und 20°C für 4 Min. zentrifugiert, in 5 ml Vollmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt, die bereits 15 ml Vollmedium enthielt. Der Erfolg der Neukultivierung wurde täglich kontrolliert.

3.2.3 Ablauf und Behandlungsschema der Zellversuche

Aktivkohlebehandlung des Kälberserums

In den Zellkulturexperimenten mit Cadmium mussten andere, durch Steroide im Kälberserum ausgelöste, estrogene Effekte ausgeschlossen werden. Daher wurde CCS (charcoal-stripped calf serum)-Medium anstelle des normalen Vollmediums eingesetzt. Dazu wurde dem Serum (FKS) 10 mg Aktivkohle/ml Serum zugesetzt und für 1 Std. geschüttelt. Nach Sedimentation der Aktivkohle über Nacht wurde für 30 Min. bei 3500 rpm und 4°C zentrifugiert und das Serum anschließend unter der Sterilbank durch einen 0,2 µm Spritzenfilter steril filtriert. Mit dem Aktivkohle-behandelten Serum wurde anschließend, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, das Medium für die jeweilige Zelllinie angesetzt.

Subkultur in Zellkulturplatten

Für die Durchführung der Versuche wurden Zellen in Zellkulturplatten mit jeweils 6 Vertiefungen kultiviert (Nunc/VWR, Langenfeld). Dazu wurden die Zellen wie bei der Zellpassage behandelt: Vollmedium wurde zunächst abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen, mit Trypsin vom Zellboden gelöst und die Reaktion mit Medium gestoppt. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und

die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit der unterschiedlichen Zelllinien wurde eine definierte Zellzahl in jeweils 3 ml CCS-Medium in die Vertiefungen ausgestreut. Anschließend erfolgte die Präinkubation für zwei Tage im Brutschrank bis zur Behandlung.

Behandlung der Zellen

Für die Behandlung der Zellen wurden folgende Substanzen verwendet: DMSO, 17 β -Estradiol (E2) (gelöst in DMSO), Cadmiumchlorid (CdCl₂, 0,1 M Lösung) (alle Sigma-Aldrich, Hamburg) sowie das Antiestrogen ZK 191703 (gelöst in DMSO), welches freundlicherweise von der Bayer Schering Pharma AG (Berlin) bereit gestellt wurde. Vor der Behandlung erfolgte ein Mediumwechsel. Für alle Versuchsansätze wurden die benötigten Konzentrationen über eine Verdünnungsreihe aus den Stammlösungen frisch angesetzt. Die Behandlung der Kontrollgruppe erfolgte mit DMSO (0,1%), die Versuchsgruppen wurden jeweils mit dem Estrogen oder abgestuften Konzentrationen an Cadmium behandelt. Die Behandlungszeit mit der Testsubstanz betrug 5 Tage, wobei an jedem zweiten Tag ein Mediumwechsel (mit zugesetzter Testsubstanz) erfolgte. In einigen Experimenten wurden Zellen nicht nur mit Cadmium bzw. Estradiol allein, sondern auch in Kombination mit dem Antagonisten ZK behandelt. Alle Versuche wurden mit einem Waschgang mit kaltem PBS und anschließender Aufnahme der Zellen in TRIzol (Invitrogen) beendet. In parallelen Tests wurde mit Hilfe des Neutralrot-Tests ermittelt, inwieweit die Behandlung mit Cadmium auch mögliche zytotoxische Effekte verursacht. Der Neutralrot-Test basiert darauf, dass intakte lebende Zellen den Farbstoff (3-Amino-7-dimethylamino-2-methylphenazinhydrochlorid) aktiv aufnehmen und in den Lysosomen anreichern (Borenfreund et al. 1990). Die eng mit der Zellzahl korrelierte Absorption des Farbstoffs wird nach Fixieren und Lyse der Zellen in Mikrotiterplatten spektralphotometrisch bei 540 nm gemessen.

3.2.4 Genexpressionsanalysen

Die Genexpression wurde anhand der relativen mRNA-Expression mittels Standardmethode RealTime RT-PCR untersucht. Dazu wurde die RNA mittels TRIzol

aus den Zellen isoliert, entsprechend der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987), die Konzentration spektrophotometrisch bestimmt und mittels Gelelektrophorese auf ihre Qualität überprüft. Anschließend erfolgte der enzymatische Verdau der DNA sowie die Erststrang cDNA-Synthese mithilfe des SuperScript Kits (Invitrogen). Die Amplifikation der cDNA erfolgte im Thermocycler. Das Protokoll umfasste folgende Schritte: Initiale Denaturierung für 5 Min. bei 95°C, darauf folgten 45 Zyklen die jeweils 1 Min. bei 94°C (Denaturierung), 1 Min. bei der entsprechenden Annealing-Temperatur (Primer-Hybridisierung) und 1 Min. bei 72°C (Elongation) umfassten. Folgende Primer wurden in den *in vitro* Versuchen eingesetzt:

Gen (human)	Primer	Amplikon	Annealing-Temperatur
1A	5'-CGT CAC AGC CCA TGC ATT TG-3' 5'-GGT TAG GTC TAC GGA GGC TC-3'	268 bp	58-62°C
PR	5'-CAT GTC AGT GGA CAG ATG CT-3' 5'-ACT TCA GAC ATC ATT TCC GG-3'	420 bp	58°C
VDR	5'-ATG GCC ATC TGC ATC GTC TC-3' 5'-GCA CCG CAC AGG CTG TCC TA-3'	307 bp	60°C
ER α	5'-GAA TCT GCC AAG GAG ACT CGC-3' 5'-ACT GGT TGG TGG CTG GAC AC-3'	151 bp	60°C
ER β	5'-TGT CTG CAG CGA TTA CGC A-3' 5'-GCG CCG GTT TTT ATC GAT T-3'	145 bp	60°C
MT2a	5'-CCG ACT CTA GCC GCC TCT T-3' 5'-GTG GAA GTC GCG TTC TTT ACA-3'	259 bp	68°C

Tab. 1: Namen, Sequenzen, Amplikongrößen und Annealing-Temperaturen der verwendeten Primer

Die Untereinheit 1A der Cytochrom C Oxidase wurde als interner Standard verwendet. Die Daten der zu untersuchenden Gene wurden über die delta-delta Methode von Pfaffl (2001) auf die Expression von 1A relativiert.

3.2.5 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen zu estrogenen Wirksamkeit von Cadmium sind nachfolgend in Form von Balkendiagrammen dargestellt. Die Balken

zeigen arithmetische Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Signifikanz zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe wurde mittels einfaktorieller ANOVA und anschließendem Tukey HSD Test im Programm SPSS ermittelt.

4. Ergebnisse

4.1 Wirkungen von Cadmium und Estradiol auf die Genexpression in Zellkulturen

4.1.1 mRNA Expression des Estrogenrezeptors α (ER α)

Zunächst wurden estrogene Effekte von Cadmium in MCF-7 Brustkrebszellen untersucht und zwar vergleichend mit Estradiol, denn die Wirkung von Steroidestrogenen in dieser Zelllinie ist bekannt. Zum einen wurde der Einfluss einer Exposition gegenüber Cadmium auf die mRNA Expression des Estrogenrezeptors α (ER α) untersucht. Dazu wurden die MCF-7 Zellen mit Cadmiumchlorid (CdCl₂) in den Konzentrationen 10, 1, 0,01 und 0,0001 μ M sowie mit Estradiol (E2, 0,01 μ M) für 5 Tage behandelt. Abbildung 7 zeigt, dass sowohl die Behandlung mit CdCl₂ als auch mit E2 zu einer signifikant verminderten Expression des ER α führte. Der Cadmium-Effekt verstärkte sich konzentrationsabhängig von 1 bis 0,0001 μ M. Die geringere Expression bei 10 μ M CdCl₂ ist eher auf unspezifische Zytotoxizität zurückzuführen.

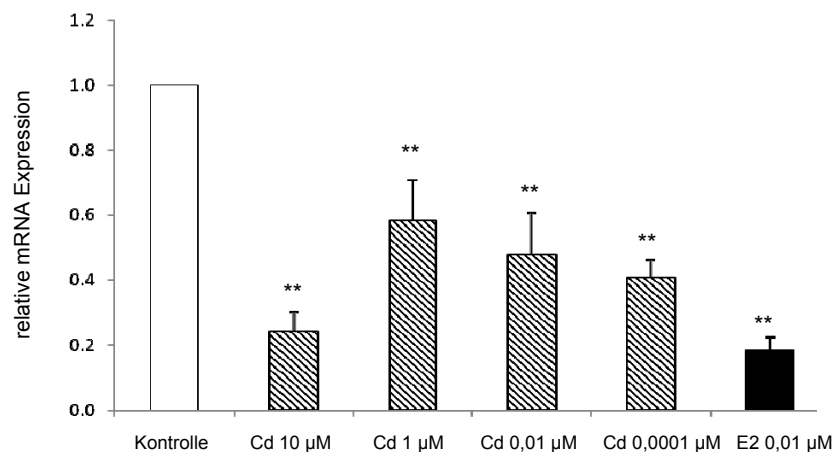


Abb. 7 Relative mRNA Expression des ER α in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit CdCl₂ (10 – 0,0001 μ M) o. E2 (0,01 μ M). p** \leq 0,01 signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, ANOVA.

Weiterhin sollten estrogene Effekte auch in den Colonkarzinomzellen HCT-116 und HT-29 untersucht werden. In den HT-29 Zellen (unbehandelte Kontrollen) war allerdings nur eine schwache Expression von ER α nachweisbar (vgl. Abbildung 8).

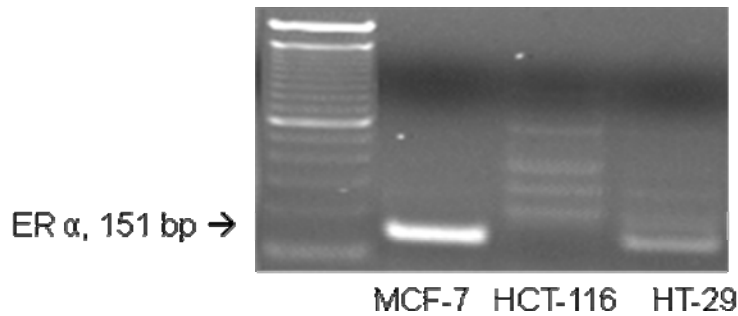


Abb. 8 Basale mRNA Expression des ER α in MCF-7, HCT-116 und HT-29 Zellen.

Die Untersuchung der ER α mRNA Expression in den behandelten HT-29 Zellen ist in Abbildung 9 dargestellt: Weder die Exposition gegenüber E2 (0,01 μ M) noch gegenüber CdCl₂ (1 - 0,0001 μ M) führte zu signifikanten Effekten. Lediglich für die Behandlung mit 1 μ M CdCl₂ fand sich eine Tendenz zur erhöhten ER α mRNA Expression. Da Cadmium in höherer Konzentration (10 μ M CdCl₂) zytotoxisch auf HT-29 Zellen wirkte, sind dafür keine Befunde gezeigt.

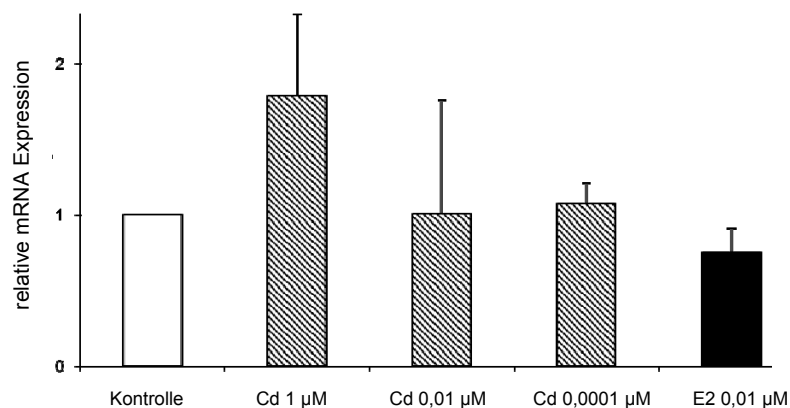


Abb. 9 Relative mRNA Expression des ER α in HT-29 Zellen nach Behandlung mit CdCl₂ (1 - 0,0001 μ M) oder E2 (0,01 μ M).

4.1.2 mRNA Expression des Estrogenrezeptors β (ER β)

Ferner sollte die Modulation des ER β nach Behandlung mit Cadmium und Estradiol in MCF-7 sowie HCT-116 und HT-29 untersucht werden. Der Rezeptorsubtyp konnte in den Zellen allerdings nicht nachgewiesen werden (vgl. Abb. 10).

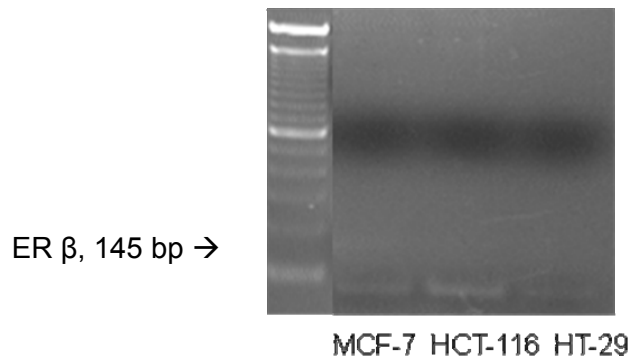


Abb. 10 Basale mRNA Expression des ER β in MCF-7, HCT-116 und HT-29 Zellen.

4.1.3 mRNA Expression des Progesteronrezeptors (PR)

Als weiterer, Estrogen-regulierter Parameter wurde der Progesteronrezeptor (PR) untersucht. Abbildung 11 zeigt die Expression in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit verschiedenen CdCl₂ Konzentrationen (10, 1, 0,01 und 0,0001 μ M): Nach Cd-Exposition war die PR Expression vermindert, mit signifikanten Effekten außer in der niedrigsten Dosis-Gruppe (mit 0,0001 μ M CdCl₂). Dagegen führte die Behandlung mit E2 (0,01 μ M) zu einer signifikanten Induktion des PR um das 30-fache.

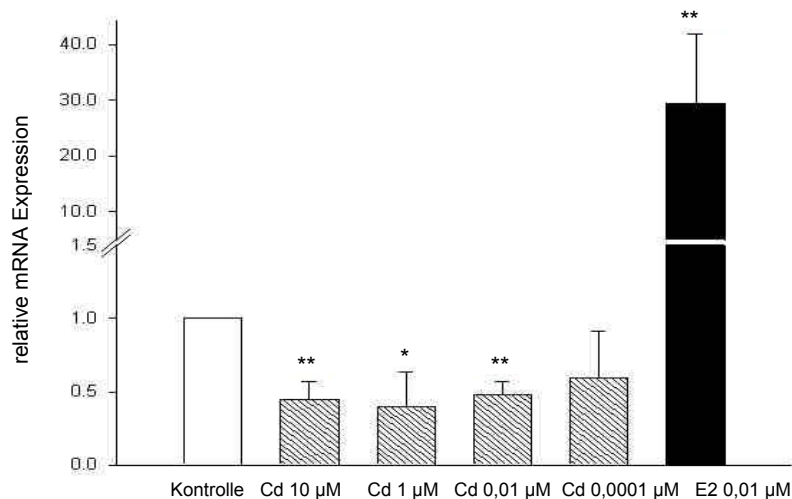


Abb. 11 Relative mRNA Expression des PR in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit CdCl₂ (10 – 0,0001 μ M) oder E2 (0,01 μ M). $p^* \leq 0,05$ und $p^{**} \leq 0,01$ signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, ANOVA.

In den beiden Colonkarzinomzelllinien konnte dieser Parameter nicht untersucht werden, weil der PR, anders als in MCF-7 Zellen, in den HCT-116 und HT-29 Zellen nicht nachweisbar war (s. Abb. 12).

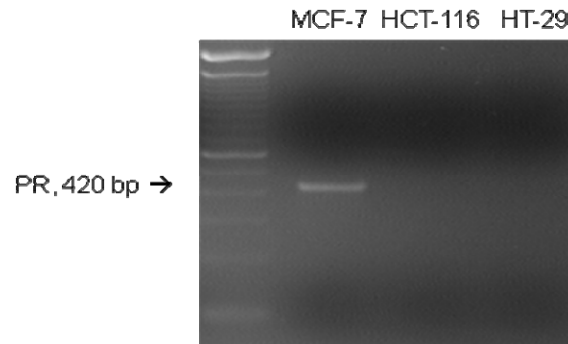


Abb. 12 Basale mRNA Expression des PR in MCF-7, HCT-116 und HT-29 Zellen.

4.1.4 mRNA Expression des Vitamin-D-Rezeptors (VDR)

Die Untersuchung des VDR sollte ebenfalls Hinweise auf estrogenen Effekte liefern. Die Behandlung von MCF-7 Zellen mit E2 (0,01 μ M) führte zur tendenziellen Erhöhung der VDR Expression, wohingegen CdCl₂ die Expression eher verminderte. Dieser Effekt war nur bei der höchsten Konzentration (10 μ M) signifikant (Abb. 13), wobei sich Zytotoxizität als Ursache nicht ganz ausschließen lässt.

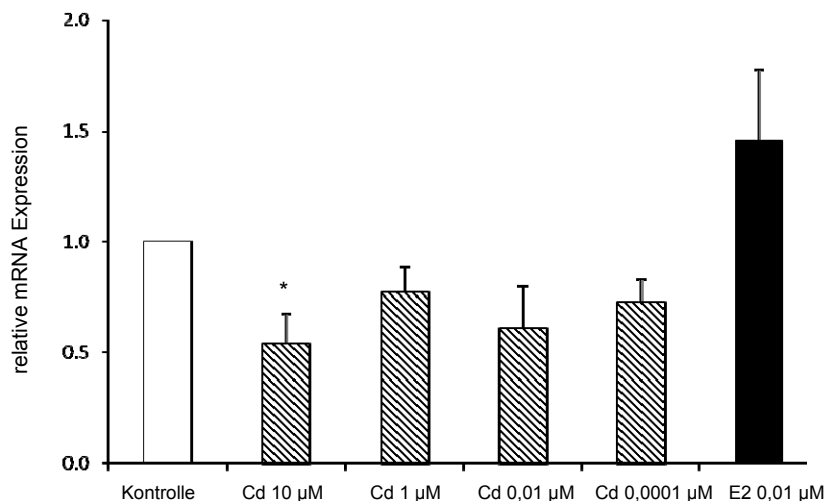


Abb. 13 Relative mRNA Expression des VDR in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit CdCl₂ (10 – 0,0001 μ M) oder E2 (0,01 μ M). $p \leq 0,05$ signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, ANOVA.

In den HCT-116 Zellen führte die Behandlung mit E2 (0,01 μM) und mit CdCl_2 (in den Konzentrationen von 1 bis 0,0001 μM) zu einer geringeren Expression des VDR (Abb. 14). Bei 1 und 0,0001 μM CdCl_2 war dies signifikant und die Expression um das 0,5-fache vermindert.

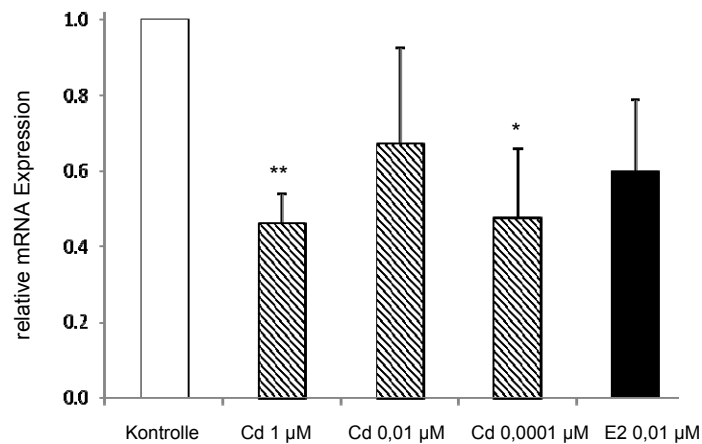


Abb. 14 Relative mRNA Expression des VDR in HCT-116 Zellen nach Behandlung mit CdCl_2 (1 – 0,0001 μM) oder E2 (0,01 μM). $p^* \leq 0,05$, $p^{**} \leq 0,01$ signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, ANOVA.

Auch in den HT-29 Zellen war die VDR Expression nach CdCl_2 - und E2-Behandlung vermindert, mit signifikanten Effekten nach Applikation von 1 und 0,01 μM CdCl_2 (Abb. 15).

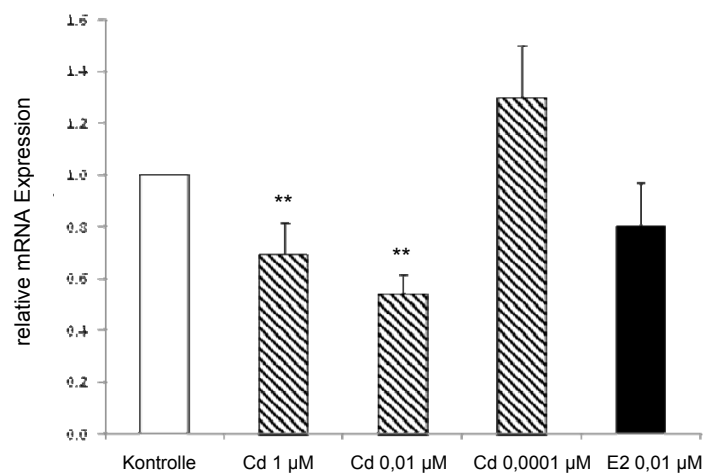


Abb. 15 Relative mRNA Expression des VDR in HT-29 Zellen nach Behandlung mit CdCl_2 (1 – 0,0001 μM) oder E2 (0,01 μM). $p^{**} \leq 0,01$ signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, ANOVA.

4.1.5 mRNA Expression von Metallothionein 2a (MT2a)

Außer möglichen estrogenen Effekten sollten auch andere, für eine Cadmium-Exposition typische, Wirkungen in den Colonkarzinomzellen untersucht werden. Hierzu wurde die Expression von Metallothionein (MT) herangezogen. Dieses Protein wird durch Metalle induziert. Abbildung 16 zeigt die Expression von MT2a in HCT-116 Zellen nach Behandlung mit CdCl₂ (1, 0,01, 0,0001 µM) bzw. E2 (0,01 µM):

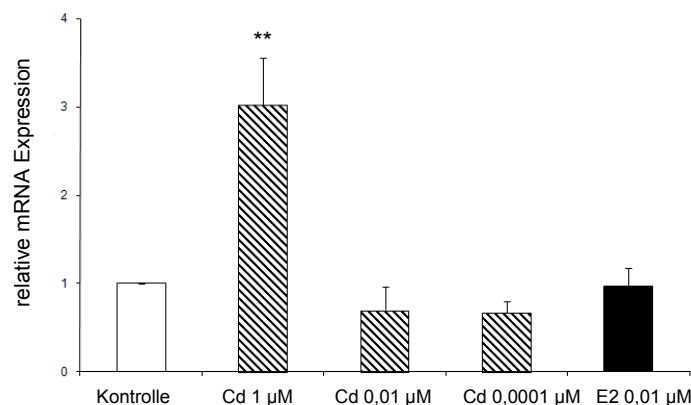


Abb. 16 Relative mRNA Expression von MT2a in HCT-116 Zellen nach Behandlung mit CdCl₂ (1 – 0,0001 µM) oder E2 (0,01 µM). p**≤ 0,01 signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, ANOVA.

Bei der höchsten Konzentration von 1 µM CdCl₂ wurde MT2a signifikant, um das 3-fache induziert. Ein vergleichbares Bild zeigte sich nach Behandlung von HT-29 Zellen mit CdCl₂: Hier wurde MT2a bei einer Exposition gegenüber 1 µM CdCl₂ signifikant, um das 10-fache stimuliert (Abb. 17). Estradiol hatte in beiden Darmzelllinien keinen Einfluss auf die Expression von MT2a.

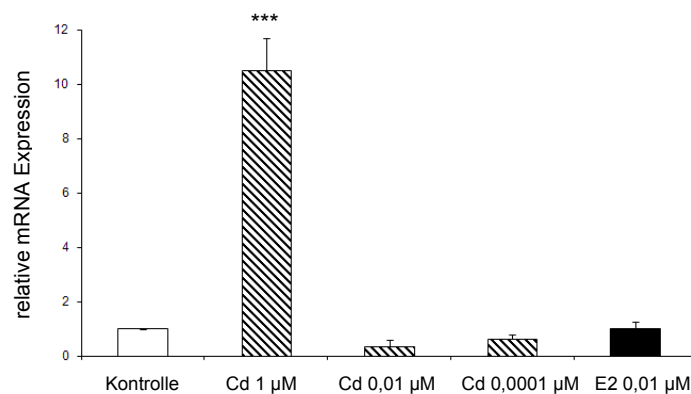


Abb. 17 Relative mRNA Expression von MT2a in HT-29 Zellen nach Behandlung mit CdCl₂ (1 – 0,0001 µM) oder E2 (0,01 µM). p***≤ 0,001 signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, ANOVA.

4.2 Kombinationen von Cadmium und Estradiol bzw. ER-Antagonist

4.2.1 PR mRNA Expression in MCF-7 Zellen

Ausgehend von der Untersuchung estrogener Effekte in den Rezeptor-positiven MCF-7 Zellen (vgl. 4.1) wurde ein Experiment zu möglichen Kombinationswirkungen durchgeführt. Dabei wurden die Zellen nicht nur mit Cadmium, Estradiol oder dem ER-Antagonisten ZK 191703 allein behandelt, sondern auch mit Gemischen: Cadmium und Estradiol kombiniert, Cadmium plus Antagonist sowie Estradiol plus Antagonist. Abbildung 18 zeigt die Expression des PR nach diesen Behandlungen: In Einklang mit den in Abb. 11 gezeigten Befunden führte CdCl_2 allein zu einer signifikant verminderten Expression, während E2 die PR mRNA Spiegel 25-fach stimulierte.

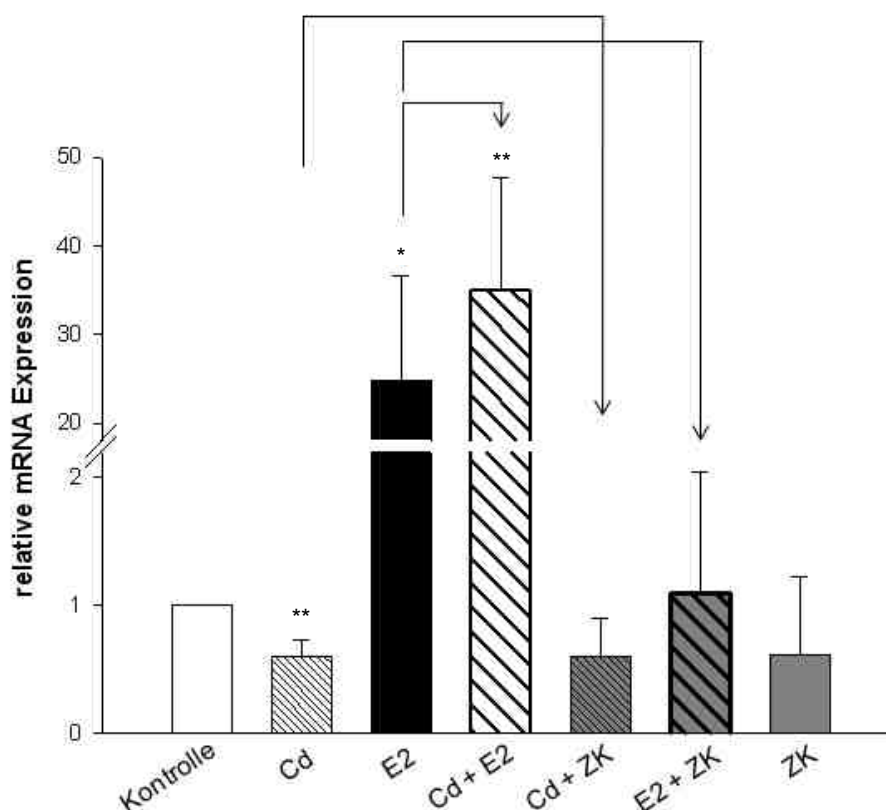


Abb. 18 Relative mRNA Expression des PR in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit CdCl_2 (1 μM), E2 (0,01 μM), CdCl_2 (1 μM) plus E2 (0,01 μM), CdCl_2 (0,01 μM) plus ZK 191703 (0,1 μM), E2 (0,01 μM) plus ZK 191703 (0,1 μM) und ZK 191703 (0,1 μM). $p^* \leq 0,05$, $p^{**} \leq 0,01$ signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, ANOVA.

Die Kombination CdCl_2 plus E2 bewirkte aber eine noch stärkere Induktion des PR um das 34-fache. Im Gemisch wirkte Cadmium also agonistisch, allein eher antagonistisch. Wie erwartet antagonisierte ZK deutlich die Estradiol-abhängige Induktion des PR. ZK allein oder zusammen mit CdCl_2 hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Expression des PR.

4.2.2 $\text{ER}\alpha$ und VDR mRNA Expression in HT-29 Zellen

Auch in den HT-29 Zellen wurden Kombinationsexperimente durchgeführt. Die Behandlung mit CdCl_2 allein hatte, wie auch schon zuvor (vgl. Abb. 9), keinen Effekt auf die $\text{ER}\alpha$ mRNA Expression, während E2-Exposition zur etwas (20%) verminderten Expression führte (Abb. 19).

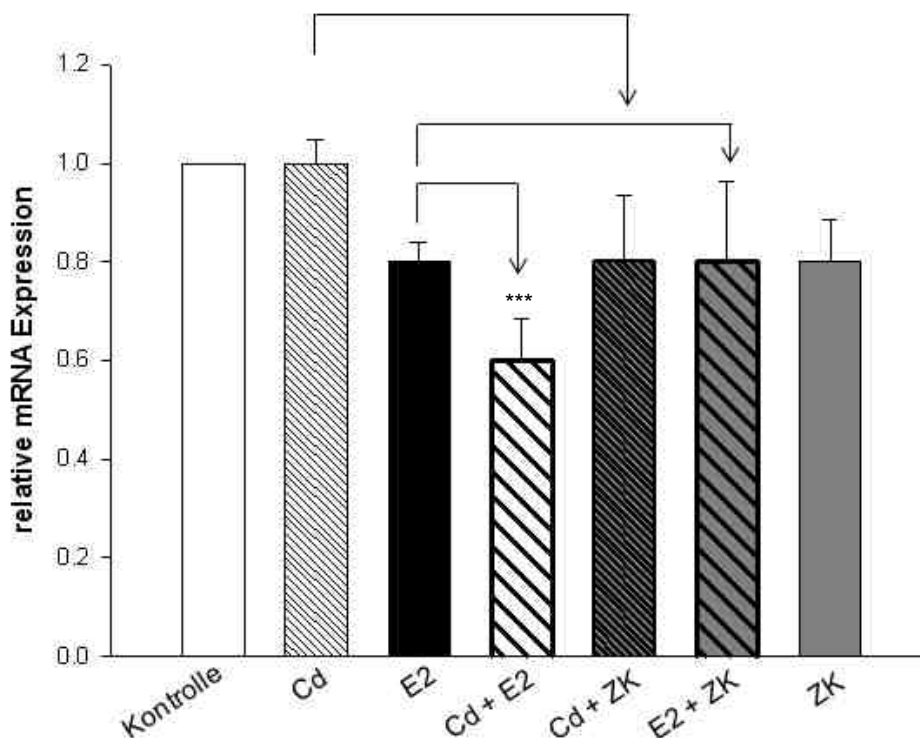


Abb. 19 Relative mRNA Expression des $\text{ER}\alpha$ in HT-29 Zellen nach Behandlung mit CdCl_2 (0,1 μM), E2 (0,01 μM), CdCl_2 (0,1 μM) plus E2 (0,01 μM), CdCl_2 (0,01 μM) plus ZK 191703 (0,1 μM), E2 (0,01 μM) plus ZK 191703 (0,1 μM) und ZK 191703 (0,1 μM). $p^{***} \leq 0,001$ signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, ANOVA.

Die kombinierte Behandlung mit CdCl_2 und E2 bewirkte aber eine signifikant verminderte Expression des $\text{ER}\alpha$ auf das 0,6-fache der Kontrolle. Zellen, die mit CdCl_2 plus ZK, E2 plus ZK oder ZK allein behandelt waren, wiesen eine etwas geringere Expression des $\text{ER}\alpha$ auf als die Kontrolle, unterschieden sich aber nicht von den jeweiligen Gruppen ohne Zusatz.

Die Messung der VDR mRNA Expression ergab eine Minderung nach Behandlung von HT-29 Zellen mit CdCl_2 und eine deutlichere, signifikant verminderte Expression des VDR nach Behandlung mit E2 (Abb. 20). Bei Exposition gegenüber der Kombination wurde der VDR jedoch signifikant, um das 1,7-fache, induziert. CdCl_2 plus ZK oder Behandlung nur mit ZK hatten keinen Einfluss auf die VDR Expression. Dagegen führte eine Exposition von HT-29 Zellen gegenüber E2 plus ZK zu einer deutlich verminderten Expression des VDR auf das 0,2-fache, also stärker als bei alleiniger Behandlung mit Estradiol.

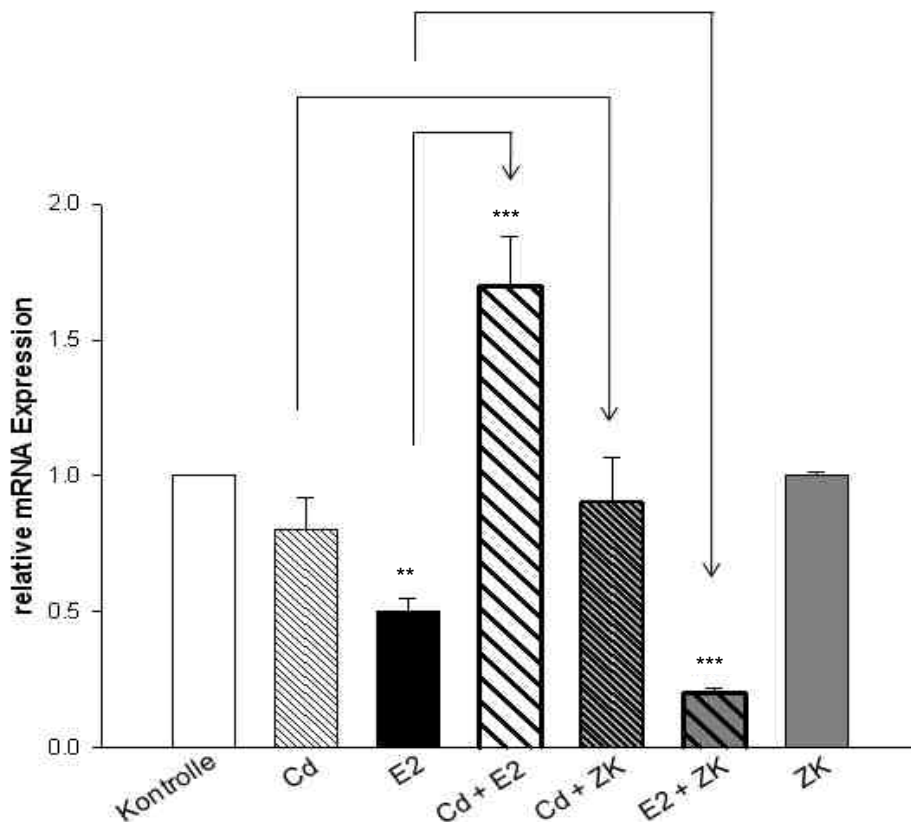


Abb. 20 Relative mRNA Expression des VDR in HT-29 Zellen nach Behandlung mit CdCl_2 (1 μM), E2 (0,01 μM), CdCl_2 (1 μM) plus E2 (0,01 μM), CdCl_2 (0,01 μM) plus ZK 191703 (0,1 μM), E2 (0,01 μM) plus ZK 191703 (0,1 μM) und ZK 191703 (0,1 μM). $p^{**} \leq 0,01$. $p^{***} \leq 0,001$ signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, ANOVA.

Tabelle 2 zeigt zusammenfassend die Tendenzen der Genexpression in MCF-7 (A) sowie den Darmzellen HT-29 (B) nach Behandlung mit Cadmium, Estradiol und der Kombination Cadmium plus Estradiol:

A			
MCF-7 Zellen	Cd	E2	Cd + E2
ER α	↓	↓↓	n.b.
PR	↓	↑↑	↑↑↑
VDR	—↘	↗	n.b.
B			
HT-29 Zellen	Cd	E2	Cd + E2
ER α	—	↓	↓↓
VDR	↘	↓	↑
MT2a	↑↑↑	—	n.b.

Tab. 2 Tendenzen der Genexpression nach Behandlung von MCF-7 Zellen (A) und HT-29 Zellen (B) mit CdCl₂ (1 μ m), E2 (0,01 μ M), CdCl₂ (1 μ M) plus E2 (0,01 μ M). Estrogenrezeptor α (ER α), Estrogenrezeptor β (ER β ; weder in MCF-7 noch in HT-29/HCT-116 Zellen exprimiert), Progesteronrezeptor (PR; Expression nur in MCF-7 Zellen), Vitamin-D-Rezeptor (VDR), Metallothionein 2a (MT2a); ↑↑↑ = starke Induktion, ↑↑ = mittlere Induktion, ↑ = leichte Induktion, ↗ = tendenzielle Induktion; ↓↓ = mittlere Verminderung, ↓ = leichte Verminderung, ↘ = tendenzielle Verminderung, — = kein Effekt, n.b. = nicht bestimmt

5. Diskussion

5.1 Charakterisierung estrogenen Wirkungen von Cadmium *in vivo*

Wie einleitend dargestellt (vgl. Kapitel 1.1.4.2), ist eine estrogenartige Wirkung von Cadmium zunächst in *in vitro* Studien an Zellkulturen aufgedeckt worden (Garcia-Morales et al. 1994; Stoica et al. 2000; Brama et al. 2007). Danach sind auch in Studien an Nagern estrogenen Effekte von Cadmium in Form von gesteigerten Uterusfeuchtgewichten, einer gesteigerten Proliferation im Mammagewebe, der Verdickung des Endometriums und der Induktion Estrogen-sensitiver Gene beschrieben worden (Johnson et al. 2003; Zhang et al. 2007). Allerdings wurde die hormonelle Aktivität von Cadmium in den *in vivo* Versuchen von Johnson et al. (2003) und von Zhang et al. (2007) nur nach intraperitonealer Injektion (*i.p.*) nachgewiesen, also einem unphysiologischen Applikationspfad. Für die nichtrauchende Bevölkerung stellt dagegen die Aufnahme von Cadmium über Nahrung und Trinkwasser die maßgebliche Expositionsrouten dar. Für eine toxikologische Bewertung von Cadmium sind Wirkdaten aus Tierversuchen mit oraler Gabe daher von höherer Relevanz, weil die Wirkstärke vom absorbierten Anteil der verabreichten Dosis und der Konzentration im Zielgewebe (target dose) abhängt (s. Kapitel 1.1.2).

Daher war es ein Ziel dieser Arbeit, die estrogenen Wirkung von Cadmium *in vivo* in Abhängigkeit von Dosis und Aufnahmepfad zu charakterisieren. Dazu wurde Wistar-Ratten Cadmium in einer breiten Dosisspanne oder ein Referenzestrogen (Estradiol, E2 bzw. Ethinylestradiol, EE) intraperitoneal (*i.p.* CdCl₂ 0,00005 bis 2 mg/kg KG; E2 0,5 mg/kg KG), aber auch oral verabreicht. Die orale Exposition umfasste dabei eine Kurzzeitapplikation *per gavage* über drei Tage (0,05 bis 4 mg CdCl₂ bzw. 0,1 mg EE/kg KG/Tag) sowie eine subchronische Gabe für 28 Tage über das Trinkwasser (0,4 bis 9 mg CdCl₂ und 0,08 mg EE/kg KG/Tag). Estrogenen Wirkungen nach Behandlung mit Cadmium bzw. der Referenzsubstanz wurden zunächst im klassischen Zielgewebe Uterus untersucht (Höfer et al. 2009).

5.1.1 Modulation Estrogen-sensitiver Parameter im Uterus von Ratten

Zur Charakterisierung hormoneller Wirkungen von Cadmium wurden die Parameter Uterusfeuchtgewicht, Uterusepithelhöhe und Expression des Estrogen-regulierten Complement Component 3 (C3) herangezogen, also etablierte Endpunkte zur Ermittlung von Estrogenität (Sundstrom et al. 1989; Diel et al. 2002b). Die Analyse zeigte deutliche Unterschiede in der Wirkstärke für die beiden Expositionspfade: Nach intraperitonealer Applikation der beiden höchsten Dosen von 0,5 und 2 mg CdCl₂/kg KG war das Uterusfeuchtgewicht der Ratten signifikant, um das 1,2- bzw. um das 1,4-fache erhöht, und eine signifikante Zunahme der Uterusepithelhöhe war schon nach *i.p.* Gabe von 0,05 mg CdCl₂/kg KG festzustellen (Fig. 1, 2 in Höfer et al. 2009). Ähnliche uterotrophe Effekte wurden auch in OVX Sprague-Dawley bzw. in Wistar-Ratten nach intraperitonealer Injektion geringerer (Johnson et al. 2003) bzw. höherer CdCl₂ Dosen (Zhang et al. 2007) berichtet. Im Gegensatz dazu waren nach oraler Applikation *per gavage* oder über das Trinkwasser (5 – 150 ppm CdCl₂) keine Veränderungen des Uterusfeuchtgewichtes oder der Uterusepithelhöhe festzustellen (Fig. 1, 2 in Höfer et al. 2009). Auch Pillet et al. (2006) fanden in der von ihnen durchgeführten Trinkwasserstudie (mit 5 und 25 ppm CdCl₂) keine uterotrophe Wirkung.

Bei oraler Applikation zeigte Cadmium zwar keine Wirkung auf morphologische Parameter (Uterusfeuchtgewicht, Uterusepithelhöhe), doch die Analyse der C3 mRNA Expression lieferte ein deutliches Indiz für eine estrogene Aktivität von Cadmium im Uterus: Nach Kurzzeit-Administration von 0,5 und 4 mg CdCl₂/kg KG *per gavage* und nach Langzeit-Applikation von 4 mg CdCl₂/kg KG über das Trinkwasser war C3 signifikant induziert (Fig. 3 in Höfer et al. 2009). Dabei war die Induktion von C3 bei gleicher Dosis von 4 mg/kg KG nach Kurzzeit-Administration höher als nach Langzeit-Administration. Die Analyse der mRNA Expression von C3 im *i.p.* Versuch zeigte einerseits eine estrogene Aktivität von Cadmium, nämlich signifikante Induktion von C3 nach Injektion der höchsten Dosis von 2 mg/kg KG und fast so hoch wie nach Injektion des Steroidestrogens.

Andererseits wurde eine antiestrogene Wirkung von Cadmium im Dosisbereich von 0,00005 bis 0,05 mg CdCl₂/kg KG beobachtet, die sich in einer deutlich verminderten C3-Expression äußerte. Dagegen beobachteten Johnson et al. (2003) bei 0,005 mg/kg KG bereits eine erhöhte Expression von C3. Dies könnte möglicherweise mit einer höheren Sensitivität des Rattenstamms zusammenhängen, zumal auch die uterotrophen Effekte von Cadmium nach *i.p.* Applikation in Sprague-Dawley Ratten ausgeprägter waren als in Wistar-Ratten (Höfer et al. 2009; Zhang et al. 2007). In einem kürzlich gemeinsam mit Felix Kluxen durchgeführten Versuch ist untersucht worden, ob der ER-Antagonist ZK 191703 die Cadmium-induzierten Wirkungen am Uterus antagonisiert und wie Cadmium zusammen mit Estradiol wirkt. Die *i.p.* Applikation von Cadmium mit E2 führte zu höheren Uterusfeuchtgewichten und einer stärkeren Expression von C3 im Uterus als nach Gabe der Einzelsubstanzen (Abb. 21 und 22).

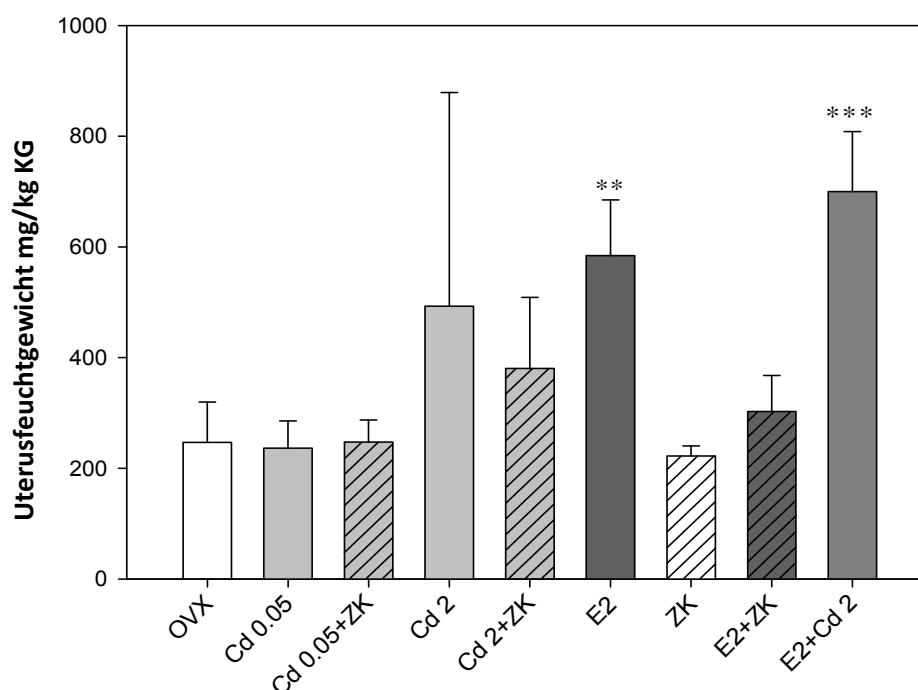


Abb. 21 Uterusfeuchtgewichte (mg/kg KG) nach einmaliger intraperitonealer Injektion von CdCl₂ 0,05 mg/kg KG, CdCl₂ 0,05 plus ZK 2,5 mg/kg KG, CdCl₂ 2 mg/kg KG, CdCl₂ 2 + ZK 2,5 mg/kg KG, E2 0,5 mg/kg KG, ZK 2,5 mg/kg KG, E2 0,5 plus ZK 2,5 mg/kg KG, E2 0,5 plus CdCl₂ 2 mg/kg KG. Gezeigt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardabweichungen für n = 6 Tiere. p** ≤ 0,01, p*** ≤ 0,001 signifikant unterschiedlich zu OVX, ANOVA (Kluxen et al. 2009)

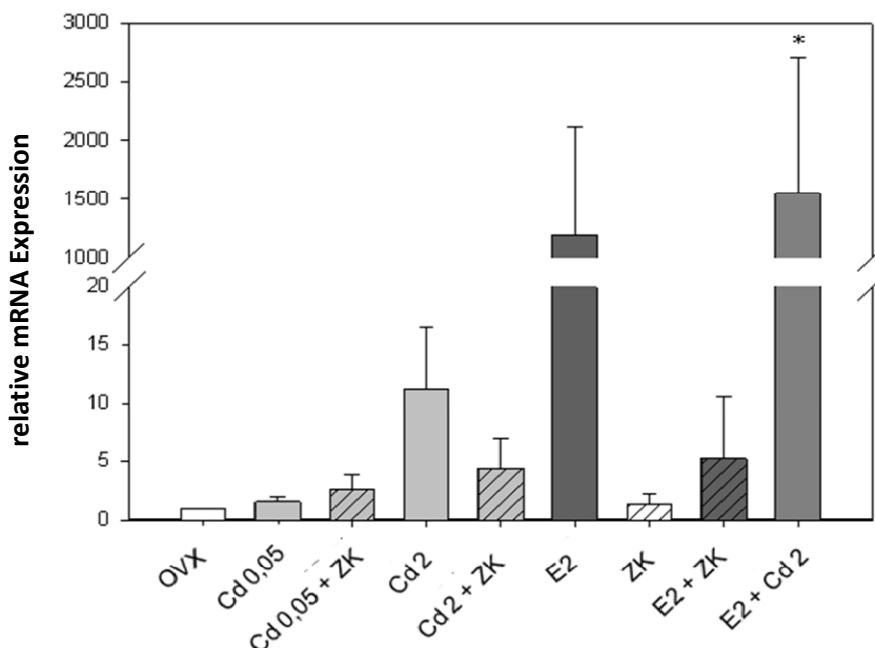


Abb. 22 Relative mRNA Expression von Complement Component 3 (C3) in Uteri von Ratten nach einmaliger intraperitonealer Injektion von CdCl₂ 0,05 mg/kg KG, CdCl₂ 0,05 plus ZK 2,5 mg/kg KG, CdCl₂ 2 mg/kg KG, CdCl₂ 2 + ZK 2,5 mg/kg KG, E2 0,5 mg/kg KG, ZK 2,5 mg/kg KG, E2 0,5 plus ZK 2,5 mg/kg KG und E2 0,5 plus CdCl₂ 2 mg/kg KG. Gezeigt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardabweichungen für n = 6 Tiere. p* ≤ 0,05 signifikant unterschiedlich zu OVX, ANOVA (Kluxen et al. 2009)

In Kombination mit Estradiol wirkte Cadmium also agonistisch. Ferner zeigen die Befunde, dass estrogene Effekte von Cadmium am Uterus durch ZK 191703 zumindest teilweise antagonisiert werden; dies ist beim Parameter C3-Expression deutlicher als beim Uterusgewicht. Die Befunde sprechen dafür, dass hormonelle Wirkungen von Cadmium am Uterus zumindest teilweise ER-vermittelt sind (Kluxen et al. 2009).

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse eine estrogene Wirkung von Cadmium im Uterus nach intraperitonealer Injektion. Anhand der Expression von C3 wurde aber deutlich, dass das Schwermetall in geringen Dosen offenbar auch antiestrogen wirken kann. Zum ersten Mal ist zudem nach oraler Exposition eine estrogenartige Wirkung für Cadmium gezeigt worden, die wie folgt charakterisiert ist: Nach Kurz- und Langzeit-Administration des Schwermetalls sind morphologische Parameter der

Estrogenität am Uterus unbeeinflusst, während das Estrogen-regulierte C3-Gen deutlich induziert ist. Der Expositionspfad und die Dosis spielen also eine entscheidende Rolle für die Ausprägung hormoneller Wirkungen am Estrogen-Zielorgan Uterus: Die deutlich höhere estrogene Potenz von Cadmium nach *i.p.* Injektion geht einher mit >100fach höheren Cd-Gewebespiegeln als nach oraler Verabreichung der gleichen Dosis (Fig. 6 in Höfer et al. 2009).

5.1.2 Cadmium-Verteilung in Blut und Geweben

Die Expositions-abhängige Verteilung des Schwermetalls nach *i.p.* bzw. nach oraler Kurz- und Langzeit-Applikation wurde nicht nur im Uterus, sondern auch durch atomabsorptionsspektrometrische Messungen der Cadmiumgehalte in Blut, Leber, Niere und Dünndarm bestimmt. Wie erwartet stieg in allen Organen der Cd-Gehalt mit der Dosis an. Die Analyse dokumentierte darüber hinaus den erheblichen Einfluss der Applikationsart auf die absoluten Spiegel: So hatten z.B. Tiere nach *i.p.* Injektion von 2 mg CdCl₂/kg KG (Einzeldosis) 33-fach höhere Cadmium-Gehalte im Blut als Ratten nach dreimaliger *gavage* Verabreichung der gleichen Dosis (Fig. 4 in Höfer et al. 2009). Nach *i.p.* Applikation von Cadmium waren im Vergleich zur oralen Applikation auch die höchsten absoluten Cadmiumgehalte in Leber und Niere zu finden (Fig. 5 in Höfer et al. 2009; Tab. 1 in Höfer et al. 2010). Einen deutlichen Einfluss der Applikationsroute auf Bioverfügbarkeit und Verteilung von Cadmium im Organismus haben auch Elsenhans et al. (1994 a,b) nach oraler und subkutaner Applikation beschrieben. Bei den Versuchen mit oraler Applikation konnten zudem interessante Unterschiede zwischen Kurz- und Langzeit-Exposition beobachtet werden: So waren in Leber und Uterus die Cadmiumgehalte nach akuter *gavage* Applikation für 3 Tage höher als nach 28-tägiger Verabreichung der gleichen täglichen Dosis (4 mg CdCl₂/kg KG) mit Trinkwasser (Fig. 5 & 6 in Höfer et al. 2009).

Die Analyse der Cadmium-Spiegel im Dünndarm zeigte ebenfalls einen dosisabhängigen Anstieg. Doch anders als in Leber, Niere und Uterus waren im Dünndarm die Cadmiumgehalte nach oraler Kurzzeit-Gabe am höchsten, gefolgt von denen nach *i.p.* Applikation und Trinkwasser-Gabe (Tab. 1 in Höfer et al. 2010). Nach parenteraler Gabe, z.B. nach intraperitonealer Injektion, resorbiertes Cadmium wird

in der Leber an Glutathion gebunden und als Konjugat mit Gallenflüssigkeit in den Darm abgegeben (Cherian and Vostal 1977). Zum Teil wird Cadmium über die Faeces ausgeschieden bzw. über die Mucosa wieder aufgenommen und in andere Organe verteilt (Zalups 1997, 2000; Zalups and Ahmad 2003). Interessanterweise waren die Cadmium-Gehalte im Dünndarm nach oraler Langzeit-Exposition geringer als nach dreimaliger *gavage* Applikation. Auch die Befunde im Dünndarm zeigen also eine unterschiedliche Deposition des Metalls für die verschiedenen Applikationsarten.

5.1.3 Hormonelle Aktivität von Cadmium im Intestinum von Ratten

Estrogenartige Wirkungen von Cadmium sind bislang ausschließlich in klassischen Zielgeweben wie Uterus und Mamma untersucht worden. Nach dem Verzehr von Nahrung ist jedoch der Intestinaltrakt Nahrungsinhaltsstoffen und Kontaminanten in hohem Maß ausgesetzt. Zudem werden im Darm Steroidhormonrezeptoren exprimiert. Daher wurden biologische Effekte von Cadmium und dem Referenzestrogen auch im Intestinum untersucht. Als typischer Responseparameter einer Cadmium Exposition wurde die Expression des Metallothionein (MT) Gens MT1a herangezogen. MTs sind cysteinreiche Proteine, die in vier Klassen (MT I bis IV) und Isoformen vorkommen (Thirumoorthy et al. 2007) und durch Metalle, Arzneimittel oder Inflammationsmediatoren induziert werden können (Klaassen et al. 1999; Coyle et al. 2002; Sato and Kondoh 2002). Isoform MT1a war nach *i.p.* Injektion der höchsten und interessanterweise auch nach der niedrigsten Cd-Dosis in Dünndarmmucosa und in der Niere signifikant induziert (Fig. 1 in Höfer et al. 2010). Nach oraler Kurzzeit-Applikation war MT1a in beiden Geweben noch stärker induziert als nach *i.p.* Gabe von Cadmium (Fig. 2 Höfer et al. 2010). Die glockenförmige Dosis-Effekt Kurve, also geringe bzw. fehlende Zunahme der MT1a mRNA bei der höchsten *gavage* Dosis (4 mg/kg KG), kann auf Toxizität infolge hoher lokaler Cd-Spiegel zurückzuführen sein. Interessanterweise führte auch Steroidestrogen-Behandlung zur erhöhten Expression von MT1a in Darm und Niere; in der Niere war der Effekt signifikant (Fig. 1 & 2 in Höfer et al. 2010). Dieser Befund ist in Einklang mit anderen Daten über einen Anstieg von MT in der Niere nach Estrogen-Behandlung (Blazka

and Shaikh 1991), und kann bedeuten, dass MT-Expression auch ER-abhängig reguliert wird und nicht allein durch Metall-induzierten oxidativen Stress.

Als Parameter für hormonelle Effekte von Cadmium im Intestinum wurde die Expression von Estrogen-regulierten Genen wie z.B. pS2 analysiert. Die Expression von pS2 wird in typischen Zielorganen und in MCF-7 Zellen (Brown et al. 1984), aber auch im Darm durch Estrogene moduliert (Singh et al. 1998). Nach *i.p.* und oraler Langzeit-Applikation von Cadmium und Steroidestrogen war die pS2 Expression in der Mucosa signifikant vermindert (Fig. 3 in Höfer et al. 2010). Dies spricht für eine estrogenartige Wirkung des Metalls im Darm. Als weiterer Parameter diente der Vitamin-D-Rezeptor (VDR), denn der VDR kann durch Estrogene in intestinalen Zellen induziert werden (Gilad et al. 2006; Liel et al. 1999; Schwartz et al. 2000). In Einklang damit war in den Untersuchungen dieser Arbeit sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine deutlich erhöhte VDR Expression nach EE-Behandlung nachweisbar. Cadmium-Exposition führte jedoch zu keiner statistisch signifikanten Modulation des VDR (Fig. 4 in Höfer et al. 2010). Die stärkere Wirkung des Steroids auf das VDR Gen könnte durch Unterschiede in der estrogenen Potenz und im Mechanismus des „Signaling“ bedingt sein, wie in Höfer et al. (2010) diskutiert: *“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 metallo hormone can activate these signaling events in the intestine which expresses subtype ERβ. Cd was found to trigger a transient phosphorylation of ERK in MCF-7 cells expressing ERα, but not in MDA-MB231 cells that express only ERβ (Liu et al. 2008).”*

Die Expression der Estrogenrezeptoren ist gewebespezifisch und wird durch den Liganden Estradiol moduliert (Enmark and Gustafsson 1999; Deroo and Korach 2006). Daher wurde auch die Expression von ER α und β analysiert. Während der ER α im Uterus aber nicht im Intestinum der Ratten nachweisbar war, konnte der ER β in beiden Geweben detektiert werden (Fig. 5 in Höfer et al. 2010). Das Expressionsmuster entspricht der Literatur zu ER α und β (Kuiper et al. 1996, 1997; Enmark and Gustafsson 1999). In Mucosa war der ER β sowohl nach Steroid- als auch nach Cadmium-Behandlung auf mRNA- und auf Proteinebene vermindert exprimiert (Fig. 6 in Höfer et al. 2010). Der Befund spricht somit für eine estrogenartige Wirkung von Cadmium im Darm.

Bislang ist der Einfluss von Cadmium auf Estrogen-regulierte Gene im Darm noch nicht untersucht worden. Die Daten dieser Arbeit zeigen nun zum ersten Mal, dass die Expression solcher Gene durch das Schwermetall moduliert werden kann. Um zu klären, ob diese Effekte direkt über die Estrogenrezeptoren vermittelt werden oder durch andere Mechanismen der Signalübertragung, sind weitere Studien nötig. Ein Ansatz sind dabei Experimente mit Hormonrezeptor Antagonisten und *in vitro* Untersuchungen an Zellkulturen.

5.2 Estrogene/Antiestrogene Wirkungen von Cadmium *in vitro*

Zur weiteren Charakterisierung hormonartiger Wirkungen von Cadmium wurden Zellkulturen eingesetzt, und zwar die Estrogen-sensitiven MCF-7 Brustkrebszellen sowie zwei Darmkrebszelllinien: HT-29 und HCT-116. Da es sich hierbei um Tumorzellen handelt, wurde zunächst untersucht, inwieweit sich *in vitro* ähnliche Wirkungen wie *in vivo* beobachtet nachstellen lassen und welche Estrogenrezeptorformen (ER α und/oder ER β) die Zellen exprimieren.

5.2.1 Effekte von Cadmium in Brustkrebszellen (MCF-7)

Bisherige *in vitro* Studien zu estrogenen Effekten von Cadmium fokussierten weitgehend auf MCF-7 Brustkrebszellen: In diesen Studien bewirkte CdCl₂ (in μ M Konzentrationen) eine gesteigerte Zellproliferation und induzierte weitere Rezeptor-vermittelte Zellantworten (Garcia-Morales et al. 1994; Choe et al. 2003; Brama et al. 2007). Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten MCF-7 Zellen exprimierten den ER α , aber keinen ER β (Abb. 8 und 10). In Einklang mit früheren Befunden (Brama et al. 2007; Garcia-Morales et al. 1994) führten Cadmium wie auch Estradiol Exposition zu einer verminderten ER α Expression (Abb. 7).

MCF-7 Zellen zeigten nur eine geringe basale Expression des Progesteronrezeptors (Abb. 12); doch nach Estradiol-Behandlung war der PR signifikant (30-fach) induziert (Abb. 11). Induktion von PR durch Steroideestrogene ist ein bekannter Effekt (Bouchard 1999; Graham and Clarke 1997). Cadmium Exposition führte hingegen zu einer signifikant verminderten PR Expression (Abb. 11 und 18). Dieses Ergebnis

unterscheidet sich von dem der Arbeitsgruppe von Garcia-Morales et al. (1994), die mit Cadmium (1 μM) eine ähnliche Induktion des PR wie nach E2 Exposition beobachteten, allerdings nach deutlich kürzeren Behandlungszeiten als in unseren Versuchen mit MCF-7 Zellen. Doch ähnlich wie dort berichtet (Garcia-Morales et al. 1994) wirkte Cadmium in Kombination mit Estradiol ebenfalls agonistisch und verstärkte die Induktion von PR (Abb. 18). Die Expression des Vitamin-D-Rezeptors (VDR) wurde bislang in MCF-7 Zellen noch nicht untersucht. Der VDR zeigte eine geringe Induktion nach E2-Behandlung und eine tendenziell geringere Expression nach Cadmium-Exposition (Abb. 13).

Zwischenfazit: Cadmium allein zeigte in MCF-7 Zellen also estrogenartige Wirkungen im Hinblick auf die Expression des ER α , hingegen nicht auf die Expression von PR und VDR. In Kombination mit E2 verstärkte Cadmium jedoch die Induktion des PR (vgl. Kapitel 4.2, Tab. 2A).

5.2.2 Effekte von Cadmium in Darmkrebszellen (HT-29 und HCT-116)

Hormonelle Effekte von Cadmium sind bislang noch nicht in Zelllinien aus dem Darm untersucht worden. Um eine mögliche Brücke zu den *in vivo* Befunden an der Mucosa zu schlagen, wurden die Darmkarzinomzellen HCT-116 und HT-29 ebenfalls mit Cadmium bzw. Estradiol behandelt und verschiedene Parameter ermittelt. In dem Zusammenhang zeigte sich allerdings, dass HCT-116 Zellen weder den ER α noch den ER β exprimieren, während in HT-29 Zellen eine basale Expression des ER α nachweisbar war (Abb. 8 und 10). Die Behandlung von HT-29 Zellen mit E2 hatte keinen messbaren Einfluss auf die ER α Expression: Cadmium führte bei der höchsten applizierten Konzentration tendenziell zu einer Zunahme (Abb. 9). Dieses Modulationsmuster ist möglicherweise auf die schwache Basalexpression des ER α in den HT-29 Zellen zurückzuführen.

Auch die Expression des VDR zeigte in HCT-116 und in HT-29 Zellen nach Estradiol- oder Cadmium-Behandlung nur geringe Veränderungen, mit einer überwiegend verminderten Expression (Abb. 14 und 15). Dagegen war der VDR in der Darmmucosa *in vivo* exponierter Ratten durch Cadmium gering, durch Steroid-estrogen deutlich induziert (Fig. 4 in Höfer et al. 2010). Die *in vivo* Befunde dieser

Arbeit entsprechen somit eher den Ergebnissen anderer Studien, die *in vitro* in HT-29 Zellen und *in vivo* in Colono- und Duodenozyten eine Induktion des VDR nach Exposition gegenüber Steroidestrogenen fanden (Liel et al. 1999; Schwartz et al. 2000; Gilad et al. 2006).

Anders als *in vivo*, wo der Progesteronrezeptor in benignen und malignen Colontumoren nachweisbar ist (Marugo et al. 1985; Schindler 2007), war der PR in den HT-29 und HCT-116 Zellen nicht nachweisbar (Abb. 12). Dagegen zeigte die Analyse von Metallothionein, als klassischem Parameter einer Cadmium Exposition und Toxizität, in Darmzelllinien ähnliche Wirkungen wie *in vivo*: In HCT-116 und HT-29 Zellen war die MT Expression nach Exposition gegenüber der höchsten Dosis von 1 μM signifikant um das 3- bzw. 10-fache stimuliert (Abb. 16 und 17). Auch in Cd-exponierten Ratten war MT in der Mucosa (und in der Niere) dosis-abhängig stärker exprimiert (Fig. 2 in Höfer et al. 2010).

5.2.3 Erkenntnisse aus den *in vitro* Untersuchungen

Aufgrund der leichten Kultivierbarkeit (unbegrenzte Teilungsfähigkeit) werden für *in vitro* Studien oft Tumorzelllinien herangezogen. Tumorzellen verlieren im Zuge der Dedifferenzierung aber die normale Wachstumskontrolle und teils auch wichtige Rezeptoren. Sie sind daher nur begrenzt geeignete *in vitro* Modelle für die Gewebe aus denen sie stammen. Befunde an Zelllinien können dennoch Einblicke in den Wirkmodus von Substanzen liefern.

In MCF-7 Brustkrebszellen erhöhte Estradiol die PR Expression deutlich, wohingegen Cadmium allein die Expression des PR minderte, also antiestrogen wirkte. Cadmium und Estradiol in Kombination verstärkten die Induktion des PR noch einmal im Vergleich zur alleinigen Applikation von Estradiol. Möglicherweise intensiviert Cadmium die Bindung des Steroids an den Rezeptor (hier ER α) und verstärkt so die estrogene Wirkung des natürlichen Liganden. Eine ähnliche agonistische Wirkung zeigte Cadmium in Kombination mit Estradiol auch *in vivo* am Uterus (Kluxen et al. 2009).

Der Antagonist ZK 191703 allein modulierte die PR Expression nicht, konnte aber wie erwartet die Wirkung von Estradiol auf den PR antagonisieren. Der Effekt von

Cadmium konnte hingegen nicht antagonisiert werden. Dies kann dafür sprechen, dass Cadmium seine Wirkung nicht über die Bindungstasche am ER α entfaltet, sondern über die Modulation zellulärer Signaltransduktionskaskaden wirkt (vgl. Kapitel 1.1.4.3).

In der Darmkrebszelllinie HT-29 wurde u. a. die Expression des ER α untersucht. Hier verstärkte Cadmium in Kombination mit Estradiol ebenfalls den Effekt, den das Steroid allein bewirkte: Der ER α wurde noch stärker reprimiert. Dieser Effekt und auch die Wirkung von Estradiol allein ließen sich allerdings mit ZK 191703 nicht antagonisieren. Allerdings ist der ER α in den HT-29 Zellen nur schwach exprimiert und daher eine Antagonisierung des relativ geringen Effekts möglicherweise nicht zu erwirken. Das VDR Gen wurde nach Cadmium oder Estradiol Exposition in den HT-29 Zellen vermindert exprimiert, während kombinierte Exposition zu einer erhöhten Expression des VDRs führte. Der ER-Antagonist ZK 191703 verstärkte in diesem Versuch sogar die Estradiol Wirkung, d. h. der VDR mRNA Level wurde noch stärker reprimiert. Insgesamt deutet dieses Experiment darauf hin, dass estrogene Effekte auf die VDR Expression eher nicht ER-abhängig sind, sondern vermutlich ebenfalls über andere zelluläre Signalwege vermittelt werden. Dafür spricht auch, dass im Promotor des VDR Gens kein ERE gefunden wurde (Gilad and Schwartz 2007).

Vermutlich sind andere *in vitro* Modelle geeigneter als die beiden hier genutzten Darmzelllinien, die wohl wegen mangelnder Rezeptor Expression nur eine geringe Sensitivität für hormonelle Wirkungen von Estradiol und Cadmium zeigten, während *in vivo* in der Mucosa durchaus estrogene Effekte auf die Expression verschiedener Gene gefunden wurden (s.o. 5.1.3). Die Frage, ob hormonelle Effekte von Cadmium in intestinalen Zellen über Interaktion mit ER β vermittelt sind, könnte künftig nach Transfektion von Zellen mit einem Expressionsvektor für den ER β untersucht werden. Darüber hinaus sind auch Untersuchungen in Primärzellkulturen tierischen oder humanen Ursprungs wünschenswert, z.B. eine Kultivierung von Dünndarmzellen, dem primären Resorptionsort für Cadmium im Organismus.

5.3 Bedeutung der Ergebnisse und Ausblick

Insgesamt zeigen die *in vivo* Ergebnisse, dass estrogene Parameter im klassischen Zielorgan Uterus sowohl nach intraperitonealer Gabe, aber auch nach oraler Kurz- und Langzeitadministration von Cadmium beeinflusst werden. Auch *in vitro* zeigte das Metall konzentrationsabhängige Wirkungen auf Estrogen-responsive MCF-7 Brustkrebszellen. Hormonelle Aktivität von Cadmium äußert sich überwiegend in einer estrogenen Wirkung, die durch reine Antiestrogene partiell antagonisiert wird. Die Modulation der C3-Expression im Uterus und der PR-Expression in MCF-7 Zellen weisen zudem auf eine antiestrogene Wirkung in Abhängigkeit von der Cadmium-Dosis hin. Eine gleichzeitige Exposition mit Cadmium und Steroidestrogen verstärkt aber deren estrogene Wirkungen. Um dieses interessante Wirkungsmuster zu klären, sind weiterführende Untersuchungen zu den molekularen Mechanismen von Cadmium und zur Interaktion mit Estrogenrezeptoren (ER α / β) nötig. Es ist denkbar, dass Cadmium durch Bindung an Thiolgruppen im ER α eine Rezeptordimerisierung und damit die Bindung an EREs ermöglicht und auf diesem Weg könnte Cadmium die Aktivierung oder Reprimierung des Zielgens bewirken.

Weitere Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmals, dass Cadmium *in vivo* auch typische Estrogen-responsive Parameter im Darm moduliert: Nach subchronischer Cadmium Gabe ist die Expression von ER β und pS2 vermindert, die des VDR aber nicht signifikant moduliert. Während im VDR Gen kein ERE vorhanden ist, verfügen das pS2 und das ER β Gen über EREs im Promotor. Die Befunde sprechen somit für eine Cadmium-induzierte Transaktivierung von Targetgenen über die EREs. Ungeklärt ist allerdings die Rolle anderer Signalwege. Daher sind zur Aufklärung des Wirkmechanismus von Cadmium im Darm weiterführende *in vivo* Studien mit Antiestrogenen oder reinen Agonisten bzw. in ER α / β - Knock out Tieren angezeigt, sowie *in vitro* Ligandenbindungs- und Reporterassays mit ER β .

Auch die hier in der Rattenmucosa aufgedeckte verminderte Expression des ER β nach Schwermetallexposition ist von weitergehendem Interesse, denn dieser Rezeptor spielt offenbar eine wichtige Rolle in der Darmhomöostase. Dafür sprechen publizierte Befunde, die z.B. den Verlust des ER β im Zuge der Tumorprogression zeigen (Foley et al. 2000; Konstantinopoulos et al. 2003; Bardin et al. 2004; Martinetti et al. 2005) oder eine regulatorische Funktion für ER β bei inflammatorischen

Darmerkrankungen (Gustafsson 2003; Harris et al. 2003; Harnish et al. 2004; Harnish 2006). Ob Cadmium bei diesen Erkrankungen eine Bedeutung hat, ist noch Spekulation, sollte aber experimentell in einem Inflammationsmodell weiter untersucht werden.

Neben den in dieser Arbeit untersuchten Estrogen-regulierten Parametern ist auch die Induktion des klassischen Stressgens Metallothionein (MT) durch Cadmium interessant. MT1a Expression war durch Cadmium, aber auch durch die Referenzestrogene Estradiol und Ethinylestradiol, in Dünndarmmucosa und Niere induziert, in Einklang mit älteren Befunden zur Induktion von MT in Niere und Uterus (Blazka und Shaikh 1991; Rivera-Gonzalez et al. 1998). Weitere Studien haben gezeigt, dass das humane MT2a-Gen über ein Hormon-responsives Element (HRE) verfügt und durch Glucocorticoide induzierbar ist (Karin et al. 1984; Karin and Richards 1984). Eine HRE-vermittelte Induktion von MT durch Cadmium kann daher auch in Betracht gezogen werden. In Diskussionen zu endokrinen Effekten von Cadmium spielen zunehmend auch Wirkungen an anderen Steroidhormonrezeptoren eine Rolle, z.B. dem Androgenrezeptor (Takiguchi and Yoshihara 2006; Byrne et al. 2009).

Abschließend folgen noch einige Anmerkungen zur toxikologischen Bewertung und Einordnung hormonartiger Wirkungen von Cadmium: Die im Rahmen dieser Arbeit dokumentierten estrogenen Wirkungen von Cadmium am Uterus (Höfer et al. 2009) bestätigen zwar frühere Befunde (nach *i.p.* Injektion von CdCl₂), relativieren diese aber ganz maßgeblich in Hinblick auf eine viel geringere hormonelle Potenz bei relevantem Expositionspfad (*per os* Applikation). Die Untersuchung estrogenen Effekte nach oraler Exposition definierter Cadmium Dosen ist für die weitere Risikoabschätzung hilfreich, da nun kritische Dosen zur Auslösung estrogenen Effekte mit solchen, die nephrotoxisch wirken (bisherige Grundlage toxikologischer Bewertungen) verglichen werden können.

Die an Ratten oral verabreichten Cadmium Mengen übersteigen deutlich (bei der kleinsten Dosis um den Faktor 100) die übliche humane Aufnahme von Cadmium mit Nahrung und Trinkwasser. Andererseits sollten hohe Dosen ein *worst-case*-Szenario nachahmen, z.B. nach Unfällen mit hoher Cadmium Freisetzung und zusätzlicher

oralen und inhalativen Aufnahme von Cadmium. Auch Tabakrauchen führt zu höheren Cadmiumspiegeln in Organen von Rauchern als bei Nichtrauchern. In dem Zusammenhang ist die Wirkung von Cadmium in anderen Estrogen-regulierten Geweben wie z.B. der Brustdrüse interessant als ein möglicher Faktor bei der Entstehung von Mammatumoren. Aber nicht nur der weibliche Organismus ist Ziel estrogener Wirkung. Hormonelle Effekte von Cadmium im männlichen Organismus, der auch Estrogenrezeptoren (ER α / β) exprimiert, sind denkbar. Daher sind lokale Effekte von Cadmium im Darm, die möglicherweise ER β -vermittelt sind (Höfer et al. 2010), von weitergehendem Interesse. Cadmium wird vom Organismus nicht allein, sondern zusammen mit anderen Nahrungsinhaltsstoffen mit estrogener Aktivität, z.B. Phytoestrogenen, aufgenommen, sodass auch eine kombinierte Exposition untersucht werden sollte.

6. Zusammenfassung

Der Mensch ist dem Schwermetall Cadmium über kontaminierte Lebensmittel, Trinkwasser oder Tabakrauch ausgesetzt. Grenzwertsetzungen sollen die orale Exposition gering halten und gegen die schon seit langem bekannte Toxizität von Cadmium schützen. Erst kürzlich hat die European Food Safety Agency aufgrund neuer Humandaten zur Nephrotoxizität die tolerierbare wöchentliche Aufnahme für Cadmium von 7 auf 2,5 µg/kg KG reduziert (EFSA 2009). Inzwischen wird Cadmium auch als Metalloestrogen und potentieller endokriner Disruptor angesehen. Doch zum Wirkmechanismus, wie Cadmium hormonelle Effekte induzieren kann, ist noch nicht viel bekannt und estrogene Wirkungen sind im Tierversuch bislang nur nach intraperitonealer Injektion dokumentiert, also einem unphysiologischen Applikationspfad. Relevanter für die toxikologische Bewertung hormonartiger Wirkungen von Cadmium sind *in vivo* Studien mit oraler Verabreichung, denn die nichtrauchende Bevölkerung ist primär über die Nahrung exponiert.

Die vorliegende Arbeit hat hormonartige Wirkungen von Cadmium *in vitro* an drei Zelllinien und *in vivo* am Modell der ovariectomierten (OVX) Ratte untersucht und charakterisiert. *In vitro* wurde die Aktivität von Cadmium anhand der Expression Estrogen-sensitiver Markergene in MCF-7 Brustkrebszellen und in den Darmkrebszelllinien HT-29 und HCT-116 untersucht. Für *in vivo* Studien wurden OVX Wistar-Ratten sowohl intraperitoneal (1 mal) als auch oral per gavage (3 Tage) und via Trinkwasser (4 Wochen) mit abgestuften Dosen Cadmiumchlorid (CdCl₂) behandelt. Hormonelle Wirkungen des Schwermetalls und eines Steroidestrogens wurden mittels histologischer und molekularer Response-Parameter charakterisiert, und zwar nicht nur im klassischen Zielgewebe Uterus, das hauptsächlich Estrogenrezeptor-Subtyp α (ERα) exprimiert, sondern auch im Darm, der vor allem Rezeptor-Subtyp β (ERβ) exprimiert und Nahrungsinhaltsstoffen und Kontaminanten direkt ausgesetzt ist.

Die *in vitro* Befunde zeigten, dass einige Tumorzelllinien für mechanistische Untersuchungen estrogener Effekte von Cadmium nur begrenzt geeignet sind, weil sie wichtige Rezeptoren im Zuge der Dedifferenzierung verlieren: Von den beiden Darm-

zellen zeigte nur eine Linie (HT-29) eine schwache Expression des ER α . Cadmium verstärkte konzentrationsabhängig die Expression von Metallothionein, das bekanntlich durch Metalle induziert wird. Allerdings konnte, anders als *in vivo* in der Mucosa (s.u.), in den Darmzelllinien keine klar ausgeprägte Modulation Estrogen-regulierter Gene nachgewiesen werden. Die MCF-7 Zellen reagierten auf Behandlung mit Cadmium oder Estradiol mit einer verminderten ER α Expression; der Progesteron-Rezeptor wurde durch Estradiol oder die Kombination des Steroids mit dem Metall induziert, aber nicht von Cadmium allein. Möglicherweise intensiviert Cadmium die Bindung des Steroids an den Rezeptor (ER α) und verstärkt so die estrogene Wirkung des natürlichen Liganden, während es allein eher antiestrogen wirkt.

Die *in vivo* Befunde aus der Nagerstudie mit einem breiten Spektrum an Dosen und unterschiedlichen Expositionswegen sind bereits publiziert (Höfer et al. 2009; Höfer et al. 2010). Dort dokumentierte Wirkungen am Uterus nach intraperitonealer (*i.p.*) Injektion von CdCl₂ bestätigen im Prinzip frühere Befunde zur Estrogenität des Schwermetalls. Anhand der Expression von Complement Component 3 (C3) wurde aber deutlich, dass das Schwermetall in geringen Dosen offenbar auch antiestrogen wirken kann. Zum ersten Mal ist zudem nach oraler Exposition eine estrogenartige Wirkung für Cadmium gezeigt worden, die wie folgt charakterisiert ist: Nach Kurz- und Langzeit-Verabreichung von CdCl₂ sind morphologische Parameter der Estrogenität am Uterus unbeeinflusst, während das Estrogen-regulierte C3-Gen deutlich induziert ist. Der Expositionspfad und die Dosis spielen also eine entscheidende Rolle für die Ausprägung hormoneller Wirkungen am Zielorgan Uterus: Die deutlich höhere estrogene Potenz von Cadmium nach *i.p.* Injektion geht einher mit >100-fach höheren Cd-Gewebespiegeln als nach oraler Verabreichung der gleichen Dosis (Höfer et al. 2009).

Weitere Ergebnisse zeigen erstmals, dass Cadmium auch im Darm der Ratten typische Estrogen-responsive Parameter moduliert: Nach subchronischer Exposition ist die Expression von ER β und pS2 vermindert, die des Vitamin-D-Rezeptors (VDR) Gens aber nicht signifikant moduliert. Während im VDR Gen kein Estrogen-responsives Element (ERE) vorhanden ist, verfügen das pS2 und das ER β Gen über EREs im Promotor. Die Befunde sprechen also für eine Cadmium-abhängige

Regulierung von Zielgenen über die EREs (Höfer et al. 2010). Ungeklärt ist allerdings die Rolle anderer Signalwege. Die hier in der Rattenmucosa aufgedeckte verminderte Expression des ER β nach Schwermetallexposition ist von weitergehendem Interesse, weil dieser Rezeptor offenbar eine wichtige Rolle in der Darmhomöostase spielt. Daher und zur Aufklärung des Wirkmechanismus von Cadmium sind somit weitere Studien angezeigt.

7. Summary

Human exposure to the heavy metal cadmium (Cd) occurs with contaminated food, drinking water and tobacco smoke. Setting of limit values are means to reduce oral exposure and thus protect consumers against the well known toxicity of cadmium. Recently, the European Food Safety Agency has lowered the tolerable weekly intake from 7.5 to 2.5 μg per kg body weight, based on new data for nephrotoxicity of cadmium in humans (EFSA 2009). Cadmium is now also regarded as metalloestrogen and potential endocrine disruptor. However, little is known about the mechanisms by which it elicits hormonal effects in cells, and estrogenic activity *in vivo* has only been documented so far in rodents upon intraperitoneal injection, an unphysiological exposure route. But, more relevant for a toxicological evaluation of hormonal effects are rodent studies with oral administration, since cadmium exposure in nonsmokers is mainly from dietary intake.

The experimental work of this thesis comprises investigations on hormonal effects of cadmium *in vitro*, in three cell lines, and studies in a rat model, the ovariectomized Wistar rat. Cadmium activity *in vitro* was studied by means of estrogen-sensitive marker genes in MCF-7 breast cancer cells and in the colon cancer cell lines HT-29 und HCT-116. For *in vivo* studies, rats received different doses of cadmium chloride (CdCl_2), either by *i.p.* injection (once), by gavage (on 3 days) or with drinking water (on 28 days). Hormonal effects resulting from heavy metal and reference steroid estrogen exposure were characterized by analysis of established histological and molecular response parameters, first in the uterus, a target tissue that expresses primarily the estrogen receptor subtype α ($\text{ER}\alpha$), but also in the intestinal tract since the gut is directly exposed to food contaminants and expresses mostly the estrogen receptor subtype β ($\text{ER}\beta$).

The results obtained *in vitro* indicate that some tumour cell lines are of limited value for mechanistic studies of estrogenicity of cadmium since important receptors are lost in dedifferentiation: Of the two colon tumour cell lines only one (HT-29) showed a weak expression of $\text{ER}\alpha$. Cadmium increased concentration-dependently the expression of metallothionein that is known to be induced by metals. But, other than observed *in vivo* in rat mucosa (*vide infra*), colon cell lines showed no clear

modulation of estrogen-regulated genes. The MCF-7 breast cancer cells responded to treatment with cadmium or estradiol by down-regulation of ER α expression; the progesterone receptor was induced by estradiol or a combination of steroid and metal, but not by cadmium alone which decreased PR expression. Cadmium may enhance binding of the steroid to its receptor (ER α) and thereby increase estrogenic effects of the natural ligand, whilst cadmium alone appears to act antiestrogenic.

The results of the *in vivo* studies for a wide range of doses and different exposure routes have been published recently (Höfer et al. 2009; Höfer et al. 2010). Effects on the rat uterus seen upon intraperitoneal (*i.p.*) injection of CdCl₂ confirm in principal earlier findings on an estrogenic activity of the heavy metal. Yet, decreases in uterine complement component 3 (C3) expression at some lower doses indicated also antiestrogenic effects of the heavy metal. Furthermore, there is now evidence for estrogenic activity upon oral exposure to cadmium that is characterized as follows: Upon short- and long-term administration of CdCl₂, the morphological parameters of estrogenicity remain unaffected in uterus, whilst the estrogen-regulated C3 gene is clearly induced. Route of exposure and dose are major determinants of potency at the target organ uterus, and a much higher estrogenic activity of cadmium upon *i.p.* injection is in line with >100-fold higher Cd-tissue levels than after oral administration of a comparable dose (Höfer et al. 2009).

Moreover, new findings indicate that cadmium can also modulate some estrogen-responsive parameters in the intestinal tract of rats: After subchronic oral metal exposure the expression of ER β and pS2 was clearly decreased, that of vitamin D receptor (VDR) was not significantly affected. The ER β and pS2 genes possess an estrogen responsive element (ERE) in their promoter, whilst EREs are not present in the promoter of the VDR gene. The results thus support the notion of cadmium regulating target genes via EREs, although other signalling events cannot be excluded at present (Höfer et al. 2010). The pronounced down-regulation of ER β and pS2 in rat intestine seen after heavy metal exposure are of concern, since pS2 is involved in mucosal healing and ER β in inflammatory bowel disease. Therefore, further investigations on the mode of action of cadmium are indicated.

8. Literatur

- Adlercreutz H and Mazur W (1997) Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann Med* 29 (2): 95-120.
- Al-Nasser IA (2000) Cadmium hepatotoxicity and alterations of the mitochondrial function. *J Toxicol Clin Toxicol* 38(4): 407-13.
- Andersen O, Nielsen JB, Sorensen JA and Scherrebeck L (1994) Experimental localization of intestinal uptake sites for metals (Cd, Hg, Zn, Se) in vivo in mice. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 3: 199-206.
- Arnold SF, Melamed M, Vorojeikina DP, Notides AC and Sasson S (1997) Estradiol-binding mechanism and binding capacity of the human estrogen receptor is regulated by tyrosine phosphorylation. *Mol Endocrinol* 11(1): 48-53.
- Arnold SF, Obourn JD, Jaffe H and Notides AC (1994) Serine 167 is the major estradiol-induced phosphorylation site on the human estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 8(9): 1208-14.
- Arnold SF, Vorojeikina DP and Notides AC (1995) Phosphorylation of tyrosine 537 on the human estrogen receptor is required for binding to an estrogen response element. *J Biol Chem* 270(50): 30205-12.
- Assikis VJ, Neven P, Jordan VC and Vergote I (1996) A realistic clinical perspective of tamoxifen and endometrial carcinogenesis. *Eur J Cancer* 32A(9): 1464-76.
- ATSDR (2008) Draft Toxicological Profile for Cadmium. Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 450 pp.
- Balasz J (2003) Sex steroids and bone: current perspectives. *Hum Reprod Update* 9(3): 207-22.
- Barbier O, Jacquillet G, Tauc M, Cougnon M and Poujeol P (2005) Effect of heavy metals on, and handling by, the kidney. *Nephron Physiol* 99(4): p105-10.
- Bardin A, Boulle N, Lazennec G, Vignon F and Pujol P (2004) Loss of ERbeta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocr Relat Cancer* 11(3): 537-51.
- Barkhem T, Nilsson S and Gustafsson JA (2004) Molecular mechanisms, physiological consequences and pharmacological implications of estrogen receptor action. *Am J Pharmacogenomics* 4(1): 19-28.
- Beato M (1989) Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56(3): 335-44.
- Beekman JM, Allan GF, Tsai SY, Tsai MJ and O'Malley BW (1993) Transcriptional activation by the estrogen receptor requires a conformational change in the ligand binding domain. *Mol Endocrinol* 7(10): 1266-74.
- Behl C, Widmann M, Trapp T and Holsboer F (1995) 17-beta estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 216(2): 473-82.
- Berglund M, Akesson A, Nermell B and Vahter M (1994) Intestinal absorption of dietary cadmium in women depends on body iron stores and fiber intake. *Environ Health Perspect* 102(12): 1058-66.
- Bernard A (2008) Cadmium & its adverse effects on human health. *Indian J Med Res* 128(4): 557-64.

- Beyersmann D and Hartwig A (2008) Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch Toxicol* 82(8): 493-512.
- Beyersmann D and Hechtenberg S (1997) Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 144(2): 247-61.
- Black LJ, Sato M, Rowley ER, Magee DE, Bekele A, Williams DC, Cullinan GJ, Bendele R, Kauffman RF, Bensch WR and et al. (1994) Raloxifene (LY139481 HCl) prevents bone loss and reduces serum cholesterol without causing uterine hypertrophy in ovariectomized rats. *J Clin Invest* 93(1): 63-9.
- Blazka ME and Shaikh ZA (1991) Sex differences in hepatic and renal cadmium accumulation and metallothionein induction. Role of estradiol. *Biochem Pharmacol* 41(5): 775-80.
- Bouchard P (1999) Progesterone and the progesterone receptor. *J Reprod Med* 44: 153-7.
- Borenfreund E, Babich H and Martin-Alguacil N (1990) Rapid chemosensitivity with human normal and tumor cells in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol* 26(11): 1030-4.
- Brama M, Gnessi L, Basciani S, Cerulli N, Politi L, Spera G, Mariani S, Cherubini S, d'Abusco AS, Scandurra R and Migliaccio S (2007) Cadmium induces mitogenic signaling in breast cancer cell by an ERalpha-dependent mechanism. *Mol Cell Endocrinol* 264(1-2): 102-8.
- Brattain MG, Brattain DE, Fine WD, Khaled FM, Marks ME, Kimball PM, Arcolano LA and Danbury BH (1981) Initiation and characterization of cultures of human colonic carcinoma with different biological characteristics utilizing feeder layers of confluent fibroblasts. *Oncodev Biol Med* 2(5): 355-66.
- Brattain MG, Brattain DE, Sarrif AM, McRae LJ, Fine WD and Hawkins JG (1982) Enhancement of growth of human colon tumor cell lines by feeder layers of murine fibroblasts. *J Natl Cancer Inst* 69(4): 767-71.
- Brown JR, Shockley, P (1982) Serum albumin: structure and characterization of its ligand binding sites, in: Jost, P.C., Griffith, O.H. (Eds.), *Lipid-Protein Interactions*, Vol 1, Wiley, New York, pp. 25-68.
- 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. *81(20):6344-8.*
- Byrne C, Divekar SD, Storch GB, Parodi DA and Martin MB (2009) Cadmium--a metalloestrogen? *Toxicol Appl Pharmacol* 238(3): 266-71.
- Campbell-Thompson M, Lynch IJ and Bhardwaj B (2001) Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ERbeta isoforms in colon cancer. *Cancer Res* 61(2): 632-40.
- Castiglione F, Taddei A, Degl'Innocenti DR, Buccoliero AM, Bechi P, Garbini F, Chiara FG, Moncini D, Cavallina G, Marascio L, Freschi G and Gian LT (2008) Expression of estrogen receptor beta in colon cancer progression. *Diagn Mol Pathol* 17(4): 231-6.
- Chen AC, Berhow MA, Tappenden KA and Donovan SM (2005) Genistein inhibits intestinal cell proliferation in piglets. *Pediatr Res* 57(2): 192-200.
- Cherian MG and Vostal JJ (1977) Biliary excretion of cadmium in rat. I. Dose-dependent biliary excretion and the form of cadmium in the bile. *J Toxicol Environ Health* 2(4): 945-54.
- Cheskis BJ, Greger JG, Nagpal S and Freedman LP (2007) Signaling by estrogens. *J Cell Physiol* 213(3): 610-7.

- Chomczynski P and Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1): 156-9.
- Choe SY, Kim SJ, Kim HG, Lee JH, Choi Y, Lee H and Kim Y (2003) Evaluation of estrogenicity of major heavy metals. *Sci Total Environ* 312(1-3): 15-21.
- Choudhury H, Harvey T, Thayer WC, Lockwood TF, Stiteler WM, Goodrum PE, Hassett JM and Diamond GL (2001) Urinary cadmium elimination as a biomarker of exposure for evaluating a cadmium dietary exposure--biokinetics model. *J Toxicol Environ Health A* 63(5): 321-50.
- Couse JF and Korach KS (2004) Estrogen receptor-alpha 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(4): 627-47.
- Cummings SR, Eckert S, Krueger KA, Grady D, Powles TJ, Cauley JA, Norton L, Nickelsen T, Bjarnason NH, Morrow M, Lippman ME, Black D, Glusman JE, Costa A and Jordan VC (1999) The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: results from the MORE randomized trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation. *Jama* 281(23): 2189-97.
- Dechering K, Boersma C and Mosselman S (2000) Estrogen receptors alpha and beta: two receptors of a kind? *Curr Med Chem* 7(5): 561-76.
- Degen GH (2004) Endokrine Disruptoren in Lebensmitteln. *Bundesgesundheitsblatt* 47(9): 848-857
- Degen GH and Owens JW (2008) Endocrine active compounds: Xenoestrogens and Xenoandrogens. In: *Toxicology and Risk Assessment: A comprehensive Introduction* (Greim H, Snyder R, Eds.) John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK, pp. 583-603 [ISBN: 978-0-470-86893-5]
- Denier X, Couteau J, Baudrimont M, Hill EM, Rotchell J and Minier C (2008) In vitro study of the effects of cadmium on the activation of the estrogen response element using the YES screen. *Mar Environ Res* 66(1): 108-10.
- Deroo BJ and Korach KS (2006) Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest* 116(3): 561-70.
- Diel P (2002a) Tissue-specific estrogenic response and molecular mechanisms. *Toxicol Lett* 127(1-3): 217-24.
- Diel P, Schmidt S and Vollmer G (2002b) 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(1-2): 191-202.
- Dudley RE, Gammal LM and Klaassen CD (1985) Cadmium-induced hepatic and renal injury in chronically exposed rats: likely role of hepatic cadmium-metallothionein in nephrotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 77(3): 414-26.
- Dudley RE, Svoboda DJ and Klaassen CD (1984) Time course of cadmium-induced ultrastructural changes in rat liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 76(1): 150-60.
- EFSA (2009) Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on cadmium in food. *The EFSA Journal* (2009) 980, 1-139.
- Elisma F and Jumarie C (2001) Evidence for cadmium uptake through Nramp2: metal speciation studies with Caco-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 285(3): 662-8.
- Elsenhans B, Kolb K, Schümann K, Forth W, (1994a) 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.
- Elsenhans B, Schüller N, Schümann K, Forth W (1994b) Oral and subcutaneous administration of cadmium chloride and the distribution of metallothionein and cadmium along the villus-crypt axis in rat jejunum. *Biol Trace Elem Res* 42(3): 179-190.
- Elsenhans B, Strugala GJ and Schafer SG (1997) Small-intestinal absorption of cadmium and the significance of mucosal metallothionein. *Hum Exp Toxicol* 16(8): 429-34.
- Enmark E and Gustafsson JA (1999) Oestrogen receptors - an overview. *J Intern Med* 246(2): 133-8.
- Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M and Gustafsson JA (1997) Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 82(12): 4258-65.
- Fan JD, Wagner BL and 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): 1605-16.
- Felley-Bosco E and Diezi J (1992) Dietary calcium restriction enhances cadmium-induced metallothionein synthesis in rats. *Toxicol Lett* 60(2): 139-44.
- Flanagan PR, McLellan JS, Haist J, Cherian G, Chamberlain MJ and Valberg LS (1978) Increased dietary cadmium absorption in mice and human subjects with iron deficiency. *Gastroenterology* 74(5 Pt 1): 841-6.
- Fogh J and Trempe G (1975) New human tumor cell lines. In: J. Fogh (ed.). *Human Tumor Cells In Vitro*, pp. 115-159. New York: Plenum Press.
- Foley EF, Jazaeri AA, Shupnik MA, Jazaeri O and Rice LW (2000) Selective loss of estrogen receptor beta in malignant human colon. *Cancer Res* 60(2): 245-8.
- Fotherby K (1996) Bioavailability of orally administered sex steroids used in oral contraception and hormone replacement therapy. *Contraception* 54(2): 59-69.
- Fowler BA (2009) Monitoring of human populations for early markers of cadmium toxicity: a review. *Toxicol Appl Pharmacol* 238(3): 294-300.
- Frasor J, Stossi F, Danes JM, Komm B, Lyttle CR and Katzenellenbogen BS (2004) Selective estrogen receptor modulators: discrimination of agonistic versus antagonistic activities by gene expression profiling in breast cancer cells. *Cancer Res* 64(4): 1522-33.
- Fritsch M, Leary CM, Furlow JD, Ahrens H, Schuh TJ, Mueller GC and Gorski J (1992) A ligand-induced conformational change in the estrogen receptor is localized in the steroid binding domain. *Biochemistry* 31(23): 5303-11.
- Galien R and Garcia T (1997) Estrogen receptor impairs interleukin-6 expression by preventing protein binding on the NF-kappaB site. *Nucleic Acids Res* 25(12): 2424-9.
- Ganapathy V, Ganapathy ME, Leibach FH (2001) Intestinal transport of peptides and amino acids, in: Barrett, K.E., Donowitz, M. (Eds.), *Current Topics in Membranes*, Academic Press, New York, pp. 379-412.
- Garcia-Morales P, Saceda M, Kenney N, Kim N, Salomon DS, Gottardis MM, Solomon HB, Sholler PF, Jordan VC and Martin MB (1994) Effect of cadmium on estrogen receptor levels and estrogen-induced responses in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 269(24): 16896-901.
- Gielen SC, Burger CW, Kuhne LC, Hanifi-Moghaddam P and Blok LJ (2005) Analysis of estrogen agonism and antagonism of tamoxifen, raloxifene, and ICI182780 in endometrial cancer cells:

- a putative role for the epidermal growth factor receptor ligand amphiregulin. *J Soc Gynecol Investig* 12(7): e55-67.
- Gilad LA, Tirosch O and Schwartz B (2006) Phytoestrogens regulate transcription and translation of vitamin D receptor in colon cancer cells. *J Endocrinol* 191(2): 387-98.
- Gilad LA and Schwartz B (2007) Association of estrogen receptor β with plasma-membrane caveola components: implication in control of vitamin D receptor. *J Mol Endocrinol* 38(6): 603-18.
- Godt J, Scheidig F, Grosse-Siestrup C, Esche V, Brandenburg P, Reich A and Groneberg DA (2006) The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *J Occup Med Toxicol* 1: 22.
- Gould ML, Hurst PR and Nicholson HD (2007) The effects of oestrogen receptors alpha and beta on testicular cell number and steroidogenesis in mice. *Reproduction* 134(2): 271-9.
- Graham JD and Clarke CL (1997) Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* 18(4): 502-19.
- Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P and Chambon P (1986) Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320(6058): 134-9.
- Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y and Shine J (1986) Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 231(4742): 1150-4.
- Groten JP, Luten JB and van Bladeren PJ (1992) Dietary iron lowers the intestinal uptake of cadmium-metallothionein in rats. *Eur J Pharmacol* 228(1): 23-8.
- Groten JP, Sinkeldam EJ, Muys T, Luten JB and van Bladeren PJ (1991) Interaction of dietary Ca, P, Mg, Mn, Cu, Fe, Zn and Se with the accumulation and oral toxicity of cadmium in rats. *Food Chem Toxicol* 29(4): 249-58.
- Guevel RL, Petit FG, Goff PL, Metivier R, Valotaire Y and Pakdel F (2000) Inhibition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) estrogen receptor activity by cadmium. *Biol Reprod* 63(1): 259-66.
- Gustafsson JA (1998) Therapeutic potential of selective estrogen receptor modulators. *Curr Opin Chem Biol* 2(4): 508-11.
- Gustafsson JA (1999) Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action. *J Endocrinol* 163(3): 379-83.
- Gustafsson JA (2003) What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signalling. *Trends Pharmacol Sci* 24(9): 479-85.
- 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, Kasaiian M and 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): G118-25.
- 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 and Keith JC, Jr. (2003) Evaluation of an estrogen receptor-beta agonist in animal models of human disease. *Endocrinology* 144(10): 4241-9.
- Harris HA (2007) Estrogen receptor-beta: recent lessons from in vivo studies. *Mol Endocrinol* 21(1): 1-13.

- Harstad EB and Klaassen CD (2002) iNOS-null mice are not resistant to cadmium chloride-induced hepatotoxicity. *Toxicology* 175(1-3): 83-90.
- Heel RC, Brogden RN, Speight TM and Avery GS (1978) Tamoxifen: a review of its pharmacological properties and therapeutic use in the treatment of breast cancer. *Drugs* 16(1): 1-24.
- Helguero LA, Faulds MH, Gustafsson JA and Haldosen LA (2005) Estrogen receptors alfa (ERalpha) and beta (ERbeta) differentially regulate proliferation and apoptosis of the normal murine mammary epithelial cell line HC11. *Oncogene* 24(44): 6605-16.
- Hermenegildo C and Cano A (2000) Pure anti-oestrogens. *Hum Reprod Update* 6(3): 237-43.
- Hertrampf T, Degen GH, Kaid AA, Laudenschlager U, Seibel J, Di Virgilio AL and Diel P (2006) Combined effects of physical activity, dietary isoflavones and 17beta-estradiol on movement drive, body weight and bone mineral density in ovariectomized female rats. *Planta Med* 72(6): 484-7.
- Hertrampf T, Gruca MJ, Seibel J, Laudenschlager U, Fritzsche KH and Diel P (2007) The bone-protective effect of the phytoestrogen genistein is mediated via ER alpha-dependent mechanisms and strongly enhanced by physical activity. *Bone* 40(6): 1529-35.
- Herynk MH and Fuqua SA (2004) Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocr Rev* 25(6): 869-98.
- Hillisch A, Peters O, Kosemund D, Müller G, Walter A, Schneider B, Reddersen G, Elger W and Fritzsche KH (2004) Dissecting physiological roles of estrogen receptor alpha and beta with potent selective ligands from structure-based design. *Mol Endocrinol* 18(7): 1599-609.
- Hoffmann EO, Cook JA, di Luzio NR and Coover JA (1975) The effects of acute cadmium administration in the liver and kidney of the rat. Light and electron microscopic studies. *Lab Invest* 32(5): 655-64.
- 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): 123-31.
- Höfer N, Diel P, Wittsiepe J, Wilhelm M, Kluxen FM, Degen GH (2010) Investigations on the estrogenic activity of the metal hormone cadmium in the rat intestine. *Arch Toxicol*. DOI: 10.1007/s00204-010-0524-x
- IARC (1976) International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man (cadmium, nickel, some epoxides, miscellaneous industrial chemicals and general considerations on volatile anaesthetics). 48-64 (World Health Organization, Geneva).
- IPCS INCHEM (2007) International Chemical Safety Card (ICSC) of Cadmium (PIM 089). The International Programme on Chemical Safety (IPCS).
- Järup L and Akesson A (2009) Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicol Appl Pharmacol*. 238: 201-8.
- Järup L, Berglund M, Elinder CG, Nordberg G and Vahter M (1998) Health effects of cadmium exposure--a review of the literature and a risk estimate. *Scand J Work Environ Health* 24 Suppl 1: 1-51.
- Jarvinen TA, Peltö-Huikko M, Holli K and Isola J (2000) Estrogen receptor beta is coexpressed with ERalpha and PR and associated with nodal status, grade, and proliferation rate in breast cancer. *Am J Pathol* 156(1): 29-35.

- Jassam N, Bell SM, Speirs V and Quirke P (2005) Loss of expression of oestrogen receptor beta in colon cancer and its association with Dukes' staging. *Oncol Rep* 14(1): 17-21.
- Jensen EV and Jacobson HI (1962) Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent Prog Horm Res* 18: 318-414.
- 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 and Martin MB (2003) Cadmium mimics the in vivo effects of estrogen in the uterus and mammary gland. *Nat Med* 9(8): 1081-4.
- Karin M, Haslinger A, Holtgreve H, Richards RI, Krauter P, Westphal HM, Beato M (1984) Characterization of DNA sequences through which cadmium and glucocorticoid hormones induce human metallothionein-IIA gene. *Nature* 308(5959): 513-9.
- Karin M and Richards RI (1984) The human metallothionein gene family: structure and expression. *Environ Health Perspect* 54: 111-5.
- Katzenellenbogen BS (2000) Mechanisms of action and cross-talk between estrogen receptor and progesterone receptor pathways. *J Soc Gynecol Investig* 7(1 Suppl): S33-7.
- Katzenellenbogen BS, Choi I, Delage-Mourroux R, Ediger TR, Martini PG, Montano M, Sun J, Weis K and Katzenellenbogen JA (2000) Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology. *J Steroid Biochem Mol Biol* 74(5): 279-85.
- Katzenellenbogen BS and Katzenellenbogen JA (2000) Estrogen receptor transcription and transactivation: Estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta: regulation by selective estrogen receptor modulators and importance in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2(5): 335-44.
- Kjellstrom T and Nordberg GF (1978) A kinetic model of cadmium metabolism in the human being. *Environ Res* 16(1-3): 248-69.
- Klaassen CD, Liu J and Choudhuri S (1999) Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39: 267-94.
- Klinge CM (2000) Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* 65(5): 227-51.
- Kluxen FM, Höfer N, Laudénbach U, Degen GH, Diel P (2009) Evaluation of estrogenic and toxicity-related effects of the heavy metal cadmium in rat uterus and small intestine. In: *Endocrine Disruptors: Modes of action and exposure assessment: 4th Symposium of Graduate College 1427, Düsseldorf, October 8-9, 2009; Programm and Abstract Volume, Poster Abstract 4*
- Koehler KF, Helguero LA, Haldosen LA, Warner M and Gustafsson JA (2005) Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta. *Endocr Rev* 26(3): 465-78.
- Konstantinopoulos PA, Kominea A, VANDOROS G, Sykiotis GP, Andricopoulos P, Varakis I, Sotiropoulou-Bonikou G and Papavassiliou 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): 1251-8.
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S and Gustafsson JA (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138(3): 863-70.
- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S and Gustafsson JA (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(12): 5925-30.

- Lamartiniere CA, Moore JB, Brown NM, Thompson R, Hardin MJ and Barnes S (1995) Genistein suppresses mammary cancer in rats. *Carcinogenesis* 16(11): 2833-40.
- Lecoeur S, Huynh-Delerme C, Blais A, Duche A, Tome D and Kolf-Clauw M (2002) Implication of distinct proteins in cadmium uptake and transport by intestinal cells HT-29. *Cell Biol Toxicol* 18(6): 409-23.
- Lehman LD and Klaassen CD (1986) Dosage-dependent disposition of cadmium administered orally to rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 84(1): 159-67.
- Li HY, Zhang WC, Yan P, Shi N, Lin W, Wu SY and Huang YQ (2005) Effect of cadmium on estrogen receptor from rat uterus in vitro. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi* 23(1): 16-9.
- Liel Y, Shany S, Smirnoff P and Schwartz B (1999) Estrogen increases 1,25-dihydroxyvitamin D receptors expression and bioresponse in the rat duodenal mucosa. *Endocrinology* 140(1): 280-5.
- Limer JL and Speirs V (2004) Phyto-oestrogens and breast cancer chemoprevention. *Breast Cancer Res* 6(3): 119-27.
- Lindberg MK, Moverare S, Skrtic S, Gao H, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA and Ohlsson C (2003) Estrogen receptor (ER)-beta reduces ERalpha-regulated gene transcription, supporting a "ying yang" relationship between ERalpha and ERbeta in mice. *Mol Endocrinol* 17(2): 203-8.
- Lindner V, Kim SK, Karas RH, Kuiper GG, Gustafsson JA and Mendelsohn ME (1998) Increased expression of estrogen receptor-beta mRNA in male blood vessels after vascular injury. *Circ Res* 83(2): 224-9.
- Liu J, Cheng ML, Yang Q, Shan KR, Shen J, Zhou Y, Zhang X, Dill AL and Waalkes MP (2007) Blood metallothionein transcript as a biomarker for metal sensitivity: low blood metallothionein transcripts in arsenicosis patients from Guizhou, China. *Environ Health Perspect* 115(7): 1101-6.
- Liu J, Liu Y, Habeebu SS and Klaassen CD (1998) Susceptibility of MT-null mice to chronic CdCl₂-induced nephrotoxicity indicates that renal injury is not mediated by the CdMT complex. *Toxicol Sci* 46(1): 197-203.
- Liu Y, Liu J and Klaassen CD (2001) Metallothionein-null and wild-type mice show similar cadmium absorption and tissue distribution following oral cadmium administration. *Toxicol Appl Pharmacol* 175(3): 253-9.
- Losordo DW, Kearney M, Kim EA, Jekanowski J and Isner JM (1994) Variable expression of the estrogen receptor in normal and atherosclerotic coronary arteries of premenopausal women. *Circulation* 89(4): 1501-10.
- Love RR, Wiebe DA, Newcomb PA, Cameron L, Leventhal H, Jordan VC, Feyzi J and DeMets DL (1991) Effects of tamoxifen on cardiovascular risk factors in postmenopausal women. *Ann Intern Med* 115(11): 860-4.
- Martin MB, Reiter R, Pham T, Avellanet YR, Camara J, Lahm M, Pentecost E, Pratap K, Gilmore BA, Divekar S, Dagata RS, Bull JL and Stoica A (2003) Estrogen-like activity of metals in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* 144(6): 2425-36.
- 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 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): 455-69.

- Marugo M, Molinari F, Fazzuoli L, Parodi MC, Bernasconi D, Menozzi F and Giordano G (1985) Estradiol and progesterone receptors in normal and pathologic colonic mucosa in humans. *J Endocrinol Invest* 8(2): 117-9.
- McInerney EM and Katzenellenbogen BS (1996) Different regions in activation function-1 of the human estrogen receptor required for antiestrogen- and estradiol-dependent transcription activation. *J Biol Chem* 271(39): 24172-8.
- Mendelsohn ME (2009) Estrogen actions in the cardiovascular system. *Climacteric* 12 Suppl 1: 18-21.
- Moore W Jr, Stara JF, Crocker WC, Malanchuk M, Iltis R (1973) Comparison of 115m cadmium retention in rats following different routes of administration. *Environ Res* 6(4): 473-8.
- Montano MM, Müller V, Trobaugh A and Katzenellenbogen BS (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. *Mol Endocrinol* 9(7): 814-25.
- Moschandreas DJ, Karuchit S, Berry MR, O'Rourke MK, Lo D, Lebowitz MD and Robertson G (2002) Exposure apportionment: ranking food items by their contribution to dietary exposure. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 12(4): 233-43.
- Müller M, Anke M, Illing-Günther H and Thiel C (1998) Oral cadmium exposure of adults in Germany. 2: Market basket calculations. *Food Addit Contam* 15(2): 135-41.
- Müller-Esterl W (2004) *Biochemie*. München, Elsevier GmbH, 1. Auflage
- Nath R, Prasad R, Palinal VK and Chopra RK (1984) Molecular basis of cadmium toxicity. *Prog Food Nutr Sci* 8(1-2): 109-63.
- Nesatyy VJ, Rutishauser BV, Eggen RI and Suter MJ (2005) Identification of the estrogen receptor Cd-binding sites by chemical modification. *Analyst* 130(7): 1087-97.
- Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M and Gustafsson JA (2001) Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 81(4): 1535-65.
- Nomiyama K, Nomiyama H and Kameda N (1998) Plasma cadmium-metallothionein, a biological exposure index for cadmium-induced renal dysfunction, based on the mechanism of its action. *Toxicology* 129(2-3): 157-68.
- Nordberg GF (2004) Cadmium and health in the 21st century--historical remarks and trends for the future. *Biomaterials* 17(5): 485-9.
- Nordberg GF (2009) Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicol Appl Pharmacol* 238(3): 192-200.
- Nordberg GF and Nordberg M (1987) Different binding forms of cadmium--implications for distribution and toxicity. *J Uoeh* 9 Suppl: 153-64.
- Nordberg GF, Piscator M and Nordberg M (1971) On the distribution of cadmium in blood. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 30(3): 289-95.
- Ogoshi K, Moriyama T and Nanzai Y (1989) Decrease in the mechanical strength of bones of rats administered cadmium. *Arch Toxicol* 63(4): 320-4.
- Omoto Y, Inoue S, Ogawa S, Toyama T, Yamashita H, Muramatsu M, Kobayashi S and Iwase H (2001) Clinical value of the wild-type estrogen receptor beta expression in breast cancer. *Cancer Lett* 163(2): 207-12.

- Pakdel F and Katzenellenbogen BS (1992) Human estrogen receptor mutants with altered estrogen and antiestrogen ligand discrimination. *J Biol Chem* 267(5): 3429-37.
- Pakdel F, Reese JC and Katzenellenbogen BS (1993) Identification of charged residues in an N-terminal portion of the hormone-binding domain of the human estrogen receptor important in transcriptional activity of the receptor. *Mol Endocrinol* 7(11): 1408-17.
- Pettersson K, Delaunay F and Gustafsson JA (2000) Estrogen receptor beta acts as a dominant regulator of estrogen signaling. *Oncogene* 19(43): 4970-8.
- Pettersson K, Grandien K, Kuiper GG and Gustafsson JA (1997) Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol* 11(10): 1486-96.
- Pettersson K and Gustafsson JA (2001) Role of estrogen receptor beta in estrogen action. *Annu Rev Physiol* 63: 165-92.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9): e45.
- Phillipotts CJ (1984) The autoradiographic localisation of retained orally administered cadmium tracer within Paneth cells of rat duodenum. *Toxicology* 33(1): 59-66.
- Pike AC, Brzozowski AM, Walton J, Hubbard RE, Thorsell AG, Li YL, Gustafsson JA and Carlquist M (2001) Structural insights into the mode of action of a pure antiestrogen. *Structure* 9(2): 145-53.
- Pike AC (2006) Lessons learnt from structural studies of the oestrogen receptor. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20(1): 1-14.
- Pillet S, D'Elia M, Bernier J, Bouquegneau JM, Fournier M and Cyr DG (2006) Immunomodulatory effects of estradiol and cadmium in adult female rats. *Toxicol Sci* 92(2): 423-32.
- Porter W, Saville B, Hoivik D and Safe S (1997) Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 11(11): 1569-80.
- Powell E and Xu W (2008) Intermolecular interactions identify ligand-selective activity of estrogen receptor alpha/beta dimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(48): 19012-7.
- Predki PF and Sarkar B (1992) Effect of replacement of "zinc finger" zinc on estrogen receptor DNA interactions. *J Biol Chem* 267(9): 5842-6.
- Predki PF and Sarkar B (1994) Metal replacement in "zinc finger" and its effect on DNA binding. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 3: 195-8.
- Quig D (1998) Cysteine metabolism and toxicity. *Altern Med Rev* 3(4): 262-70.
- Rabenstein DL, Isab AA, Kadima W and Mohanakrishnan P (1983) A proton nuclear magnetic resonance study of the interaction of cadmium with human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 762(4): 531-41.
- Ribeiro RC, Kushner PJ and Baxter JD (1995) The nuclear hormone receptor gene superfamily. *Annu Rev Med* 46: 443-53.
- Rivera-Gonzalez R, Petersen DN, Tkalcovic G, Thompson DD and 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.

- Roger P, Sahla ME, Makela S, Gustafsson JA, Baldet P and Rochefort H (2001) Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer Res* 61(6): 2537-41.
- Rulisek L and Vondrasek J (1998) Coordination geometries of selected transition metal ions (Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, and Hg²⁺) in metalloproteins. *J Inorg Biochem* 71(3-4): 115-27.
- Ryan PB, Scanlon KA, MacIntosh DL (2001) Analysis of dietary intake of selected metals in the NHEXAS-Maryland investigation. *Environ. Health Perspect* 109(2): 121-128.
- Safe S (2003) Cadmium's disguise dupes the estrogen receptor. *Nat Med* 9(8): 1000-1.
- Satarug S and Moore MR (2004) Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. *Environ Health Perspect* 112(10): 1099-103.
- Sato M and 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.
- Sauer JM, Waalkes MP, Hooser SB, Kuester RK, McQueen CA and Sipes IG (1997) Suppression of Kupffer cell function prevents cadmium induced hepatocellular necrosis in the male Sprague-Dawley rat. *Toxicology* 121(2): 155-64.
- Savouret JF, Bailly A, Misrahi M, Rauch C, Redeuilh G, Chauchereau A and Milgrom E (1991) Characterization of the hormone responsive element involved in the regulation of the progesterone receptor gene. *Embo J* 10(7): 1875-83.
- Schindler AE (2007) Long-term use of progestogens: colon adenoma and colon carcinoma. *Gynecol Endocrinol* 23 Suppl 1: 42-4.
- Schrey P, Wittsiepe J, Budde U, Heinzow B, Idel H, Wilhelm M (2000) Dietary intake of lead, cadmium, copper and zinc by children from the North Sea island Amrum. *Int J Hyg Environ Health* 203: 1-9.
- Schumann K, Friebel P, Schmolke G and Elsenhans B (1996) State of Iron Repletion and Cadmium Tissue Accumulation as a Function of Growth in Young Rats After Oral Cadmium Exposure. *Arch Environ Contam Toxicol* 1996(4): 483-7.
- Schwartz B, Smirnoff P, Shany S and 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 and 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): 941-50.
- Seidal K, Jorgensen N, Elinder CG, Sjogren B and Vahter M (1993) Fatal cadmium-induced pneumonitis. *Scand J Work Environ Health* 19(6): 429-31.
- Setchell KD and Cassidy A (1999) Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nutr* 129(3): 758S-767S.
- Shaikh ZA and Smith JC (1980) Metabolism of orally ingested cadmium in humans. *Dev Toxicol Environ Sci* 8: 569-74.
- Shiau AK, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA and Greene GL (1998) The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 95(7): 927-37.

- Silva E, Lopez-Espinosa MJ, Molina-Molina JM, Fernandez M, Olea N and Kortenkamp A (2006) Lack of activity of cadmium in in vitro estrogenicity assays. *Toxicol Appl Pharmacol* 216(1): 20-8.
- Simm PJ, Bajpai A, Russo VC and Werther GA (2008) Estrogens and growth. *Pediatr Endocrinol Rev* 6(1): 32-41.
- Singh S, Poulsom 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): 153-60.
- Smolders RG, van der Mooren MJ, Sipkema P and Kenemans P (2003) Estrogens, homocysteine, vasodilatation and menopause: basic mechanisms, interactions and clinical implications. *Gynecol Endocrinol* 17(4): 339-54.
- Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S and Brennan M (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51(5): 1409-16.
- Srivastava N, Chowdhury PR, Averna M and Srivastava RA (2001) Estrogen increases hepatic lipase levels in inbred strains of mice: a possible mechanism for estrogen-dependent lowering of high density lipoprotein. *Mol Cell Biochem* 220(1-2): 87-93.
- Srivastava RA, Srivastava N, Averna M, Lin RC, Korach KS, Lubahn DB and Schonfeld G (1997) Estrogen up-regulates apolipoprotein E (ApoE) gene expression by increasing ApoE mRNA in the translating pool via the estrogen receptor alpha-mediated pathway. *J Biol Chem* 272(52): 33360-6.
- Stice JP, Lee JS, Pechenino AS and Knowlton AA (2009) Estrogen, aging and the cardiovascular system. *Future Cardiol* 5(1): 93-103.
- Stoica A, Katzenellenbogen BS and Martin MB (2000) Activation of estrogen receptor-alpha by the heavy metal cadmium. *Mol Endocrinol* 14(4): 545-53.
- Sundstrom SA, Komm BS, Ponce-de-Leon H, Yi Z, Teuscher C and Lyttle CR (1989) Estrogen regulation of tissue-specific expression of complement C3. *J Biol Chem* 264(28): 16941-7.
- Takiguchi M and Yoshihara S (2006) New aspects of cadmium as endocrine disruptor. *Environ Sci* 13(2): 107-16.
- Tallkvist J, Bowlus CL and Lonnerdal B (2001) DMT1 gene expression and cadmium absorption in human absorptive enterocytes. *Toxicol Lett* 122(2): 171-7.
- Taylor AH and Al-Azzawi F (2000) Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *J Mol Endocrinol* 24(1): 145-55.
- Thirumoorthy N, Manisenthil Kumar KT, Shyam Sundar A, Panayappan L, Chatterjee M (2007) Metallothionein: an overview. *World J Gastroenterol* 13(7): 993-6.
- Thompson J and Bannigan J (2008) Cadmium: toxic effects on the reproductive system and the embryo. *Reprod Toxicol* 25(3): 304-15.
- Tolbert T and Oparil S (2001) Cardiovascular effects of estrogen. *Am J Hypertens* 14(6 Pt 2): 186S-193S.
- Tora L, White J, Brou C, Tasset D, Webster N, Scheer E and Chambon P (1989) The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* 59(3): 477-87.

- Vahter M, Akesson A, Liden C, Ceccatelli S and Berglund M (2007) Gender differences in the disposition and toxicity of metals. *Environ Res* 104(1): 85-95.
- Verdrengh M, Jonsson IM, Holmdahl R and Tarkowski A (2003) Genistein as an anti-inflammatory agent. *Inflamm Res* 52(8): 341-6.
- Vanacker JM, Pettersson K, Gustafsson JA and Laudet V (1999) Transcriptional targets shared by estrogen receptor- related receptors (ERRs) and estrogen receptor (ER) alpha, but not by ERbeta. *Embo J* 18(15): 4270-9.
- Vitale C, Mendelsohn ME and Rosano GM (2009) Gender differences in the cardiovascular effect of sex hormones. *Nat Rev Cardiol* 6(8): 532-42.
- Waalkes MP and Goering PL (1990) Metallothionein and other cadmium-binding proteins: recent developments. *Chem Res Toxicol* 3(4): 281-8.
- Wada-Hiraike O, Imamov O, Hiraike H, Hultenby K, Schwend T, Omoto Y, Warner M and Gustafsson JA (2006) Role of estrogen receptor beta in colonic epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(8): 2959-64.
- Warnmark A, Almlöf T, Leers J, Gustafsson JA and Treuter E (2001) Differential recruitment of the mammalian mediator subunit TRAP220 by estrogen receptors ERalpha and ERbeta. *J Biol Chem* 276(26): 23397-404.
- Webb M, Holt D, Brown N and Hard GC (1988) The teratogenicity of cadmium-metallothionein in the rat. *Arch Toxicol* 61(6): 457-67.
- Webb P, Nguyen P, Valentine C, Lopez GN, Kwok GR, McInerney E, Katzenellenbogen BS, Enmark E, Gustafsson JA, Nilsson S and Kushner PJ (1999) The estrogen receptor enhances AP-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions. *Mol Endocrinol* 13(10): 1672-85.
- Weigel NL (1996) Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochem J* 319 (Pt 3): 657-67.
- WHO/IPCS (1992) Cadmium. Environmental Health Criteria Document 134, IPCS. WHO, Geneva, 1992, 1-280.
- WHO/IPCS (2002) The International Programme on Chemical Safety (IPCS): Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. Damstra T, Barlow S, Bergmann A, Kavlock R and Van der Kraak G. Geneva, World Health Organization.
- WHO/IPCS (2004) IPCS Risk Assessment Terminology.
- Wilhelm M, Lombeck I, Kouros B, Wuthe J and Ohnesorge FK (1995) [Duplicate study on the dietary intake of some metals/metalloids by children in Germany. part II. Aluminum, cadmium and lead]. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 197(5): 357-69.
- Wilson VS, Bobseine K and Gray LE, Jr. (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(1): 69-77.
- Yamano T, DeCicco LA and Rikans LE (2000) Attenuation of cadmium-induced liver injury in senescent male fischer 344 rats: role of Kupffer cells and inflammatory cytokines. *Toxicol Appl Pharmacol* 162(1): 68-75.
- Yamnik RL and Holz MK (2010) mTOR/S6K1 and MAPK/RSK signaling pathways coordinately regulate estrogen receptor alpha serine 167 phosphorylation. *FEBS Lett* 584(1):124-8.

- Young PC, Cleary RE and Ragan WD (1977). Effect of metal ions on the binding of 17beta-estradiol to human endometrial cytosol. *Fertil Steril* 28(4): 459-63.
- Ysart G, Miller P, Croasdale M, Crews H, Robb P, Baxter M, de L'Argy C and Harrison N (2000) 1997 UK Total Diet Study--dietary exposures to aluminium, arsenic, cadmium, chromium, copper, lead, mercury, nickel, selenium, tin and zinc. *Food Addit Contam* 17(9): 775-86.
- Zalups RK (1997) Influence of different degrees of reduced renal mass on the renal and hepatic disposition of administered cadmium. *J Toxicol Environ Health* 51(3): 245-64.
- Zalups RK (2000) Evidence for basolateral uptake of cadmium in the kidneys of rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 164(1): 15-23.
- Zalups RK and Ahmad S (2003) Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicol Appl Pharmacol* 186(3): 163-88.
- Zang Y, Odwin-Dacosta S and Yager JD (2009) Effects of cadmium on estrogen receptor mediated signaling and estrogen induced DNA synthesis in T47D human breast cancer cells. *Toxicol Lett* 184(2): 134-8.
- 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.

9. Publikationen und Vorträge

Originalarbeiten

Parr MK, Laudenbach-Leschowsky U, Höfer N, Schänzer W, Diel P (2009) Anabolic and androgenic activity of 19-norandrostenedione after oral and subcutaneous administration--analysis of side effects and metabolism. *Toxicol Lett* 188(2):137-41.

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):123-31.

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*. DOI: 10.1007/s00204-010-0524-x

Postervorträge

Höfer N, Degen GH, Diel P (2007) Cadmium as metalloestrogen: Estrogen receptor-mediated effects in the intestinal tract. In: Tag des wissenschaftlichen Nachwuchses; Konferenzband 2007, Düsseldorf 22. Juni, 65

Höfer N, Degen GH, Diel P (2007) Estrogen receptor-mediated effects of Cadmium: in vitro and in vivo studies. In: Food, Gut, and the Immune System: A Challenge in Environmental Medicine; 1st Symposium of Graduate College 1427, Düsseldorf October 4-5, 2007, Program/Abstract volume, Poster 8

Höfer N, Degen GH, Diel P (2008) The estrogenic potency of the heavy metal cadmium depends on the route of administration. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 377, Suppl.1, 70-71 (347)

Höfer N, Degen GH, Diel P (2008) Modulation of estrogen-dependent gene expression in breast and colon cancer cell lines by the heavy metal cadmium. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 377, Suppl.1, 71 (348)

Höfer N, Degen GH, Diel P (2008) Modulation of estrogen dependent gene regulation in breast and colon cancer cell lines by the heavy metal cadmium. In: *Nutrition and Health: Intestinal Effects of Food Constituents; 2nd Symposium of Graduate College 1427, Düsseldorf April 3-4, 2008, Program/Abstract volume, Poster 10*

Höfer N, Degen GH, Wilhelm M, Wittsiepe J, Diel P (2009) Oral administration of the heavy metal cadmium results in a stimulation of estrogen sensitive genes in the uterus. 52. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, 4.-7. März 2009, Gießen. Poster PS1-09-4, 66

Höfer N, Diel P, Wilhelm M, Wittsiepe J, Degen GH (2009) The metalloestrogen cadmium exerts dose and route dependent hormonal activity in female rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 379, Suppl.1, 70 (344)

Höfer N, Degen GH, Diel P (2009) The heavy metal cadmium exerts estrogenic potency after oral administration. 91st Annual Meeting of the Endocrine Society, 10-13 Juni, Washington D.C., USA. Poster P3-41, S. 111

Höfer N, Diel P, Wilhelm M, Wittsiepe J, Degen GH (2009) Estrogenic activity of the heavy metal cadmium in female rats is dose and route dependent. *Toxicol Lett* 189 Suppl. 1, S. 221, Poster R07

Kluxen FM, Höfer N, Laudénbach U, Degen GH, Diel P (2009) Evaluation of estrogenic and toxicity-related effects of the heavy metal cadmium in rat uterus and small intestine. *Endocrine Disruptors: Mode of Action and Exposure Assessment; 4th Symposium of Graduate College 1427,*

Düsseldorf, October 8-9, 2009, Programm and Abstract Volume, Poster Abstracts 4

Fachvorträge nach Einladung

„Cadmium: Östrogene Potenz des Schwermetalls in vivo und in vitro“ Vortrag am 26. Januar 2009, Ruhr-Universität Bochum, im Rahmen des Kolloquiums Schwermetalle (Organisation: Inst. für Hygiene, Sozial- und Umweltmedizin), Einladung durch Herrn Prof. Michael Wilhelm

„Hormonal activity of cadmium in rat uterus and intestine“ Vortrag am 09. Oktober 2009, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, im Rahmen des 4th Symposium of Graduate College 1427: Endocrine Disruptors: Modes of action and exposure assessment; Abstract wurde zur oralen Präsentation ausgewählt