

## Short-Term Test for Toxicogenomic Analysis of Ecotoxic Modes of Action in *Lemna minor*

Alexandra Loll<sup>1</sup> ([alexandra.loll@ime.fraunhofer.de](mailto:alexandra.loll@ime.fraunhofer.de)), Hannes Reinwald<sup>2</sup> ([hannes.reinwald@bayer.com](mailto:hannes.reinwald@bayer.com)), Steve U. Ayobahan<sup>1</sup> ([uwa.steve.ayobahan@ime.fraunhofer.de](mailto:uwa.steve.ayobahan@ime.fraunhofer.de)), Bernd Göckener<sup>1</sup> ([bernd.goeckener@ime.fraunhofer.de](mailto:bernd.goeckener@ime.fraunhofer.de)), Gabriela Salinas-Riester<sup>3</sup> ([Gabriela.Salinas-Riester@medizin.uni-goettingen.de](mailto:Gabriela.Salinas-Riester@medizin.uni-goettingen.de)), Christoph Schäfers<sup>1</sup> ([christoph.schaefers@ime.fraunhofer.de](mailto:christoph.schaefers@ime.fraunhofer.de)), Karsten Schlich<sup>1</sup> ([karsten.schlich@ime.fraunhofer.de](mailto:karsten.schlich@ime.fraunhofer.de)), Gerd Hamscher<sup>4</sup> ([gerd.hamscher@lcb.chemie.uni-giessen.de](mailto:gerd.hamscher@lcb.chemie.uni-giessen.de)), Sebastian Eilebrecht<sup>1</sup> ([sebastian.eilebrecht@ime.fraunhofer.de](mailto:sebastian.eilebrecht@ime.fraunhofer.de))

<sup>1</sup> Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und angewandte Ökologie IME, Schmallenberg

<sup>2</sup> Bayer CropScience, Monheim am Rhein

<sup>3</sup> Institut für Pathologie, Universitätsmedizin Göttingen

<sup>4</sup> Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmitteltechnologie, Universität Gießen

### 1 Abstract

Die Umweltrisikobewertung neuer Substanzen beinhaltet Studien an ökotoxikologischen Modellorganismen. Neben der hohen Relevanz der entsprechenden Richtlinientests für den Umweltschutz sind sie jedoch kosten- und zeitintensiv. Darüber hinaus liefern diese Tests oft nur wenige Informationen zu schädlichen Wirkmechanismen. Daher wird die Entwicklung effizienter, aussagekräftiger Testsysteme zur Umweltrisikobewertung immer wichtiger.

Ziel unserer Studie, die mit dem Paul-Crutzen-Preis 2024 ausgezeichnet wurde, war es daher, einen verkürzten Test für die Wasserlinse *Lemna minor* unter Einbeziehung von Toxikogenomik zu entwickeln. Dies diente der Identifizierung von Genexpressions-Biomarkern zur Wirkmechanismen-Unterscheidung. Die Erfassung solcher Biomarker legt den Grundstein für die Entwicklung von Screening-Methoden [1].

Link auf die Originalpublikation:

<https://doi.org/10.1021/acs.est.2c01777>

### 2 Einleitung

Analysen auf molekularer Ebene stellen ein in der Ökotoxikologie neu genutztes Konzept dar. Bisher wurden primär physiologische Effekte auf Organismen oder Populationen betrachtet. Molekularbiologische OMICs-Methoden, die die Veränderung der Gesamtheit bestimmter Moleküle, wie Proteine oder RNA erfassen, bieten hier vielfältige Optimierungsmöglichkeiten [2]. Ziel unserer Forschung ist es daher, eine molekulare Datenbank zu erstellen, anhand derer Screening-Verfahren für Modellorganismen der Ökotoxikologie entwickelt werden können. Diese Datenbank soll den ermittelten molekularen Fingerabdruck einer Substanz sowohl mit ihren schädlichen Effekten auf den Testorganismus als auch mit ihrer Wirkweise in Beziehung setzen. Zukünftig könnte dies ermöglichen, Wirkstoffe schon in einem frühen Entwicklungsstadium auf ihre Umweltrelevanz zu überprüfen. Ein großer Vorteil wäre, dass nur geringe Mengen des Wirkstoffs für eine Umweltrisikovorhersage benötigt würden, was wiederum schnelle Tests mit mehreren Substanzen ermöglicht.

Als Beitrag zur Datenbank sollte im Rahmen meiner Arbeit ein verkürzter Test zur Erfassung toxikogenomischer Fingerabdrücke im Modellorganismus *L. minor* etabliert werden.

#### 2.1 *Lemna minor*



Die Testspecies *Lemna minor* (Kleine Wasserlinse, Quelle: Wikipedia)

*Lemna minor* ist eine der am häufigsten eingesetzten Pflanzen zur aquatischen Ökotoxizitätsbeurteilung. Mit ihrer schnellen, asexuellen Reproduktion sowie hohen Anpassungsfähigkeit bietet die kleine Wasserpflanze optimale Bedingungen für Labortests. Zur Ermittlung ökotoxischer Effekte wird gemäß OECD-Richtlinientest Nr. 221 die Wachstumsinhibierung der Pflanze betrachtet [3]. Die nach 7 Tagen ermittelten morphologischen Effekte können durch OMICs mit Erkenntnissen zu molekularen Effekten ergänzt werden. Aufgrund der hohen Sensitivität der OMICs entwickelten wir einen auf 3 Tage verkürzten Test.

#### 2.2 Testsubstanzen

Zur Etablierung des verkürzten Testansatzes wurden zwei Substanzen unterschiedlicher anthropogener Nutzung ausgewählt. Dabei handelte es sich um das Medikament Atorvastatin und das Herbizid Bentazon. Atorvastatin ist eines der am häufigsten verwendeten Statine in der Humanmedizin,

welches das Schlüsselenzym der menschlichen Cholesterinsynthese [3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMGR)] hemmt und somit cholesterin- und lipidsenkende Wirkungen hat [4,5]. Auch Pflanzen besitzen eine HMGR, weshalb Wirkungen auf *L. minor* zu erwarten waren [6,7]. Bentazon ist ein Herbizid, das die Photosynthese von Pflanzen hemmt [8]. Darüber hinaus wurde Bentazon in einer früheren Studie ebenfalls mit einer Hemmung der HMGR in Verbindung gebracht [9].

Vor der Durchführung des verkürzten Tests mit den beiden Substanzen ergaben sich drei prinzipielle Fragestellungen:

1. Erhalten wir überhaupt eine Genantwort in *L. minor* nach nur 3 Tagen Exposition?
2. Können wir die molekularen Signaturen, die durch verschiedene Substanzen hervorgerufen werden, unterscheiden?
3. Können wir diese Signaturen auf bestimmte Wirkmechanismen zurückführen?

### 3 Methodik

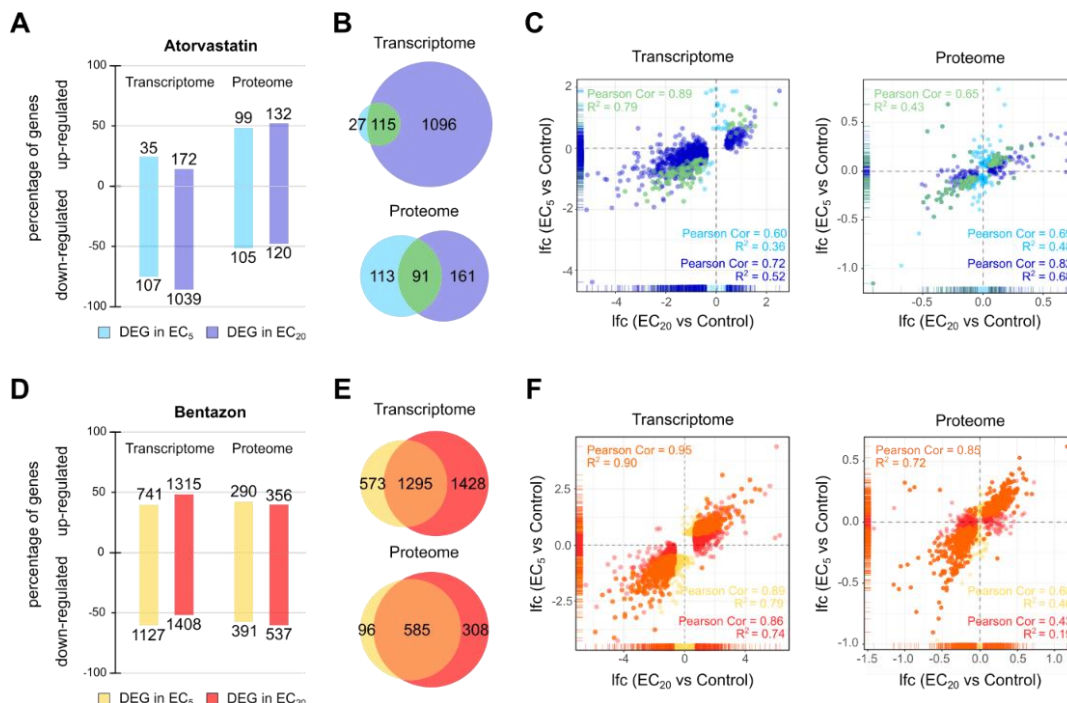
Bevor der auf 3 Tage verkürzte Haupttest ausgeführt wurde, wurden Vortests zur Bestimmung geeigneter Testkonzentrationen gemäß OECD TG 221 durchgeführt. Ausgewählt wurden niedrige Effektkonzentrationen (EC<sub>5</sub> und EC<sub>20</sub>) um systemische Effekte weitestgehend auszuschließen, die bei höheren Effektkonzentrationen auftreten können.

Der verkürzte Test wurde mit Nominalkonzentrationen von 0,03 (EC<sub>5</sub>) und 0,09 mg/L (EC<sub>20</sub>) für Atorvastatin und 0,7 (EC<sub>5</sub>) und 1,0 mg/L (EC<sub>20</sub>) für Bentazon durchgeführt. Die chemische Analyse mittels UHPLC-MS/MS ergab Wiederfindungsraten zwischen 90 und 103 %. Nach einem Expositionszeitraum von drei Tagen wurden Veränderungen der Genexpression mittels Transkriptomik und Proteomik untersucht. Dazu wurden die Gesamt-RNA sowie -Proteine aus der Pflanze extrahiert. Die Untersuchung der RNA erfolgte mittels Illumina-Sequenzierung, während die Proteine mit einer LC-MS/MS-Methode quantifiziert wurden. Die darauf folgenden bioinformatischen Auswertungen ermöglichten einen Einblick in molekulare Signaturen, die durch die Testsubstanzen hervorgerufen wurden. Besonders hervorzuheben ist die Annotation des Referenzgenoms, welche zuvor nicht vorlag. Für genauere Informationen lesen Sie gern unsere Publikation.

### 4 Ergebnisse und Diskussion

#### 4.1 Toxikogenomik

Die Durchführung der beiden verkürzten Tests mit anschließender Transkriptom- und Proteom-Analyse verursachte in beiden Fällen eine deutliche Antwort auf der Ebene der Genexpression. Auskunft über eine solche im Vergleich zur Kontrolle veränderten Genexpression gaben signifikant differentiell exprimierte Gene (DEGs).



**Abbildung 1:** Veränderungen der Genexpression in *L. minor*, induziert durch die Exposition mit EC<sub>5</sub> und EC<sub>20</sub> von Atorvastatin und Bentazon nach 3 Tagen. (A) Prozentsätze der Hoch- und Herunterregulierung von DEGs auf Transkriptom- und Proteomebene nach Exposition mit der EC<sub>5</sub> (hellblau) und EC<sub>20</sub> (dunkelblau) von Atorvastatin im Vergleich zur Kontrolle. Die Anzahl der hoch- und herunterregulierten Gene sind als Balkenmarkierungen angegeben. (B) Venn-Diagramme, die die Anzahl der DEGs nach Exposition mit der EC<sub>5</sub> und EC<sub>20</sub> von Atorvastatin und deren Coresets (grün) auf Transkriptom- (oben) und Proteomebene (unten) zeigen. (C) Streudiagramme, die die Korrelation der differentiellen Genexpression zwischen der Exposition gegenüber der EC<sub>5</sub> und EC<sub>20</sub> von Atorvastatin auf Transkriptom- (links) und Proteomebene (rechts) zeigen, indem ihre lfc-Werte verglichen werden. (D) wie (A), jedoch für Bentazon mit EC<sub>5</sub> (gelb) und EC<sub>20</sub> (rot). (E) wie (B), jedoch für Bentazon mit Coreset (orange) (F) wie (C), jedoch für Bentazon.

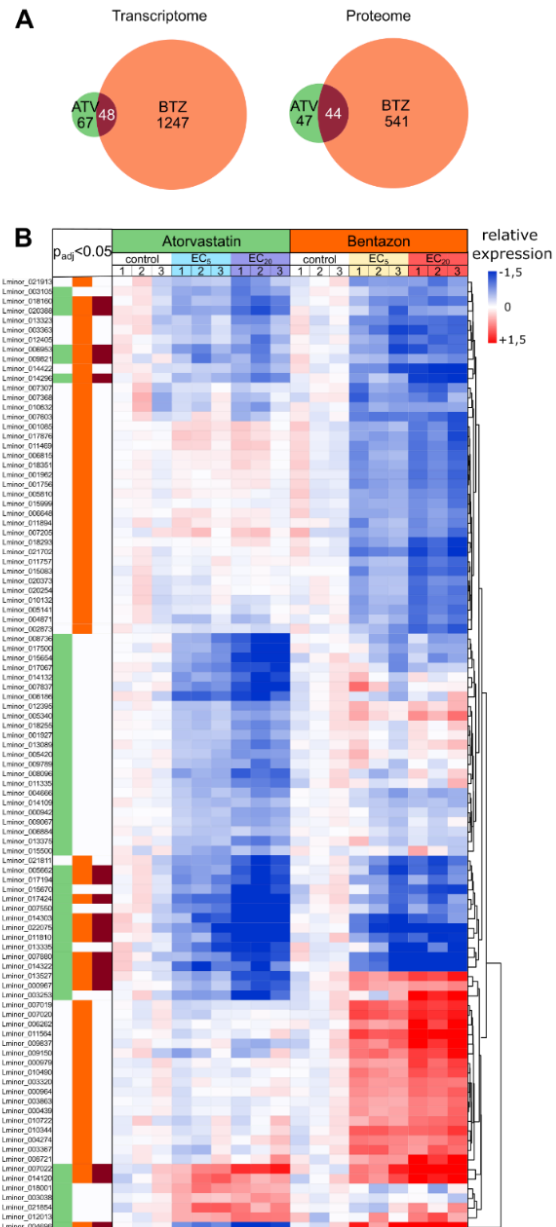
Für beide Testverbindungen beobachteten wir ein konzentrationsabhängiges Verhalten der Genexpressionsänderungen, sowohl in Bezug auf die Anzahl der DEGs als auch auf die Stärke ihrer Regulierung, die durch den  $\log_2\text{-fold change}$  (lfc) ausgedrückt wird (Abbildung 1). Während positive Werte eine Hochregulation bedeuten, handelt es sich bei negativen lfc-Werten um herabregulierte Gene.

Die gemeinsamen DEGs, die durch beide Expositionsbedingungen einer Substanz reguliert wurden, wurden als *Coreset* der Substanz definiert und stellen frühe und konsistent regulierte Gene dar. Die lfc-Werte der *Coresets* wiesen eine positive Korrelation auf (Abbildung 1C und F). Dies bedeutet, dass die DEGs durch beide Expositionen überwiegend in die gleiche Richtung sowie ähnlich stark reguliert wurden, was sie zu einer Quelle geeigneter Biomarker-Kandidaten für die jeweilige Substanz in *L. minor* macht.

Während bisher nur vereinzelte Studien transkriptomische Veränderungen von *L. minor* analysierten [10–12], fehlten vor allem proteomische Daten der Wasserpflanze. Dementsprechend wurden Transkriptom- und Proteomdaten von *L. minor* zuvor noch nie kombiniert betrachtet. Um die Übereinstimmung der Ergebnisse beider Ebenen zu untersuchen, verglichen wir die Expressionsänderungen der *Coreset*-DEGs auf Proteomebene mit denen auf Transkriptomenebene. Dabei zeigte sich, dass die große Mehrheit der DEGs auf beiden Ebenen in die gleiche Richtung reguliert wurde.

Um zu beurteilen, ob die erhaltenen Fingerabdrücke der einzelnen Substanzen als Grundlage für die Substanz-Unterscheidung dienen können, verglichen wir als nächstes die identifizierten *Coresets* von Atorvastatin und Bentazon.

Auf Transkriptomenebene überlappten sich die DEG-Coresets von Atorvastatin und Bentazon bei insgesamt 48 Genen. Auf der Ebene des Proteoms betrug die Schnittmenge der *Coresets* insgesamt 44 Gene (Abbildung 2A). Im Fall des Transkriptoms wiesen die *Coreset*-DEGs, beider Wirkstoffe eine positive Korrelation auf (Pearson-Korrelation = 0,57,  $p \leq 0,0001$ ). Dies könnte auf einem teilweise übereinstimmenden Wirkmechanismus der Substanzen beruhen. Während Atorvastatin bei Menschen und Pflanzen als HMGR-Hemmer wirkt [13], beeinträchtigt das Herbizid Bentazon die Photosynthese [14]. Frühere Studien deuteten jedoch auch darauf hin, dass Bentazon HMGR hemmende Eigenschaften hat [9]. Angesichts dieser potenziell teilweise übereinstimmenden Wirkmechanismen beider Testsubstanzen war es sowohl interessant, Ähnlichkeiten, als auch Unterschiede in ihren Genexpressionsprofilen zu untersuchen. Die Signaturen der beiden Substanzen, die nicht Teil der Schnittmenge waren, verhielten sich substanzspezifisch, d.h. ihre Expression wurde überwiegend nicht durch die jeweils andere Substanz reguliert. Solche Gene könnten potentiell zur Unterscheidung der Substanzen bzw. Wirkmechanismen genutzt werden.



**Abbildung 2:** Vergleich der durch Atorvastatin und Bentazon induzierten Genexpressionssignaturen in *L. minor*. (A) Venn-Diagramme, die die Anzahl der DEGs durch Exposition mit der EC<sub>5</sub>- und EC<sub>20</sub> der beiden Substanzen auf der Transkriptom- (links) und Proteomebene (rechts) zeigen. (B) Heatmap, die die relative Expression der 50 wichtigsten DEGs, basierend auf ihrer mittleren Expression in der Kontrollbedingung, für die Transkriptomenebene zeigt. Eine rote Farbe bedeutet Hochregulierung, eine blaue Farbe Herabregulierung eines Gens im Vergleich zur Kontrolle. Der Farbcode am oberen Rand jeder Spalte gibt die Testbedingung an. Die Spalten zeigen die biologischen Replikate (1-3) pro Bedingung. Die Gene wurden euklidisch geclustert. Der Farbcode auf der linken Seite ordnet die Gene den in (A) definierten DEG-Sets zu.

Auch die in der Heatmap (Abbildung 2B) dargestellten Signaturen ermöglichten eine klare Unterscheidung der molekularen Wirkungen von Atorvastatin und Bentazon, wobei die gemeinsamen Gencluster nur einen geringen Anteil an jeder Signatur ausmachten. Dennoch zeigten die gemeinsamen Signaturen eine ähnliche Regulierung in der Mehrheit der Gene. Von be-



sonderem Interesse für die Auswahl potenzieller diskriminierender Biomarker waren Gene, die durch die beiden Wirkstoffe unterschiedlich reguliert wurden.

## 4.2 Funktionelle Analyse

Um einen Einblick in die funktionellen Prozesse, die von beiden Substanzen beeinträchtigt wurden, zu erhalten, mussten wir das Referenzgenom von *L. minor* zunächst funktionell annotieren. Dazu erstellten wir ein *R package*, das öffentlich auf zenodo zugänglich ist (<https://zenodo.org/record/6045874>). Die Zuordnung von Genfunktionen zu den *L. minor*-Genen beruhte auf Homologien zu gut annotierten verwandten Organismen. Nachdem Daten zur Funktion der Gene erfasst waren, konnte eine Überrepräsentationsanalyse ausgeführt werden. Diese wiederum ermöglichte es, die biologischen Prozesse zu identifizieren, die besonders von der Exposition der Pflanze betroffen waren.

Nach einem tieferen Blick in lipid- und lichtbezogene biologische Prozesse, ergab sich, dass lichtbezogene Prozesse überwiegend durch Bentazon beeinträchtigt wurden, was durch den Wirkmechanismus der Photosynthese-Hemmung erklärbar war. Atorvastatin führte überwiegend zur Beeinträchtigung der lipid-bezogenen biologischen Prozesse, was wiederum den Wirkmechanismus der HMGR-Hemmung widerspiegelte. Zudem konnten auch einige Beeinträchtigungen lipidbezogener Prozesse Bentazon zugeordnet werden, was durch die bereits erwähnte teilweise Übereinstimmung des Wirkmechanismus der HMGR-Hemmung erklärt werden konnte.

## 5 Fazit

Abschließend möchte ich gerne die drei zentralen Fragen der Studie beantworten, die in der Einleitung bereits erwähnt wurden:

1. Erhalten wir überhaupt eine Genantwort nach nur 3 Tagen Exposition?  
→ Ja, wir konnten in beiden Fällen eine deutlich veränderte Genexpression ermitteln.
2. Können wir die molekularen Signaturen, die durch verschiedene Substanzen hervorgerufen werden, unterscheiden?  
→ Ja, wir erhielten, je nach Testsubstanz, spezifische molekulare Fingerabdrücke.
3. Können wir die Signaturen auf bestimmte Wirkmechanismen zurückführen?  
→ Ja, die überrepräsentierten Genfunktionen konnten durch die bereits bekannten Wirkmechanismen erklärt werden.

Letztlich konnten wir einen verkürzten, dreitägigen ökotoxikogenomischen Test an *L. minor* etablieren, der die Identifizierung von Biomarker-Kandidaten für die Wirkungsweise verschiedener Substanzen ermöglicht. Somit konnten wir auf der Grundlage von Genexpressionsprofilen und biologischen Funktionen spezifische Biomarker-Kandidaten für den jeweiligen Wirkmechanismus extrahieren. Darüber hinaus wählten wir Biomarker-Kandidaten aus, deren Expression durch beide

Prüfsubstanzen verändert wurde, jedoch in unterschiedliche Richtungen. Diese könnten die Unterscheidung der Substanzen bzw. Wirkmechanismen ermöglichen. Die Expressionsveränderungen dieser Biomarker-Kandidaten in dem hier entwickelten verkürzten *L. minor*-Test könnte zukünftig mit Hilfe von Schnellanalysen wie RT-qPCR untersucht werden. Dies würde ein zeitsparendes Screening auf den jeweiligen Wirkmechanismus ermöglichen und die Möglichkeiten des siebentägigen OECD-Richtlinientests ergänzen.

Unsere Studie ebnet somit erste Wege in Richtung einer Zukunft, in der OMICs sowie daraus abgeleitete Screening-Methoden frühzeitig zur Überprüfung der Ökotoxizität von Substanzen angewandt werden und ermöglicht somit Einsparungen von Zeit und Kosten in der Substanzentwicklung.

Neben der gezeigten Anwendung von OMICs zur frühen Umweltrisikobewertung, bieten sie auch die Möglichkeit in Re-Evaluierungen schnelle und aussagekräftige Daten zur Ökotoxizität von Substanzen zu generieren. Ein Beispiel für eine solche Anwendung ist meine Doktorarbeit, in der ich OMICs zur Beurteilung der Umweltschädlichkeit von künstlichen Süßstoffen nutze. Hintergrund der Arbeit ist, dass die Ökotoxizität künstlicher Süßstoffe trotz ihrer Persistenz in der aquatischen Umwelt bisher unzureichend untersucht ist.

## 6 Literatur

- [1] Loll, A.; Reinwald, H.; Ayobahan, S. U.; Göckener, B.; Salinas, G.; Schäfers, C.; Schlich, K.; Hamscher, G.; Eilebrecht, S. Short-term test for toxicogenomic analysis of ecotoxic modes of action in *Lemna minor*. *Environmental Science and Technology* **2022**, 56, 11504–11515.
- [2] Reinwald, H.; Alvincz, J.; Salinas, G.; Schäfers, C.; Hollert, H.; Eilebrecht, S. Toxicogenomic profiling after sublethal exposure to nerve- and muscle-targeting insecticides reveals cardiac and neuronal developmental effects in zebrafish embryos. *Chemosphere* **2022**, 291, 132746.
- [3] Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD). Guideline No. 221 for the testing of Chemicals - *Lemna sp.* growth inhibition test, 2006.
- [4] Lennernäs, H. Clinical pharmacokinetics of atorvastatin. *Clinical Pharmacokinetics* **2003**, 42, 1141–1160.
- [5] Franzoni, F.; Quiñones-Galvan, A.; Regoli, F.; Ferrannini, E.; Galetta, F. A comparative study of the in vitro anti-oxidant activity of statins. *International Journal of Cardiology* **2003**, 90, 317–321.
- [6] Istvan, E. S. Bacterial and mammalian HMG-CoA reductases: Related enzymes with distinct architectures. *Current Opinion in Structural Biology* **2001**, 11, 746–751.
- [7] Campos, N.; Arró, M.; Ferrer, A.; Boronat, A. Determination of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase activity in plants. *Methods in Molecular Biology* **2014**, 1153, 21–40.

- [8] Herbicide Resistance Action Committee. HRAC Mode of Action Classification 2020 Poster, 2020. [www.hracglobal.com](http://www.hracglobal.com).
- [9] Grumbach, K. H.; Bach, T. J. The effect of PS II herbicides, amitrol and SAN 6706 on the activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme-A-reductase and the incorporation of [2-<sup>14</sup>C]acetate and [2-<sup>3</sup>H]mevalonate into chloroplast pigments of radish seedlings. *Zeitschrift für Naturforschung - Section C Journal of Biosciences* **1979**, 34, 941–943.
- [10] Wang, W.; Li, R.; Zhu, Q.; Tang, X.; Zhao, Q. Transcriptomic and physiological analysis of common duckweed *Lemna minor* responses to NH<sub>4</sub><sup>+</sup> toxicity. *BMC Plant Biology* **2016**, 16, 1–13.
- [11] Li, R.; Luo, C.; Qiu, J.; Li, Y.; Zhang, H.; Tan, H. Metabolomic and transcriptomic investigation of the mechanism involved in enantioselective toxicity of imazamox in *Lemna minor*. *Journal of Hazardous Materials* **2022**, 425, 127818.
- [12] van Hoeck, A.; Horemans, N.; Monsieurs, P.; Cao, H. X.; Vandenhove, H.; Blust, R. The first draft genome of the aquatic model plant *Lemna minor* opens the route for future stress physiology research and biotechnological applications. *Biotechnology for Biofuels* **2015**, 8, 1–13.
- [13] Brain, R. A.; Solomon, K. R. A protocol for conducting 7-day daily renewal tests with *Lemna gibba*. *Nature Protocols* **2007**, 2, 979–987.
- [14] Czékus, Z.; Farkas, M.; Bakacsy, L.; Ördög, A.; Gallé, Á.; Poór, P. Time-dependent effects of bentazon application on the key antioxidant enzymes of soybean and common ragweed. *Sustainability (Switzerland)* **2020**, 12, 1–20.

## Korrespondenzadresse

Alexandra Loll  
Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und angewandte Ökologie IME  
Auf dem Aberg 1  
D – 57392 Schmallenberg  
Email: [alexandra.loll@ime.fraunhofer.de](mailto:alexandra.loll@ime.fraunhofer.de)