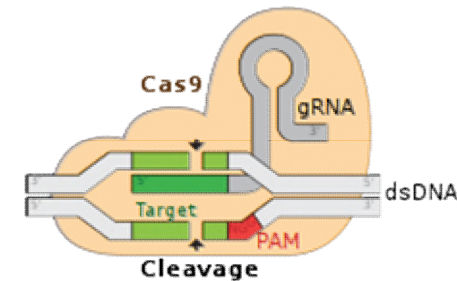




CRISPR-Cas voor de drinkwatermicrobiologie?

Samenvatting

Sinds de ontwikkeling van toepassingen van het CRISPR-Cas systeem komen er regelmatig veelbelovende mogelijkheden in het nieuws. Deze nieuwe mogelijkheden richten zich vooral op het gebruik van CRISPR-Cas voor het gericht aanpassen van het DNA om daarmee (erfelijke) ziekten te kunnen genezen. Het is echter niet te verwachten dat toepassingen van genetische modificatie op korte en middellange termijn hun weg zullen vinden in de drinkwatermicrobiologie. CRISPR-Cas voor het aantonen van specifieke micro-organismen met eenvoudige middelen is wel een veelbelovende toepassing van dit systeem. Deze toepassing zou kunnen resulteren in de ontwikkeling van methoden waarmee specifieke micro-organismen op locatie kunnen worden aangetoond in water. Als voldoende gevoeligheid haalbaar is dan geeft dat mogelijkheden voor de ontwikkeling van eenvoudige methoden waarmee micro-organismen (zoals fecale indicatoren) op locatie kunnen worden aangetoond. Dit geeft mogelijkheden om snel en flexibel de drinkwaterkwaliteit te monitoren.



Figuur: Schematische weergave van de werking van het CRISPR-Cas systeem (Bron: Wikipedia).

Consequenties voor u

| | Laag | Middel | Hoog | Beknopte uitleg |
|-----------|------|--------|------|--|
| Impact | | | | Mogelijk geeft CRISPR-Cas tools waarmee snel en op locatie de hygiënische kwaliteit van drinkwater kan worden bepaald. |
| Zekerheid | | | | Er moeten ontwikkelstappen gezet worden waarvan de uitkomst nog onzeker is. |



Trendbeschrijving en achtergrond

Historie

De afgelopen jaren is met enige regelmaat de term CRISPR-CAS in het nieuws. CRISPR-CAS verwijst naar een genetisch systeem dat van origine in prokaryoten (bacteriën en archaea) voorkomt en wat voor veelbelovende nieuwe ontwikkeling binnen de biologie heeft gezorgd. Met het CRISPR-Cas systeem zijn er baanbrekende mogelijkheden ontstaan voor genetische modificatie van organismen en voor specifieke detectie van nucleïnezuren (DNA of RNA) van (micro-) organismen. Het CRISPR-Cas systeem maakt onderdeel uit van het afweermechanisme van prokaryote organismen, waarmee deze organismen zich beschermen tegen infecties met bacterievirussen (ook wel bacteriofagen genoemd) [1]. Een grote doorbraak in de toepassing van CRISPR-Cas was de ontdekking dat dit systeem kan worden gebruikt om zeer gericht het DNA van een organisme (bacterie, schimmel, plant, dier of mens) op een specifieke locatie te knippen en te veranderen [2]. Dit principe kan worden gebruikt om genetische veranderingen aan te brengen (genetische modificatie) om daarmee genetische afwijkingen te repareren en wellicht erfelijke ziekten bij mensen te genezen. De ontdekkers van deze techniek, Jennifer Doudna en Emmanuelle Charpentier, kregen voor hun ontdekking in 2020 de Nobelprijs voor scheikunde. Naast de toepassing voor genetische modificatie zijn recent ook veelbelovende toepassingen beschreven waarbij CRISPR-Cas kan worden gebruikt voor het snel en eenvoudig aantonen van de aanwezigheid van specifieke

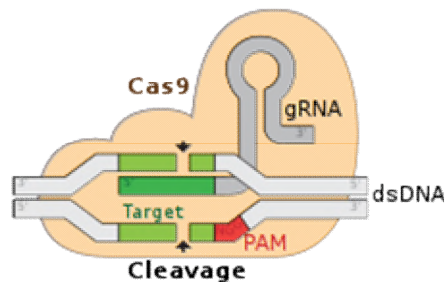
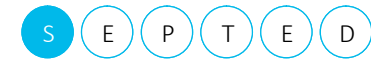
DNA-sequenties. Daarmee komen nieuwe mogelijkheden beschikbaar voor detectie van specifieke (micro-) organismen. In deze trendalert wordt achterhaald of dergelijke toepassingen ook gebruikt kunnen worden in drinkwater.

Hoe werkt CRISPR-Cas?

Voor de beschrijving van de werking van het CRISPR-Cas systeem in prokaryote micro-organismen is de Nederlandse microbioloog John van der Oost en zijn onderzoeksgroep aan de Wageningen Universiteit de pioniers geweest [1]. Tijdens de infectie van een bacterie door een virus (bacteriofaag) wordt het erfelijk materiaal (nucleïnezuren: DNA of RNA) van het virus ingebracht in de bacterie. Als afweerreactie op het binnendringen van dit erfelijke materiaal zal het CRISPR-Cas systeem in werking treden waarmee de virusinfectie wordt stopgezet. Dit CRISPR-cas systeem bestaat uit twee onderdelen:

- CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats): RNA-moleculen die, vanwege de sequentie, specifiek kunnen binden aan de nucleïnezuren van het virus dat de bacteriële cel binnendringt.
- Cas enzymen (CRISPR associated proteins): eiwitten die, na binding van de CRISPR's aan de binnengedrongen nucleïnezuren van het virus, deze nucleïnezuren klieven en daarmee het virus onschadelijk maken.

Bij de praktische toepassing van het CRISPR-Cas systeem worden CRISPR RNA-moleculen synthetisch in een laboratorium gemaakt en deze moleculen worden vervolgens als “gids-RNA” (gRNA) gebruikt (Figuur 1). Het gRNA bevat een variabel deel (donkergroen) en een vaste sequentie (grijs). Het variabele deel van het gRNA is dusdanig samengesteld dat de sequentie van dit deel op een specifieke locatie (lichtgroen) van het “doelwit-DNA” of “doelwit-RNA” bindt. Dit doelwit-DNA kan de specifieke locatie zijn waar de modificatie moet gaan plaats vinden (toepassing: genetische modificatie bijvoorbeeld het repareren van een defect gen bij een erfelijke ziekte) of kan DNA of RNA zijn van het te detecteren gen (toepassing: specifieke detectie bijvoorbeeld detectie van een specifieke ziekteverwekker). De binding van het gRNA aan het cellulaire DNA of RNA activeert het Cas enzym waardoor het Cas enzym gaat fungeren als een “biochemische schaar” waarmee het DNA of RNA enzymatisch wordt gekipt. Het knippen van het DNA of RNA kan op verschillende manieren plaats vinden en is afhankelijk van het gebruikte Cas enzym. Bij het gebruik van het Cas9 enzym is de locatie waar deze knip plaatsvindt specifiek bepaald door de locatie van binding van het gRNA en de aanwezigheid van een korte (3-6 nucleotiden) DNA-sequentie (Protospacer adjacent motif, PAM, genoemd, Figuur 1). Door het gebruik van andere Cas enzymen (zoals Cas 12a, Cas 13 en Cas 14) kan het knippen van het DNA (of RNA) ook plaats vinden op willekeurige locaties in het DNA of RNA.



Figuur 1. Schematische weergave van de werking van het CRISPR-Cas systeem (figuur afkomstig van Wikipedia).

Toepassing: genetische modificatie

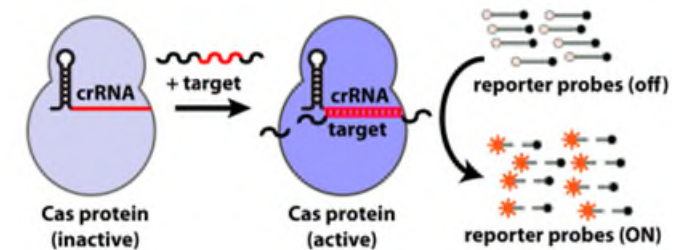
De toepassing van het CRISPR-Cas systeem voor het gericht aanbrengen van genetische veranderingen of het repareren van genetische afwijkingen is veelbelovend. Bij deze toepassing wordt het gRNA zodanig samengesteld dat het variabele deel van het gRNA (Figuur 1) bindt aan het deel van het DNA van het organisme waar de verandering moet gaan plaats vinden. Na binding van het gRNA zal het Cas enzym het DNA op een vaste locatie knippen en kan het DNA aansluitend gericht worden aangepast. In de praktijk blijkt het echter nog lastig om het Cas enzym alleen op de juiste locatie te laten knippen en om op deze specifieke locatie een andere sequentie in te brengen. Daarnaast zijn ook nog veel optimalisatiestappen noodzakelijk. Uiteindelijk is te verwachten dat er mogelijkheden worden ontwikkeld waarbij CRISPR-Cas kan worden gebruikt voor bijvoorbeeld het gericht genezen van (erfelijke) ziekten, het verbeteren van

landbouwgewassen en het aanpassen van micro-organismen.

Toepassing: specifieke detectie van micro-organismen

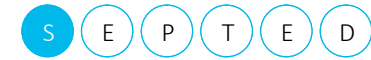
In 2016 is een methode beschreven waarbij voor het eerst het CRISPR-Cas systeem is toegepast als detectiesysteem voor het specifieke detectie van het RNA van het Zika virus [3]. Aansluitend zijn er, in relatief korte tijd, methoden ontwikkeld voor het aantonen van een groot aantal verschillende micro-organismen waarbij CRISPR-Cas wordt gebruikt voor detectie (reviews: [4-6]). Met deze toepassing van CRISPR-Cas is het mogelijk om het RNA of DNA van micro-organismen specifiek en met relatief hoge gevoeligheid aan te tonen. Bij het gebruik van CRISPR-Cas als detectiemethode wordt er gebruik gemaakt van alternatieve Cas-enzymen. Deze Cas-enzymen worden eveneens geactiveerd door specifieke binding van een gRNA-molecuul aan de te detecteren RNA- of DNA-sequentie (afkomstig van het organisme) waarna het geactiveerde Cas-enzym vervolgens het DNA van synthetische "reporterprobes" knipt (Figuur 2). Deze reporterprobes maken onderdeel uit van het reactiemengsel en bestaan uit synthetische DNA- of RNA-moleculen waaraan een actieve biochemische groepen zijn gekoppeld. Er zijn verschillende mogelijkheden beschikbaar waarmee het knippen van de "reporterprobes" zichtbaar gemaakt kan worden. Deze kunnen zijn gebaseerd op de vorming van meetbaar fluorescentielicht waarbij er, door gebruik te maken van probes met verschillende kleuren (golflengten), meerdere organismen gelijktijdig kunnen worden aangetoond. Daarnaast zijn er ook mogelijkheden om

geknipte reporter-probes zichtbaar te maken door deze te scheiden van de ongeknipte reporter-probes in een zeer eenvoudig cellulose testsysteem waarbij de geknipte probes een lokale verkleuring zullen veroorzaken (zoals de SARS-CoV-2 zelftest). Doordat specifieke binding van slechts één gRNA (of crRNA) resulteert een geactiveerd Cas eiwit waarmee veel reporterprobes kunnen worden geknipt, vindt een versterking van het signaal plaats waarmee relatief gevoelige tests kunnen worden ontwikkeld.



Figuur 2. Schematische weergave van het gebruik van CRISPR-Cas voor het aantonen van de aanwezigheid van specifieke RNA- of DNA-sequenties. Figuur overgenomen uit [4].

Ten opzichte van de standaardmethode voor detectie van het DNA of RNA van specifieke micro-organismen (PCR) zijn snelheid (20 min.) en eenvoud grote voordelen van het gebruik van CRISPR-Cas. De reacties kunnen worden uitgevoerd bij een constante temperatuur waarbij verschillende temperaturen mogelijk zijn en voor het meten van de analyseresultaten is geen



geavanceerde apparatuur noodzakelijk. Hierdoor is te verwachten dat de uitvoering van deze analyses ook op locatie mogelijk gaat zijn. Tot nu toe kan met deze methodiek de aan- of afwezigheid van ziekteverwekkende micro-organismen in een monster worden aangetoond, maar betrouwbare kwantificatie van micro-organismen is met CRISPR-Cas (nog) niet mogelijk.

Relevantie voor de drinkwatersector

Toepassing genetische modificatie met CRISPR-Cas voor drinkwater?

Met het aanpassen van micro-organismen ontstaan er wellicht ook mogelijkheden om de micro-organismen die een rol spelen in de drinkwaterzuivering aan te passen zodat deze organismen ongewenste stoffen gericht en efficiënter kunnen verwijderen. Met een dergelijke aanpak zou, in principe, een optimaal biologische zuiveringsproces ontworpen kunnen worden. Het is daarbij zeer de vraag in hoeverre genetische modificatie een meerwaarde heeft ten opzichte van de biochemische potentie die al in de natuurlijk voorkomende micro-organismen aanwezig is. En, naast de technische mogelijkheden, vormen ethische overwegingen en potentiële gezondheids- en/of milieurisico's van genetisch gemodificeerde organismen een belangrijke drempel bij de uiteindelijke toepassing van CRISPR-Cas voor genetische modificatie. Het valt niet te verwachten dat deze drempel snel genomen zal worden voor het inzetten van genetisch gemodificeerde

micro-organismen in de drinkwaterzuivering. Het is daarom niet waarschijnlijk dat CRISPR-Cas in dit kader op de korte en middellange termijn invloed zal gaan hebben op de drinkwatersector.

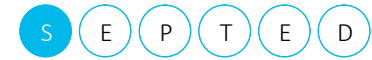
Toepassing CRISPR-Cas detectiemethoden voor drinkwater?

De eenvoud, snelheid en de mogelijkheid voor het uitvoeren van analyses op locatie kan betekenen dat snelle microbiologische kwaliteitscontroles van het drinkwater op locatie mogelijk gaan worden. Dit zou vooral een groot voordeel op kunnen leveren in situaties waarbij snel handelen van belang is zoals bijvoorbeeld na problemen met de hygiënische kwaliteit van drinkwater of voor controles na ingrepen in het distributienet. In dergelijke situaties is snelle informatie over de hygiënische betrouwbaarheid belangrijk om de levering van veilig drinkwater snel te kunnen waarborgen. Deze controles bestaan uit het meten van fecale indicatororganismen (*E. coli* en enterococci) waarbij afwezigheid van fecale indicatoren in 100 ml drinkwater het kwaliteitscriterium is. Het is de vraag of de gevoeligheid van CRISPR-Cas voldoende zal zijn om aan deze criteria te kunnen voldoen. Er zijn ook mogelijkheden beschikbaar om de gevoeligheid van CRISPR-Cas te verbeteren, door een additionele specifieke vermeerderingsstap van het doel-DNA (of -RNA) toe te voegen hierbij kan gekozen worden voor het toepassen van PCR. Maar alternatieve DNA/RNA-vermeerderingsmethoden die bij een constante temperatuur kunnen plaatsvinden zoals RPA Recombinase Polymerase Amplification (RPA) [7] Rolling Circle Amplification (RCA) [8] of Loop-Mediated

Isothermal Amplification (LAMP) [9] liggen daarbij meer voor de hand omdat daarmee geen technisch hoogstaande apparatuur noodzakelijk is. Het is mogelijk dat de ontwikkeling van een combinatie van een vermeerderingsstap en CRISPR-Cas mogelijk is en voldoende gevoelig zal kunnen zijn voor het detecteren van lage concentraties micro-organismen in een watermonster. Voor het uitvoeren van gevoelige detectiemethoden op locatie vormt CRISPR-Cas, naast een gevoelig detectiesysteem, ook een methode waarmee eenvoudig, snel en efficiënt het DNA uit het water geïsoleerd kan worden - een essentieel onderdeel waarop ontwikkeling noodzakelijk zal zijn.

Meer informatie

1. Brouns, S.J., et al., *Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes*. *Science*, 2008. **321**(5891): p. 960-4.
2. Jinek, M., et al., *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*. *Science*, 2012. **337**(6096): p. 816-21.
3. Pardee, K., et al., *Rapid, Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular Components*. *Cell*, 2016. **165**(5): p. 1255-1266.
4. Bhattacharyya, R.P., S.G. Thakku, and D.T. Hung, *Harnessing CRISPR Effectors for Infectious Disease Diagnostics*. *ACS Infect Dis*, 2018. **4**(9): p. 1278-1282.
5. Sashital, D.G., *Pathogen detection in the CRISPR-Cas era*. *Genome Medicine*, 2018. **10**(1): p. 32.



6. Kaminski, M.M., et al., *CRISPR-based diagnostics*. Nat Biomed Eng, 2021. **5**(7): p. 643-656.
7. Lobato, I.M. and C.K. O'Sullivan, *Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances*. Trends in analytical chemistry : TRAC, 2018. **98**: p. 19-35.
8. Gu, L., et al., *Research Progress on Rolling Circle Amplification (RCA)-Based Biomedical Sensing*. Pharmaceuticals (Basel, Switzerland), 2018. **11**(2): p. 35.
9. Wong, Y.-P., et al., *Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms*. Journal of Applied Microbiology, 2018. **124**(3): p. 626-643.

Keywords

DNA, RNA, Moleculair, PCR, Detectie, Micro-organismen, bacteriën, virussen, hygiënisch betrouwbaar drinkwater