

VU Research Portal

Applicability of functional genomics tools for water quality assessment

van der Linden, S.C.

2013

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

van der Linden, S. C. (2013). *Applicability of functional genomics tools for water quality assessment*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Samenvatting

Water is van vitaal belang voor al het leven dat wij kennen. Via datzelfde water worden we echter continu blootgesteld aan allerlei stoffen die mogelijk ongewenste effecten kunnen hebben. Om de veiligheid en de kwaliteit van het water te bepalen, worden van een beperkt aantal stoffen de concentraties in het water chemisch bepaald. Een van de problemen hierbij is dat men altijd alleen maar een beeld krijgt van een klein deel van de totaal aanwezige stoffen. Daarbij komt nog dat van de meeste stoffen die aanwezig zijn niet bekend is wat de precieze effecten zijn. Dus hoewel de chemisch-analytische methoden steeds meer en steeds gevoeliger kunnen meten, is het vertalen van gevonden stoffen naar mogelijke risico's niet mogelijk.

Stoffen hebben een (soms ongewenst) biologisch effect doordat ze interfereren met natuurlijke processen in het lichaam, zoals reageren met essentiële enzymen of het verstoren van communicatie tussen cellen. Elk ongewenst effect van stoffen op een organisme – of mogelijk uiteindelijk een populatie – is in principe terug te voeren op een te initiëren effect op moleculair niveau. Een alternatieve methode om te achterhalen of er schadelijke stoffen aanwezig zijn in water is door niet zozeer te kijken naar de aanwezigheid van specifieke, individuele stoffen maar door te kijken naar de aanwezigheid van effecten. Door het in kaart brengen van deze initiërende effecten in een monster kan wellicht een beter overzicht worden verkregen wat betreft de kwaliteit van een watermonster. Daarvoor zijn dan wel methoden nodig die heel precies specifieke effecten kunnen bepalen.

De laatste jaren is er steeds meer bekend over het mechanisme waardoor stoffen negatieve effecten kunnen bewerkstelligen. Op basis van die mechanistische kennis kunnen screeningsmethoden worden ontwikkeld die deze effecten in kaart brengen. Het doel van het onderzoek dat staat beschreven in dit proefschrift was dergelijke technieken te ontwikkelen en toe te passen, om inzicht te krijgen in de aanwezigheid van potentieel ongewenste effecten in water. Hierbij wordt gebruik gemaakt van testen die zijn gebaseerd op gekweekte (humane) cellen (*in vitro* testen) en is vooral gekeken naar effecten die indicatief zijn voor een mogelijke verstoring van het hormonale systeem of voor DNA-schade.

Hormonen zijn boodschappers in het lichaam, en werken via een specifieke receptor die als schakelaar fungeert om bepaalde processen aan of uit te zetten. Omdat hormonen vele fysiologische processen reguleren – waaronder de energiehuishouding, de immuunrespons, vruchtbaarheid, voortplanting en embryonale ontwikkeling – is een goed functionerend hormonaal systeem van levensbelang. Uit onderzoek blijkt echter dat sommige stoffen in staat zijn om de natuurlijke hormonen na te bootsen en zo de noodzakelijke balans te verstoren. Het meeste onderzoek richt zich hierbij op stoffen die in staat zijn het vrouwelijk geslachtshormoon estradiol na te bootsen en zo de bijbehorende receptor te activeren. Verantwoordelijke stoffen die tot dusver zijn geïdentificeerd zijn zowel van natuurlijke (niet-afgebroken hormonen) als van antropogene (medicijnen, industriële chemicaliën) oorsprong.

Momenteel richt het meeste onderzoek zich op stoffen die de vrouwelijke geslachtshormonen kunnen nabootsen. Daarom is een eerste poging gedaan om effecten op andere hormoonreceptoren in kaart te brengen. Naast de oestrogeen receptor (vrouwelijk geslachtshormoon) is ook gekeken naar stoffen die in staat zijn om de androgeen receptor (mannelijk geslachtshormoon), progestageen receptor (hormoon betrokken bij de vruchtbaarheid)

en de glucocorticoid receptor (hormoon dat is betrokken bij glucosemetabolisme en bij immuun-systeemonderdrukking en -activering) te activeren (hoofdstuk 2). Bij dit onderzoek is gebruik gemaakt van testen (bioassays), gebaseerd op menselijke cellen, die licht produceren wanneer de specifieke hormoonreceptor wordt geactiveerd. Hierbij zijn verschillende watermonsters getest, waaronder drinkwater, oppervlaktewater en verschillende soorten afvalwater (ziekenhuis, industrieel, papierfabriek en huishoudelijk). Uit dit onderzoek bleek dat er inderdaad stoffen aanwezig zijn die in staat zijn om de verschillende hormoonreceptoren te activeren. Vervolgens is een poging gedaan om de verantwoordelijke stoffen te identificeren die actief zijn op de glucocorticoid receptor (hoofdstuk 3). Dit is gedaan voor het afvalwater van een ziekenhuis en daarbij bleek dat de waargenomen activiteit bijna helemaal kan worden verklaard door de aanwezigheid van bekende (maar tot nu toe nooit naar gezochte) medicijnen.

Voordat een nieuwe methode geaccepteerd wordt als toepassing in de praktijk, is het belangrijk om te laten zien dat de resultaten die gemeten worden op verschillende tijdstippen en uitgevoerd worden door verschillende laboratoria, vergelijkbaar zijn. Hiervoor is een validatie uitgevoerd tussen verschillende labs voor de AR CALUX, een bioassay die activiteit meet op de androgeen receptor (hoofdstuk 4). De validatie laat zien dat de resultaten van deze testen robuust zijn en dat de testen goed overdraagbaar zijn naar andere labs.

Naast de focus op hormonale verstoringen is ook een poging gedaan om nieuwe assays te ontwikkelen die zich richten op een andere signaalroute, namelijk die van schade aan het DNA. Omdat DNA de drager is van alle genetische informatie, kan schade hieraan leiden tot ongewenste effecten, bijvoorbeeld doordat er fouten ontstaan bij de productie van eiwitten. Stoffen kunnen op verschillende manieren het DNA beschadigen: direct, doordat ze met DNA een interactie kunnen aangaan, of indirect, bijvoorbeeld doordat ze ervoor zorgen dat er andere stoffen ontstaan die met DNA kunnen reageren (o.a. oxidatieve stress) of doordat ze ervoor zorgen dat DNA reparatiesystemen niet goed functioneren (hoofdstuk 5). Hiervoor zijn drie verschillende testen ontwikkeld, gebaseerd op dezelfde cellen als de testen voor hormonale activiteit: één voor de detectie van DNA-schade, één voor de detectie van oxidatieve stress en één als controle voor celtoxiciteit en niet-specifieke response. Alle drie de cellijnen zijn gevalideerd met ongeveer 65 stoffen, waaronder stoffen waarvan bekend is dat ze DNA-schade veroorzaken via verschillende mechanismen.

Waar bovenstaande testen zich vooral richten op het inzichtelijk maken van activiteit via één specifiek mechanisme, is in hoofdstuk 6 een poging gedaan om verschillende effecten tegelijkertijd te detecteren door gebruik te maken van genexpressieprofielen. Hierbij is het genexpressiepatroon bepaald van cellen die zijn blootgesteld aan verschillende referentiestoffen. Vervolgens is gekeken of het mogelijk is om het genexpressiepatroon dat ontstaat door cellen bloot te stellen aan complexe mengsels, te herleiden naar de genexpressiepatronen van de individuele stoffen die aanwezig zijn in dat mengsel. Deze aanwezigheid van deze effecten is waar mogelijk gecontroleerd met specifieke assays zoals beschreven in de voorgaande hoofdstukken. Hieruit bleek dat het erg lastig is om de individuele patronen te onderscheiden, onder andere doordat interacties tussen de verschillende effecten de cellulaire response beïnvloeden en daarmee de ook de uiteindelijke resultaten.

Hoewel uit onder andere het bovenstaand onderzoek is gebleken dat de biologische testmethoden een waardevolle bijdrage kunnen leveren aan het detecteren van ongewenst

effecten in water, is het nog een lange weg naar daadwerkelijke implementatie van dergelijke testen. Grotendeels komt dit doordat alle relevante richtlijnen momenteel gebaseerd zijn op individuele stoffen (die ongewenst zijn omdat ze negatieve effecten kunnen hebben) en niet op effecten. De aanwezigheid van effecten an sich geeft niet meteen aan dat er ook een risico is voor de gezondheid. Daarom is het belangrijk dat vóór er implementatie kan plaatsvinden, er eerst richtlijnen worden ontwikkeld waarbij niet alleen de aanwezigheid maar ook de hoeveelheid van effecten in perspectief wordt geplaatst.

Maar ook zonder dat dergelijke richtlijnen zijn afgeleid, is het zinvol om het screenen op effecten op te nemen in monitoringsstrategieën. De beschikbare biologische testen kunnen weliswaar nog niet alle toxicologisch relevante effecten voorspellen - en mogelijk zal dat ook nooit het geval zijn - maar het is wel mogelijk om met de biologische testen die beschikbaar zijn een betere inschatting te maken omtrent de aanwezigheid van potentieel ongewenste stoffen. De informatie die dergelijke testen leveren, is aanvullend op de informatie die wordt verkregen met chemische analyse.