

Diss. ETH N° 18004

**ENDOCRINE-DISRUPTING CHEMICALS IN THE AIR:  
INVESTIGATION OF EMISSION SOURCES AND AMBIENT  
CONCENTRATIONS WITH REPORTER GENE ASSAYS AND  
CHEMICAL ANALYSIS**

A dissertation submitted to  
ETH ZURICH

for the degree of  
Doctor of Sciences

presented by

**DANIELA WENGER**

Dipl. phil.-nat., University of Bern

born May 13, 1976

citizen of Thierachern (BE), Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Renato Zenobi, examiner

Dr. Andreas C. Gerecke, co-examiner

Prof. Dr. Hanspeter Nägeli, co-examiner

Prof. Dr. Konrad Hungerbühler, co-examiner

2008

---

## Summary

Endocrine-disrupting chemicals (EDCs) are compounds that interfere with the normal functioning of the hormonal system by mimicking or antagonizing naturally occurring hormones and/or by modulating hormonal responses. In this way, endocrine disruptors can lead to adverse health effects in humans and animals. Chemicals capable of disrupting the action of gonadal steroids such as estrogens have received most attention. Estrogens are major determinants of development and function of the reproductive, nervous, and immune system. Hence, estrogens and their target cells/tissues are important for research on EDCs. The molecular mechanisms of interferences with estrogen actions, for example, by estrogen receptor (ER) or aryl hydrocarbon receptor (AhR) interactions, are thought to represent a possible link between exposure to certain EDCs and observed adverse health effects. Besides dietary uptake of EDCs through contaminated water and food, inhalation and swallowing of airborne EDCs might be important exposure pathways.

Two different *in vitro* reporter gene assays, based either on T47D human breast cancer cells (ER-CALUX) or H4IIE rat hepatoma cells (DR-CALUX), were applied to detect and quantify ER and AhR ligands (i.e., estrogenic and direct-/indirect-acting antiestrogenic compounds) in diesel exhaust and ambient particulate matter. Gas chromatography/high resolution mass spectrometry (GC/HRMS) was used to analyze compounds that potentially contribute to the observed assay activity of a sample. Exhaust was generated by a heavy-duty diesel engine and was studied as unfiltered exhaust or was either treated with an iron-catalyzed or a copper/iron-catalyzed diesel particulate filter (DPF). Collected samples included particle-bound and semivolatile compounds. The final extraction step was conducted in a Soxhlet apparatus for 24 h, using toluene as solvent. Atmospheric particulate matter with an aerodynamic diameter of less than 1  $\mu\text{m}$  (PM<sub>1</sub>) was collected at an urban (Bern) and a rural site (Payerne) in Switzerland during a period of high air pollution in winter 2006 (sampling cam-

paign 15 days). PM1 filters were extracted with dichloromethane for 24 h in a Soxhlet apparatus. Prior to assay analysis, all extracts were transferred to dimethylsulfoxide (DMSO).

The collected diesel exhaust samples contained compounds that were able to activate ER- and AhR-mediated gene expression in human breast cancer and rat hepatoma cells, respectively. Estrogenic activity prevailed over ER-mediated antiestrogenic activity. An overall ER-mediated activity of  $1.63 \pm 0.31$  ng 17 $\beta$ -estradiol-CALUX equivalents (E2-CEQ) per cubic meter of unfiltered diesel exhaust was found, after a cell exposure time of 24 h. In filtered exhaust,  $0.74 \pm 0.07$  (iron-catalyzed DPF) and  $0.55 \pm 0.09$  ng E2-CEQ m<sup>-3</sup> (copper/iron-catalyzed DPF) were measured. This corresponded to a decrease in estrogenic activity by 55 and 66%. Unfiltered exhaust exhibited AhR-mediated activity of  $60 \pm 14$  ng 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin-CALUX equivalents (TCDD-CEQ) m<sup>-3</sup>, applying a cell exposure time of 24 h. AhR agonist emissions were lowered by 88% ( $6.9 \pm 2.1$  ng TCDD-CEQ m<sup>-3</sup>) and 89% ( $6.4 \pm 0.5$  ng TCDD-CEQ m<sup>-3</sup>) when the diesel engine was operated in combination with the iron- and copper/iron-based DPF system, respectively. The sum of nine polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs; fluoranthene, pyrene, chrysene, benz[*a*]anthracene, benzo[*b*]fluoranthene, benzo[*k*]fluoranthene, benzo[*a*]pyrene, indeno[1,2,3-*cd*]pyrene, benzo[*ghi*]perylene) and the 2,3,7,8-polychlorinated dibenzodioxins/furans (2,3,7,8-PCDD/Fs, 17 congeners), which all are known AhR agonists, contributed only marginally (0.6–1.6%) to the overall AhR-mediated activity. This indicates that either very potent or considerable amounts of other aryl hydrocarbons must be present in diesel exhaust. AhR-mediated activity decreased over time (cell exposure 8–96 h) and reached a plateau of 1–2 ng TCDD-CEQ m<sup>-3</sup> after 72 h, as observed with both an unfiltered and a filtered exhaust sample. Probably, this was due to inactivation of AhR agonists by biotransformation. After 72 h, the activity of the filtrated sample corresponded to the activity calculated for the sum of the 2,3,7,8-PCDD/Fs (persistent compounds) determined in this sample. Interestingly, ER-mediated activity was nearly constant from 12 to 72 h of exposure. In summary, the presented *in vitro* studies demonstrated that catalytic DPFs

---

are a promising technology to lower the ER- and AhR-mediated endocrine-disrupting potential of diesel exhaust.

The collected PM1 samples also induced ER- and AhR-mediated activity. Observed estrogenic activities corresponded to E2-CEQ concentrations ranging from 2–23 ng E2-CEQ per gram of PM1 and from 0.07–1.25 pg E2-CEQ per cubic meter of sampled air. There was a strong correlation between the temporal trends of PM1 estrogenicity at the urban and rural site ( $r^2 = 0.8$ ). Five hydroxylated PAHs (hydroxy-PAHs), which show structural similarities to E2, were assessed for their estrogenic activity, using the ER-CALUX assay. The following order of estrogenic potency was found: 2-hydroxychrysene > 2-hydroxyphenanthrene > 1-hydroxypyrene > 2-hydroxynaphthalene > 1-hydroxynaphthalene. Three of these hydroxy-PAHs (2-hydroxyphenanthrene, 2-hydroxynaphthalene, and 1-hydroxynaphthalene) were detected in all PM1 extracts. These three compounds contributed little to the overall estrogenic activity (i.e., maximally 0.2%). Comparisons of PM1 estrogenicity with concentrations of several gaseous air pollutants and with meteorological data did not permit to elucidate specific emission sources and formation processes of atmospheric xenoestrogens. Activities measured with the DR-CALUX assay corresponded to TCDD-CEQ concentrations of 0.5–2  $\mu\text{g g}^{-1}$  and 10–87  $\text{pg m}^{-3}$ . No significant difference in AhR-mediated activity was observed between the urban and the rural site. In contrast to ER-mediated activity, the temporal trends of AhR-mediated activity did not correlate between sites. Nine 4- to 6-ring PAHs (fluoranthene, pyrene, chrysene, benz[*a*]anthracene, benzo[*a*]pyrene, benzo[*b*]fluoranthene, benzo[*k*]fluoranthene, indeno[1,2,3-*cd*]pyrene, dibenzo[*a,h*]anthracene) were analyzed in the PM1 extracts by GC/HRMS. The sum of their concentrations was highly correlated with the overall AhR-mediated activity at both sites (urban site  $r^2 = 0.9$ , rural site  $r^2 = 0.7$ ). Furthermore, the summed activity of the nine PAHs explained 9–20% and 2–16% of the overall AhR-mediated activity at the urban and rural site, respectively. Thus, the investigated PAHs are a relevant factor for the AhR-mediated activity of PM1. At both sites, the most important contributor was benzo[*k*]fluoranthene, causing ~60% of the total PAH activity. It was not found that traf-

fic emissions lead to elevated AhR-mediated activity at the urban site compared to the rural site. In summary, the presented studies showed that ambient particulate matter contains compounds that are able to interact with ERs and AhRs *in vitro* and thus bear the risk to interfere with hormonal pathways *in vivo* and/or to induce AhR-mediated toxicity.

---

## Zusammenfassung

Hormonaktive Chemikalien (engl. endocrine-disrupting chemicals, EDCs) sind Verbindungen, die das normale Funktionieren des Hormonsystems stören, indem sie natürlich vorkommende Hormone nachahmen oder blockieren und/oder in hormoninduzierte Abläufe eingreifen. Auf diese Weise können hormonaktive Stoffe die Gesundheit von Mensch und Tier nachteilig beeinflussen. Am meisten Aufmerksamkeit haben bisher hormonaktive Verbindungen erhalten, welche die Wirkung von Sexualhormonen wie zum Beispiel von Östrogenen beeinträchtigen. Östrogene sind entscheidend für die Entwicklung und Funktion des Fortpflanzungs-, Nerven- und Immunsystems. Daher sind Östrogene und ihre Zielzellen/-gewebe wichtig für die Erforschung von EDCs. Man geht davon aus, dass die molekularen Mechanismen, auf denen Störungen östrogenen Wirkungen basieren, einen möglichen Zusammenhang herstellen können zwischen Belastung durch bestimmte EDCs und beobachteten negativen Auswirkungen auf die Gesundheit. Solche Mechanismen sind beispielsweise Interaktionen mit Östrogenrezeptoren (engl. estrogen receptor, ER) oder «Dioxin-Rezeptoren» (präzise engl. Bezeichnung: aryl hydrocarbon receptor, AhR). Neben der Aufnahme von EDCs über kontaminiertes Wasser und Nahrung stellen das Einatmen und Verschlucken von hormonaktiven Stoffen aus der Luft möglicherweise weitere wichtige Belastungspfade dar.

Zwei verschiedene *in vitro* Reporteragen-Assays, die auf menschlichen T47D Brustkrebszellen (ER-CALUX) bzw. H4IIE Leberkrebszellen von Ratten (DR-CALUX) basieren, wurden verwendet, um ER- und AhR-Liganden (östrogene sowie direkt/indirekt wirkende antiöstrogene Verbindungen) in Dieselabgas- und Feinstaubproben zu detektieren und quantifizieren. Gaschromatographie und hochauflösende Massenspektrometrie (engl. gas chromatography/high resolution mass spectrometry, GC/HRMS) wurden eingesetzt, um Verbindungen zu analysieren, die möglicherweise zur beobachteten Assay-Aktivität einer Probe beitragen. Dieselabgas wurde mit einem Schwerkraftfahrzeugmotor generiert und als

unfiltriertes oder filtriertes Abgas untersucht. Das filtrierte Abgas war mit einem Eisen- oder Kupfer/Eisen-katalysierten Partikelfilter (engl. diesel particulate filter, DPF) behandelt worden. Die gesammelten Abgasproben enthielten sowohl partikelgebundene als auch semivolatile Verbindungen. Der letzte Extraktionsschritt (24 h) wurde in einem Soxhlet-Apparat mit Toluol als Lösungsmittel ausgeführt. Aussenluftpartikel mit einem aerodynamischen Durchmesser von  $\leq 1 \mu\text{m}$  (PM1) wurden in der Schweiz an einem städtischen (Bern) und einem ländlichen Standort (Payerne) während einer Phase mit hoher Luftverschmutzung im Winter 2006 gesammelt (15-tägige Sammelkampagne). Die PM1-Filter wurden mit Dichlormethan während 24 h extrahiert (Soxhlet). Alle Extrakte wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) überführt, bevor sie mit den Bioassays getestet wurden.

Die gesammelten Diesellabgasproben enthielten Verbindungen, die in der Lage waren ER- und AhR-vermittelte Genexpression in menschlichen und murinen Krebszellen zu aktivieren. Östrogene Aktivität überwog ER-vermittelte antiöstrogene Aktivität. Nach einer Zellexpositionszeit von 24 h wurde eine östrogene Gesamtaktivität von  $1.63 \pm 0.31 \text{ ng } 17\beta\text{-Östradiol-CALUX Equivalenten (E2-CEQ)}$  pro Kubikmeter unfiltriertem Abgas nachgewiesen. In filtriertem Abgas wurden  $0.74 \pm 0.07$  (Eisen-katalysierter Partikelfilter) und  $0.55 \pm 0.09 \text{ ng E2-CEQ m}^{-3}$  (Kupfer/Eisen-katalysierter Partikelfilter) gemessen. Dies entsprach einer Abnahme der östrogenen Aktivität um 55 bzw. 66%. Unfiltriertes Abgas zeigte eine AhR-vermittelte Aktivität von  $60 \pm 14 \text{ ng } 2,3,7,8\text{-Tetrachlorodibenzodioxin-CEQ m}^{-3}$  (Expositionszeit 24 h). Die Emission von AhR-Agonisten wurde um 88% ( $6.9 \pm 2.1 \text{ ng TCDD-CEQ m}^{-3}$ ) und 89% ( $6.4 \pm 0.5 \text{ ng TCDD-CEQ m}^{-3}$ ) gesenkt, wenn der Dieselmotor in Kombination mit dem Eisen- bzw. Kupfer/Eisen-basierten Filtersystem betrieben wurde. Die Summe von bekannten AhR-Agonisten, nämlich von neun polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (engl. polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs; Fluoranthen, Pyren, Chrysen, Benz[*a*]anthracen, Benzo[*b*]fluoranthen, Benzo[*k*]fluoranthen, Benzo[*a*]pyren, Indeno[1,2,3-*cd*]pyren, Benzo[*ghi*]perylen) und den 2,3,7,8-polychlorierten Dioxinen und Furanen (engl. 2,3,7,8-polychlorinated dibenzodioxins/furans, 2,3,7,8-PCDD/Fs; 17 Kongenere), trug nur geringfügig (0.6–1.6%)

zur AhR-vermittelten Gesamtaktivität bei. Dies lässt vermuten, dass besonders potente oder beachtliche Mengen weiterer Arylkohlenwasserstoffe im Dieselabgas vorhanden sein müssen. Die Aktivität sowohl einer unfiltrierten wie auch einer filtrierten Abgasprobe nahm mit der Länge der Expositionszeit ab (8–96 h) und erreichte nach 72 h ein Plateau von 1–2 ng TCDD-CEQ m<sup>-3</sup>. Der Grund dafür war vermutlich die Umwandlung von AhR-Agonisten zu inaktiven Verbindungen. Die Aktivität der getesteten filtrierten Probe entsprach nach 72 h genau der für die Summe der 2,3,7,8-PCDD/Fs (persistente Verbindungen) berechneten Aktivität. Interessanterweise blieb die östrogene Aktivität während den getesteten Expositionszeiten (12–72 h) annähernd konstant. Die durchgeführten *in vitro* Studien zeigten, dass mit katalytischen Partikelfiltersystemen eine viel versprechende Technologie zur Verfügung steht, welche die Emission von hormonaktiven/toxischen Stoffen deutlich vermindert.

Die gesammelten PM1-Proben induzierten ebenfalls ER- und AhR-vermittelte Aktivität. Die gemessenen östrogenen Aktivitäten entsprachen 2–23 ng E2-CEQ pro Gramm PM1 bzw. 0.07–1.25 pg E2-CEQ pro Kubikmeter Luft. Zwischen dem zeitlichen Verlauf der östrogenen PM1-Aktivität des urbanen und ländlichen Standorts wurde eine starke Korrelation festgestellt ( $r^2 = 0.8$ ). Fünf hydroxylierte PAHs, die strukturelle Ähnlichkeiten zu E2 aufweisen, wurden mit dem ER-CALUX Assay auf ihre östrogene Aktivität getestet. Folgende Reihenfolge östrogenen Stärke wurde festgestellt: 2-Hydroxychrysen > 2-Hydroxyphenanthren > 1-Hydroxypyren > 2-Hydroxynaphthalen > 1-Hydroxynaphthalen. Drei dieser hydroxylierten PAHs (2-Hydroxyphenanthren, 2-Hydroxynaphthalen, 1-Hydroxynaphthalen) wurden in allen PM1-Extrakten nachgewiesen. Diese drei Verbindungen trugen wenig zur östrogenen Gesamtaktivität bei (maximal 0.2%). Durch den Vergleich der östrogenen Aktivität von PM1 mit Konzentrationen von verschiedenen gasförmigen Luftschadstoffen und mit meteorologischen Daten konnten keine spezifischen Emissionsquellen und Bildungsprozesse in der Atmosphäre ausfindig gemacht werden. Mit dem DR-CALUX Assay wurden TCDD-CEQ Konzentrationen im Bereich von 0.5 bis 2 µg g<sup>-1</sup> bzw. 10 bis 87 pg m<sup>-3</sup> gemessen. Zwischen dem städtischen und ländlichen Standort

konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der AhR-vermittelten Aktivität gefunden werden. Im Gegensatz zur östrogenen Aktivität korrelierte der zeitliche Verlauf der AhR-basierten Aktivität nicht zwischen den beiden Standorten. Neun 4- bis 6-Ring PAHs (Fluoranthen, Pyren, Chrysen, Benz[*a*]anthracen, Benzo[*b*]fluoranthen, Benzo[*k*]fluoranthen, Benzo[*a*]pyren, Indeno[1,2,3-*cd*]pyren, Dibenzo[*a,h*]anthracen) wurden mit GC/HRMS in den PM1 Extrakten analysiert. Die Konzentrationen dieser Verbindungen korrelierten an beiden Standorten stark mit der Gesamtaktivität (städtisch,  $r^2 = 0.9$ ; ländlich,  $r^2 = 0.7$ ). Die Summenaktivität der neun PAHs erklärte 9–20% bzw. 2–16% der Gesamtaktivität am städtischen bzw. ländlichen Standort. Dies zeigt, dass der Beitrag der untersuchten PAHs relevant ist. An beiden Standorten war Benzo[*k*]fluoranthene am wichtigsten und machte ~60% der gesamten PAH-Aktivität aus. Es konnte nicht gezeigt werden, dass Verkehrsemissionen zu erhöhter AhR-basierter Aktivität am städtischen Standort führten. Zusammenfassend zeigten diese Studien, dass Partikel in der Luft Verbindungen enthalten, die *in vitro* mit Östrogenrezeptoren (ERs) und «Dioxin-Rezeptoren» (AhRs) interagieren können und daher möglicherweise auch hormonregulierte Prozesse *in vivo* stören und/oder AhR-vermittelte Toxizität induzieren können.