

## CALUX bioassays

### Werkingsmechanisme

Zoogdiercellen beschikken over een breed scala aan mechanismen waarmee zij specifiek kunnen reageren op signalen of stress die worden opgewekt door verbindingen waaraan zij worden blootgesteld. CALUX<sup>®</sup> (Chemically Activated LUciferase eXpression) assays vormen een set van zoogdiercellijnen die werden gemodificeerd om naast deze natuurlijke respons ook een kwantificeerbare respons te produceren: Als een cel wordt getriggerd om een respons te genereren, wordt een enzym (luciferase) aangemaakt dat licht produceert tijdens een reactie die het katalyseert. Na toevoeging van een substraat (luciferine) wordt de lichtproductie gekwantificeerd met behulp van een luminometer. Het geproduceerde signaal is evenredig met het veroorzaakte effect.

Terwijl de meeste genen bij meerdere reacties betrokken kunnen zijn, zorgt het moleculaire ontwerp van de CALUX<sup>®</sup> assays ervoor dat de waargenomen reactie zeer specifiek is voor het effect van belang. Er is een breed scala aan specifieke CALUX<sup>®</sup> assays beschikbaar, waarvan er een aantal zijn opgenomen in de basis-set bioassays voor de SFT2.

### Procedure

CALUX<sup>®</sup> assays kunnen worden gebruikt voor het bepalen van de toxiciteit van de complexe mengsels van stoffen in waterextracten. De cellen worden gekweekt in wellplaten (gewoonlijk 96 of 384 wells), wat een grotere verwerkingscapaciteit en automatisering mogelijk maakt. Vervolgens worden zij 6 uur (PAH CALUX) of 24 uur blootgesteld aan een verdunningsreeks van het waterextract. Gelijktijdig met de monsters worden de cellen ook blootgesteld aan een concentratiereeks van een referentieverbinding. Wanneer er CALUX assays in de antagonistische modus worden uitgevoerd (anti-AR en -PR) moet gelijktijdig ook de cytotox CALUX worden uitgevoerd om het effect van celdood op de metingen te controleren. Na een bepaalde blootstellingstijd wordt de lichtproductie in de onafhankelijke wells gekwantificeerd.

De door het monster opgewekte activiteit wordt vervolgens uitgedrukt in equivalenten van de referentieverbinding.

Voor de binnen SFT2 geselecteerde CALUX assays is geen aanvullende monster bewerking nodig, en kunnen de standaard bemonstering- en monstervoorbewerking procedures gevolgd worden.

#### CALUX assays in de basis-set

Een aantal CALUX assays is zeer geschikt voor de reguliere monitoring van de potentiële toxiciteit van drink- en oppervlaktewater. Een raamwerk voor wat voor type bioassays daarvoor kan worden toegepast is gegeven door de Global Water Research Coalition ([GWRC, 2020](#)). Een aantal van deze assays geven een indicatie van algemene toxiciteit aan de hand van de activatie van cellulaire respons op giftige stoffen, zoals de oxidatieve stress respons (Nrf2) en het xenobiotisch metabolisme (PAH, PPAR $\alpha$  en PXR). Voor Nrf2 is een (niet CALUX) alternatief, de AREc32 bioassay. Hier is echter weinig ervaring mee in Nederland naast een rapport ter evaluatie van KWR water. Ook celdood (cytotox) is indicatief voor de toxiciteit van een zeer breed scala aan stoffen. Andere assays reageren specifiek op de werking van bepaalde stofgroepen, omdat ze de activatie van hormoonreceptoren kwantificeren. Ze zijn daarmee indicatief voor veel voorkomende bronnen van vervuiling zoals rioolwaterzuivering effluent (ER $\alpha$ ) en pesticiden (anti-AR en -PR), maar ook voor hormoonverstoring in mensen en dieren (ER $\alpha$ , AR en PR).

Gezamenlijk dekken deze assays een groot deel van de activiteiten van de toxische stoffen die mogelijk aanwezig zijn in drink- en oppervlaktewater, terwijl ze ook indicatief zijn voor de stofgroepen of vervuilingbronnen die de oorzaak kunnen zijn van de gemeten toxiciteit. De meeste assays zijn relevant voor zowel mens als milieu (bijv. ER $\alpha$ ), en zijn daardoor geschikt voor de analyse van zowel drinkwater als oppervlaktewater. Maar, voor veel testen is meer onderzoek nodig om te weten hoe ze risico precies inschatten met betrekking tot waterkwaliteit. Daarom zijn deze testen vooralsnog niet allemaal opgenomen in de bioassay basis-set van de SFT2.

### Aanbieder(s) en kosten

CALUX assays worden aangeboden door BioDetection Systems (BDS) in Amsterdam. Omdat BDS patenthouder van de CALUX methode is, worden deze assays maar door weinig andere laboratoria uitgevoerd. De kosten voor het uitvoeren van de meeste CALUX assay bij BDS bedragen ± €100 per monster per eindpunt. Voor aanbieders zie het Overzicht [Aanbieders Advies en Uitvoering](#) op de website van de SFT2.