



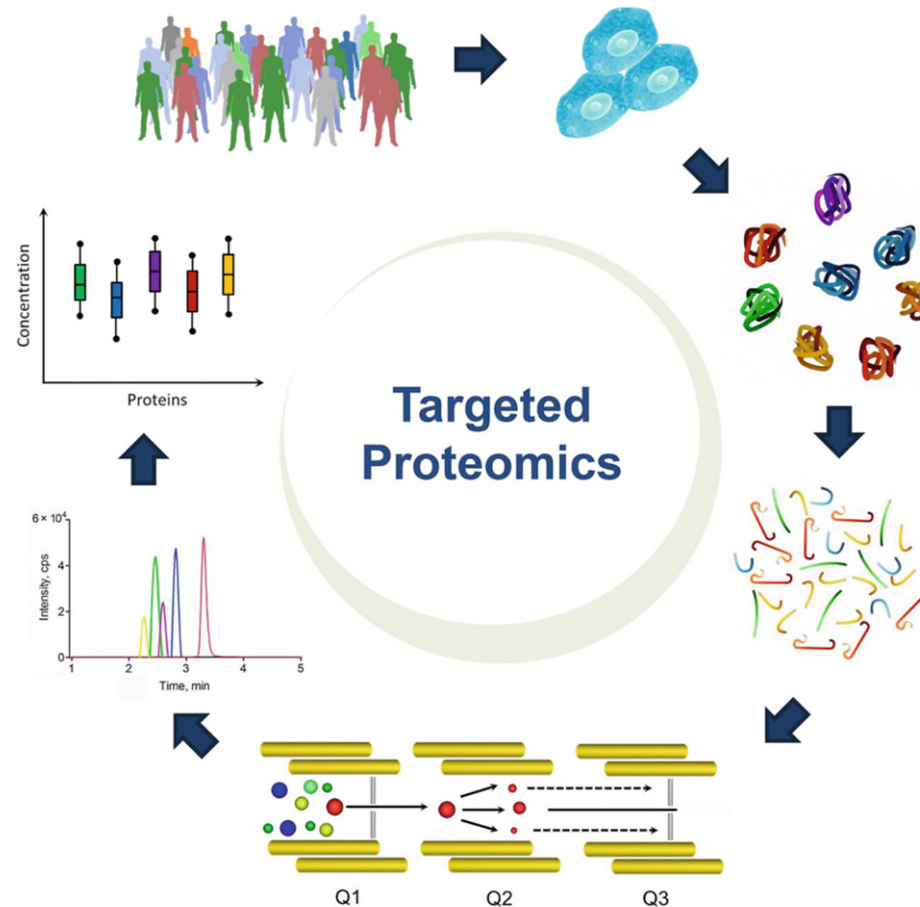
## Environmental proteomics: het gebruik van proteomics methoden voor milieu monitoring

### Samenvatting

Proteomics is een gevestigde discipline die zich richt op de studie van het eiwitprofiel van organismen. Hoewel hoofdzakelijk toegepast in klinische studies, worden proteomics benaderingen gebruikt voor milieudoelinden, met name om verontreiniging te monitoren en, procesbeheersing, waar zij aanvullende informatie kunnen opleveren naast op genoom gebaseerde methoden zoals PCR en NGS. Evenzo zijn er enkele eerste pogingen gedaan om deze benaderingen toe te passen voor het bewaken van de menselijke gezondheid via “wastewater-based epidemiology”. Hoewel dit veelbelovend is, is aanvullend onderzoek nodig om te bepalen hoe deze aanpak in de watersector kan worden toegepast en daartoe moeten haalbaarheidsstudies worden uitgevoerd.

Gevolgen voor u

	Laag	Middel	Hoog	Beknopte uitleg
Impact				
Zekerheid				



Figuur 1: Overzicht van targeted proteomics<sup>1</sup>.

## Trendbeschrijving en achtergrond

### Introductie

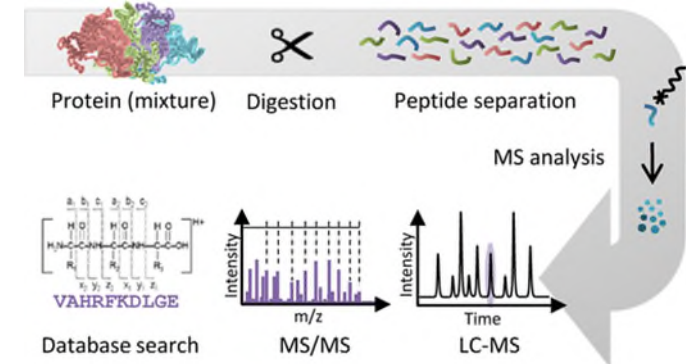
De Corona Virus Infectious Disease (COVID-19), die sinds begin 2020 de hele wereld teistert, heeft ernstige gevolgen gehad voor de menselijke samenleving, met tot op heden meer dan 171 miljoen bevestigde gevallen en 3,5 miljoen doden (op juni 2021)<sup>2</sup>. Dit heeft ook ingrijpende gevolgen gehad voor de watersector en dat zal in de nabije toekomst zo blijven<sup>3</sup>. De pandemie heeft echter ook de aanzet gegeven tot de ontwikkeling van innovatieve, interdisciplinaire en baanbrekende benaderingen om de gevolgen van de pandemie onder controle te krijgen. De wastewater-based epidemiology (WBE) benadering die, in het geval van COVID19, berust op de analyse van RNA van SARS-CoV-2 in afvalwater om de circulatie van het virus op gemeenschapsniveau te monitoren, is zeker een van de belangrijkste voorbeelden van deze ontwikkelingen. Deze aanpak, die voor het eerst werd toegepast door onderzoekers van KWR<sup>4</sup>, wordt nu in 55 landen over de hele wereld toegepast<sup>5</sup>. De aanpak berust op RNA-gebaseerde methoden waarbij gebruik wordt gemaakt van kwantitatieve real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR)<sup>4</sup> of, meer recentelijk, ook van digital droplet PCR (ddPCR)<sup>6</sup>, alsook van next generation sequencing (NGS)<sup>7</sup>.

Er worden grote inspanningen geleverd om deze technieken verder te ontwikkelen, te verfijnen en te harmoniseren (d.w.z. vergelijkbare resultaten in verschillende laboratoria). Geïnspireerd door het werk dat in klinische omgeving is gedaan, is in recente studies de mogelijkheid onderzocht om proteoom-gebaseerde methoden m.b.v. massaspectrometrie (MS) te gebruiken als aanvulling op RNA-gebaseerde methoden. MS-gebaseerde benaderingen worden gebruikt om alle proteïnen tezamen (het proteoom) van organismen te karakteriseren. In het specifieke geval van SARS-CoV-2 is dit gebruikt voor diagnostische doeleinden. De toepassing van proteomics-benaderingen is echter niet beperkt tot klinische studies, maar kan worden uitgebreid tot de analyse van milieumonsters. Dit wordt "environmental proteomics" genoemd. Op basis van de ervaringen opgedaan SARS-CoV-2 en de (diagnostische) analyse daarvan met behulp van gerichte proteomics, is het doel van deze trend alert een overzicht van deze technieken te geven en de relevantie van environmental proteomics voor de (drink)water sector te inventariseren.

### MS-gebaseerde proteomics

MS-gebaseerde proteomics-benaderingen, met inbegrip van methoden waarbij LC-scheiding wordt toegepast, berusten over het algemeen op de enzymatische splitsing van complexe eiwitmengsels afkomstig van

organismen, klinische of milieumonsters, gevolgd door MS-analyse<sup>8</sup> (Figuur 2).



Figuur 2: Algemene benadering gebruikt in "bottom-up" LC-MS-gebaseerde proteomics<sup>9</sup>.

In het specifieke geval van SARS-CoV-2 zijn MS-gebaseerde methoden mogelijk aanvullend als diagnostisch instrument voor de detectie van SARS-CoV-2 in menselijke monsters. Een van de belangrijkste drijfveren voor deze ontwikkelingen is dat virale proteïnen stabielere zouden kunnen zijn dan viraal RNA, waardoor het risico van vals-negatieve resultaten wordt verminderd<sup>10</sup>. Bovendien is proteomics op basis van MS ongericht en allesomvattend, waarbij alle (potentiële) pathogene virussen kunnen worden opgespoord<sup>10</sup>.

### SARS-CoV-2 MS methoden als voorbeeld



Voor de diagnose van SARS-CoV-2 zijn op MS gebaseerde methoden gebruikt voor de analyse van diverse human monsters<sup>10</sup>. De gebruikte methoden berusten over het algemeen op zogeheten gerichte proteomics, die gebaseerd zijn op de opsporing van SARS-CoV-2-specifieke peptiden. Over het algemeen zijn de methoden gericht op het nucleoproteïne van het virus<sup>11</sup>, terwijl de spike<sup>-12</sup> en membraaneiwwitten<sup>13</sup> in mindere mate werden gerapporteerd.

Hoewel vrij ongecompliceerd, variëren de protocollen voor monstervoorbereiding nogal tussen de studies, waarbij sommige bijvoorbeeld eiwitprecipitatie met aceton<sup>14</sup> of trichloorazijnzuur<sup>13</sup> of zelfs vriesdrogen<sup>15</sup> voorafgaand aan verdere verwerking rapporteren. Niettemin wordt in alle studies het gebruik van trypsine voor de eiwitvertering voorafgaand aan de analyse gerapporteerd. De algemene procedure voor enzymatische digestie met trypsine bestaat uit een eerste denaturatiestap met een chaotroop middel zoals ureum, gevolgd door reductie van disulfidebruggen met dithiothreitol en tenslotte alkylering van cysteïnen met iodoazijnzuur of iodoacetamide<sup>9</sup>. Nano-LC gekoppeld aan nano-ESI bronnen en Orbitrap HRMS behoorden tot de meest gerapporteerde instrumentele methoden voor de analyse van SARS-CoV-2 peptiden in menselijke monsters. In de meeste gevallen werden C18 stationaire fasen gebruikt voor de scheiding, soms in combinatie

met trapping pre-columns voor monsterconcentratie vóór de analyse<sup>14</sup>.

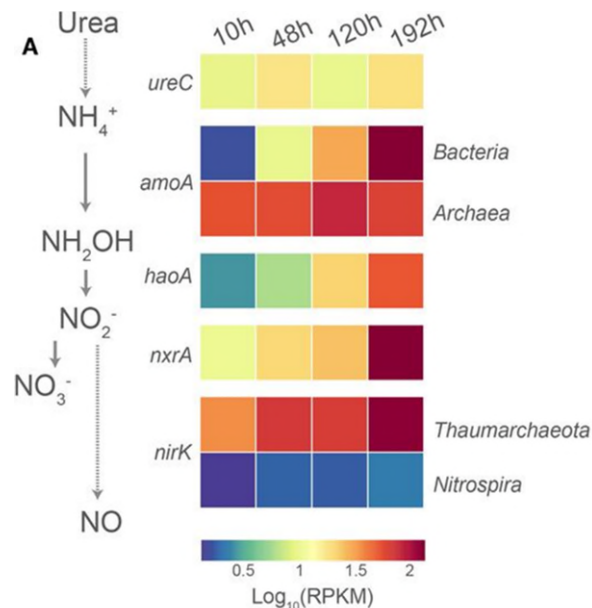
### **Kwantificeringsbenaderingen in gerichte proteomics**

Kwantificering in MS-gebaseerde proteomics studies wordt in het algemeen gedaan hetzij met behulp van de gehele peptide (d.w.z., MS1 gerichte methoden) of met behulp van fragmenten hiervan (d.w.z., MS2 gerichte methoden)<sup>16</sup>. Voor kwantificeringsdoeleinden kan gebruik worden gemaakt van in de handel verkrijgbaar referentiemateriaal. In het specifieke geval van SARS-CoV-2 werd in de meeste studies tot dusver alleen melding gemaakt van detectie en identificatie van SARS-CoV-2, aangezien de nadruk lag op de diagnostiek en niet op de kwantitatieve analyse. In een recent werk van Shajahan et al. (2020)<sup>17</sup> wordt echter melding gemaakt van de kwantificering van de concentratie van spike-eiwit in geanalyseerde monsters. Referentiematerialen werden aangekocht bij RayBiotech®, dat ook aangeeft te beschikken over nucleoproteïne-referentiemateriaal voor kwantificeringsdoeleinden.

### **Toepassing op milieumonsters**

Vanuit ecologisch oogpunt zijn proteomics methoden toegepast voor de monitoring van verontreiniging, vooral als aanvulling op ecologische biomonitoring, die

berust op het bepalen van bioconcentratie of bioaccumulatie van verontreinigende stoffen in (aquatische) organismen. Het idee achter het gebruik van environmental proteomics is dat proteïnen kunnen worden gebruikt als biomarkers om een specifieke verontreinigende stof op te sporen en te kwantificeren<sup>18</sup>. Het gebruik van proteomische biomarkers is echter niet beperkt tot de beoordeling van aquatische verontreiniging, maar kan ook worden gebruikt voor de monitoring van de menselijke gezondheid (via de analyse van afvalwater), met name omdat biomarkers voor bepaalde ziekten in urine kunnen worden aangetroffen<sup>19</sup>. Methodes die zijn ontwikkeld voor het opruimen en concentreren van proteïnen in complexe menselijke matrices kunnen dan ook worden toegepast voor milieumonsters, zoals zij reeds worden gebruikt voor de analyse van kleine moleculen in de WBE.



Figuur 3: De aanwezigheid van de proteïnen (de enzymen ureC, amoA, haoA, nxrA, nirK) die complete nitrificatie mogelijk maken en de relatieve expressie ratios van deze proteïnen (log<sub>10</sub>) in bepaalde microbiële populaties aan de hand van een geanalyseerd eiwitprofiel<sup>20</sup>.

Er zijn ook alternatieve methoden gerapporteerd waarbij polymeersondes worden gebruikt die in de in- of effluenten van rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZI's) worden geplaatst<sup>21</sup>. Deze lijken goed te werken voor afvalwater en zijn gemakkelijk te verwerken, maar maken het niet mogelijk kwantitatieve resultaten te verkrijgen. Dit is echter niet altijd nodig, aangezien de loutere aan- of afwezigheid van bepaalde soorten

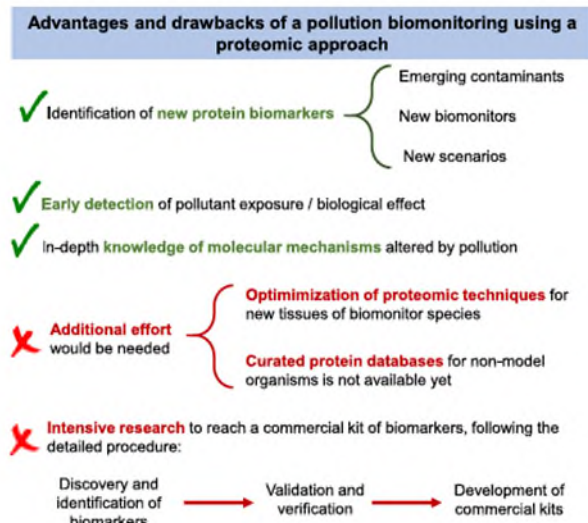
proteïnen al voldoende informatie kan opleveren (bv. SARS-CoV-2).

### Toepassing op monitoring van processen in het milieu

Proteoom-analyse kan ook gebruikt worden voor het monitoren en begrijpen van (microbiële) populaties en processen tijdens bijv. (afval)waterzuivering (Figuur 3)<sup>21,22</sup>. Het kan verklaringen geven voor schommelingen in verwijderingsefficiëntie die veroorzaakt worden door bepaalde processen, waarmee gericht oplossingen bedacht kunnen worden. Ook in distributiesystemen kan met begrip van microbiële processen achterhaald worden waarom nagroei veroorzaakt wordt, en hoe dit voorkomen kan worden. Voor zover bekend, zijn dit soort studies tot nu toe nog niet uitgevoerd. Er is op dit moment BTO-onderzoek gaande naar de mogelijkheden voor het toepassen van proteoom-analyse in drinkwaterbehandeling. Een grote uitdaging hierbij is om genoeg eiwit uit water te extraheren voor een goede, dekkende proteoom-analyse. Aan de TU Delft is op dit moment ook onderzoek hiernaar gaande, waar men inventariseert of en hoe dit mogelijk is. Een vervolgonderzoek zou kunnen zijn om het proteoom van praktijkmonsters in drinkwaterbehandeling te analyseren en om de dominante processen proberen te achterhalen.

### Relevantie

Proteomics-benaderingen zijn op grote schaal gebruikt om de samenstelling, structuur, en concentratie van proteïnen in een breed scala van organismen te karakteriseren. Voortbouwend op de recente berichten dat deze methoden kunnen worden gebruikt als aanvullende diagnostische instrumenten voor de monitoring van SARS-CoV-2, hebben wij de mogelijkheid onderzocht om in het bijzonder gerichte proteomics te gebruiken voor milieubewakingsdoeleinden. Hoewel dit nog in de kinderschoenen staat, bestaat er reeds een aanzienlijke hoeveelheid literatuur over de toepassing van MS-gebaseerde proteomics methoden voor de monitoring van aquatische verontreiniging<sup>18</sup>. Deze benaderingen worden echter hoofdzakelijk toegepast vanuit een ecologisch perspectief, namelijk om het effect van verontreiniging op aquatische organismen te beoordelen. Hoewel deze methoden minder relevant zijn voor de directe bewaking van de waterkwaliteit, kunnen zij toch worden gebruikt als proxies voor de evaluatie van de algehele verontreiniging van bronnen die worden gebruikt voor de productie van drinkwater.



Figuur 4: Overzicht van de voor- en nadelen van proteomics voor de monitoring van milieuverontreiniging<sup>18</sup>.

Anderzijds is de procesbeheersing bij de behandeling van afval- en drinkwater een gebied waarop proteomics-methoden relevant zouden kunnen worden. Met name de activiteit en het effect van microbiële gemeenschappen in behandlungsprocessen en hun relatie met het behandelingsrendement zouden verder kunnen worden onderzocht. Deze methoden kunnen als aanvulling op andere ongerichtte benaderingen, zoals metagenomics en NGS, worden toegepast.

Ten slotte kan de monitoring van proteïnebiomarkers in de context van WBE-studies de toepassing van afvalwatermonitoring voor volksgezondheidsdoelinden verder uitbreiden. Dit zou op verschillende manieren kunnen gebeuren, enerzijds als aanvulling op bestaande RNA-gebaseerde methoden die momenteel worden gebruikt om de circulatie van ziekteverwekkers in gemeenschappen te monitoren (i.e., PCR en NGS). Anderzijds om informatie te verzamelen over de gezondheid van de bevolking door het rechtstreeks meten van specifieke proteïnen in afvalwater die in verband worden gebracht met bepaalde soorten ziekten, of als aanvulling op RNA/DNA-gebaseerde methoden, om bijv. het microbioom op gemeenschapsniveau te monitoren.

Terwijl proteomics in klinische omgevingen een gevestigde discipline is, staat de toepassing ervan op milieumonitoring nog in de kinderschoenen. Hoewel het verschillende potentiële toepassingen heeft in de watersector, moeten verkennende studies worden uitgevoerd om te bepalen welke specifieke vragen deze benadering kan helpen beantwoorden en of het voordelen heeft in vergelijking met andere moleculair microbiologische benaderingen zoals qPCR, metagenomics, metatranscriptomics en NGS.

## Trefwoorden

Proteomics, SARS-CoV-2, LC-HRMS, procesbeheersing, epidemiologie op basis van afvalwater, verontreinigingsmonitoring

## Auteurs

Frederic Béen, Peer Timmers, Lotte van Leuken (UvA), Hilja Groen (UvA)



## Referenties

1. Chen, Y. & Liu, L. Targeted Proteomics. in *Functional Proteomics: Methods and Protocols* (eds. Wang, X. & Kuruc, M.) 265–277 (Springer New York, 2019). doi:10.1007/978-1-4939-8814-3\_17.
2. Johns Hopkins University. COVID-19 Map. *Johns Hopkins Coronavirus Resource Center* <https://coronavirus.jhu.edu/map.html> (2021).
3. Antwi, S. H., Getty, D., Linnane, S. & Rolston, A. COVID-19 water sector responses in Europe: A scoping review of preliminary governmental interventions. *Science of The Total Environment* **762**, 143068 (2021).
4. Medema, G., Heijnen, L., Elsinga, G., Italiaander, R. & Brouwer, A. Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in sewage and correlation with reported COVID-19 prevalence in the early stage of the epidemic in the Netherlands. *Environmental Science & Technology Letters* (2020) doi:10.1021/acs.estlett.0c00357.
5. UC Merced. COVIDPooPs19. <https://ucmerced.maps.arcgis.com/apps/dashboards/c778145ea5bb4daeb58d31afee389082> (2021).
6. Heijnen, L. *et al.* Droplet Digital RT-PCR to detect SARS-CoV-2 variants of concern in wastewater. *medRxiv* (2021) doi:doi.org/10.1101/2021.03.25.21254324.
7. Izquierdo-Lara, R. *et al.* Monitoring SARS-CoV-2 Circulation and Diversity through Community Wastewater Sequencing, the Netherlands and Belgium. *Emerging Infectious Diseases journal* **27**, (2021).
8. Karpievitch, Y. V., Polpitiya, A. D., Anderson, G. A., Smith, R. D. & Dabney, A. R. Liquid Chromatography Mass Spectrometry-Based Proteomics: Biological and Technological Aspects. *Ann Appl Stat* **4**, 1797–1823 (2010).
9. Switzar, L., Giera, M. & Niessen, W. M. A. Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments. *J. Proteome Res.* **12**, 1067–1077 (2013).
10. Grossegeesse, M. *et al.* Perspective on Proteomics for Virus Detection in Clinical Samples. *J. Proteome Res.* **19**, 4380–4388 (2020).
11. Schuster, O. *et al.* Specific and Rapid SARS-CoV-2 Identification Based on LC-MS/MS Analysis. *ACS Omega* **6**, 3525–3534 (2021).



12. Sanda, M., Morrison, L. & Goldman, R. N- and O-Glycosylation of the SARS-CoV-2 Spike Protein. *Anal. Chem.* **93**, 2003–2009 (2021).
13. Gouveia, D. *et al.* Proteotyping SARS-CoV-2 Virus from Nasopharyngeal Swabs: A Proof-of-Concept Focused on a 3 Min Mass Spectrometry Window. *J. Proteome Res.* **19**, 4407–4416 (2020).
14. Ihling, C. *et al.* Mass Spectrometric Identification of SARS-CoV-2 Proteins from Gargle Solution Samples of COVID-19 Patients. *J. Proteome Res.* (2020) doi:10.1021/acs.jproteome.0c00280.
15. Nikolaev, E. N. *et al.* Mass-Spectrometric Detection of SARS-CoV-2 Virus in Scrapings of the Epithelium of the Nasopharynx of Infected Patients via Nucleocapsid N Protein. *J. Proteome Res.* **19**, 4393–4397 (2020).
16. Borràs, E. & Sabidó, E. What is targeted proteomics? A concise revision of targeted acquisition and targeted data analysis in mass spectrometry. *PROTEOMICS* **17**, 1700180 (2017).
17. Shajahan, A., Supekar, N. T., Gleinich, A. S. & Azadi, P. Deducing the N- and O-glycosylation profile of the spike protein of novel coronavirus SARS-CoV-2. *Glycobiology* **30**, 981–988 (2020).
18. López-Pedrouso, M., Varela, Z., Franco, D., Fernández, J. A. & Aboal, J. R. Can proteomics contribute to biomonitoring of aquatic pollution? A critical review. *Environmental Pollution* **267**, 115473 (2020).
19. Rice, J. & Kasprzyk-Hordern, B. A new paradigm in public health assessment: Water fingerprinting for protein markers of public health using mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **119**, 115621 (2019).
20. Orellana, L. H. *et al.* Comparing DNA, RNA and protein levels for measuring microbial activity in nitrogen-amended soils. *bioRxiv* 466680 (2018) doi:10.1101/466680.
21. Carrascal, M., Abian, J., Ginebreda, A. & Barceló, D. Discovery of large molecules as new biomarkers in wastewater using environmental proteomics and suitable polymer probes. *Science of The Total Environment* **747**, 141145 (2020).



22. Perez-Lopez, C. *et al.* Non-target protein analysis of samples from wastewater treatment plants using the regions of interest-multivariate curve resolution (ROIMCR) chemometrics method. *Journal of Environmental Chemical Engineering* **9**, 105752 (2021).