

Auteursrechterlijke overeenkomst

Opdat de Universiteit Hasselt uw eindverhandeling wereldwijd kan reproduceren, vertalen en distribueren is uw akkoord voor deze overeenkomst noodzakelijk. Gelieve de tijd te nemen om deze overeenkomst door te nemen, de gevraagde informatie in te vullen (en de overeenkomst te ondertekenen en af te geven).

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling met

Titel: Moleculaire mechanismen van zware metaalvervuiling in Arabidopsis thaliana - Spelen lipoxygenasen een rol?
Richting: 2de masterjaar in de biomedische wetenschappen - klinische moleculaire wetenschappen
Jaar: 2009

in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

Niet tegenstaand deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt behoud ik als auteur het recht om de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij te reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

Ik bevestig dat de eindverhandeling mijn origineel werk is, en dat ik het recht heb om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. Ik verklaar tevens dat de eindverhandeling, naar mijn weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

Ik verklaar tevens dat ik voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen heb verkregen zodat ik deze ook aan de Universiteit Hasselt kan overdragen en dat dit duidelijk in de tekst en inhoud van de eindverhandeling werd genotificeerd.

Universiteit Hasselt zal mij als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze overeenkomst.

Ik ga akkoord,

KEUNEN, Els

Datum: 14.12.2009

***Moleculaire mechanismen van zware metaalvervuiling
in Arabidopsis thaliana
Spelen lipoxygenasen een rol?***

Els Keunen

promotor :
Prof. dr. Ann CUYPERS

Eindverhandeling voorgedragen tot het bekomen van de graad
master in de biomedische wetenschappen klinische moleculaire
wetenschappen



Inhoudsopgave

Lijst met Figuren en Tabellen	
Lijst met Afkortingen	
Dankwoord	
Samenvatting	
1 Inleiding	1
1.1 Cadmium en koper: gevolgen voor mensen	1
1.2 Cadmium en koper: gevolgen voor planten	2
1.2.1 Metaalopname	2
1.2.2 Morfologische en fysiologische effecten	2
1.2.3 Cellulaire effecten	2
1.3 Oxidatieve stress	3
1.4 Lipoxygenasen	5
1.4.1 Lipoxygenasen: reactie en subfamilies	5
1.4.2 Intracellulaire lokalisatie en functies van lipoxygenasen	5
1.5 De oxylipine pathway in <i>Arabidopsis thaliana</i>	6
1.5.1 De biosynthese van oxylipines	6
1.5.2 Jasmonaten: biosynthese en functies	6
1.6 De rol van lipoxygenasen in signaaltransductie bij cadmium- en koperstress	8
1.7 Objectieven van het onderzoek	8
1.7.1 Algemeen belang van het onderzoek	8
1.7.2 <i>Arabidopsis thaliana</i> als modelorganisme	8
1.7.3 Lipoxygenase knockout <i>Arabidopsis thaliana</i> planten	9
1.7.4 Doelstellingen en fasen van het onderzoek	9
2 Materiaal en Methoden	10
2.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> plantengroei en behandeling met cadmium of koper	10
2.1.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> hydrocultuur	10
2.1.2 Verticale agarplaten en analyse van de wortelgroei	10
2.1.3 Ronde agarplaten en analyse van het bladoppervlak	11
2.2 Metaalbepaling	12
2.3 Bepaling van de waterstofperoxideconcentratie	12
2.4 Analyse van lipidenperoxidatie	12
2.5 Genexpressie	12
2.6 Hiërarchische clustering van de genexpressie data	14
2.7 Statistische analyse	14
3 Resultaten en Discussie	16
3.1 Cadmiumgeïnduceerde cellulaire effecten op korte termijn.....	16
3.1.1 Het cadmiumgehalte in wildtype versus <i>lox1</i> mutante planten	16
3.1.2 Cadmium, de cellulaire redoxstatus en geïnduceerde signaaltransductiepathways	17
3.1.3 Wildtype en <i>lox1</i> -mutant: geobserveerde verschillen onder controleomstandigheden	22
3.1.4 Wildtype en <i>lox1</i> -mutant: Cd-geïnduceerde responsen met betrekking tot de cellulaire redoxstatus en signaaltransductie	24

3.2	Metaalgevoeligheid van wildtype versus <i>lox1</i> mutante planten	27
3.2.1	Zware metalen inhiberen de primaire wortelgroei in wildtype en <i>lox1</i> mutante planten	27
3.2.2	Zware metalen beïnvloeden het bladoppervlak van wildtype en <i>lox1</i> mutante planten	29
3.2.3	Integratie van de effecten van Cd en Cu op de wortel- en bladgroei van wildtype versus <i>lox1</i> mutante planten	30
3.3	Metaalspecifieke lange-termijn effecten op de antioxidatieve verdediging van wildtype versus <i>lox1</i> mutante planten	31
3.3.1	Speelt LOX1 op lange termijn nog steeds een rol?	32
3.3.2	De antioxidatieve verdediging: transcriptionele inhibitie door Cd in de wortels	33
3.3.3	Metaalspecifieke responsen van de antioxidatieve verdediging in de blaadjes	34
3.3.4	Integratie van metaalspecifieke responsen op lange termijn	34
4	Conclusie en Synthese	37
	Referenties	39

Lijst met Figuren en Tabellen

A. Figuren

Inleiding

- Figuur 1.1:** Cellulaire lokalisatie van de enzymatische ROS-scavenging pathways in de plantencel 4
- Figuur 1.2:** De LOX-gekatalyseerde reactie en positionele specificiteit 5
- Figuur 1.3:** De oxylipine pathway in planten 7
- Figuur 1.4:** Intracellulaire lokalisatie van enzymen en metabolieten die deel uitmaken van de JA-biosynthese 7

Resultaten en Discussie

- Figuur 3.1:** De Cd-concentraties in de wortels en blaadjes na 24 uur blootstelling 16
- Figuur 3.2:** De H₂O₂-concentraties in de wortels en blaadjes na 24 uur blootstelling aan Cd 17
- Figuur 3.3:** Bepaling van lipidenperoxidatie op basis van de concentratie TBA-reactieve metabolieten in de wortels en blaadjes na 24 uur blootstelling aan Cd 18
- Figuur 3.4:** De groei van de primaire wortel tijdens één week blootstelling aan Cd 28
- Figuur 3.5:** De groei van de primaire wortel tijdens één week blootstelling aan Cu 28
- Figuur 3.6:** Visuele voorstelling van het bladoppervlak na twee weken blootstelling aan Cd of Cu 29
- Figuur 3.7:** Het effect van Cd en Cu op het bladoppervlak 30

B. Tabellen

Materiaal en Methoden

- Tabel 2.1:** Samenstelling van de gebruikte groeimedia voor het kweken van *Arabidopsis thaliana* planten op verticale en ronde agarplaten 11
- Tabel 2.2:** De sequenties van de forward en reverse primers gebruikt om de expressie van de vermelde genen via real-time PCR (SYBR green chemie) te bepalen 15

Resultaten en Discussie

- Tabel 3.1:** Genexpressie in de wortels na 24 uur blootstelling aan Cd 19
- Tabel 3.2:** Genexpressie in de blaadjes na 24 uur blootstelling aan Cd 21
- Tabel 3.3:** Genexpressie van *LOX1* en antioxidatieve enzymen in de wortels na één week blootstelling aan Cd of Cu 32
- Tabel 3.4:** Genexpressie van *LOX1* en antioxidatieve enzymen in de blaadjes na één week blootstelling aan Cd of Cu 33

Lijst met Afkortingen

ACX	Acyl-CoA-oxidase
ACX1A	Acyl-CoA-oxidase 1A
AOC	Alleenoxide-cyclase
AOS	Alleenoxide-synthase
APX	Ascorbaatperoxidase
Asc	Ascorbaat
CAT	Catalase
Cd	Cadmium
CDPK1	Calcium-afhankelijk proteïne kinase 1
Col-0	Wildtype <i>Arabidopsis thaliana</i> planten ecotype Columbia
CSD	Koper/zink-superoxidedismutase
Cu	Koper
DES	Divinyl-ether-synthase
FAD	Vetzuurdesaturase
Fe	Ijzer
FSD	Ijzer-superoxidedismutase
GPX	Glutathionperoxidase
GSH	Gereduceerd glutathion
HPL	Hydroperoxide-lyase
HPOD	Hydroperoxy-octadecadiëenzuur
HPOT	Hydroperoxy-octadecatriëenzuur
H ₂ O ₂	Waterstofperoxide
JA	Jasmonaat
JMT	Jasmonaat-carboxylmethyltransferase
KAT	L-3-ketoacyl-CoA-thiolase
LOX	Lipoxygenase
LOX1	Lipoxygenase isovorm 1
<i>lox1</i>	<i>lox1</i> mutante <i>Arabidopsis thaliana</i> planten ecotype Columbia
MAPK/MPK	Mitogen-activated protein kinase
MFP	Multifunctioneel eiwit
MKK	Mitogen-activated protein kinase kinase
O ₂	Moleculaire zuurstof
O ₂ ^{•-}	Superoxideradicaal
¹ O ₂	Singlet zuurstof
[•] OH	Hydroxylradicaal
OPC	3-oxo-2-(2'(9Z)-pentenyl)-cyclopentaaan-1 octaanzuur
12-oxo-PDA/OPDA	12-oxo-fytodienzuur
OPR	OPDA-reductase
OXI1	Oxidative stress inducible kinase 1
PCR	Polymerase kettingreactie
POX	Peroxygenase
PrxR	Peroxiredoxine
PUFAs	Polygonverzadigde vetzuren
RBOH	Respiratory Burst Oxidase Homolog
ROS	Reactieve zuurstofvormen
SOD	Superoxidedismutase
TBA	Thiobarbituurzuur
TCA	Trichloorazijnzuur
Trx	Thioredoxine
WRKY25	DNA-bindingseiwit (transcriptiefactor)
ZAT12	H ₂ O ₂ -responsief zinc finger proteïne
Zn	Zink

Dankwoord

Afstuderen, het is en blijft een speciaal moment in je leven. Een moment dat je volgens mij niet kan bereiken zonder de steun van vele mensen. Vooreerst is er natuurlijk mijn promotor, Prof. dr. Ann Cuypers. Ann, bedankt voor uw eindeloze enthousiasme, het veelvuldig nalezen van mijn thesis, alle babbels en momenten van steun, net wanneer ik het nodig had! Mede dankzij u was mijn stageperiode een schot in de roos! Ik kijk alvast uit naar de komende vier jaar! Ook Prof. dr. Veerle Somers, de tweede beoordelaar van mijn thesis, wil ik graag bedanken voor haar tijd om samen mijn vorderingen in het lab te bespreken. Bedankt voor uw tips en motiverende blijk van appreciatie voor mijn werk.

Kelly en Tony, bedankt voor jullie deskundige hulp, tips, jullie advies en enthousiasme in het lab. Carine en Ann, bedankt voor alles wat jullie gedaan hebben (teveel om op te noemen...). Ook een grote dankjewel aan alle mensen in de verschillende onderzoeksgroepen van het CMK, die samen zorgen voor een supersfeer in en rond het labo.

Mijn mede-stagegenootjes, Marijke en Heidi, zonder jullie hadden de afgelopen zeven maanden er heel wat minder kleurrijk uitgezien. Bedankt meisjes!

Tenslotte ook een grote dankjewel aan mijn ouders, die het mogelijk maakten voor mij om deze studies te kunnen volgen. Tot het einde toe waren en zijn jullie nog steeds een grote steun. Ook Roel en de rest van mijn familie wil ik graag bedanken voor hun interesse en steun.

Els

26 juni 2009.

Samenvatting

Zware metalen zoals cadmium (Cd) en koper (Cu) zijn in verhoogde mate aanwezig in verschillende Belgische regio's, met nefaste gevolgen voor het hele ecosysteem. Blootstelling aan Cd of Cu veroorzaakt in planten niet alleen morfologische effecten, zoals een verminderde wortelgroei; ook op cellulair niveau treden toxiciteitsverschijnselen op. Eén van deze effecten is oxidatieve stress; de cellulaire redoxbalans wordt verstoord in het voordeel van reactieve zuurstofvormen (ROS) wat mogelijk schade maar ook signalling induceert. Het ophelderen van de moleculaire mechanismen hiervoor verantwoordelijk is van groot belang voor een beter begrip van metaalvervuiling en de gevolgen voor planten. Eerdere onderzoeksresultaten suggereren dat lipoxygenasen van belang zijn voor metaalgeïnduceerde signaaltransductie. De transcriptie en activiteit van deze oxygenerende enzymen neemt immers sterk toe tengevolge van metaalstress, vooral opvallend bij isovorm 1 (LOX1). Om de potentiële rol van dit enzym tijdens blootstelling aan Cd of Cu te bestuderen, werden in dit project *Arabidopsis thaliana* planten met een verstoorde *LOX1*-transcriptie gebruikt. Als gevolg van een homozygote T-DNA insertie in het gen coderend voor lipoxygenase 1 produceren deze **lox1-mutanten** geen functionele LOX1-enzymen.

In een eerste onderzoeksfase werden zowel *lox1* mutante als wildtype (ecotype Columbia) planten drie weken opgekweekt in hydrocultuur en vervolgens 24 uur behandeld met Cd (5 of 10 μM). Een globale screening van oxidatieve stressgerelateerde responsen toont aan dat beide genotypes verschillen qua **niveau van waterstofperoxide en lipidenperoxidatie**, twee parameters die wijzen op oxidatieve stress. Via real-time PCR (SYBR Green chemie) werd de transcriptie van verschillende pro- en antioxidatieve enzymen, evenals van enzymen betrokken bij signaaltransductie, in (on)behandelde wildtype en *lox1* mutante planten bepaald. Opvallend is de over het algemeen verlaagde transcriptie van de gemeten enzymen in de wortels van onbehandelde *lox1*-mutanten ten opzichte van het wildtype, een patroon dat zich in de blaadjes omkeert. Dit betekent mogelijks dat LOX1 meer van belang is voor signalling in de wortel zelf en eventueel ook intercellulair van wortel naar blad. Echter, wanneer de planten blootgesteld worden aan Cd, treden over de grote lijn geen verschillen meer op. Het feit dat beide genotypes tijdens metaalstress **transcriptioneel gelijkaardige responsen** vertonen, is mogelijks het gevolg van compensatie door andere lipoxygenasen in een stresssituatie. Dit wijst er alleszins op dat LOX1 niet alleen verantwoordelijk is voor signaaltransductie tijdens metaalstress.

In een tweede onderzoeksfase werd de metaalgevoeligheid van beide genotypes bepaald door ze te kweken op agarplaten en vervolgens gedurende een langere periode (één week) bloot te stellen aan een reeks Cd- of Cu-concentraties. De groei van de primaire wortel van *lox1*-mutanten wordt door Cd minder sterk aangetast in vergelijking met het wildtype, terwijl Cu voor beide genotypes een sterke vergelijkbare reductie van de primaire wortelgroei induceert. De **verminderde Cd-gevoeligheid** van de wortels van de mutant suggereert dat LOX1 toch een belangrijke rol speelt tijdens metaalstress, wat weliswaar via de transcriptie van de gemeten enzymen niet tot uiting komt. Immers, gefocust op de genexpressie van antioxidatieve enzymen, vertonen ook hier wildtype en *lox1* mutante planten globaal gelijkaardige responsen. In de toekomst moet zeker getracht worden om te werken met combinatiemutanten, om op die manier meerdere lipoxygenasen functioneel te inhiberen. Het gebruik van deze planten kan het inzicht betreffende de rol van lipoxygenasen tijdens metaalstress vergroten. Eveneens zal een analyse van beide genotypes op andere biologische niveaus (eiwitexpressie en/of -activiteit) bijdragen tot een verbeterde kennis van metaalgeïnduceerde signalling en de rol van lipoxygenasen hierin.

1 Inleiding

De exponentiële uitbreiding van industrie en landbouw tijdens de late 19^{de} en vroege 20^{ste} eeuw heeft geleid tot een aanzienlijke pollutie van ons milieu met zware metalen, zoals cadmium en koper. Deze metalen zijn in verhoogde mate aanwezig in de bodem, de lucht, het grondwater en verschillende sedimenten in diverse Belgische regio's, waaronder de Noorderkempen. Zelfs lage metaalconcentraties kunnen ernstige problemen veroorzaken bij verschillende organismen [1,2].

Zware metalen hebben een dichtheid van meer dan 5 g/cm³ en kunnen essentieel of niet-essentieel zijn. **Cadmium** (Cd), met een dichtheid van 8,64 g/cm³, is niet-essentieel en niet-redoxactief. In de natuur komt Cd voornamelijk voor als tweewaardig kation. Het lost goed op in het bodemwater, waardoor het reeds bij lage concentraties biobeschikbaar is en schadelijke effecten kan veroorzaken [1-4].

Koper (Cu) heeft een dichtheid van 8,96 g/cm³ en is in tegenstelling tot Cd wel essentieel voor mens, dier, plant en micro-organismen. Het is een redoxactief transitie-metaal dat in fysiologische omstandigheden voorkomt als één- of tweewaardig kation. Als essentieel micronutriënt is Cu vereist voor een normale groei en ontwikkeling. Het maakt structureel deel uit van verschillende regulerende eiwitten en is eveneens belangrijk als cofactor voor bepaalde enzymen, zoals koper/zink superoxidedismutasen (Cu/ZnSOD). Toch kan een verhoogde blootstelling aan Cu schadelijke effecten veroorzaken omwille van de redoxactieve eigenschappen van dit metaal [2,5].

1.1 Cadmium en koper: gevolgen voor mensen

Humane **Cd-blootstelling** is het gevolg van de Cd-verwerkende industrie, opwaaiend stof, roken en het consumeren van gecontamineerd voedsel en drinkwater [4,6-7]. Recent werd aangetoond dat huisstof mogelijk een belangrijke vorm van chronische metaalblootstelling vormt in gebieden met gecontamineerde gronden [7]. Cadmium wordt voornamelijk via **ingestie of inhalatie** opgenomen. Via de luchtwegen kan echter tot tien keer meer Cd worden geabsorbeerd in vergelijking met absorptie door het gastrointestinaal kanaal. Vervolgens komt Cd terecht in de bloedbaan en wordt het getransporteerd naar onder andere de lever, nieren en pancreas. Het metaal kan bijgevolg schadelijke gevolgen hebben voor diverse organen [6,8-11]. Eén van de belangrijkste doelorganen van Cd-toxiciteit zijn de **nieren**. Zowel de glomeruli als niertubuli kunnen beschadigd worden door een te hoge blootstelling aan Cd. Dit kan leiden tot proteïnurie, glucosurie, aminoacidurie, polyurie, hyperfosfaturie en -calciurie. Een verhoogde calciumexcretie kan aanleiding geven tot de vorming van nierstenen en osteoporose. Dysfunctie van tubulaire cellen kan de activering van vitamine D in de nieren verstoren. Dit beïnvloedt de absorptie van calcium in de darm, wat leidt tot een verhinderde botmineralisatie [8,9].

Cadmium kan ook directe effecten hebben ter hoogte van het **bot**. Dierstudies hebben aangetoond dat het metaal de vorming en activiteit van osteoclasten kan stimuleren, waardoor de collageenmatrix in de botten wordt afgebroken. Hierdoor verhoogt de kans op botfracturen, vooral in de risicogroep van postmenopauzale vrouwen [9].

In 1993 classificeerde 'The International Agency for Research on Cancer' (IARC) Cd als **humaan carcinogeen**, categorie I op basis van correlaties tussen Cd-blootstelling en onder andere long- en nierkanker. Järup *et al.* rapporteerden in 1998 echter dat het bewijs voor deze classificatie beperkt is, waardoor het volgens hen aangeraden is Cd te beschouwen als vermoedelijk humaan carcinogeen, groep 2A [8]. Recent werd opnieuw een associatie tussen Cd-blootstelling en longkanker aangetoond [10].

Blootstelling aan **verhoogde Cu-concentraties** kan de gezondheid schaden. Een overdosis Cu kan aanwezig zijn in verschillende soorten **voedsel** (zoals vlees en vis), drinkwater en in de lucht. Acute Cu-vergiftiging kan veroorzaakt worden door overmatige inname van koperzouten via voeding of drinkwater. Dit gaat gepaard met **symptomen** zoals misselijkheid, braken, diarree, maagbloedingen, een verhoogde hartslag, hypotensie tot zelfs convulsies en verlamming. Koper irriteert de **luchtwegen**, wat bij mensen die beroepshalve blootgesteld worden aan dit metaal, aanleiding kan geven tot hoesten, niezen, een loopneus, thoraxpijn en longfibrose. Herhaaldelijke blootstelling aan te hoge Cu-concentraties kan eveneens leiden tot **lever- en nierschade**, gekenmerkt door necrose en fibrose [12,13].

1.2 Cadmium en koper: gevolgen voor planten

Cadmium is een niet-essentieel element dat de groei en ontwikkeling van planten negatief beïnvloedt [1]. Koper is een essentieel micronutriënt, dat noodzakelijk is voor een normale plantengroei. Een te hoge Cu-concentratie echter verstoort belangrijke cellulaire processen [5].

1.2.1 Metaalopname

De opname van metalen door planten is sterk afhankelijk van de **biobeschikbaarheid en metaalconcentratie in de bodem**. Beide eigenschappen kunnen beïnvloed worden door de aanwezigheid van organische stoffen, de kationuitwisselingscapaciteit, pH, redoxpotentiaal, temperatuur en concentraties van andere elementen [1]. Aangezien Cd een niet-essentieel element is, wordt aangenomen dat planten niet beschikken over specifieke opnameroutes voor dit metaal. Planten nemen Cd wel op via transportsystemen voorzien voor andere elementen zoals calcium, ijzer en zink [14,15]. Koper echter is essentieel voor planten en wordt opgenomen via specifieke transportmechanismen, zoals transporters behorend tot de geconserveerde 'copper transporter' (CTR) familie [5,14,16].

1.2.2 Morfologische en fysiologische effecten

Zware metalen zijn belangrijke abiotische stressfactoren voor planten, die op een sterke en snelle manier leiden tot een **gereduceerde groei**. Overmatige blootstelling aan Cd of Cu veroorzaakt immers een verminderde celwandelasticiteit. Ook belangrijke fysiologische processen – zoals de **fotosynthese** – worden verstoord, wat de plantengroei eveneens negatief beïnvloedt. Bijkomend inhiberen Cd en Cu de biosynthese van chlorofyl, waardoor de blaadjes geel worden (chlorose). Cadmium verlaagt de activiteit van enzymen betrokken bij de CO₂-fixatie, terwijl een verhoogde Cu-concentratie voornamelijk de fotosynthetische elektronentransportketen zal verstoren [4,5,17].

Ook andere fysiologische processen worden door verhoogde metaalconcentraties beïnvloed. Zo verstoort Cd de opening van de huidmondjes, met een verstoorde **transpiratie** tot gevolg [1,18]. Het metaal interageert ook met de waterbalans [1,4]. Zware metalen verstoren eveneens de oxidatieve fosforylering in de mitochondriën, waardoor het **respiratieproces** niet meer normaal verloopt [1,5]. Tenslotte wordt de **nutriëntenbalans** aangetast door zowel Cd als Cu. Deze metalen interfereren immers met de opname, het transport en gebruik van elementen (calcium, magnesium, fosfaat, kalium en nitraten) en water. Dit is onder andere het gevolg van interacties tussen zware metalen en de structuur van het plasmamembraan, waardoor de permeabiliteit ervan vermindert [4,5,19].

1.2.3 Cellulaire effecten

Planten beschikken over complexe mechanismen om te kunnen omgaan met verhoogde hoeveelheden aan zware metalen. Extracellulaire mycorrhiza's, de celwand en wortelsecreties proberen in eerste instantie de accumulatie van Cd of Cu in het cytosol te voorkomen. Ook het plasmamembraan kan

hiertoe bijdragen door de influx van metalen te beperken en de efflux te verhogen. Indien in het cytosol toch een verhoogde vrije metaalconcentratie optreedt, zullen enerzijds bepaalde liganden – zoals aminozuren, organische zuren, fytochelatoren en metallothioneïnen – de metalen binden. Anderzijds beschikt de cel ook over mechanismen om eventueel beschadigde eiwitten te herstellen en het plasmamembraan te beschermen. Tenslotte kan de vrije metaalconcentratie beperkt worden door vacuolaire compartimentalisatie [20].

Indien deze eerste lijn van verdediging niet afdoende is – en de vrije metaalconcentratie in het cytosol toch toeneemt – kunnen schadelijke effecten optreden, zoals oxidatieve stress [4,20]. Deze effecten zijn het gevolg van verschillende interacties op cellulair niveau. Zo kunnen metalen binden aan sulfhydrylgroepen aanwezig in **proteïnen**, waardoor de activiteit of structuur wordt verstoord. Ook kunnen ze een essentieel element in eiwitten verplaatsen, wat de eiwitfunctie negatief beïnvloedt. **Enzymen** zijn één van de belangrijkste targets van zware metaalionen, die voornamelijk leiden tot het maskeren van katalytisch actieve groepen en eiwitdenaturatie [4,19-21].

Zowel Cd als Cu zijn beschreven als genotoxisch. Zo kunnen beide metalen binden aan de celkern of oxidatieve stress induceren (zie 1.3). Dit veroorzaakt modificatie van DNA-basen, inter- en intramoleculaire crosslinking van DNA en proteïnen, mutaties en DNA-breuken [2,4,13].

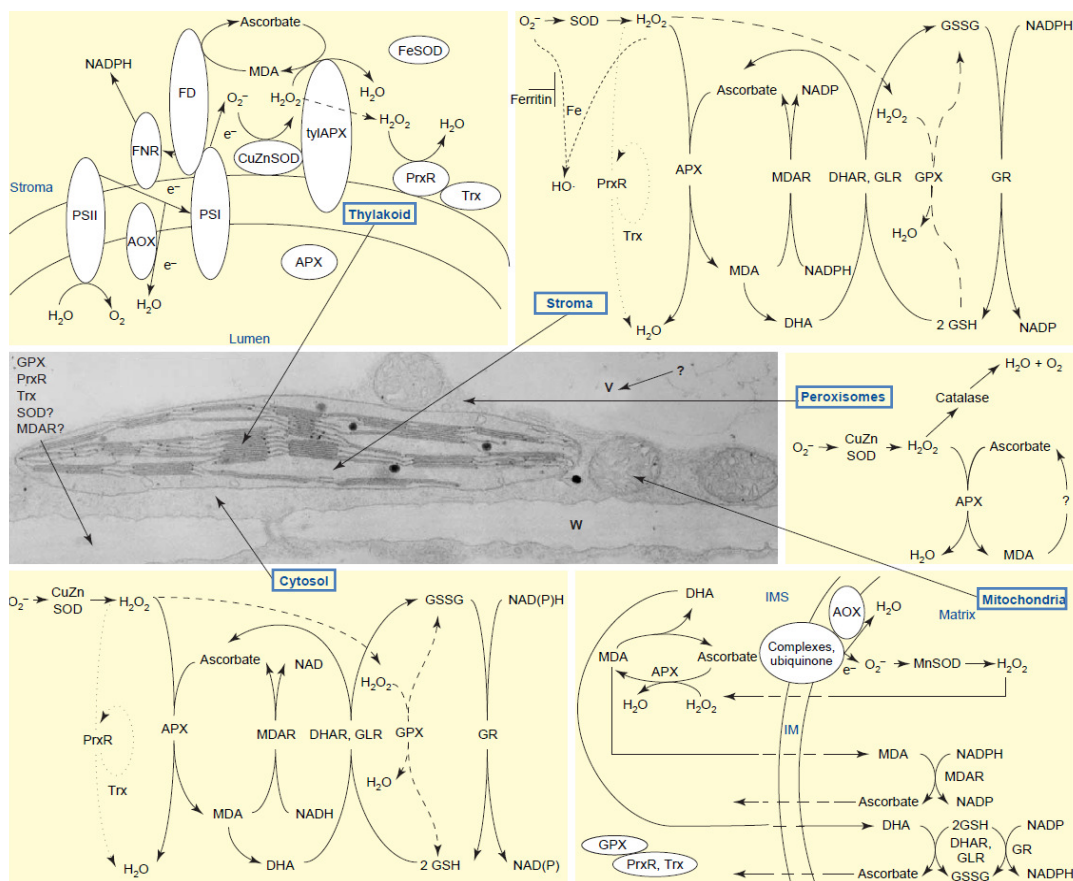
Ook de functie van het **plasmamembraan** kan aangetast worden door zware metalen. Dit is het gevolg van verschillende mechanismen zoals de oxidatie en crosslinking van vetzuurstaarten. Ook kunnen belangrijke membraan-eiwitten zoals protonpompen geïnhibeed worden. Tenslotte kan de samenstelling en vloeibaarheid van het membraan veranderen onder invloed van Cd en Cu [20].

1.3 Oxidatieve stress

Eén van de belangrijkste effecten van Cd en Cu op cellulair niveau is **oxidatieve stress** [4]. Hierbij wordt de balans tussen de hoeveelheid pro-oxidanten zoals reactieve zuurstofvormen (ROS) en beschikbare antioxidanten verstoord in het voordeel van ROS, wat cellulaire schade kan veroorzaken.

Reactieve zuurstofvormen zijn gedeeltelijk gereduceerde vormen van atmosferische zuurstof ($^3\text{O}_2$). Tengevolge van de excitatie van O_2 wordt singlet zuurstof ($^1\text{O}_2$) gevormd. Het overdragen van één, twee of drie elektronen op O_2 leidt tot de vorming van respectievelijk superoxideradicalen ($\text{O}_2^{\circ-}$), waterstofperoxide (H_2O_2) en de zeer schadelijke hydroxylradicalen ($^{\circ}\text{OH}$). Deze radicalen komen in normale condities voor in aerobe organismen omdat ze ontstaan tijdens metabole processen, zoals de fotosynthese en respiratie in chloroplasten en mitochondriën. Zowel eiwitten, lipiden en nucleïnezuren kunnen geoxideerd worden wanneer ROS in verhoogde mate accumuleren, wat vaak leidt tot veranderingen in celstructuur en mutagenese. Hoewel ROS in hoge concentraties schadelijk zijn voor organismen, functioneren sommige ROS als cellulaire signaalmoleculen [4,22].

Om de accumulatie van deze potentieel toxische componenten in de cel onder controle te houden, beschikken planten over een uitgebreid en efficiënt antioxidatief verdedigingssysteem. Dit systeem bestaat uit enzymen die $\text{O}_2^{\circ-}$ en H_2O_2 neutraliseren, zoals superoxidedismutasen (SOD), catalasen (CAT), ascorbaatperoxidasen (APX), glutathionperoxidasen (GPX), peroxiredoxines (PrxR) en thioredoxines (Trx). Daarnaast wordt het systeem aangevuld met metabolieten zoals ascorbaat (Asc) en glutathion (GSH). Een overzicht van de componenten, de gekatalyseerde reacties en de lokalisatie van het antioxidatief verdedigingssysteem wordt weergegeven in Fig. 1.1. In bijna elk cellulair compartiment komen specifieke ROS-scavenging enzymen en metabolieten voor, die zorgen voor het behoud van de cellulaire redoxbalans binnen bepaalde grenzen [23].



Figuur 1.1: Cellulaire lokalisatie van de enzymatische ROS-scavenging pathways in de plantencel. Het microscopisch beeld (midden links) geeft de relatieve volumes van de cellulaire compartimenten en hun fysieke positie ten opzichte van elkaar aan. Membraangebonden enzymen worden in het wit afgebeeld. Afkortingen: AOX, alternatief oxidase; APX, ascorbaatperoxidase; CAT, catalase; DHA, dehydroascorbaat; DHAR, DHA-reductase; FD, ferredoxine; FNR, ferredoxine-NADPH-reductase; GLR, glutaredoxine; GPX, glutathionperoxidase; GR, glutathionreductase; GSH, gereduceerd glutathion; GSSG, geoxideerd glutathion; IM, binnenste membraan; IMS, binnenste membraanruimte; MDA, monodehydroascorbaat; MDAR, MDA-reductase; PrxR, peroxiredoxine; PSI, fotosysteem I; PSII, fotosysteem II; SOD, superoxidisedismutase; Trx, thioredoxine; tyl, thylakoïd; V, vacuole, W, celwand (Aangepast van Mittler *et al.*, 2004 [23]).

Blootstelling aan verhoogde Cd- of Cu-concentraties induceert oxidatieve stress, maar dit gebeurt voor beide metalen op een andere manier. Metalen zonder redoxactieve eigenschappen, zoals Cd, kunnen de redoxbalans enkel indirect verstoren. Blootstelling aan verhoogde Cd-concentraties vermindert de beschikbare hoeveelheid GSH. Ook kan Cd de fotosynthetische elektrontransportketen verstoren, waardoor 1O_2 en $O_2^{\cdot-}$ ontstaan. Het metaal kan verschillende antioxidatieve enzymen inhiberen, zoals SOD en CAT. Ook worden essentiële elementen uit eiwitten vrijgesteld, die potentieel redoxactief zijn en hierdoor de cellulaire redoxbalans verstoren. Cadmium induceert eveneens lipidenperoxidatie, mogelijk het gevolg van een verhoogde lipoxygenase-activiteit. Tenslotte veroorzaakt Cd-stress de inductie van NADPH-oxidasen. Deze enzymen transfereren elektronen van cytosolair NADPH naar extracellulair O_2 , wat leidt tot de vorming van $O_2^{\cdot-}$ en als gevolg hiervan ook H_2O_2 [4,24-26].

Aangezien Cu een redoxactief transitiemetaal is, kan het aanleiding geven tot de vorming van $^{\circ}OH$ uit $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 via de niet-enzymatische Haber-Weiss cyclus. Dit leidt tot veranderingen in de activiteit en het niveau van verschillende antioxidatieve componenten, zoals APX en SOD. De antioxidatieve respons treedt op in zowel blad als wortel [4,5]. De vorming van toxische $^{\circ}OH$ -radicalen kan in celmembranen aanleiding geven tot lipidenperoxidatie, een proces waarbij $^{\circ}OH$ interageert met polyonverzadigde vetzuren (PUFAs) zoals linol- en linoleenzuur. Ook de inductie van lipoxygenasen in aanwezigheid van Cu kan leiden tot een verhoogde lipidenperoxidatie [24].

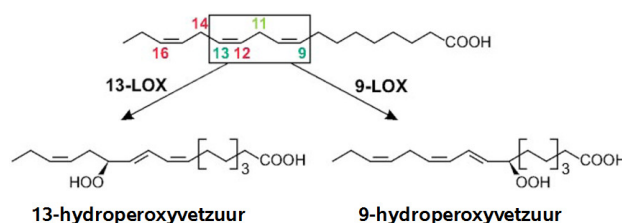
Ook al is er veel onderzoek verricht naar de cellulaire responsen geïnduceerd door zware metalen, toch is de informatie omtrent de regulerende signalisatiepathways eerder beperkt. Een groep van enzymen die mogelijk een belangrijke rol spelen in signaaltransductie geïnduceerd door Cd- en Cu-stress, zijn **lipoxygenasen**. Zo tonen preliminaire resultaten van onderzoek in het labo Milieubiologie van de Universiteit Hasselt aan dat de genexpressie van verschillende lipoxygenasen in het modelorganisme *Arabidopsis thaliana* toeneemt na 24 uur behandeling met Cd (5 en 10 μM) of Cu (2 en 5 μM) [25,26].

1.4 Lipoxygenasen

Lipoxygenase-activiteit komt in alle biologische systemen voor, zowel tijdens de ontwikkeling als tijdens omgevingsgeruleerde processen. De producten van deze reactie zijn polyonverzadigde hydroperoxyvetzuren en afgeleide metabolieten die oxylipines worden genoemd. De initiële vorming van hydroperoxyvetzuren kan enerzijds het gevolg zijn van chemische oxidatie; anderzijds kunnen ze ook gevormd worden door lipoxygenasen [27,28].

1.4.1 Lipoxygenasen: reactie en subfamilies

Lipoxygenasen (linoleaat:zuurstof oxidoreductasen; LOXen; EC 1.13.11.12) zijn non-heem ijzerbevattende vetzuurdioxygenasen die wijdverspreid voorkomen in zowel planten als dieren. Onder fysiologische omstandigheden katalyseren deze enzymen de additie van moleculaire zuurstof (dioxygenatie) aan PUFAs met een (1Z,4Z)-pentadien systeem. Hierdoor ontstaan onverzadigde hydroperoxyvetzuren, die aanleiding geven tot de vorming van oxylipines. In planten zijn linolzuur (18:2) en α -linoleenzuur (18:3) de meest voorkomende substraten voor LOX-activiteit. Beide vetzuren kunnen ter hoogte van koolstofatoom 9 of 13 geoxygeneerd worden door LOX, wat aanleiding geeft tot twee groepen van componenten, de (9S)-hydroperoxy- en (13S)-hydroperoxyvetzuren (Fig. 1.2). Ook al zijn vrije vetzuren de substraten bij voorkeur, toch kunnen LOXen ook membraanlipiden oxygeneren [27-29].



Figuur 1.2: De LOX-gekatalyseerde reactie en positionele specificiteit (Aangepast van Feussner en Wasternack, 2002 [27]).

In het modelorganisme *Arabidopsis thaliana* komen zes verschillende LOX-isovormen voor. Twee ervan (LOX1 en LOX5) zijn 9-LOXen, terwijl de overige (LOX2, LOX3, LOX4 en LOX6) 13-LOXen zijn [27].

1.4.2 Intracellulaire lokalisatie en functies van lipoxygenasen

Lipoxygenasen zijn normaal aanwezig in plantenzaden, maar spelen geen duidelijke fysiologische rol in de ontwikkeling ervan. Mogelijk zijn deze enzymen belangrijk voor het opslaan van vetstoffen in de ontwikkelende zaadjes. Tijdens de kieming worden nieuwe LOXen gesynthetiseerd in de zaailing en cotyledonen, die in de volwassen plant aanwezig blijven [29]. Lipoxygenasen spelen een rol in senescentie en worden geactiveerd als respons op verschillende stressfactoren, zoals droogte, pathogene infectie en verwonding. Ze zijn ook betrokken bij groei- en ontwikkelingsprocessen en de biosynthese van regulerende moleculen zoals oxylipines. Lipoxygenase-afhankelijke lipidenperoxidatie is ook belangrijk voor de regulatie van hypersensitieve geprogrammeerde celdood in planten [27,30]. De intracellulaire lokalisatie van verschillende LOXen is van groot belang om meer inzicht te verkrijgen in

de fysiologische functies ervan. In *Arabidopsis thaliana* bevindt LOX1 zich in het cytoplasma, terwijl de overige isovormen in de envelop van de chloroplasten tot expressie komen. Voor LOX2 is bevestigd dat dit enzym direct aanleiding kan geven tot de vorming van oxylipines zoals jasmonaten [27,28,30].

1.5 De oxylipine pathway in *Arabidopsis thaliana*

De oxylipine pathway reguleert verschillende biologische processen in planten door het beïnvloeden van de expressie van genen coderend voor metabole en signalisatiecomponenten. De producten van de oxylipine pathway (ook bekend als de octadecanoïd pathway in planten) worden afgeleid van vetzuren en oxylipines genoemd. Oxylipines functioneren als signaalmoleculen tijdens de ontwikkeling, maar ook tijdens verwonding en aanvallen door insecten of pathogenen [31].

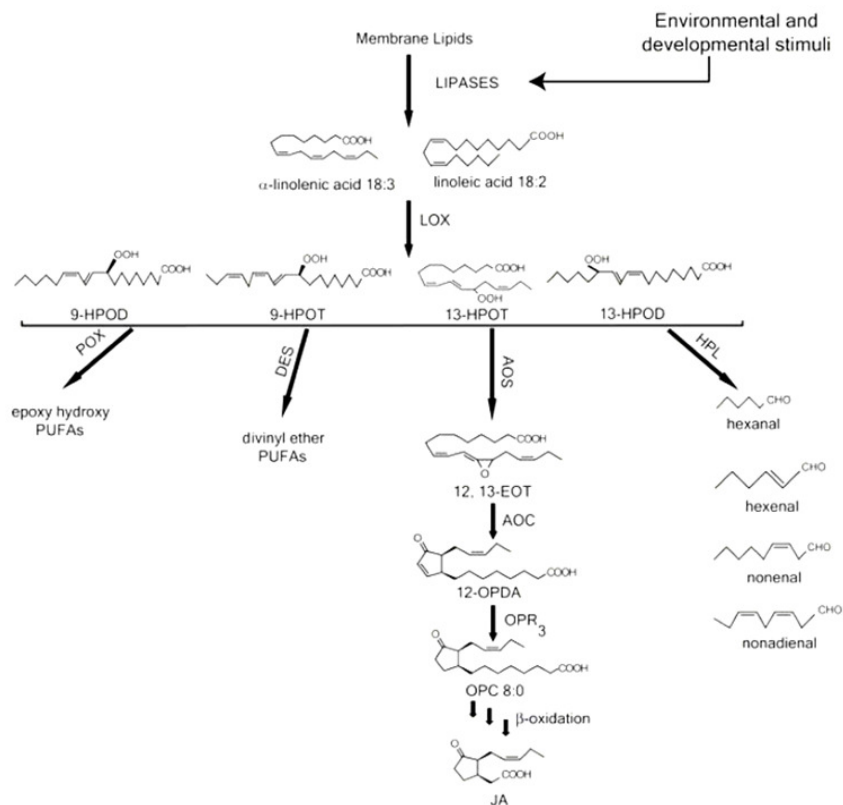
1.5.1 De biosynthese van oxylipines

De biosynthese van oxylipines start ter hoogte van membranen met de vrijzetting van PUFAs door lipasen zoals vetzuurdesaturasen (FAD). Deze vetzuren worden vervolgens geoxygeneerd door LOX, waardoor hydroperoxyvetzuren ontstaan. De hydroperoxy-derivaten van linolzuur zijn – afhankelijk van de positionele specificiteit van LOX – 9- of 13-hydroperoxy-octadecadienzuren (HPOD), terwijl α -linoleenzuur wordt omgezet tot 9- of 13-hydroperoxy-octadecatrienzuren (HPOT). Deze derivaten zijn de substraten voor vier belangrijke metabole pathways, gekatalyseerd door peroxygenase (POX), divinyl-ether-synthase (DES), alleenoxide-synthase (AOS) en hydroperoxide-lyase (HPL) (Fig. 1.3), vier enzymen behorend tot de cytochroom P450 familie [31].

De POX-pathway geeft via intramoleculaire transfer van zuurstof aanleiding tot de vorming van epoxy/hydroxy-PUFAs, terwijl DES instaat voor de vorming van divinyl-ethers zoals colneleenzuur. Het HPL katalyseert de oxidatieve klieving van de koolstofketen van hydroperoxyvetzuren, waardoor aldehyden worden gevormd. Zowel aldehyden als divinyl-ethers die aanwezig zijn in de blaadjes, zijn belangrijke antimicrobiële en schimmelwerende componenten. De AOS-pathway, die uiteindelijk leidt tot de vorming van jasmonaten, wordt uitvoerig beschreven in sectie 1.5.2. Naast deze vier hoofdpathways bestaan bijkomend nog drie reacties die minder goed gekarakteriseerd zijn, zoals de LOX-gekatalyseerde vorming van ketodiënen [27,31].

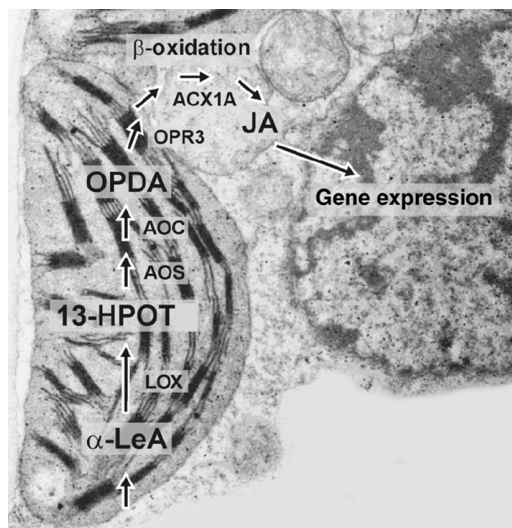
1.5.2 Jasmonaten: biosynthese en functies

De AOS-tak van de oxylipine pathway (Fig. 1.3) geeft aanleiding tot de vorming van jasmonaten. Deze lipide-afgeleide componenten hebben – naast hun rol in plantengroei en ontwikkeling – signalisatiefuncties betrokken bij de respons van planten op biotische en abiotische stressfactoren. De biosynthese van jasmonaten vertrekt vanaf 13-HPOT (gevormd door 13-LOX), dat wordt omgezet tot 12-oxo-fytodienzuur (12-oxo-PDA, OPDA) door alleenoxide-synthase (AOS) en alleenoxide-cyclase (AOC). Vervolgens wordt 12-oxo-PDA gereduceerd tot 3-oxo-2-(2'(9Z)-pentenyl)-cyclopentaan-1 octaanzuur (OPC) door OPDA-reductase 3 (OPR3). Hierna zorgen drie stappen van de β -oxidatie ervoor dat de carboxylketen van OPC wordt ingekort, waardoor jasmonaat (JA) ontstaat. De enzymen die hiervoor verantwoordelijk zijn, zijn acyl-CoA-oxidase 1A (ACX1A), multifunctioneel eiwit (MFP) en L-3-ketoacyl-CoA-thiolase (KAT). Jasmonaat kan tenslotte verschillende modificaties ondergaan, waardoor een divers aantal componenten gevormd kan worden. Een voorbeeld is de omzetting tot het vluchtige methyljasmonaat (methyl-JA), een reactie die gekatalyseerd wordt door het jasmonaat-carboxylmethyltransferase (JMT).



Figuur 1.3: De oxylipine pathway in planten. Deze figuur geeft de vier belangrijkste metabole pathways weer, maar er bestaan bijkomend nog drie reacties die in mindere mate gekarakteriseerd zijn (zie tekst). Afkortingen: LOX, lipoxygenase; 9/13-HPD, 9/13-hydroperoxy-octadecadien-zuur; 9/13-HPOT, 9/13-hydroperoxy-octadecatrien-zuur; POX, peroxygenase; DES, divinyl-ether-synthase; AOS, alleenoxide-synthase; HPL, hydroperoxide-lyase; PUFAs, polyonverzadigde vetzuren; 12,13-EOT, 12,13-epoxy-octadecatrien-zuur; AOC, alleenoxide-cyclase; 12-OPDA, 12-oxo-fytodien-zuur; OPR₃; OPDA-reductase 3; OPC 8:0, 3-oxo-2-(2'(9Z)-pentenyl)-cyclopentaan-1 octaan-zuur; JA, jasmonaat (Aangepast van Chehab *et al.*, 2007 [31]).

Jasmonaten zijn tenslotte in staat om in de nucleus de expressie van verschillende genen positief of negatief te reguleren [32,33]. In Fig. 1.4 is een overzicht weergegeven van de biosynthese van jasmonaten en de cellulaire lokalisatie van de betrokken enzymen en metabolieten.



Figuur 1.4: Intracellulaire lokalisatie van enzymen en metabolieten die deel uitmaken van de JA-biosynthese. Links: chloroplast. Midden: peroxisoom. Rechts: nucleus. Afkortingen: α-LeA, α-linoleenzuur; LOX, lipoxygenase; 13-HPOT, 13-hydroperoxy-octadecatrien-zuur; AOS, alleenoxide-synthase; AOC, alleenoxide-cyclase; OPDA, 12-oxo-fytodien-zuur; OPR₃, OPDA-reductase 3; ACX1A, acyl-CoA-oxidase 1A; JA, jasmonaat (Aangepast van Wasternack, 2007 [32]).

1.6 De rol van lipoxygenasen in signaaltransductie bij cadmium- en koperstress

Zoals eerder vermeld, is de kennis betreffende de signalisatiemechanismen verantwoordelijk voor de cellulaire responsen van planten op Cd- of Cu-stress eerder beperkt. De resultaten van eerdere studies omtrent deze signalisatiemechanismen suggereren dat LOXen een belangrijke rol zouden kunnen spelen in deze processen. Skórzyńska-Polit en collega's (2006) hebben aangetoond dat de LOX-activiteit in *Arabidopsis thaliana* blaadjes van planten behandeld met Cd of Cu (5 of 50 μM) na zeven dagen significant hoger is in vergelijking met deze in onbehandelde planten [30]. Preliminair resultaten van onderzoek in het labo Milieubiologie van de Universiteit Hasselt tonen eveneens aan dat de genexpressie van verschillende LOXen in deze plant sterk toeneemt na 24 uur behandeling met Cd (5 en 10 μM) of Cu (2 en 5 μM) [26]. Via het induceren van lipidenperoxidatie tijdens blootstelling aan Cd of Cu kunnen LOXen de redoxbalans in plantencellen verstoren, waardoor er meer pro-oxidanten gevormd kunnen worden. Deze pro-oxidanten (ROS) zijn niet noodzakelijk schadelijk voor de plantencel, maar kunnen ook belangrijke signalisatiecomponenten zijn tijdens metaalstress [25]. Daarnaast zijn LOXen mede verantwoordelijk voor de accumulatie van jasmonaten tijdens Cd- en Cu-stress [17]. Ook al is aangetoond dat JA gevormd wordt via de 13-LOX reactie [34], dit sluit niet uit dat producten gevormd door 9-LOXen zoals LOX1, mogelijk gemetaboliseerd worden via de AOS-pathway. Daarnaast is LOX1 verantwoordelijk voor de productie van een heel spectrum oxylipines [27,35], die mogelijk een belangrijke rol spelen in metaalgeïnduceerde responsen in *Arabidopsis thaliana*. Zowel pro-oxidanten als oxylipines zijn belangrijke signaalmoleculen aanwezig in plantencellen, die beide beïnvloed worden door de actie van LOXen. Mogelijk zijn beide pathways dus intracellulair verbonden via crosstalkmechanismen.

1.7 Objectieven van het onderzoek

De exacte rol die LOXen spelen in de signalisatiemechanismen geïnduceerd door blootstelling aan verhoogde Cd- en Cu-concentraties, is niet duidelijk gedefinieerd. Om de kennis betreffende dit onderwerp te vergroten, worden in dit onderzoek LOX knockout *Arabidopsis thaliana* planten gebruikt.

1.7.1 Algemeen belang van het onderzoek

Het ophelderen van signalisatieprocessen geïnduceerd door zware metalen zou kunnen bijdragen tot de ontwikkeling van specifieke strategieën om plantengroei op gecontamineerde gronden te stimuleren. Hierdoor worden minder metaalbevattende stofpartikels verspreid naar de menselijke bevolking. Het kan ook belangrijk zijn voor het kweken van planten die niet bestemd zijn voor consumptie. Dit kan een winstgevend alternatief zijn voor boeren met gecontamineerde landbouwgronden, met mogelijke fyto-remediëring tot gevolg.

1.7.2 *Arabidopsis thaliana* als modelorganisme

Het modelorganisme dat in deze studie gebruikt wordt om de effecten van metaalblootstelling in LOX knockout planten te bestuderen, is *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia). Deze plant maakt deel uit van de mosterdfamilie (*Cruciferae* of *Brassicaceae*) en komt van nature verspreid voor in Europa, Azië en Noord-Amerika. Reeds meer dan een decennium wordt deze plant beschouwd als het modelorganisme bij uitstek in verschillende plantstudies. Een belangrijke reden hiervoor is dat het volledige genoom van de plant – bestaande uit 120 megabasen verspreid over vijf chromosomen – in kaart is gebracht. Andere voordelen van deze plant zijn de korte generatietijd (ongeveer zes weken), zijn beperkte grootte, het feit dat de planten gemakkelijk te kweken en te transformeren zijn en dat er verschillende mutanten (zoals LOX knockout planten) voorhanden zijn [36,37].

1.7.3 Lipoxygenase knockout *Arabidopsis thaliana* planten

Gebaseerd op de resultaten van vorige studies, worden LOXen beschouwd als mogelijk belangrijke componenten van de signalisatiemechanismen die geïnduceerd worden door zware metalen zoals Cd en Cu [26,30]. In dit project worden LOX knockout planten gebruikt om deze hypothese na te gaan. Preliminaire resultaten suggereren dat de LOX isovorm 1 (LOX1) in *Arabidopsis thaliana* belangrijk is in de respons van deze plant op Cd- en Cu-stress. Zo neemt de genexpressie van dit enzym sterk toe, voornamelijk in de wortels [26]. Aangezien de metalen eerst de wortels bereiken, zou LOX1 een rol kunnen spelen in zowel intracellulaire (in de wortels) als intercellulaire (van wortel naar blad) signalisatiemechanismen. Daarbij komt LOX1 tot expressie in het cytosol, de intracellulaire component die direct geconfronteerd wordt met verhoogde metaalconcentraties [30]. Daarom wordt in dit project geopteerd te werken met LOX1 knockout *Arabidopsis thaliana* planten (**lox1-mutanten**, SALK_059431) [35]. Door de respons van deze mutante planten op Cd- of Cu-stress te vergelijken met deze van wildtype planten, is het mogelijk de rol van LOX1 als potentieel belangrijke signaalfactor tijdens metaalstress te bestuderen.

1.7.4 Doelstellingen en fasen van het onderzoek

Deze paragraaf geeft een overzicht van de onderzoekstopics die dit project vooropstelt.

Globale screening van de cellulaire redoxstatus en signaaltransductiepathways

De eerste onderzoeksfase heeft als doel te bepalen welke responsen cadmium induceert op de **cellulaire redoxstatus en signaaltransductiepathways** in beide genotypes. Zowel wildtype als *lox1* mutante planten worden gekweekt via een hydropoon systeem, dat ontwikkeld werd om planten simultaan te kweken met beperkte individuele variatie [37]. Na drie weken worden beide genotypes gedurende **24 uur** blootgesteld aan Cd (controle en twee concentraties). Verschillende metingen met betrekking tot de cellulaire redoxbalans (bepaling van de waterstofperoxideconcentratie, analyse van lipidenperoxidatie) en geactiveerde signalisatiemechanismen (genexpressie via de real-time polymerase kettingreactie (PCR)) worden op zowel wortels als blaadjes uitgevoerd. Deze algemene screening laat toe om te bepalen welke componenten van de cellulaire redoxbalans en/of signalisatieroutes beïnvloed worden door Cd.

Metaalgevoeligheid van wildtype versus *lox1* mutante planten

In de volgende fase van het project wordt de **metaalgevoeligheid** van *lox1* mutante *Arabidopsis thaliana* planten bepaald en vergeleken met deze van wildtype planten. Hiertoe worden beide genotypes in cultuur gebracht op verticale agarplaten en gedurende één week blootgesteld aan een reeks Cd- en Cu-concentraties. De **wortelgroei** van beide genotypes wordt vergeleken als belangrijke parameter van metaalgevoeligheid. Ook het **bladoppervlak** is een belangrijke indicator van de gevoeligheid van de planten voor Cd of Cu. Om deze parameter in beeld te brengen, worden beide genotypes in cultuur gebracht op ronde agarplaten en blootgesteld aan dezelfde reeks Cd- en Cu-concentraties.

Uitdieping van metaalspecifieke antioxidatieve responsen in relatie tot LOX1

In de laatste fase wordt dieper ingegaan op **antioxidatieve responsen** die in de eerste fase naar voren kwamen, waarnaast mogelijke **dosisrespons effecten** geïdentificeerd kunnen worden. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van planten gekweekt op verticale agarplaten die gedurende één week worden blootgesteld aan een concentratiereeks van Cd of Cu. Door de resultaten van wildtype en *lox1* mutante planten te vergelijken, zal een mogelijke rol voor LOX1 in signaaltransductie tijdens metaalstress op korte en lange termijn duidelijk worden.

2 Materiaal en Methoden

Om metaalgeïnduceerde responsen te bestuderen, werden twee soorten *Arabidopsis thaliana* planten (ecotype Columbia) gebruikt. Zowel wildtype (Col-0) als *lox1* mutante planten werden op drie manieren in cultuur gebracht en onderworpen aan verschillende experimentele analyses. De *lox1* mutante *Arabidopsis thaliana* planten (SALK_059431) hebben homozygoot een T-DNA insertie in het laatste exon van het gen coderend voor lipoxygenase 1 [35].

2.1 *Arabidopsis thaliana* plantengroei en behandeling met cadmium of koper

In dit project werd gebruik gemaakt van drie verschillende geoptimaliseerde kweeksystemen voor *Arabidopsis thaliana*.

2.1.1 *Arabidopsis thaliana* hydrocultuur

Een belangrijke kweekmethode voor *Arabidopsis thaliana* is via hydrocultuur, waarbij de wortels zich in een gemodificeerde voedingsoplossing bevinden [37]. Oppervlaktegesteriliseerde zaadjes van *Arabidopsis thaliana* (wildtype en *lox1*-mutant) werden gezaaid in buisjes gevuld met bevochtigd zand. Deze buisjes bevonden zich in een rooster dat bovenop een met aluminiumfolie bedekte plastic bak werd geplaatst. In deze bakken werd gemodificeerde Hoagland-oplossing (bestaande uit 0.505 mM KNO₃, 0.15 mM Ca(NO₃)₂ x 4 H₂O, 0.1 mM NH₄H₂PO₄, 0.1 mM MgSO₄ x 7 H₂O, 4.63 μM H₃BO₃, 0.91 μM MnCl₂ x 4 H₂O, 0.03 μM CuSO₄ x 5 H₂O, 0.06 μM H₂MoO₄ x H₂O, 0.16 μM ZnSO₄ 7H₂O, 1.64 μM FeSO₄ x 7 H₂O en 0.81 μM Na₂-EDTA [37]) aangebracht, die continu doorborreld werd met zuurstof. Vervolgens werden de plantjes gedurende drie weken gekweekt bij een dag/nacht temperatuur van 22°C/18°C, 12 uren licht en 65% vochtigheid. De planten werden voorzien van licht via koude witte fluorescente buizen (L 140W/20SA, Osram, Augsburg, Duitsland) bij een fotosynthetische fotonfluxdensiteit van 165 μmol m⁻²s⁻¹ ter hoogte van het blad [37]. Na drie weken werd Cd (5 of 10 μM) in sulfaatvorm aan de voedingsoplossing toegevoegd. Gedurende 24 uur kwamen de plantjes via hun wortels in contact met de metaalbevattende oplossing. Nadien werden de blaadjes en wortels geoogst, gewogen, onmiddellijk bevroren in vloeibare stikstof en bewaard bij -70°C [37] voor verdere analyse (zie 2.3-2.5).

2.1.2 Verticale agarplaten en analyse van de wortelgroei

Een tweede manier om *Arabidopsis thaliana* planten te kweken, is door oppervlaktegesteriliseerde zaadjes (wildtype en *lox1*-mutant) aan te brengen op vierkante platen (12 cm x 12 cm) met groeimedium. In dit kweekstelsel kan de wortelgroei van de planten duidelijk gevolgd worden.

In dit project werden twee soorten groeimedia gebruikt. Een eerste, wat armer medium is gebaseerd op een 50-voudige verdunning van het Gamborg's B5 medium [38,39] en werd bereid vertrekkende van een commerciële stockoplossing (G5768, Sigma-Aldrich, Bornem). De exacte samenstelling wordt weergegeven in Tabel 2.1A. Sucrose (0.5%, Sigma-Aldrich, Bornem) en agar n°2 (1%, Lab M Limited, Bury, Lancashire, Verenigd Koninkrijk) werden toegevoegd om respectievelijk de zaadkieming te homogeniseren en het medium te laten stollen. Het tweede groeimedium is rijker aan voedingsstoffen; de samenstelling wordt aangegeven in Tabel 2.1B.

Per groeiplaat werden 25 gesteriliseerde zaadjes aangebracht, waarna de platen twee tot drie dagen bij 4°C bewaard werden in het donker. Nadien werden de platen verticaal in een kweekkamer geplaatst, waar de plantjes gedurende één week opgroeiden vóór behandeling in een dag/nacht ritme (12 uren licht, 23°C en 12 uren donker, 18°C) [38,39].

Tabel 2.1: Samenstelling van de gebruikte groeimedia voor het kweken van *Arabidopsis thaliana* planten op verticale en ronde agarplaten. De pH van beide media wordt op 5.7-5.8 gebracht met behulp van 5 M KOH.

A. Traditionele groeimedium		B. Verrijkt groeimedium	
Macronutriënten			
MgSO ₄	0.02 mM	MgSO ₄	0.5 mM
CaCl ₂	0.02 mM	CaCl	0.5 mM
NaH ₂ PO ₄	0.022 mM	KH ₂ PO ₄	1 mM
KNO ₃	0.5 mM	KNO ₃	10 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.02 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5 mM
MnSO ₄	0.94 µM		
Micronutriënten			
H ₃ BO ₃	0.97 nM	H ₃ BO ₃	50 µM
KI	90 nM	MnCl ₂	12 µM
CuSO ₄	2 nM	CuCl ₂	1 µM
ZnSO ₄	0.14 nM	ZnCl ₂	1 µM
Na ₂ MoO ₄	20.6 nM	NH ₄ Mo	0.03 µM
CoSO ₄	2.06 nM		
Buffer			
MES	2.56 mM	MES	2.56 mM
Ijzeroplossing			
FeCl ₃	3.6 µM	NaFeEDTA	0.05 mM

Na één week incubatie zijn de zaadlobben van de plantjes volledig geopend en zijn de wortels ongeveer 2 cm lang. Op dat moment werden de plantjes getransfereerd naar nieuwe Cd- of Cu-bevattende platen, zodat er zich uiteindelijk vier wildtype en evenveel mutante plantjes per plaat bevonden en de groei van beide genotypes naast elkaar gevolgd kon worden. Het groeimedium in de behandelingsplaten werd op dezelfde manier bereid als bij de groeiplaten, met dit verschil dat er geen sucrose werd toegevoegd. Dit is een meer realistische groeisituatie omdat de planten verplicht worden aan fotosynthese te doen. Na autoklaveren werd Cd of Cu toegevoegd; de uiteindelijke metaalconcentraties in de platen bedroegen 0, 5, 10, 15, 20, 25 of 30 µM. Per concentratie werden vijf platen bereid, zodat uiteindelijk 20 wildtype en 20 mutante plantjes aan dezelfde behandeling onderworpen werden. In de laatste experimentele fase (uitdiepingexperiment) bedroegen de gebruikte concentraties voor Cd 0, 10, 20, 40 en 60 µM, terwijl deze voor Cu 0, 20, 30, 40 of 50 µM waren. Ook hier werden vijf platen per concentratie bereid, waarop vijf wildtype planten langs vijf *lox1*-mutanten werden blootgesteld.

Na transfer van de plantjes naar de metaalbevattende platen, werden de worteluiteinden dagelijks op hetzelfde moment gemerkt. Hierdoor werd de invloed van metaalblootstelling op de wortelgroei in beeld gebracht. Zeven dagen na de transfer van de plantjes werden digitale beelden bekomen van de planten met behulp van een conventionele scanner. Via Optimas™ (versie 6.1, Optimas Corporation®, Verenigde Staten) werd vervolgens het effect van de Cd- en Cu-concentraties op de wortelgroei geanalyseerd. Nadien werden de blaadjes en wortels van de planten voor het uitdiepingexperiment geogost, onmiddellijk bevroren in vloeibare stikstof en bewaard bij -70°C voor analyse van genexpressie (zie 2.5).

2.1.3 Ronde agarplaten en analyse van het bladoppervlak

Een laatste manier om *Arabidopsis thaliana* planten te kweken, is door de zaadjes aan te brengen op ronde platen (Ø 9 cm) met groeimedium. Deze kweekopzet maakt het mogelijk het bladoppervlak van de planten in beeld te brengen. Het gebruikte groeimedium (Tabel 2.1A) werd op dezelfde manier bereid als bij de verticale agarplaten [38,39]. Sucrose (0.5%) en agar n°2 (0.7%) werden toegevoegd. Na autoklaveren van het medium werden de verschillende Cd- of Cu-concentraties (0, 5, 10, 15, 20, 25 of 30 µM) toegevoegd; vervolgens werden 12 zaadjes van beide genotypes per plaat aangebracht. Na incubatie van de platen gedurende twee tot drie dagen bij 4°C in het donker, werden ze in de

kweekkamer geplaatst (cfr. supra), waar de plantjes gedurende twee weken opgroeiden. De planten werden dus direct geconfronteerd met verhoogde metaalconcentraties in het groeimedium.

Na twee weken werden digitale beelden bekomen van het bladoppervlak van beide genotypes met behulp van een conventionele scanner. Via Optimas™ (versie 6.1, Optimas Corporation®, Verenigde Staten) werd het effect van de verschillende Cd- en Cu-concentraties op het bladoppervlak geanalyseerd.

2.2 Metaalbepaling

Tijdens het oogsten van plantjes gekweekt via het hydrocultuursysteem werden per conditie tien blaadjes en tien wortels gebruikt om het gehalte aan Cd in beide plantorganen te bepalen. Hiertoe werden de blaadjes gespoeld met gedestilleerd H₂O, terwijl de wortels eenmaal met 1 mM Pb(NO₃)₂ en tweemaal met gedestilleerd H₂O werden gespoeld. Het spoelen met Pb(NO₃)₂ zorgt ervoor dat Cd gebonden aan het worteloppervlak verwijderd wordt. De blad- en wortelstalen werden vervolgens gedroogd bij 80°C in de droogoven. Nadien werden de stalen in een warmteblok ontsloten met HNO₃ (70-71%). De Cd-concentratie werd tenslotte bepaald via vlam-atomaire absorptie spectrometrie (vlam-AAS) (Perkin-Elmer, 1100B, Verenigde Staten). Als referentiestalen werden een blanco (enkel HNO₃) en een standaard (NIST Spinazie 1570a, Gaithersburg, Verenigde Staten) geanalyseerd. De analyse gebeurde door de onderzoeksgroep Toegepaste en Analytische Scheikunde aan de Universiteit Hasselt.

2.3 Bepaling van de waterstofperoxideconcentratie

De concentratie H₂O₂ (in nmol per gram vers gewicht) werd in blad en wortel bepaald met behulp van de 'Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit' (A22188, Molecular Probes, Invitrogen, Merelbeke) [40]. In deze kit wordt het Amplex Red reagens (10-acetyl-3,7-dihydroxyfenoxazine) gebruikt in combinatie met het enzym horse radish peroxidase om H₂O₂ te detecteren. Wanneer het Amplex Red reagens reageert met H₂O₂ wordt het roodfluorescerende oxidatieproduct resorufine gevormd. Het gewicht van blad en wortel lag tussen 20 en 50 mg, waarbij de reactiebuffer proportioneel met het staalgewicht werd toegevoegd. De fluorescentie werd bepaald via de FLUOStar Optima Microplate Reader (BMG LabTech, Isogen Life Science, Sint-Pieters-Leeuw).

2.4 Analyse van lipidenperoxidatie

De mate waarin lipidenperoxidatie optreedt in blad (> 100 mg) en wortel (80-100 mg) werd bepaald door spectrofotometrisch het gehalte aan thiobarbituurzuur-reactieve metabolieten (TBArm) zoals malondialdehyde (MDA, een membranair afbraakproduct), te meten. De plantenstalen werden gehomogeniseerd in 0.1% trichloorazijnzuur (TCA) (3 ml voor bladmateriaal, 1-2 ml voor wortels) met behulp van mortier en stamper. Na centrifugatie van de stalen (10 minuten, 20 000 g, 4°C) werd het supernatans met een factor 5 verdund in 0.5% 2-thiobarbituurzuur (TBA). Dit gebeurde voor elk staal in duplo. Als blancostaal werd vertrokken van 0.1% TCA. Vervolgens werden de stalen gedurende 30 minuten in een warmwaterbad bij 95°C geplaatst. Na snelle afkoeling in een ijsbad, werden de stalen gecentrifugeerd (10 minuten, 20 000 g, 4°C). Tenslotte werd de absorptie van het supernatans gemeten bij 532 nm ten opzichte van de blanco. Er werd gecorrigeerd voor aspecifieke absorptie door eveneens te meten bij 600 nm [41]. De metingen gebeurden met de UV-1602 spectrofotometer (Shimadzu, Deurne).

2.5 Genexpressie

Blad- en wortelstalen werden onder ijskoude omstandigheden fijngemalen met de Retsch MM 2000 Mixer Mill (Retsch, Haan, Duitsland). Vervolgens werd het RNA uit het plantenmateriaal geëxtraheerd met behulp van de 'mirVana™ miRNA Isolation Kit' (Ambion, Applied Biosystems, Lennik) [42]. Na extractie

werd het RNA ingevroren in vloeibare stikstof en bewaard bij -70°C . Zowel de concentratie als de zuiverheid van het geëxtraheerde RNA werden bepaald via de NanoDrop[®] ND-1000 Spectrofotometer (NanoDrop Technologies Inc, Isogen Life Science, Sint-Pieters-Leeuw) [43]. Het toestel meet op drie golflengten: 230, 260 en 280 nm. De RNA-concentratie wordt bepaald aan de hand van de absorptie bij 260 nm, terwijl de A_{260}/A_{230} en A_{260}/A_{280} ratio's een indicatie geven van de zuiverheid. De kwaliteit van de RNA-stalen werd gecontroleerd met de Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Diegem) [44].

In de volgende stap werd het geëxtraheerde RNA omgezet tot cDNA via het enzym reverse transcriptase (RT). Deze RT-PCR reactie werd uitgevoerd met de 'QuantiTect[®] Reverse Transcription Kit' (Qiagen, Venlo, Nederland [45]) in de Eppendorf MasterCycler[®] Gradient (Eppendorf, Hamburg, Duitsland). Hierbij is het belangrijk om voor elk staal te vertrekken van eenzelfde hoeveelheid RNA (1 μg) om bij real-time PCR gelijkwaardige resultaten te bekomen. Het protocol van de kit beslaat twee grote stappen. In een eerste stap wordt eventueel aanwezig genomisch DNA verwijderd met behulp van 'gDNA Wipeout buffer' (2 minuten, 42°C). Vervolgens wordt het eigenlijke cDNA gevormd in een reactiemengsel bestaande uit 5x Quantiscript RT buffer (4 μl), Quantiscript Reverse Transcriptase (1 μl), RT Primer Mix (1 μl) en 14 μl staal. Deze reactie vindt plaats gedurende 30 minuten bij 42°C , waarna het enzym wordt geïnactiveerd (3 minuten, 95°C). Het cDNA werd 1/10 verdund in 1/10 verdunde Tris-EDTA buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, pH 8.0; Sigma-Aldrich, Bornem) en bewaard bij -20°C .

Het bekomen cDNA is het startmateriaal voor de real-time PCR-reactie, waarbij de amplificatie van het cDNA wordt gevolgd in de tijd. De detectie van de gevormde PCR-producten (amplicons) gebeurt via de SYBR Green chemie. Deze kleurstof fluoresceert indien ze bindt aan dubbelstrengige amplicons. Hoe verder de PCR-reactie vordert, hoe meer dubbelstrengig DNA wordt geproduceerd. Hierdoor zal de gemeten fluorescentie-intensiteit tengevolge van SYBR Green proportioneel toenemen. Aangezien één kleurstof gebruikt wordt om de expressie van verschillende genen te bepalen, is deze meettechniek zeer flexibel. Echter, SYBR Green bindt niet sequentiespecifiek aan dubbelstrengig DNA, waardoor de techniek vatbaar is voor vals-positieve resultaten zoals primer-dimeren. Via een dissociatiecurve kan onderscheid gemaakt worden tussen de amplicons en eventuele primer-dimeren en genomisch DNA.

Bij real-time PCR wordt tijdens de exponentiële fase gemeten, aangezien er in deze fase een nagenoeg perfecte correlatie bestaat tussen de stijging van PCR-producten en de oorspronkelijke hoeveelheid cDNA. Hoe meer cDNA initieel aanwezig is, hoe sneller de gemeten fluorescentie een drempelwaarde ('threshold') bereikt. Deze drempelwaarde – het fluorescentieniveau waarbij de fluorescentie van de stalen boven de achtergrond uitkomt – wordt vastgelegd in het lineaire gebied van de logaritmische PCR-amplificatieplot. Het cyclusnummer waarbij de fluorescentie van de stalen deze drempelwaarde overschrijdt, wordt Ct ('cycle threshold') genoemd. Op deze manier kan de genexpressie van de targetgenen gekwantificeerd worden [46]. Een voorwaarde hierbij is dat in de real-time PCR-reactie eveneens referentiegenen worden geanalyseerd. Omdat ideale referentiegenen niet bestaan, worden verschillende genen getest via computeralgoritmen (geNorm en NormFinder) om zo de meest stabiele referentiegenen te bepalen. De gebruikte referentiegenen in dit project – At2g28390 (SAND-familie eiwit), At5g08290 (mitose eiwit YSL8) en At5g15710 (F-box eiwit) – hebben de hoogste expressiestabiliteit na behandeling met Cd en Cu [47].

De real-time PCR-reacties werden uitgevoerd volgens het 'Fast SYBR[®] Green Master Mix Protocol' in 96-well platen die in het 7500 Fast Real-Time PCR Systeem (Applied Biosystems, Lennik) geplaatst werden [48]. Per cDNA-staal (2.5 μl) werd 7.5 μl mastermix – bestaande uit 2x Fast SYBR[®] Green Master Mix (5 μl , Applied Biosystems, Lennik), forward en reverse primers (0.3 μl ; 300 nM) en RNase-vrij H_2O

(1.9 μ l) – toegevoegd. De gebruikte primers werden ontwikkeld en geoptimaliseerd met behulp van de Primer Express software (Applied Biosystems, Lennik). In elke PCR-reactie werden eveneens 'no template controls' geanalyseerd. In deze reacties werd geen cDNA, maar RNase-vrij H₂O samengevoegd met de mastermix. Dit is een controle op contaminatie, aangezien in deze reacties geen PCR-producten gevormd mogen worden. De 96-well platen werden vervolgens gecentrifugeerd (1 minuut, 20 000 g, 4°C) en in het toestel geplaatst, waarna het volgende programma gestart werd:

- 2 minuten op 50°C: de uracil-bevattende PCR-producten van vorige reacties worden geknipt door uracil-N-glycosylase (UNG);
- 20 seconden op 95°C: het HotStarTaq DNA Polymerase wordt geactiveerd;
- 3 seconden op 95°C: het template cDNA denatureert;
- 30 seconden op 60°C: primer annealing en elongatie;
- dissociatiestap: de temperatuur stijgt van 60°C tot 95°C, waarbij de bekomen PCR-producten dissociëren en de fluorescentie-intensiteit afneemt.



De data verkregen uit deze experimenten werden genormaliseerd ten opzichte van de expressie van de gebruikte referentiegenen volgens de $2^{-\Delta Ct}$ methode [49]. Tabel 2.2 geeft een overzicht van de gemeten genen en de sequenties van de gebruikte forward en reverse primers.

2.6 Hiërarchische clustering van de genexpressie data

Om coregulatie van genen tijdens metaalstress te identificeren, werd een clusteringanalyse uitgevoerd met behulp van de GenEx Software (versie 4.3.1, MultiD Analyses AB, Göteborg, Zweden). De analyse is gebaseerd op vier verschillende algoritmen ('unweighted pairs', 'single linkage', 'complete linkage' en 'Ward's algorithm'). De afstanden werden berekend op basis van de 'Euclidian Distance Measure'.

2.7 Statistische analyse

Vooraleer de statistische analyse uitgevoerd kon worden, moest bepaald worden of de data voldeden aan twee assumpties: normaalverdeling en gelijke varianties (homoscedasticiteit). De normaliteit van de data werd nagegaan met behulp van vier testen (Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Cramer-von Mises en Anderson-Darling). Indien de data niet aan de normaliteitsassumptie voldeden, werden ze getransformeerd ($\log(x)$, \sqrt{x} , e^x of $1/x$). De homoscedasticiteit werd onderzocht via een residuplot.

De experimentele resultaten werden statistisch geanalyseerd via de GLM-procedure in SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, Verenigde Staten). Hierbij werd de nulhypothese nagegaan via een- of tweeweg ANOVA op drie significantieniveaus (0.1, 0.05 en 0.01). Voor de post-analyse werd de Tukey-Kramer test gebruikt. Indien de data niet voldeden aan de twee assumpties, zelfs niet na transformatie, werd een niet-parametrische Kruskal-Wallis test uitgevoerd, met als post-analyse een niet-parametrische multiple comparisons test gebaseerd op ranking.

Tabel 2.2: De sequenties van de forward en reverse primers gebruikt om de expressie van de vermelde genen via real-time PCR (SYBR green chemie) te bepalen. De tabel geeft een overzicht van de gemeten enzymen per klasse waartoe ze behoren. Afkortingen: LOX, lipoxygenase; RBOH, 'respiratory burst oxidase homolog'; CSD, Cu/Zn-superoxidedismutase; FSD, Fe-superoxidedismutase; APX, ascorbaatperoxidase; CAT, catalase; OXI1: oxidative stress inducible kinase 1; CDPK1, calcium-afhankelijk proteïne kinase 1; MKK2, MAPK kinase 2; WRKY25, DNA-bindingseiwit (transcriptiefactor); ZAT12, H₂O₂-responsief zinc finger proteïne; FAD, vetzuurdesaturase; AOS, alleenoxide-synthase; AOC: alleenoxide-cyclase; OPR, OPDA-reductase; ACX, acyl-CoA-oxidase; MFP, multifunctioneel eiwit; KAT, L-3-ketoacyl-CoA-thiolase; JMT, jasmonaat-carboxylmethyltransferase; MPK6, MAPK6.

Gen	Forward primer	Reverse primer
REFERENTIEGENEN		
<i>At2g28390</i>	AACTCTATGCAGCATTTGATCCACT	TGATTGCATATCTTTATCGCCATC
<i>At5g08290</i>	TACTGTTCGGTTGTTCTCCATTT	CACTGAATCATGTTTGAAGCAAGT
<i>At5g15710</i>	TTTCGGCTGAGAGGTTTCGAGT	GATTCCAAGACGTAAGCAGATCAA
PRO-OXIDATIEVE ENZYMEN		
<i>LOX1</i>	TTGGCTAAGGCTTTTGTCGG	GTGGCAATCACAACCGGTTTC
<i>LOX2</i>	TTTGCTCGCCAGACACTTG	GGGATCACCATAAACGGCC
<i>LOX3</i>	ACGTTGTCGTAAGGTCGCC	GTCTCGTGGCACATACATAGGTAATG
<i>LOX4</i>	AAGGTCTCCCTGCTGATCTCAT	AAGCCCATGTGGTTGTGTTG
<i>LOX5</i>	GGCAAACCGGCCGTAAT	CGTCCCTTGGCACGTATATGTT
<i>LOX6</i>	GGCGATTTGACATGGAAGGA	ACAAGCCTCACGCCACATTC
<i>RBOHA</i>	CATTTGCTAGGCCAACTG	TTCACTAACCCAGCTGCTCCA
<i>RBOHB</i>	GATCGCGACAACCTCGGATA	CGGAAGATGGACTGTTATTTGATTG
<i>RBOHC</i>	TCACCAGAGACTGGCACAATAAA	GATGCTCGACCTGAATGCTC
<i>RBOHD</i>	AACTCTCCGCTGATTCCAACG	TGGTCAGCGAAGTCTTTAGATTCTT
<i>RBOHE</i>	GTGATGCAAGATCAACCCTGA	GCCTTGCAAAATGTGTTCTCA
<i>RBOHF</i>	GGTGTATGAACGAAGTTGCA	AATGAGAGCAGAACGAGCATCA
ANTIOXIDATIEVE ENZYMEN		
<i>CSD1</i>	TCCATGCAGACCCTGATGAC	CCTGGAGACCAATGATGCC
<i>CSD2</i>	GAGCCTTTGTGGTTACGAG	CACACCACATGCCAATCTCC
<i>FSD1</i>	CTCCAATGCTGTGAATCCC	TGGTCTTCGGTTCTGGAAGTC
<i>APX1</i>	TGCCACAAGGATAGGTCTGG	CCTTCCTTCTCTCCGCTCAA
<i>APX2</i>	TTGCTGTTGAGATCACTGGAGGA	TGAGGCAGACGACCTTCAGG
<i>CAT1</i>	AAGTGCTTCATCGGGAAGGA	CTTCAACAAAACGCTTCACGA
<i>CAT2</i>	AACTCTCCATGACCGTTGGA	TCCGTTCCCTGTGAAATTG
<i>CAT3</i>	TCTCAACAACATCTCTCCCTCA	GTGAAATTAGCAACCTTCTCGATCA
SIGNALLING ENZYMEN		
<i>OXI1</i>	CGATTATTGTCGGGACAGA	CTAATACAAGCTCCGCCGC
<i>CDPK1</i>	CAAAGCTGGGCTTCAGAAGG	AAACCCATTTCATCGACATC
<i>MKK2</i>	GGATCCAAACAGTCGAAGCTC	TGCATCTGTGAAGTAGGACGC
<i>WRKY25</i>	GAAAGATCCGACGACGACG	TCCAATAATTTACGAGCG
<i>ZAT12</i>	GTGCGAGTCACAAGAAGCTAACA	GCGACGACGTTTTACCTTCTCA
JASMONAAT-BIOSYNTHESE ENZYMEN		
<i>FAD3</i>	TTTATTGGGCCGCCAAG	TGTCTGAGAACTCCCATGTCCA
<i>FAD7</i>	CCATGTTTTGGGCTCTCTTTGTT	CCACACTGTTCAACTTCGGATCA
<i>AOS</i>	CCGGTACTTACATGCCGTC	CGTGTTTAGGCTCCGATGGAT
<i>AOC3</i>	CTTTCTTCTGGAATTGGGGC	TCGTTGAGCTCATACAGTTT
<i>OPR2</i>	GTGTCCCTCTTCTACCCCTTA	AGGAACGCTTCCGTACGATTT
<i>OPR3</i>	GGCATGTTGGACGTGCTTCT	CCGAGATTGGTTTGTTCGTTGA
<i>ACX1</i>	TGATTTGGTTGAGGCCGCTAT	TCCTTGCCACCTATGTCTTGC
<i>ACX2</i>	TAACGCTTGCAAGATCTCACATTG	GCAGCTTTTGCACTTGGGTC
<i>MFP2</i>	ACACTCATCAATCCTCCGTC	CATCATTCTGCTCAAGGCCT
<i>KAT1</i>	ACCCTTCCGGACTTGCAAAA	CAGCACCGTCACTTAATTGGCT
<i>KAT2</i>	ATGGCCATAGGCCATCCTTT	AAACGGCAGTCTTTACCACGG
<i>JMT</i>	AGCTCTTATGTCATGGCCAAA	CTCGCAGCATAGTAAGGAGCGT
JASMONAAT-RESPANSIEF ENZYM		
<i>MPK6</i>	TAAGTCCCGACAGTGCATCC	GATGGGCCAATGCGTCTAA

3 Resultaten en Discussie

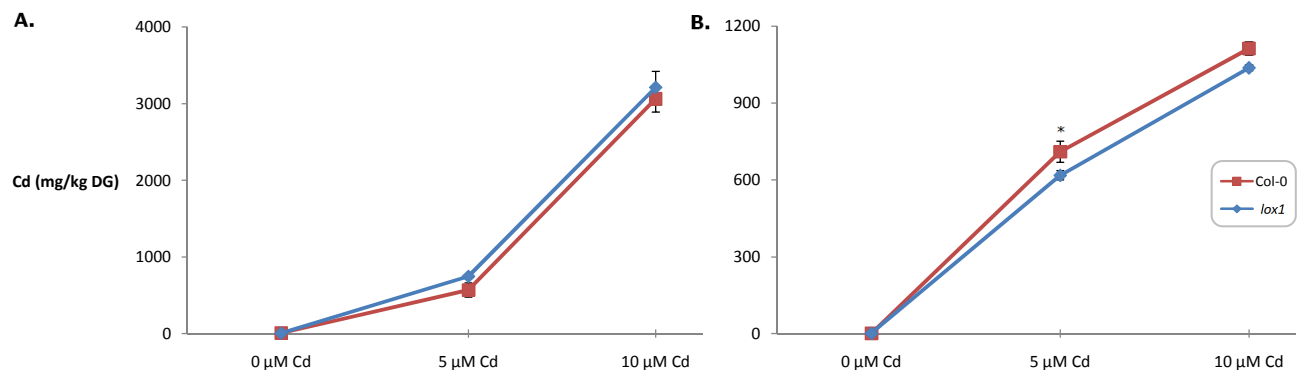
Om de rol van LOX1 tijdens metaalgeïnduceerde oxidatieve stress en daardoor uitgelokte signaaltransductiemechanismen te bestuderen, werden in dit project *lox1* mutante *Arabidopsis thaliana* planten gebruikt. Door een homozygote T-DNA insertie in het laatste exon van het LOX1-gen is er een gebrek aan functionele LOX1-enzymen [35].

3.1 Cadmiumgeïnduceerde cellulaire effecten op korte termijn

Blootstelling aan Cd induceert oxidatieve stress in *Arabidopsis thaliana*, zelfs wanneer het metaal in lage, realistische concentraties gedurende een korte tijdspanne (24 uur) wordt toegediend [25,26]. In wildtype planten (ecotype Columbia) werd dit effect door de onderzoeksgroep Milieubiologie nauwkeurig bestudeerd. Smeets *et al.* (2008) onderzochten de effecten van Cd op de redoxbalans van drie weken oude *Arabidopsis thaliana* planten die 24 uur werden blootgesteld aan 5 of 10 μM Cd in hydrocultuur. De resultaten tonen aan dat het metaal transcriptionele en enzymatische effecten gerelateerd met oxidatieve stress induceert in de zaailingen. Verder wordt eveneens een belangrijk rol gesuggereerd voor lipoxygenasen in de oxidatieve stressrespons, meer bepaald voor LOX1. De genexpressie van dit enzym neemt namelijk significant toe in de wortels, terwijl dit effect niet in de blaadjes optreedt [25]. Aangezien LOX1 lipidenperoxidatie induceert, kan de toegenomen genexpressie van dit enzym een mogelijke oorzaak zijn van ROS-productie in de wortels na blootstelling aan Cd. Dit is in lijn met de resultaten van eerder onderzoek, waar een verhoogde LOX-activiteit wordt genoemd als een belangrijke factor in Cd-geïnduceerde oxidatieve stress [50]. Bijkomend leidt LOX1 tot de productie van een spectrum aan oxylipines [27,35], die een potentieel belangrijke rol spelen in metaalgeïnduceerde responsen in *Arabidopsis thaliana*. Om de mogelijke rol van LOX1 tijdens Cd-stress te bestuderen, werden zowel wildtype (Col-0) als *lox1* mutante planten gedurende drie weken gekweekt via een geoptimaliseerd hydrocultuursysteem [37]. Vervolgens werden beide genotypes 24 uur blootgesteld aan 5 of 10 μM Cd, waarna ze onderworpen werden aan verschillende experimentele analyses.

3.1.1 Het cadmiumgehalte in wildtype versus *lox1* mutante planten

Een belangrijke parameter die de Cd-geïnduceerde cellulaire respons in planten beïnvloedt, is de exacte hoeveelheid Cd opgenomen door wortels en blaadjes. Om te bepalen of *lox1*-mutanten al dan niet dezelfde metaalhoeveelheid opnemen, werd het **Cd-gehalte** in wortel en blad bepaald en vergeleken met de gehalten in wildtype (Col-0) planten.



Figuur 3.1: De Cd-concentraties in mg per kg droog gewicht (DG) in de wortels (A) en blaadjes (B) van drie weken oude wildtype (Col-0) versus *lox1* mutante (*lox1*) *Arabidopsis thaliana* genotypes blootgesteld aan 5 of 10 μM Cd gedurende 24 uur of gegroeid onder controleomstandigheden. De waarden zijn het gemiddelde \pm S.E. van ten minste drie biologisch onafhankelijke replica's. *: $p < 0.1$ (Col-0 ten opzichte van *lox1*, ANOVA).

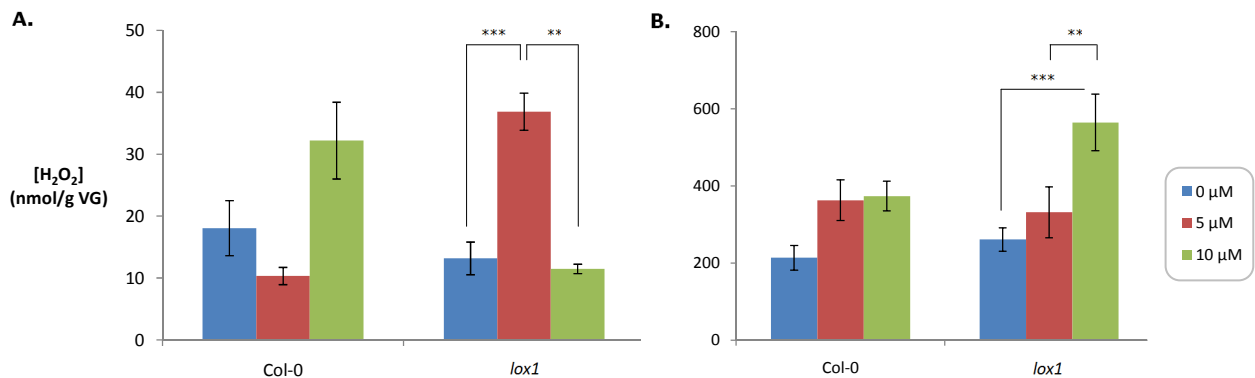
Blootstelling aan 5 of 10 μM Cd verhoogt de Cd-concentratie in wortel (Fig. 3.1A) en blad (Fig. 3.1B) significant voor beide genotypes ($p < 0.0001$ ten opzichte van de eigen controle, niet aangeduid in Fig. 3.1). In de wortels vertonen beide genotypes qua Cd-gehalte geen significante verschillen; voor beide treedt de sterkste stijging op na blootstelling aan 10 μM Cd (Fig. 3.1A). In de blaadjes is dit ook het geval, maar bij blootstelling aan 5 μM Cd is het Cd-gehalte in wildtype planten hoger dan in de *lox1*-mutanten ($p = 0.0666$) (Fig. 3.1B).

3.1.2 Cadmium, de cellulaire redoxstatus en geïnduceerde signaaltransductiepathways

Zoals eerder vermeld, leidt blootstelling aan Cd tot oxidatieve stress in *Arabidopsis thaliana* [25,26]. In dit onderdeel wordt de respons van wildtype planten op het niveau van de cellulaire redoxstatus vergeleken met deze van planten zonder LOX1-functie. Op deze manier wordt een mogelijke rol voor dit enzym in Cd-geïnduceerde stressresponsen bestudeerd.

Het niveau pro-oxidanten in wildtype versus *lox1* mutante planten

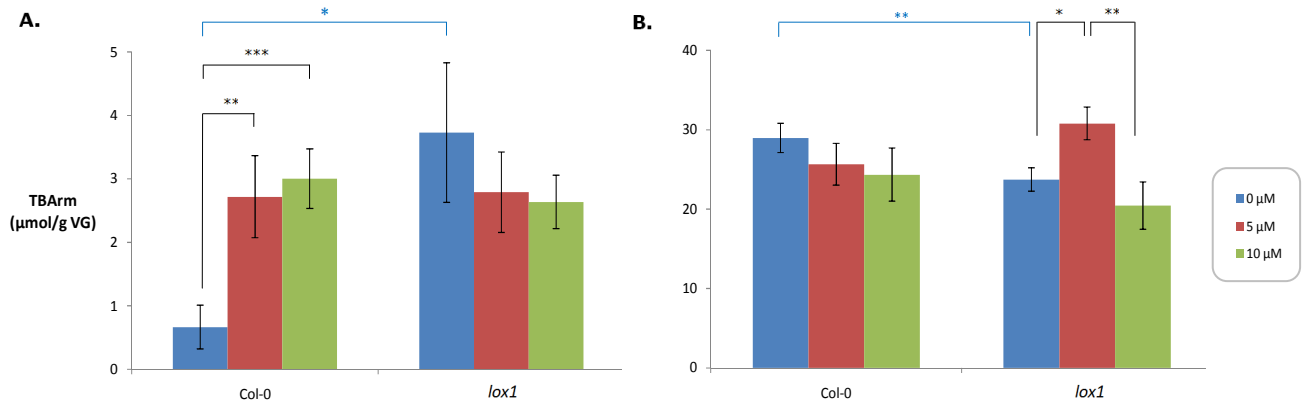
Blootstelling aan zware metalen leidt tot een verhoogde H_2O_2 -productie [17,51]. Daarom werd de concentratie aan H_2O_2 bepaald in wortels en blaadjes van Cd-blootgestelde wildtype (Col-0) planten en vergeleken met deze in *lox1*-mutanten (Fig. 3.2).



Figuur 3.2: De H_2O_2 -concentraties in nmol per gram vers gewicht (VG) in de wortels (A) en blaadjes (B) van drie weken oude wildtype (Col-0) versus *lox1* mutante (*lox1*) *Arabidopsis thaliana* genotypes blootgesteld aan 5 of 10 μM Cd gedurende 24 uur of gegroeid onder controleomstandigheden. De waarden zijn het gemiddelde \pm S.E. van vijf biologisch onafhankelijke replica's. Significatieniveaus: **: $p < 0.05$; ***: $p < 0.01$ (ANOVA).

In het wildtype worden zowel in wortel als blad geen significante effecten waargenomen; enkel bij 10 μM is in beide organen een stijgende trend aanwezig (Fig. 3.2A en B). In de wortels van de *lox1*-mutant leidt blootstelling aan 5 μM Cd tot een sterk verhoogd H_2O_2 -niveau. Deze stijging neemt bij 10 μM terug af tot het controleniveau (Fig. 3.2A). In de blaadjes veroorzaakt 10 μM Cd echter een sterke toename in H_2O_2 -concentratie (Fig. 3.2B). Het effect van de Cd-blootstelling lijkt in de wortels afhankelijk van het genotype en er is een significante interactie tussen Cd-behandeling en het genotype ($p < 0.0001$).

De inductie van **lipidenperoxidatie** werd bepaald door de concentratie TBA-reactieve metaboliëten (TBArm) te meten in de wortels en blaadjes van beide genotypes (Fig. 3.3). Daar waar de H_2O_2 -concentratie onder controleomstandigheden niet verschilt voor beide genotypes, treedt wel een merkbaar verschil op met betrekking tot het optreden van lipidenperoxidatie. In de wortels van de onbehandelde *lox1*-mutant is een hogere concentratie TBArm aanwezig dan in het onbehandelde wildtype, een patroon dat zich in de blaadjes omkeert (blauwe aanduidingen in Fig. 3.3A en B). Dit wijst mogelijk op een verhoogde basale lipidenperoxidatie in de wortels van de mutante planten; deze parameter is bijgevolg duidelijk afhankelijk van het genotype.



Figuur 3.3: Bepaling van lipidenperoxidatie op basis van de concentratie TBA-reactieve metabolieten (TBArm) in μmol per gram vers gewicht (VG) in de wortels (A) en blaadjes (B) van drie weken oude wildtype (Col-0) versus *lox1* mutante (*lox1*) *Arabidopsis thaliana* genotypes blootgesteld aan 5 of 10 μM Cd gedurende 24 uur of gegroeid onder controleomstandigheden. De waarden zijn het gemiddelde \pm S.E. van vijf biologisch onafhankelijke replica's. Significantieniveaus: *: $p < 0.1$; **: $p < 0.05$; ***: $p < 0.01$ (ANOVA).

Blootstelling aan Cd leidt tot een verhoogde lipidenperoxidatie in de wortels van het wildtype, terwijl in de blaadjes geen veranderingen optreden (Fig. 3.3A en B). Beide responsen zijn consistent met eerdere observaties binnen de onderzoeksgroep [26]. In de *lox1*-mutant wordt enkel in de blaadjes een hoger niveau TBArm gedetecteerd bij 5 μM Cd, dat bij 10 μM terugvalt naar het controleniveau (Fig. 3.3B).

Transcriptionele responsen in de wortels van wildtype versus *lox1* mutante planten

Om een duidelijk beeld te krijgen van de effecten van Cd-blootstelling op cellulair niveau, werd de **genexpressie** van een reeks enzymen betrokken bij verschillende cellulaire reacties bestudeerd in wildtype en *lox1* mutante planten. Enkel de wortels worden in het gebruikte kweekstelsel direct blootgesteld aan Cd. De acute responsen in dit plantorgaan zijn dus vermoedelijk – naast Cd zelf dat in de blaadjes terechtkomt – van belang voor signalling naar de blaadjes. In dit onderdeel worden de reacties op transcriptieel niveau in de wortels van beide genotypes bestudeerd (Tabel 3.1).

Een algemeen geobserveerde respons in de wortels is dat de genexpressie van alle gemeten enzymen in de onbehandelde *lox1*-mutant bijna consequent lager ligt ten opzichte van deze in het wildtype (Col-0). Enkel *CAT1* vertoont een significant hogere expressie in de mutant ('ONBEHANDELD' in Tabel 3.1). De vraag is nu of deze verlaagde basale transcriptie gevolgen heeft voor de respons op Cd.

A. Genexpressie van pro-oxidatieve enzymen in de wortels

De eerste groep enzymen die bestudeerd werden, zijn pro-oxidatief; ze kunnen leiden tot een verhoogde ROS-accumulatie in stresscondities. Zowel de effecten op de genexpressie van **lipoxygenasen** als **NADPH-oxidasen** – *i.e.* 'respiratory burst oxidase homolog' (RBOH) – werden in beeld gebracht via real-time PCR. In de wortels van het Cd-behandelde wildtype verhoogt enkel 10 μM de *LOX1*-expressie significant en sterk, terwijl in de mutant 5 μM Cd reeds een significante verhoging teweegbrengt. De expressie van *LOX2* blijft onveranderd, terwijl deze van de overige LOX-isovormen toeneemt ten gevolge van Cd-stress (meestal bij 10 μM) in beide genotypes. Isovorm 3 vertoont zelfs een sterkere transcriptieel upregulatie dan *LOX1*. De uitzondering hier is *LOX5*; deze isovorm wordt door Cd transcriptieel onderdrukt in beide genotypes (Tabel 3.1). De NADPH-oxidasen vertonen een uniform verhoogde genexpressie na Cd-blootstelling in de wortels van zowel Col-0 als *lox1* mutante *Arabidopsis thaliana* planten, met uitzondering van de *RBOHC*-transcripten (Tabel 3.1).

Tabel 3.1: Genexpressie van enzymen in de wortels van onbehandelde en Cd-behandelde wildtype (Col-0) en *lox1* mutante (*lox1*) *Arabidopsis thaliana* planten. De eerste kolom geeft aan om welk gen het gaat en tot welke klasse dit gen behoort. De kolom 'ONBEHANDELD' geeft transcriptionele verschillen onder controleomstandigheden aan, waarbij *lox1* relatief ten opzichte van Col-0 ($1.00 \pm \text{S.E.}$) wordt weergegeven. Vervolgens wordt per genotype de genexpressie na Cd-blootstelling relatief ten opzichte van de eigen controle ($0 \mu\text{M Cd}$ bij Col-0 en *lox1*; $1.00 \pm \text{S.E.}$) aangegeven. De analyse vond plaats in de wortels van drie weken oude *Arabidopsis thaliana* plantjes blootgesteld aan 5 of $10 \mu\text{M Cd}$ gedurende 24 uur of gegroeid onder controleomstandigheden. De waarden zijn het gemiddelde \pm S.E. van vijf biologisch onafhankelijke replica's. Afkortingen: LOX, lipoxygenase; RBOH, 'respiratory burst oxidase homolog'; CSD, Cu/Zn-superoxidedismutase; FSD, Fe-superoxidedismutase; APX, ascorbaatperoxidase; CAT, catalase; OXI1: oxidative stress inducible kinase 1; CDPK1, calcium-afhankelijk proteïne kinase 1; MKK2, MAPK kinase 2; WRKY25, DNA-bindingseiwit (transcriptiefactor); ZAT12, H_2O_2 -responsief zink finger proteïne; FAD, vetzuurdesaturase; AOS, alleenoxide-synthase; AOC: alleenoxide-cyclase; OPR, OPDA-reductase; ACX, acyl-CoA-oxidase; MFP, multifunctioneel eiwit; KAT, L-3-ketoacyl-CoA-thiolase; JMT, jasmonaat-carboxylmethyltransferase; MPK6, MAPK6. Significantieniveaus: ■ en ■: $p < 0.1$; ■ en ■: $p < 0.05$; ■ en ■: $p < 0.01$ voor respectievelijk een verhoogde en verlaagde transcriptie (ANOVA).

WORTEL	ONBEHANDELD		Col-0		<i>lox1</i>	
	Col-0	<i>lox1</i>	$5 \mu\text{M Cd}$	$10 \mu\text{M Cd}$	$5 \mu\text{M Cd}$	$10 \mu\text{M Cd}$
PRO-OXIDATIEVE ENZYMEN						
<i>LOX1</i>	1.00 ± 0.15	0.07 ± 0.00	2.62 ± 0.75	104.72 ± 5.50	2.19 ± 0.22	68.63 ± 8.52
<i>LOX2</i>	1.00 ± 0.46	1.85 ± 0.44	0.94 ± 0.27	1.16 ± 0.14	0.79 ± 0.14	0.46 ± 0.26
<i>LOX3</i>	1.00 ± 0.01	0.64 ± 0.25	2.23 ± 0.99	435.05 ± 33.82	1.85 ± 0.46	357.22 ± 51.02
<i>LOX4</i>	1.00 ± 0.16	0.99 ± 0.19	1.89 ± 0.27	51.37 ± 6.97	2.78 ± 0.62	34.77 ± 6.16
<i>LOX5</i>	1.00 ± 0.17	0.38 ± 0.03	0.47 ± 0.11	0.94 ± 0.06	0.45 ± 0.07	0.64 ± 0.10
<i>LOX6</i>	1.00 ± 0.09	0.92 ± 0.04	0.78 ± 0.17	3.08 ± 0.37	1.02 ± 0.07	2.38 ± 0.26
<i>RBOHA</i>	1.00 ± 0.12	0.88 ± 0.06	1.34 ± 0.21	3.31 ± 0.17	1.83 ± 0.15	3.71 ± 0.23
<i>RBOHB</i>	1.00 ± 0.07	0.61 ± 0.06	1.15 ± 0.27	2.53 ± 0.21	1.51 ± 0.20	2.37 ± 0.42
<i>RBOHC</i>	1.00 ± 0.10	0.52 ± 0.03	0.80 ± 0.14	0.75 ± 0.07	0.85 ± 0.06	0.93 ± 0.18
<i>RBOHD</i>	1.00 ± 0.18	0.34 ± 0.03	1.82 ± 0.37	7.21 ± 0.88	1.84 ± 0.26	4.05 ± 0.53
<i>RBOHE</i>	1.00 ± 0.03	0.80 ± 0.05	1.63 ± 0.09	3.22 ± 0.34	2.15 ± 0.12	4.30 ± 0.22
<i>RBOHF</i>	1.00 ± 0.03	1.02 ± 0.04	1.35 ± 0.30	2.94 ± 0.21	1.77 ± 0.15	2.95 ± 0.11
ANTIOXIDATIEVE ENZYMEN						
<i>CSD1</i>	1.00 ± 0.06	0.90 ± 0.03	0.34 ± 0.09	1.37 ± 0.11	0.43 ± 0.03	1.56 ± 0.02
<i>CSD2</i>	1.00 ± 0.05	1.06 ± 0.02	0.61 ± 0.15	1.30 ± 0.09	0.68 ± 0.05	1.27 ± 0.12
<i>FSD1</i>	1.00 ± 0.12	0.98 ± 0.13	5.79 ± 1.37	9.77 ± 0.99	9.04 ± 1.00	5.64 ± 0.54
<i>APX1</i>	1.00 ± 0.09	0.74 ± 0.07	0.62 ± 0.15	1.10 ± 0.08	0.65 ± 0.03	0.71 ± 0.03
<i>APX2</i>	1.00 ± 0.25	0.74 ± 0.23	1.43 ± 0.60	38.79 ± 2.48	7.82 ± 3.17	45.90 ± 6.95
<i>CAT1</i>	1.00 ± 0.08	1.48 ± 0.08	1.18 ± 0.29	8.08 ± 0.54	1.13 ± 0.12	7.41 ± 0.59
<i>CAT2</i>	1.00 ± 0.08	0.26 ± 0.02	0.64 ± 0.15	0.69 ± 0.02	0.87 ± 0.12	0.41 ± 0.05
<i>CAT3</i>	1.00 ± 0.17	0.46 ± 0.03	1.23 ± 0.29	3.50 ± 0.77	0.88 ± 0.20	1.16 ± 0.23
SIGNALLING ENZYMEN						
<i>OXI1</i>	1.00 ± 0.11	0.40 ± 0.03	2.04 ± 0.50	12.84 ± 1.66	2.54 ± 0.23	20.84 ± 5.71
<i>CDPK1</i>	1.00 ± 0.01	0.88 ± 0.02	1.16 ± 0.08	3.39 ± 0.30	1.25 ± 0.09	3.65 ± 0.32
<i>MKK2</i>	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.01	1.21 ± 0.07	3.03 ± 0.14	1.42 ± 0.06	3.30 ± 0.19
<i>WRKY25</i>	1.00 ± 0.05	0.90 ± 0.05	1.70 ± 0.03	3.53 ± 0.10	1.77 ± 0.09	3.89 ± 0.19
<i>ZAT12</i>	1.00 ± 0.34	0.45 ± 0.07	2.91 ± 0.98	52.17 ± 2.88	3.05 ± 0.48	45.49 ± 10.78
JASMONAAT-BIOSYNTHESE ENZYMEN						
<i>FAD3</i>	1.00 ± 0.08	0.58 ± 0.02	0.90 ± 0.22	0.28 ± 0.02	0.93 ± 0.05	0.24 ± 0.05
<i>FAD7</i>	1.00 ± 0.10	0.99 ± 0.03	1.13 ± 0.16	1.65 ± 0.19	0.86 ± 0.01	1.11 ± 0.17
<i>AOS</i>	1.00 ± 0.23	0.15 ± 0.01	0.80 ± 0.29	2.97 ± 0.65	1.19 ± 0.04	1.37 ± 0.34
<i>AOC3</i>	1.00 ± 0.03	0.78 ± 0.06	1.31 ± 0.03	4.15 ± 0.72	1.36 ± 0.06	3.66 ± 0.29
<i>OPR2</i>	1.00 ± 0.11	0.30 ± 0.03	1.04 ± 0.26	2.83 ± 0.22	0.86 ± 0.07	5.16 ± 1.53
<i>OPR3</i>	1.00 ± 0.02	0.85 ± 0.08	0.94 ± 0.05	1.65 ± 0.13	0.69 ± 0.06	1.22 ± 0.20
<i>ACX1</i>	1.00 ± 0.07	0.74 ± 0.02	1.48 ± 0.06	9.22 ± 1.11	2.05 ± 0.20	9.44 ± 0.62
<i>ACX2</i>	1.00 ± 0.08	0.84 ± 0.03	0.88 ± 0.18	2.35 ± 0.12	1.40 ± 0.17	3.48 ± 0.12
<i>MFP2</i>	1.00 ± 0.13	0.23 ± 0.02	0.93 ± 0.20	2.34 ± 0.35	0.56 ± 0.08	0.96 ± 0.13
<i>KAT1</i>	1.00 ± 0.07	0.88 ± 0.01	1.07 ± 0.15	1.55 ± 0.06	0.87 ± 0.02	1.00 ± 0.04
<i>KAT2</i>	1.00 ± 0.29	0.18 ± 0.05	0.91 ± 0.44	1.54 ± 0.52	0.52 ± 0.10	3.82 ± 1.25
<i>JMT</i>	1.00 ± 0.07	0.93 ± 0.09	0.64 ± 0.13	0.06 ± 0.02	0.82 ± 0.06	0.02 ± 0.00
JASMONAAT-RESPONSIEF ENZYM						
<i>MPK6</i>	1.00 ± 0.12	0.97 ± 0.01	1.06 ± 0.14	1.92 ± 0.13	1.04 ± 0.05	1.55 ± 0.08

B. Genexpressie van antioxidatieve enzymen in de wortels

De plantencel beschikt over een uitgebreid antioxidatief verdedigingssysteem om toxische ROS-accumulatie tengevolge van metaalstress te voorkomen. Dit systeem bestaat uit enzymatische en niet-enzymatische componenten. In deze analyse werd gefocust op de transcriptionele effecten op de enzymen die verantwoordelijk zijn voor de **scavenging van $\text{O}_2^{\cdot -}$ en H_2O_2** . Wat betreft de enzymen die $\text{O}_2^{\cdot -}$ dismuteren, verlaagt in de wortels van beide genotypes de expressie van *CSD1* en *CSD2* bij $5 \mu\text{M Cd}$, terwijl blootstelling aan $10 \mu\text{M Cd}$ een lichte stijging induceert. De *FSD1*-expressie wordt over de volledige lijn sterk verhoogd. In het wildtype neemt de transcriptie het sterkst toe bij $10 \mu\text{M Cd}$; in de mutant

echter reageert dit enzym op transcriptioneel niveau het meest bij blootstelling aan 5 μM Cd (Tabel 3.1).

De H_2O_2 -scavenging enzymen APX1 en APX2 reageren in de wortels op transcriptioneel niveau tegenovergesteld. Terwijl de APX1-expressie afneemt, neemt deze van APX2 sterk toe na blootstelling aan 10 μM Cd in beide genotypes. In het wildtype herstelt de APX1-expressie na een daling bij 5 μM opnieuw bij 10 μM , terwijl de daling persistent is in de *lox1*-mutant. Een tweede groep enzymen die H_2O_2 scavengen, zijn de catalasen. De genexpressie van CAT1 vertoont een sterke upregulatie na blootstelling van *Arabidopsis* zaailingen aan 10 μM Cd. In het wildtype verlaagt de CAT2-genexpressie significant bij 5 μM Cd, terwijl in de mutant enkel een dalende trend wordt waargenomen. Tenslotte verhoogt de transcriptie van CAT3 significant in het wildtype, terwijl in de *lox1* mutant geen significante effecten optreden (Tabel 3.1). Opvallend is ook het duidelijk verschil in genexpressie van APX1 en de catalasen in beide genotypes onder controleomstandigheden ('ONBEHANDELD' in Tabel 3.1).

C. Cadmiumgeïnduceerde signaaltransductiepathways in de wortels

De '**mitogen-activated protein kinase**' (MAPK)-familie vormt mogelijk een centrale signalisatiecascade belangrijk in diverse (a)biotische stresscondities, zoals blootstelling aan Cd en Cu [52,53]. Uit eerdere resultaten binnen de onderzoeksgroep komt voornamelijk het 'oxidative stress inducible kinase 1' (*OXI1*) naar voren als één van de sterkst geïnduceerde genen van de MAPK-familie na Cd- of Cu-blootstelling [2]. In de wortels van onbehandelde *lox1*-mutanten is de expressie van *OXI1* significant verlaagd ten opzichte van deze in het wildtype ('ONBEHANDELD' in Tabel 3.1). Blootstelling aan Cd leidt bij beide genotypes tot een sterk verhoogde *OXI1*-expressie (Tabel 3.1). Aangezien stressfactoren zoals Cd altijd meerdere regulerende pathways activeren, werd in dit project ook de transcriptionele respons van een calcium-afhankelijk kinase (CDPK1), een MAPK kinase (MKK2) en twee transcriptiefactoren (WRKY25 en ZAT12) bestudeerd. De genen coderend voor deze signalling componenten kwamen in het verleden naar voren als zijnde Cd-responsief [2]. In de wortels van onbehandelde *lox1*-mutanten vertonen de gemeten signaaltransductiegenen een verlaagde genexpressie, die – naast *OXI1* – enkel voor *CDPK1* significant is ('ONBEHANDELD' in Tabel 3.1). Blootstelling aan Cd veroorzaakt in de wortels van beide genotypes een uniform verhoogde genexpressie van de gemeten signalling enzymen (Tabel 3.1).

D. De invloed van Cd op de JA-biosynthese in de wortels: effecten op transcriptioneel niveau

Aangezien ook **jasmonaten** (JA) gesuggereerd worden als belangrijke signaaltransductiemoleculen tijdens Cd-stress [17], werd in het verleden reeds de genexpressie van de enzymen verantwoordelijk voor de biosynthese van deze moleculen bestudeerd in de onderzoeksgroep Milieubiologie. Uit deze resultaten bleek dat de expressie van de JA-biosynthese genen duidelijk toeneemt tijdens Cd-stress [26]. Aangezien LOX1 mogelijks betrokken is bij de productie van JA, werd de rol van de enzymen die instaan voor de JA-biosynthese in *lox1*-mutanten in dit project bestudeerd. Op basis van eerdere resultaten werden verschillende enzymen uit de biosynthesepathway geselecteerd en werd vervolgens het effect van Cd-stress op hun genexpressie bepaald. In de wortels valt onmiddellijk de uniform onderdrukte genexpressie van de biosynthese-enzymen in de onbehandelde *lox1*-mutant ten opzichte van het wildtype op ('ONBEHANDELD' in Tabel 3.1).

De genexpressie van de twee bestudeerde FAD-isovormen vertoont in het wildtype een verschillende respons op Cd. Daar waar de *FAD3*-expressie significant daalt bij 10 μM Cd, neemt deze van *FAD7* toe. In de *lox1*-mutant vertoont deze laatste echter geen significante veranderingen, net zoals *AOS* en *OPR3*, enzymen die in het wildtype transcriptioneel wel toenemen. Blootstelling aan Cd leidt tot een verhoogde expressie van *AOC3*, *OPR2*, *ACX1* en *ACX2* in beide genotypes. Daar waar *MFP2* en *KAT1* transcriptioneel

toenemen in het wildtype, treedt een significante daling op in de *lox1*-mutant. De *KAT2*-expressie stijgt enkel in de *lox1*-mutant, terwijl de *JMT*-expressie sterk daalt in beide genotypes (Tabel 3.1).

Eén van de **downstream componenten** van jasmonaten is de MAPK-cascade MAPK kinase 3 – MAPK6 (MKK3-MPK6). Takahashi *et al.* (2007) toonden aan dat MPK6 geactiveerd wordt door JA, waarbij ook MKK3 een rol speelt [54]. In de wortels van zowel wildtype als *lox1* mutante planten leidt de hoogst toegediende Cd-concentratie tot een verhoogde *MPK6*-expressie (Tabel 3.1).

Tabel 3.2: Genexpressie van enzymen in de **blaadjes** van onbehandelde en Cd-behandelde wildtype (Col-0) en *lox1* mutante (*lox1*) *Arabidopsis thaliana* planten. De eerste kolom geeft aan om welk gen het gaat en tot welke klasse dit gen behoort. De kolom 'ONBEHANDELD' geeft transcriptieel verschillen onder controleomstandigheden aan, waarbij *lox1* relatief ten opzichte van Col-0 ($1.00 \pm \text{S.E.}$) wordt weergegeven. Vervolgens wordt per genotype de genexpressie na Cd-blootstelling relatief ten opzichte van de eigen controle ($0 \mu\text{M Cd}$ bij Col-0 en *lox1*; $1.00 \pm \text{S.E.}$) aangegeven. De analyse vond plaats in de wortels van drie weken oude *Arabidopsis thaliana* plantjes blootgesteld aan 5 of 10 $\mu\text{M Cd}$ gedurende 24 uur of gegroeid onder controleomstandigheden. De waarden zijn het gemiddelde \pm S.E. van vijf biologisch onafhankelijke replica's. Afkortingen: LOX, lipoxygenase; RBOH, 'respiratory burst oxidase homolog'; CSD, Cu/Zn-superoxidedismutase; FSD, Fe-superoxidedismutase; APX, ascorbaatperoxidase; CAT, catalase; OXI1: oxidatieve stress inducible kinase 1; CDPK1, calcium-afhankelijk proteïne kinase 1; MKK2, MAPK kinase 2; WRKY25, DNA-bindingseiwit (transcriptiefactor); ZAT12, H₂O₂-responsief zink finger proteïne; FAD, vetzuurdesaturase; AOS, alleenoxide-synthase; AOC: alleenoxide-cyclase; OPR, OPDA-reductase; ACX, acyl-CoA-oxidase; MFP, multifunctioneel eiwit; KAT, L-3-ketoacyl-CoA-thiolase; JMT, jasmonaat-carboxylmethyltransferase; MPK6, MAPK6. Significantieniveaus:

■ en ■ : $p < 0.1$; ■ en ■ : $p < 0.05$; ■ en ■ : $p < 0.01$ voor respectievelijk een verhoogde en verlaagde transcriptie (ANOVA).

BLAD	ONBEHANDELD		Col-0		<i>lox1</i>	
	Col-0	<i>lox1</i>	5 $\mu\text{M Cd}$	10 $\mu\text{M Cd}$	5 $\mu\text{M Cd}$	10 $\mu\text{M Cd}$
PRO-OXIDATIEVE ENZYMEN						
<i>LOX1</i>	1.00 \pm 0.21	0.30 \pm 0.05	1.24 \pm 0.22	2.77 \pm 0.99	1.37 \pm 0.48	1.85 \pm 0.48
<i>LOX2</i>	1.00 \pm 0.26	1.35 \pm 0.16	4.22 \pm 0.94	3.72 \pm 1.58	3.31 \pm 1.03	4.92 \pm 0.27
<i>LOX3</i>	1.00 \pm 0.18	1.18 \pm 0.11	3.13 \pm 0.53	2.01 \pm 0.68	2.52 \pm 0.42	2.74 \pm 0.62
<i>LOX4</i>	1.00 \pm 0.18	1.07 \pm 0.16	5.83 \pm 0.64	2.87 \pm 0.85	5.96 \pm 0.98	6.15 \pm 0.42
<i>LOX5</i>	1.00 \pm 0.22	1.43 \pm 0.21	3.24 \pm 0.68	4.91 \pm 0.07	2.87 \pm 0.94	1.31 \pm 0.34
<i>LOX6</i>	1.00 \pm 0.18	1.31 \pm 0.06	1.06 \pm 0.21	0.82 \pm 0.32	0.74 \pm 0.17	0.81 \pm 0.04
<i>RBOHC</i>	1.00 \pm 0.44	1.77 \pm 0.52	71.51 \pm 13.01	35.14 \pm 6.47	43.96 \pm 11.71	22.43 \pm 5.32
<i>RBOHD</i>	1.00 \pm 0.16	1.29 \pm 0.20	2.95 \pm 0.63	3.61 \pm 1.42	3.81 \pm 1.20	3.87 \pm 0.97
<i>RBOHE</i>	1.00 \pm 0.21	1.33 \pm 0.17	4.26 \pm 0.78	14.22 \pm 5.19	3.22 \pm 0.38	10.18 \pm 0.97
<i>RBOHF</i>	1.00 \pm 0.18	1.13 \pm 0.10	4.56 \pm 0.69	4.48 \pm 1.77	3.95 \pm 0.61	3.26 \pm 0.20
ANTIOXIDATIEVE ENZYMEN						
<i>CSD1</i>	1.00 \pm 0.23	1.95 \pm 0.11	2.59 \pm 0.38	0.74 \pm 0.21	0.69 \pm 0.17	0.51 \pm 0.12
<i>CSD2</i>	1.00 \pm 0.23	1.66 \pm 0.12	1.06 \pm 0.21	0.15 \pm 0.03	0.29 \pm 0.13	0.19 \pm 0.04
<i>FSD1</i>	1.00 \pm 0.23	0.77 \pm 0.13	0.44 \pm 0.03	0.79 \pm 0.27	1.31 \pm 0.45	1.41 \pm 0.14
<i>APX1</i>	1.00 \pm 0.23	1.42 \pm 0.09	1.71 \pm 0.25	1.66 \pm 0.62	1.21 \pm 0.27	1.44 \pm 0.13
<i>APX2</i>	1.00 \pm 0.28	0.73 \pm 0.13	3.34 \pm 0.59	3.27 \pm 0.30	2.09 \pm 0.78	6.01 \pm 0.65
<i>CAT1</i>	1.00 \pm 0.22	1.04 \pm 0.04	1.43 \pm 0.15	2.05 \pm 0.46	1.38 \pm 0.36	2.67 \pm 0.23
<i>CAT2</i>	1.00 \pm 0.28	1.44 \pm 0.17	0.90 \pm 0.20	0.78 \pm 0.32	0.76 \pm 0.25	1.43 \pm 0.39
<i>CAT3</i>	1.00 \pm 0.26	2.04 \pm 0.45	1.16 \pm 0.33	1.71 \pm 0.70	0.78 \pm 0.14	0.88 \pm 0.24
SIGNALLING ENZYMEN						
<i>OXI1</i>	1.00 \pm 0.25	0.68 \pm 0.11	17.83 \pm 3.36	11.51 \pm 4.21	17.81 \pm 5.24	22.92 \pm 3.17
<i>CDPK1</i>	1.00 \pm 0.20	1.16 \pm 0.07	3.70 \pm 0.46	2.97 \pm 1.03	2.77 \pm 0.62	2.87 \pm 0.28
<i>MKK2</i>	1.00 \pm 0.25	1.50 \pm 0.16	2.62 \pm 0.33	2.12 \pm 0.76	1.40 \pm 0.31	1.47 \pm 0.16
<i>WRKY25</i>	1.00 \pm 0.27	1.32 \pm 0.17	5.40 \pm 0.46	4.29 \pm 1.62	2.84 \pm 0.85	1.51 \pm 0.11
<i>ZAT12</i>	1.00 \pm 0.49	1.35 \pm 0.38	16.04 \pm 4.11	25.70 \pm 15.96	10.35 \pm 4.47	17.07 \pm 3.56
JASMONAAT-BIOSYNTHESE ENZYMEN						
<i>FAD3</i>	1.00 \pm 0.20	0.95 \pm 0.12	0.80 \pm 0.16	0.45 \pm 0.14	0.65 \pm 0.19	0.53 \pm 0.05
<i>FAD7</i>	1.00 \pm 0.18	1.23 \pm 0.14	0.58 \pm 0.12	0.25 \pm 0.10	0.48 \pm 0.12	0.46 \pm 0.03
<i>AOS</i>	1.00 \pm 0.26	3.22 \pm 1.04	2.77 \pm 0.86	2.19 \pm 1.44	0.34 \pm 0.10	2.00 \pm 0.73
<i>AOC3</i>	1.00 \pm 0.22	0.81 \pm 0.08	12.07 \pm 1.92	5.92 \pm 1.67	12.52 \pm 1.43	18.02 \pm 1.88
<i>OPR2</i>	1.00 \pm 0.18	1.11 \pm 0.18	1.61 \pm 0.32	1.32 \pm 0.58	1.26 \pm 0.29	3.35 \pm 1.02
<i>OPR3</i>	1.00 \pm 0.19	1.49 \pm 0.09	4.61 \pm 0.96	2.27 \pm 0.83	2.89 \pm 0.51	3.91 \pm 0.63
<i>ACX1</i>	1.00 \pm 0.18	1.30 \pm 0.09	4.62 \pm 0.74	3.51 \pm 1.16	3.83 \pm 0.48	7.07 \pm 1.26
<i>ACX2</i>	1.00 \pm 0.20	1.46 \pm 0.08	2.09 \pm 0.04	3.19 \pm 0.69	1.08 \pm 0.10	4.26 \pm 0.71
<i>MFP2</i>	1.00 \pm 0.26	1.29 \pm 0.27	2.29 \pm 0.58	4.45 \pm 1.47	3.71 \pm 0.88	14.95 \pm 5.87
<i>KAT1</i>	1.00 \pm 0.11	1.19 \pm 0.08	0.72 \pm 0.14	0.57 \pm 0.16	0.54 \pm 0.15	2.99 \pm 0.92
<i>KAT2</i>	1.00 \pm 0.26	1.54 \pm 0.24	3.20 \pm 0.96	14.10 \pm 7.84	0.78 \pm 0.37	25.77 \pm 9.38
<i>JMT</i>	1.00 \pm 0.27	0.95 \pm 0.12	1.07 \pm 0.26	0.40 \pm 0.11	0.93 \pm 0.40	0.70 \pm 0.14
JASMONAAT-RESPONSIEF ENZYM						
<i>MPK6</i>	1.00 \pm 0.13	1.17 \pm 0.05	1.76 \pm 0.25	1.07 \pm 0.35	1.20 \pm 0.10	1.03 \pm 0.17

Transcriptionele responsen in de blaadjes van wildtype versus *lox1* mutante planten

De blaadjes van de gekweekte planten komen in het hydropoon systeem niet onmiddellijk in contact met Cd, wat de reacties op transcriptioneel niveau mogelijks beïnvloedt (Tabel 3.2). Opvallend is dat het eerder geobserveerde patroon betreffende de genexpressie in de wortels van onbehandelde *lox1*-mutanten zich voor sommige genen omkeert in de blaadjes ('ONBEHANDELD' in Tabel 3.2).

A. Genexpressie van pro-oxidatieve enzymen in de blaadjes

In de blaadjes vertonen de meeste ROS-producerende enzymen een transcriptionele upregulatie in beide genotypes na Cd-blootstelling. Een uitzondering hierop is *LOX1*; de expressie neemt enkel in het wildtype significant toe (Tabel 3.2). Opvallend is dat de genexpressie van *RBOHC* significant verhoogd is in de *lox1*-mutant onder controleomstandigheden, terwijl deze van *LOX1* lager ligt ten opzichte van de expressie in de blaadjes van het wildtype ('ONBEHANDELD' in Tabel 3.2).

B. Genexpressie van antioxidatieve enzymen in de blaadjes

Na Cd-blootstelling neemt de *CSD1*-expressie bij 5 μM in het wildtype toe, terwijl de mutant een significant lagere genexpressie vertoont. De *CSD2*-expressie wordt in beide genotypes significant verlaagd (Tabel 3.2). Wat betreft de enzymen die H_2O_2 neutraliseren, verhoogt de *APX1*-expressie enkel significant in de mutant na blootstelling aan 10 μM Cd, terwijl *APX2* transcriptioneel wordt verhoogd in beide genotypes. Enkel de *CAT1*-expressie stijgt in beide genotypes bij 10 μM Cd (Tabel 3.2).

C. Cadmiumgeïnduceerde signaaltransductiepathways in de blaadjes

Net zoals in de wortels wordt de genexpressie van *OXI1* in de blaadjes in beide genotypes sterk verhoogd. Ook de overige enzymen betrokken bij cadmiumgeïnduceerde signaaltransductie vertonen over het algemeen een upregulatie die gelijkaardig is in wildtype en *lox1*-mutant (Tabel 3.2).

D. De invloed van Cd op de JA-biosynthese in de blaadjes: effecten op transcriptioneel niveau

Blootstelling aan Cd verlaagt de genexpressie van de gemeten FAD-isovormen in beide genotypes. De overige enzymen (uitgezonderd AOS) vertonen in zowel wildtype als *lox1* mutante planten een gelijkaardig gestegen genexpressie. De *KAT1*-expressie echter verlaagt significant in het wildtype, terwijl 10 μM Cd een lichte stijging induceert in de *lox1*-mutant. Er manifesteert zich een dalende trend in de *JMT*-expressie in het wildtype, die in de *lox1* mutante planten minder tot uiting komt (Tabel 3.2). De genexpressie van het JA-responsief *MPK6* tenslotte stijgt enkel significant bij 5 μM Cd in de blaadjes van het wildtype (Tabel 3.2).

3.1.3 Wildtype en *lox1*-mutant: geobserveerde verschillen onder controleomstandigheden

Onbehandelde *lox1*-mutanten vertonen enkele opmerkelijke verschillen betreffende de cellulaire redoxstatus en signaaltransductie, die naar alle waarschijnlijkheid te wijten zijn aan het gebrek aan functionele *LOX1*-enzymen en wat meer licht werpt op de rol van *LOX1* onder normale omstandigheden. Zo vertonen de wortels van de *lox1*-mutant een verhoogde basale concentratie TBA-reactieve metabolieten, een patroon dat zich omkeert in de blaadjes. De membranen van *lox1*-mutanten zouden dus potentieel al onder controleomstandigheden beschadigd zijn ten opzichte van deze van wildtype planten. Aangezien beide genotypes enkel verschillen in de aan- of afwezigheid van functionele *LOX1*-enzymen, zou de geobserveerde respons erop kunnen wijzen dat *LOX1* beschermend werkt tegen lipidenperoxidatie in de wortels, mogelijks via de synthese van oxylipines.

Ook op het niveau van transcriptie komen enkele verschillen tussen beide genotypes voor, zowel in de wortels als in de blaadjes. Opvallend is dat de *LOX1*-transcriptie in onbehandelde *lox1*-mutanten sterk verlaagd is ten opzichte van deze in het wildtype. In het onbehandelde wildtype functioneert LOX1 normaal, waardoor alle producten van LOX1-geïnduceerde pathways gevormd worden (verschillende oxylipines). Deze producten zouden er via een positief feedbackmechanisme voor kunnen zorgen dat de transcriptie van *LOX1* op peil blijft. In de onbehandelde mutant zorgt het gebrek aan functionele LOX1-enzymen er mogelijk voor dat er minder producten gevormd worden, waardoor potentiële feedbackmechanismen achterwege blijven. Dit zou de downregulatie van *LOX1*-transcriptie in de wortels en blaadjes van de onbehandelde *lox1*-mutant ten opzichte van het wildtype kunnen verklaren.

Zowel LOX1 als LOX5 behoren tot de 9-LOXen en hebben dus dezelfde positionele specificiteit met betrekking tot de oxygenatie-reactie die ze uitvoeren. Toch zorgt inhibitie van LOX1 onder controleomstandigheden niet voor een upregulatie van LOX5 om het gebrek aan 9-LOX activiteit te compenseren, althans niet op het niveau van transcriptie. In de toekomst is het van belang te bepalen wat de invloed is van het verhinderen van *LOX1*-transcriptie op de eiwithoeveelheid en -activiteit van de overige lipoxygenasen, wat hun rol onder controleomstandigheden kan toelichten.

Naast de lipoxygenasen zijn ook de NADPH-oxidasen belangrijke **pro-oxidatieve enzymen** in planten. Over het algemeen is de genexpressie van de gemeten NADPH-oxidasen verlaagd in de wortels van onbehandelde *lox1*-mutanten ten opzichte van het wildtype. In de blaadjes is enkel de genexpressie van *RBOHC* hoger in de onbehandelde *lox1*-mutant. Of deze transcriptionele effecten zich ook op andere biologische niveaus doordrukken, moet in de toekomst zeker bepaald worden. Aangezien deze enzymen $O_2^{\cdot-}$ produceren, kan ook een bepaling van de concentratie aan deze ROS-vorm bijdragen aan een verhoogd inzicht betreffende de rol van NADPH-oxidasen in wildtype versus *lox1* mutante planten.

Ook op het niveau van de **antioxidatieve verdediging** vertonen beide genotypes zowel in wortel als blad enkele opmerkelijke verschillen. Zo verschilt de genexpressie van *APX1* en de catalasen in de wortels van beide genotypes onder controleomstandigheden. Dit verklaart mogelijks de geobserveerde verhoogde lipidenperoxidatie in de wortels van onbehandelde *lox1*-mutanten ten opzichte van wildtype planten. Immers, de verminderde genexpressie van *APX1*, *CAT2* en *CAT3* kan impliceren dat er minder ROS worden weggevangen, waardoor ROS-gemedieerde membraanschade toeneemt en de transcriptie van eerder genoemde genen zelfs verder negatief beïnvloed kan worden. In de blaadjes is de basale genexpressie van de gemeten antioxidatieve enzymen in de *lox1*-mutant in ieder geval gelijk of hoger dan in het wildtype, in tegenstelling tot deze in de wortels. Dit is een mogelijke verklaring voor het geobserveerde verlaagde niveau van lipidenperoxidatie in de blaadjes van onbehandelde *lox1*-mutanten ten opzichte van wildtype planten. Immers, door een verhoogde basale transcriptie van de antioxidatieve enzymen en dus mogelijks ook hun enzymactiviteit, worden eventueel meer ROS weggevangen en zou er minder ROS-gemedieerde membraanschade optreden. Deze hypothesen moeten genuanceerd worden in het kader van het niveau waarop gemeten wordt; een veranderde genexpressie impliceert niet altijd een veranderde eiwitconcentratie en/of -activiteit. Dit moet in de toekomst zeker geverifieerd worden.

Zowel de leden van de '**mitogen-activated protein kinase**' (MAPK)-familie als de **jasmonaten** zijn belangrijke signaaltransductiecomponenten die naast hun rol in metaalgeïnduceerde signalling ook belangrijk zijn voor het normale metabolisme van planten. De enzymatische activiteit van lipoxygenasen speelt een belangrijke rol in het begin van de JA-biosynthesecascade. Het gebrek aan functionele LOX1-enzymen in de *lox1*-mutant zou de reden kunnen zijn voor de (bijna) volledige inhibitie van de genexpressie van de biosynthese-enzymen in de wortels. Toch sluit deze onderdrukking niet uit dat

jasmonaten geproduceerd worden in de mutant aangezien ook andere lipoxygenasen bij dit proces betrokken kunnen zijn. Opmerkelijk is dat dit patroon in de blaadjes van *lox1*-mutanten volledig verdwijnt. Een mogelijke verklaring hier is dat LOX1 in de wortels een meer cruciale rol speelt voor het metabolisme, mogelijks via de synthese van jasmonaten. Deze hypothese wordt ondersteund door de verlaagde expressie van *LOX1* in de blaadjes ten opzichte van de wortels onder controleomstandigheden (data niet getoond). In de blaadjes werd LOX2 in het verleden al naar voren geschoven als zijnde een belangrijk enzym tijdens controle- en stresssituaties [2,25,26]. Bovendien is de basale genexpressie van dit enzym is veel lager in de wortels dan in de blaadjes (data niet getoond). Deze lipoxygenase-isovorm neemt mogelijks een belangrijke rol in tijdens signaaltransductie in de blaadjes.

Uit bovenstaande data kan geconcludeerd worden dat het verhinderen van de functie van LOX1 in de wortels de transcriptie van enkele belangrijke enzymen betrokken bij de cellulaire redoxstatus en belangrijke signaaltransductiepathways downreguleert. Deze componenten bevinden zich vermoedelijk dus downstream van LOX1, wat van dit enzym een aantrekkelijke kandidaat maakt als belangrijke speler in de cellulaire respons op zware metalen zoals Cd. Immers, tijdens metaalstress moeten deze enzymen geactiveerd worden om oxidatieve stress te beperken en eventueel te verhinderen. De uitzondering hier is CAT1; de genexpressie van dit H₂O₂-scavenging enzym is in de mutant hoger dan in het wildtype. In de blaadjes echter vertonen de gemeten enzymen eerder een verhoogde transcriptie in de onbehandelde *lox1*-mutant. Deze resultaten suggereren dat LOX1 voornamelijk belangrijk zou kunnen zijn voor signalling in de wortel en van de wortel naar het blad, maar dat in het blad zelf andere mechanismen kunnen optreden.

3.1.4 Wildtype en *lox1*-mutant: Cd-geïnduceerde responsen met betrekking tot de cellulaire redoxstatus en signaaltransductie

Ook al vertonen de wortels en blaadjes van wildtype en *lox1* mutante planten blootgesteld aan Cd een gelijkaardige Cd-opname, toch treden enkele genotype-afhankelijke responsen op met betrekking tot de cellulaire redoxstatus en geïnduceerde signaaltransductiemechanismen. Blootstelling aan Cd induceert oxidatieve stress, wat gekenmerkt wordt door een toegenomen H₂O₂-concentratie in wortel en blad [2,26]. Daar waar wildtype en *lox1*-mutant verschillend reageren op Cd in de wortels, loopt het patroon in de blaadjes vrijwel gelijk. Een tweede parameter van oxidatieve stress is lipidenperoxidatie. Blootstelling aan Cd leidt tot een verhoogde lipidenperoxidatie in de wortels van het wildtype, wat consistent is met eerdere observaties binnen de onderzoeksgroep [26]. In de *lox1*-mutant echter worden geen significante effecten waargenomen. Dit is mogelijk te wijten aan het gebrek aan functionele LOX1-activiteit in de mutant, die in het wildtype wel kan reageren op blootstelling aan Cd en bijgevolg lipidenperoxidatie kan induceren. In de blaadjes van het wildtype leidt Cd niet tot een verhoging van lipidenperoxidatie, een effect wat eveneens overeenkomt met eerder geobserveerde resultaten [26]. In de blaadjes van de *lox1*-mutant echter veroorzaakt Cd wel lipidenperoxidatie. Aangezien *LOX1* hoofdzakelijk in de wortels tot expressie komt, kunnen in de blaadjes andere mechanismen leiden tot het verhoogde niveau van lipidenperoxidatie. Een opvallend verschijnsel tenslotte is dat zowel de H₂O₂-concentratie als het niveau van lipidenperoxidatie hoger zijn in de blaadjes dan in de wortels. Dit is waarschijnlijk te wijten aan de aanwezigheid van de fotosynthetische elektrontransportketen in het blad, waardoor het basaal niveau van deze oxidatieve stressgerelateerde parameters toeneemt.

Zoals reeds eerder vermeld, steunt de hypothese dat LOX1 een belangrijke rol zou spelen tijdens Cd-stress op de eerder geobserveerde sterk verhoogde transcriptie van dit enzym, vooral in de wortels [2,26]. Blootstelling aan Cd veroorzaakt een toegenomen productie van verschillende oxylipines,

waaronder de jasmonaten [17]. Dit is mogelijk de reden voor de sterk verhoogde transcriptie van *LOX1* in de wortels van het wildtype, die echter ook optreedt in de *lox1*-mutant. Aangezien niet enkel *LOX1* aanleiding kan geven tot de eerder genoemde producten van de lipoxygenase-pathway, kunnen in de mutant alternatieve routes geactiveerd worden door Cd. Hierdoor kunnen de feedbackmechanismen via oxylipines toch in werking treden en zou mogelijk de *LOX1*-transcriptie toenemen. Deze hypothese moet in de toekomst zeker onderzocht worden door middel van promotorstudies en oxylipine-profiling in zowel onbehandelde als Cd-behandelde wildtype versus *lox1* mutante planten.

Blootstelling aan Cd beïnvloedt in de wortels en blaadjes van wildtype en *lox1* mutante planten de genexpressie van enzymen betrokken bij de cellulaire redoxstatus en signaaltransductie. In de wortels valt bij de **pro-oxidatieve enzymen** vooral de aanzienlijke toename in *LOX3*-genexpressie op. Deze *LOX*-isovorm bevindt zich niet in het cytoplasma, zoals *LOX1*, maar in de plastiden en wordt in de wortels van beide genotypes transcriptieel sterk gestimuleerd door Cd. Mogelijks speelt *LOX3* een belangrijke rol in signalling in de wortel alsook van wortel naar blad. De transcriptionele toename van NADPH-oxidasen onder invloed van Cd-blootstelling wijst op een verhoogde ROS-productie in de wortels, een effect dat eerder onderzoek aantoonde [26]. Deze resultaten bevestigen de rol van NADPH-oxidasen in een ROS-gemedieerde respons op Cd in de wortels. Ook in de blaadjes vertonen de meeste ROS-producerende enzymen op transcriptieel niveau een upregulatie in beide genotypes na Cd-blootstelling. Uitzondering hierop is *LOX1*; de expressie neemt enkel in het wildtype significant toe. Toch is de mate waarin de genexpressie van *LOX1* toeneemt veel minder groot in vergelijking met de respons in de wortels. Vermoedelijk neemt de lipidenperoxidatie (onder andere tengevolge van een verhoogde *LOX*-activiteit) toe ter hoogte van de plaats van blootstelling, *i.e.* de wortels, waar dit proces een belangrijke oorzaak van ROS-generatie is. In de blaadjes leiden waarschijnlijk andere mechanismen tot de inductie van oxidatieve stress. Dit is mogelijks het gevolg van Cd-transport van wortel naar blad; anderzijds kunnen signalisatiemechanismen van wortel naar blad in werking treden. Opmerkelijk is ook dat de geobserveerde stimulatie van *LOX3*-genexpressie in de wortels in de blaadjes helemaal verdwijnt. Dit steunt de hypothese dat *LOX3* een belangrijke rol speelt in signalisatie in en vanuit de wortel (cfr. supra).

Vooraf het enzymatische **antioxidatieve verdedigingssysteem** lijkt in beide genotypes anders te reageren op blootstelling aan Cd. Het meest opvallende verschil schuilt in de genexpressie van *FSD1*. In de wortels reageert dit enzym op transcriptieel niveau in de *lox1*-mutant sterker bij 5 μM Cd. Dit verschil kan mogelijks onder andere verklaard worden door het feit dat de wortels van de *lox1*-mutant een verhoogd stressniveau (meer lipidenperoxidatie in controleomstandigheden) vertonen, waardoor het antioxidantief systeem sneller reageert op bijkomende stressfactoren. Ook zou de snellere inductie van de genexpressie van *FSD1* in de wortels van de mutant zelf verantwoordelijk kunnen zijn voor de verhoogde productie van H_2O_2 bij blootstelling aan 5 μM Cd, een observatie die werd bevestigd door het uitvoeren van een hiërarchische clustering van de bekomen data. Een opmerkelijk verschil tussen Cd-behandelde wortels en blaadjes is de sterke toename in *FSD1*-genexpressie in de wortels, die niet optreedt in de blaadjes van beide genotypes. Het is dus duidelijk dat de geobserveerde inductie van *FSD1* orgaanspecifiek is, zoals reeds eerder werd aangetoond [25,26].

In dit project werden twee groepen van H_2O_2 -scavenging enzymen op transcriptieel niveau bestudeerd. Een belangrijk verschil tussen APX en CAT is de mate van affiniteit voor H_2O_2 ; hoog voor APX en laag voor CAT. Dit maakt van APX ideale enzymen om H_2O_2 als signaalmolecule te reguleren [26,55]. In de wortels neemt de expressie van *APX1* af, terwijl deze van *APX2* in beide genotypes sterk toeneemt onder invloed van Cd-behandeling. In de blaadjes echter verandert de transcriptie van *APX1* nauwelijks;

ook de toename van de *APX2*-genexpressie is beduidend lager. Deze resultaten suggereren dat *APX2* voornamelijk in de wortels van essentieel belang is voor de H_2O_2 -signalling, zowel in wildtype als *lox1* mutante planten. Ook opvallend zijn de transcriptionele verschillen tussen de gemeten catalasen, vooral in de wortels van Cd-behandelde planten. Daar waar de genexpressie van *CAT2* afneemt, stijgt deze van *CAT1* en *CAT3*. Ook al zijn deze effecten enkel in het wildtype significant, toch is de trend ook aanwezig in *lox1*-mutanten. Zoals aangetoond door Zimmermann *et al.* (2006) wordt de activiteit van de verschillende catalase-isovormen gereguleerd door het proces van senescentie, een georganiseerd verlies van normale celfuncties gecontroleerd door de celkern. Hierbij spelen ROS vermoedelijk een essentiële rol, voornamelijk deze afgeleid van peroxisomen (H_2O_2). De initiële stap in dit proces is de transcriptionele downregulatie van het gen coderend voor catalase 2. Hierdoor verhoogt het H_2O_2 -niveau, wat de activerende factor is voor de inductie van *CAT3*-genexpressie en -activiteit [56]. Deze effecten worden eveneens waargenomen in de wortels van Cd-blootgestelde wildtype en *lox1* mutante planten, wat aangeeft dat Cd vroege senescentie induceert.

Zowel de leden van de '**mitogen-activated protein kinase**' (MAPK)-familie als de **jasmonaten** worden beschouwd als belangrijke signaaltransductiecomponenten geïnduceerd door Cd-stress [17,52]. Uit eerdere resultaten binnen de onderzoeksgroep komt voornamelijk het 'oxidative stress inducible kinase 1' (*OXI1*) naar voren als één van de sterkst geïnduceerde genen van de MAPK-familie na Cd- of Cu-blootstelling [2]. Ook andere onderzoeksgroepen suggereren *OXI1* als belangrijke factor in Cd- en Cu-geïnduceerde signaaltransductiepathways. Rentel *et al.* (2004) toonden aan dat zowel de genexpressie als de activiteit van dit kinase geïnduceerd worden door H_2O_2 [53]. Op deze manier vormt dit serine-threonine kinase een essentiële link tussen oxidatieve signaalmoleculen (zoals H_2O_2) en daardoor uitgelokte reacties. Mogelijks vormt *OXI1* een belangrijk onderdeel van een complex netwerk dat lipidensignalling en oxidatieve stress signalen integreert, zoals gedemonstreerd door Anthony *et al.* (2006) [57]. Blootstelling aan Cd leidt in de wortels en blaadjes van het wildtype en de *lox1*-mutant tot een sterk verhoogde *OXI1*-expressie, wat de mogelijke rol van dit kinase in metaalgeïnduceerde signalling bevestigt. Ook de andere gemeten signalling enzymen vertonen zowel in wortel als blad een uniform verhoogde genexpressie; hun rol tijdens metaalstress wordt dus op transcriptioneel niveau bevestigd voor beide genotypes.

Om de rol van jasmonaten tijdens Cd-stress verder toe te lichten, werd in dit project de invloed van metaalbehandeling op de genexpressie van verschillende enzymen die instaan voor de JA-biosynthese bestudeerd in wildtype en *lox1* mutante planten. De synthesecascade start met de vetzuurdesaturasen (FAD), die verantwoordelijk zijn voor de productie van substraten voor de LOXen. De transcriptie van de gemeten isovormen vertoont in beide genotypes een daling of blijft onveranderd onder invloed van Cd (met uitzondering van *FAD7* in de wortels van het wildtype). Deze resultaten suggereren dat Cd-blootstelling leidt tot de inductie van JA-biosynthese, maar niet via FAD. De overige enzymen vertonen in beide genotypes over het algemeen dezelfde transcriptionele respons in zowel wortel als blad, wat niet duidelijk maakt of jasmonaten meer of minder van belang zijn in *lox1*-mutanten. Tenslotte is in de wortels de sterk onderdrukte transcriptie van *JMT* opvallend. Dit enzym zet JA om in methyl-JA, een vluchtige component die in planten een belangrijke rol speelt als signaalmolecule [58]. Vorig onderzoek wees uit dat deze component de expressie van enkele genen die een rol spelen in de biosynthese van JA (*LOX2*, *AOS*, *OPR1* en *OPR3*) induceert. Dit suggereert dat methyl-JA een sleutelfactor is in de JA-signalling, waarbij het zijn eigen productie controleert via een positief feedbackmechanisme [58]. Omdat uit dit experiment blijkt dat de *JMT*-genexpressie afneemt (voornamelijk in de wortels), is het mogelijk

dat de eigenlijke hoeveelheid methyl-JA ook daalt. Hierdoor zou het positief feedbackmechanisme buitenspel worden gezet in Cd-geïnduceerde signaaltransductie in beide genotypes. Mogelijkerwijs impliceren deze resultaten dat de vorming van JA tengevolge van Cd-stress slechts een initieel effect is dat op lange termijn minder van belang wordt. Deze hypothese moet uiteraard bevestigd worden door de effectieve hoeveelheid methyl-JA in wortel en blad van beide Cd-behandelde genotypes te bepalen.

3.2 Metaalgevoeligheid van wildtype versus *lox1* mutante planten

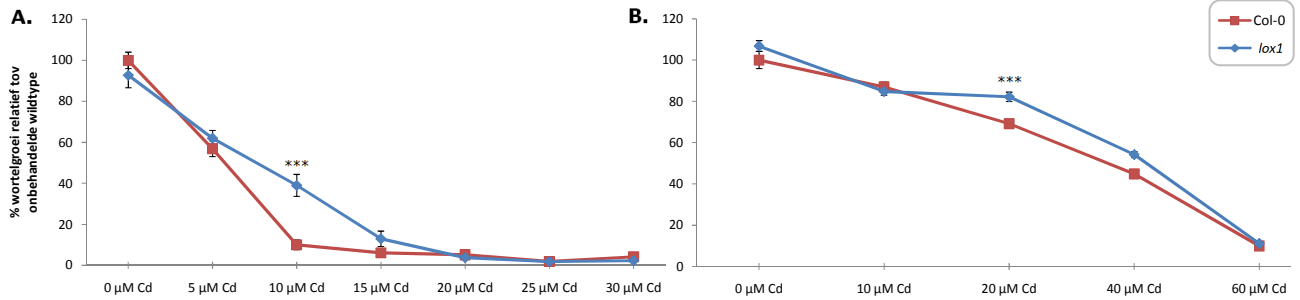
Zowel in de wortels als in de blaadjes van planten blootgesteld aan zware metalen, treden cellulaire en moleculaire effecten op. Zoals aangetoond in het vorige onderdeel, vertonen wildtype en *lox1* mutante planten kleine verschillen wat betreft Cd-geïnduceerde cellulaire responsen op korte termijn. Dit wijst mogelijks op een verschil in gevoeligheid voor het metaal tussen beide genotypes. Om dit te bestuderen, werden beide genotypes gekweekt en blootgesteld aan een reeks Cd-concentraties. Aangezien ook Cu een belangrijk metaal is dat in verhoogde concentraties in het milieu kan voorkomen en eveneens oxidatieve stressresponsen induceert in *Arabidopsis thaliana* [26], werd de gevoeligheid van wildtype planten versus *lox1*-mutanten voor dit metaal eveneens bepaald.

3.2.1 Zware metalen inhiberen de primaire wortelgroei in wildtype en *lox1* mutante planten

Het wortelsysteem van planten is van essentieel belang voor een goede groei en ontwikkeling, maar wordt bij groei op metaalgecontamineerde gronden vaak het eerst aangetast. Daarom is het opvolgen van de wortelgroei van planten blootgesteld aan Cd of Cu een belangrijke parameter voor de mate waarin de planten gevoelig zijn voor beide metalen. Zowel wildtype (Col-0) als *lox1* mutante *Arabidopsis thaliana* planten werden gedurende een week opgekweekt op twee verschillende groeimedia. Het eerste is een traditioneel plantengroeiumedium, dat in het verleden standaard gebruikt werd om de planten op te kweken vooraleer ze te transfereren naar metaalbevattende platen. Echter, indien de planten zich langer dan één week op dit medium bevonden, vertoonden ze verschijnselen van nutriëntendeficiëntie, zoals een verkleurd en verkleind bladoppervlak. Ook al worden de planten in dit experiment slechts gedurende één week gekweekt op hetzelfde medium, zonder enige vorm van nutriëntendeficiëntie, toch werd geopteerd om ook een tweede, rijker groeiumedium te gebruiken om zo de mogelijkheid te creëren voor een langere blootstelling. Bovendien kunnen de resultaten van planten opgegroeid op beide kweekmedia met elkaar vergeleken worden en informatie verstrekken met betrekking tot de gevoeligheid van planten op natuurlijke bodems. De samenstelling van beide media is aangegeven in Tabel 2.1.

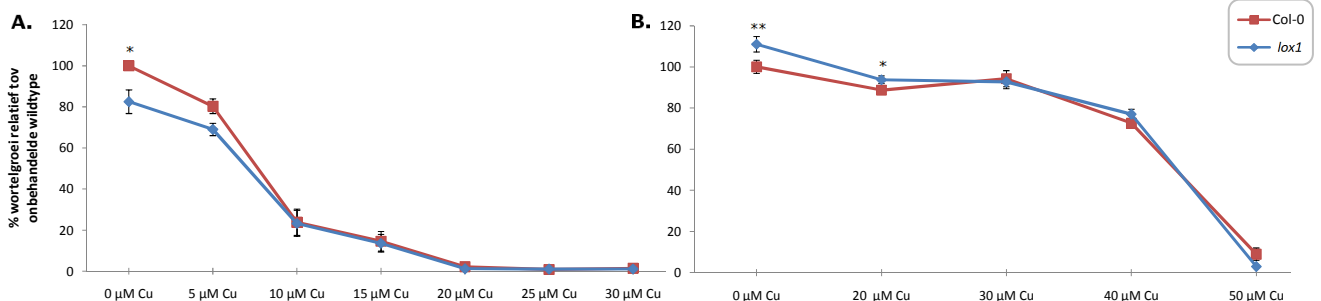
Na één week werden de plantjes, die dan beschikken over geopende zaadlobben en wortels van ongeveer 2 cm lang, getransfereerd naar metaalbevattende groeimedia. De gebruikte Cd- en Cu-concentraties in het originele groeiumedium liggen tussen 0 en 30 μM met telkens een interval van 5 μM , terwijl de metaalconcentraties in het rijker groeiumedium hoger liggen (Cd: 10, 20, 40 of 60 μM ; Cu: 20, 30, 40 of 50 μM). In het nieuwe medium zijn meer nutriënten aanwezig, zodat de competitie voor opname in de plant groter is. Ook kan deze verhoogde nutriëntenconcentratie ervoor zorgen dat een grotere hoeveelheid Cd of Cu gecomplexeerd wordt in het medium, waardoor de fractie biobeschikbare metalen afneemt en de toegediende metaalconcentratie dus moet verhogen.

Voor beide experimenten werd de primaire wortelgroei, rekening houdend met een eventueel verschil in beginlengte tussen wildtype en *lox1*-mutant, tijdens blootstelling aan Cd of Cu bepaald. In Fig. 3.4 wordt de invloed van Cd op de wortelgroei van beide genotypes weergegeven, terwijl Fig. 3.5 de resultaten voor de Cu-blootgestelde planten aangeeft.



Figuur 3.4: De groei van de primaire wortel van wildtype (Col-0) versus *lox1* mutante (*lox1*) *Arabidopsis thaliana* planten tijdens blootstelling aan Cd. Eén week oude planten werden gedurende één week blootgesteld aan verschillende concentraties Cd, waarbij de groei van de primaire wortels werd opgevolgd. De planten werden gekweekt op het traditionele (A) en nieuwe, verrijkte groeimedium (B). De toename in wortellengte tijdens de metaalbehandeling van ten minste 20 biologisch onafhankelijke replica's wordt genormaliseerd ten opzichte van de wortellengte vóór behandeling. De gemiddelde wortelgroei van onbehandelde wildtype planten fungeert als referentiepunt (100%). ***: $p < 0.01$ (Col-0 ten opzichte van *lox1*; niet-parametrische test). Significante verschillen ten opzichte van de eigen controle (*i.e.* het eigen onbehandelde genotype) worden niet aangeduid, maar vermeld in de tekst.

Zoals blijkt uit Fig. 3.4 groeit de primaire wortel van **onbehandelde** *lox1*-mutanten gekweekt op het traditionele groeimedium iets minder goed dan deze van wildtype planten (0 μM Cd; Fig. 3.4A), terwijl deze trend zich omkeert op het nieuwe groeimedium (0 μM Cd; Fig. 3.4B). Over het algemeen vertonen beide genotypes op het nieuwe groeimedium een grotere wortellengte (data niet getoond). Verder leiden alle Cd-concentraties op beide groeimedia tot een significante en sterke daling van de wortelgroei in beide genotypes ten opzichte van onbehandelde planten van hetzelfde genotype ($p < 0.01$; niet aangeduid in Fig. 3.4). De *lox1*-mutant vertoont echter een significant verhoogde wortelgroei bij 10 μM Cd op het traditionele medium (Fig. 3.4A), terwijl op het nieuwe medium de primaire wortel van de mutant minder wordt aangetast dan deze van het wildtype bij 20 μM Cd (Fig. 3.4B). Uit bovenstaande data komt de verlaagde Cd-gevoeligheid van de *lox1*-mutant ten opzichte van het wildtype duidelijk naar voren. Ook valt op dat Cd de wortels van planten gekweekt op het traditionele, iets armere groeimedium sneller aantast. De dalende groeicurven kennen immers een steil verloop, waarbij blootstelling aan 5 μM Cd in het wildtype de wortelgroei reeds met bijna 50% inhibeert. In de mutant is hiervoor een hogere Cd-concentratie (10 μM) nodig, wat consequent is met de verminderde gevoeligheid van de mutant voor Cd (Fig. 3.4A). Wanneer beide genotypes op het nieuwe rijkere medium werden gekweekt, vertonen de groeicurven een minder steil verloop. Hier is voor het wildtype en de *lox1*-mutant een veel hogere Cd-concentratie (40 μM) nodig om de helft van de wortelgroei tijdens metaalbehandeling te inhiberen (Fig. 3.4B). Daar waar de wortels van de *lox1*-mutant duidelijk minder gevoelig blijken voor Cd, is dit niet het geval voor Cu (Fig. 3.5).



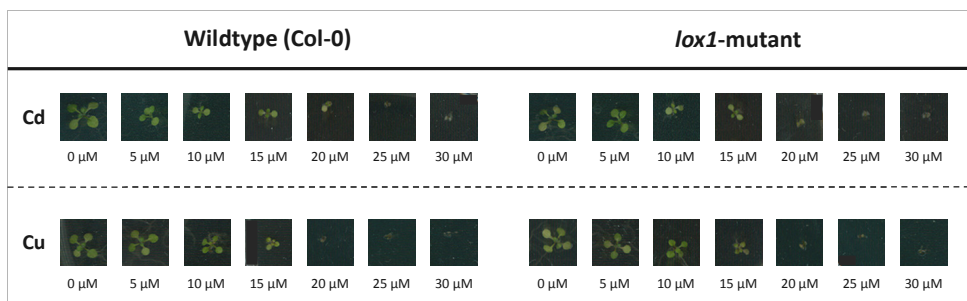
Figuur 3.5: De groei van de primaire wortel van wildtype (Col-0) versus *lox1* mutante (*lox1*) *Arabidopsis thaliana* planten tijdens blootstelling aan Cu. Eén week oude planten werden gedurende één week blootgesteld aan verschillende concentraties Cu, waarbij de groei van de primaire wortels werd opgevolgd. De planten werden gekweekt op het traditionele (A) en nieuwe, verrijkte groeimedium (B). De toename in wortellengte tijdens de metaalbehandeling van ten minste 20 biologisch onafhankelijke replica's wordt genormaliseerd ten opzichte van de wortellengte vóór behandeling. De gemiddelde wortelgroei van onbehandelde wildtype planten fungeert als referentiepunt (100%). Significantiënvous (Col-0 ten opzichte van *lox1*): *: $p < 0.1$; **: $p < 0.05$ (niet-parametrische test). Significante verschillen ten opzichte van de eigen controle (*i.e.* het eigen onbehandelde genotype) worden niet aangeduid, maar vermeld in de tekst.

Hier vertoont de primaire wortel van **onbehandelde** *lox1*-mutanten gekweekt op het traditionele groeimedium een significant kleinere groei dan deze van wildtype planten (0 μM Cu; Fig. 3.5A), terwijl de wortelgroei van de mutanten gekweekt op het nieuwe groeimedium significant groter is (0 μM Cu; Fig. 3.5B). De trend die zich in het Cd-experiment vertoonde (Fig. 3.4) wordt hier dus bevestigd. Ook hier vertonen beide genotypes over het algemeen een grotere wortellengte wanneer ze gekweekt worden op het nieuwe groeimedium (data niet getoond).

Wat betreft de effecten van de **Cu**-behandeling lopen de groeicurven van de wortels van beide genotypes over het algemeen gelijk (Fig. 3.5). Blootstelling aan Cu leidt in wildtype en *lox1* mutante planten gekweekt op het traditionele groeimedium vanaf 10 μM Cu tot een significant verlaagde wortelgroei ten opzichte van het eigen onbehandelde genotype ($p < 0.01$, niet aangeduid in Fig. 3.5A). Dit is ook het geval voor beide genotypes gekweekt op het nieuwe groeimedium en behandeld met 20, 30, 40 of 50 μM Cu ($p < 0.05$ of 0.01, niet aangeduid in Fig. 3.5B). Ook hier kennen de curven een minder steil verloop wanneer de planten gekweekt worden op het rijkere medium, waar pas bij de hoogste Cu-concentratie (50 μM) een volledige groei-inhibitie optreedt (Fig. 3.5B). Bij planten gekweekt op het traditionele groeimedium treedt dit effect veel eerder op (Fig. 3.5A).

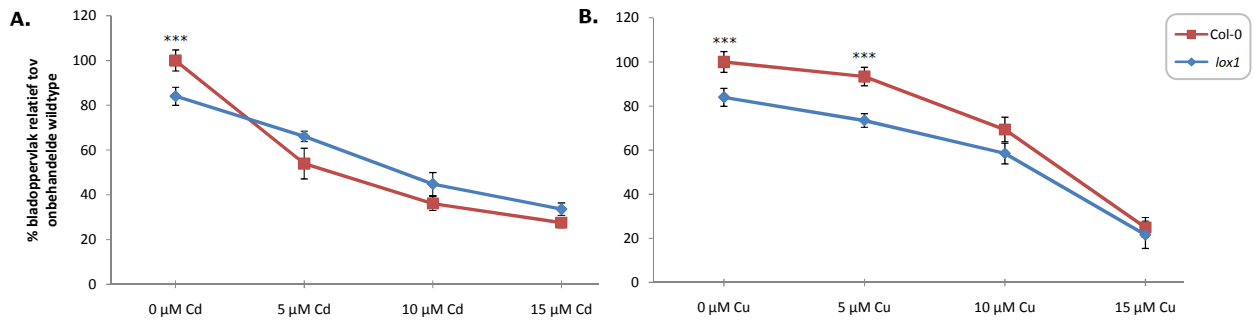
3.2.2 Zware metalen beïnvloeden het bladoppervlak van wildtype en *lox1* mutante planten

Om de effecten van Cd en Cu op het bladoppervlak van wildtype planten versus *lox1*-mutanten te bepalen, werden beide genotypes in cultuur gebracht op ronde agarplaten. Deze bevatten het traditionele groeimedium, waarin verschillende Cd- of Cu-concentraties (tussen 0 en 30 μM , telkens met een interval van 5 μM) werden aangebracht. Vervolgens werden de planten gedurende twee weken gekweekt en dus direct blootgesteld aan de verhoogde zware metaalconcentraties. Tenslotte werd het bladoppervlak van beide genotypes na metaalbehandeling bepaald en vergeleken (Fig. 3.6 en 3.7).



Figuur 3.6: Het effect van Cd en Cu op het bladoppervlak van wildtype (Col-0) versus *lox1* mutante *Arabidopsis thaliana* planten, die gedurende twee weken opgroeiden op metaalbevattend medium. Voor elke toegediende Cd- of Cu-concentratie wordt het bladoppervlak van één plantje representatief voor de overige planten blootgesteld aan dezelfde metaalconcentratie afgebeeld.

Zoals Fig. 3.6 aangeeft hebben de planten blootgesteld aan metaalconcentraties vanaf 20 μM een sterk verkleind bladoppervlak dat de meting bemoeilijkt; deze planten werden daarom uit de verdere analyse geweerd. In Fig. 3.7 wordt de invloed van Cd en Cu op de blaadjes van beide genotypes aangegeven. Een eerste opvallend verschijnsel is het kleinere bladoppervlak van *lox1*-mutanten onder controleomstandigheden ten opzichte van dat van wildtype planten ('0 μM Cd', Fig. 3.7A en '0 μM Cu', Fig. 3.7B). In het wildtype leidt Cd-blootstelling tot een vermindering van de bladoppervlakte ($p < 0.01$ bij elke concentratie ten opzichte van het onbehandelde genotype, niet aangeduid in Fig. 3.7A), wat ook in de mutant het geval is ($p < 0.05$ voor elke concentratie ten opzichte van het onbehandelde genotype, eveneens niet aangeduid in Fig. 3.7A).



Figuur 3.7: Het effect van Cd (A) en Cu (B) op het bladoppervlak van wildtype (Col-0) versus *lox1* mutante (*lox1*) *Arabidopsis thaliana* planten. De planten werden gedurende twee weken blootgesteld aan de aangegeven metaalconcentraties aangebracht in het traditionele groeimedium. De waarden zijn het gemiddelde \pm S.E. van ten minste drie biologisch onafhankelijke replica's, waarbij het bladoppervlak van het onbehandelde wildtype als referentiepunt (100%) wordt gebruikt. ***: $p < 0.01$ (Col-0 ten opzichte van *lox1*; niet-parametrische test). Significante verschillen ten opzichte van de eigen controle (*i.e.* het eigen onbehandelde genotype) worden niet aangeduid, maar vermeld in de tekst.

Toch vertonen de gemeten oppervlakten bij de Cd-behandelde mutant een verhoogde trend ten opzichte van deze bij wildtype planten. Ondanks de kleinere bladoppervlakte in onbehandelde condities kan de mutant zich dus schijnbaar beter handhaven indien Cd-blootstelling optreedt (voornamelijk bij 5 en 10 μM). Dit komt overeen met de verminderde gevoeligheid van de primaire wortel voor Cd (Fig. 3.4A).

Ook Cu induceert een vermindering van het bladoppervlak bij beide genotypes, maar dit effect treedt pas op bij hogere Cu-concentraties. Pas vanaf 10 μM Cu is de daling significant in het wildtype ($p < 0.01$ ten opzichte van het onbehandelde genotype, niet aangeduid in Fig. 3.7B). In de *lox1*-mutant leiden alle concentraties tot een significante afname van het bladoppervlak ($p < 0.1$ voor 5 μM Cu, $p < 0.01$ voor de overige concentraties ten opzichte van het onbehandelde genotype, niet aangeduid in Fig. 3.7B). Wat hier vooral opvalt, is dat de wildtype planten het qua bladoppervlak beter blijven doen dan de *lox1*-mutant, totdat de Cu-concentraties waarschijnlijk toxisch worden.

3.2.3 Integratie van de effecten van Cd en Cu op de wortel- en bladgroei van wildtype versus *lox1* mutante planten

Zowel de ontwikkeling van de wortels als de blaadjes van wildtype en *lox1* mutante planten wordt geïnhibeerd door zware metalen zoals Cd en Cu. Toch treden ook enkele basale verschillen op wanneer de wortels en blaadjes van beide onbehandelde genotypes vergeleken worden. Een eerste consequent geobserveerd effect is de verlaagde primaire wortelgroei van onbehandelde *lox1*-mutanten versus wildtype planten gekweekt op het traditionele groeimedium, een effect dat zich bij gebruik van het rijkere groeimedium omkeert. Deze laatste observatie is in lijn met de resultaten gepubliceerd door Vellosillo *et al.* (2007). Zij toonden aan dat planten zonder LOX1-functie een uitgebreider wortelsysteem met meer laterale wortels ontwikkelen in vergelijking met wildtype planten. Dit betekent dat LOX1 mogelijk mee de wortelontwikkeling in *Arabidopsis thaliana* bepaalt en/of beperkt [35]. De discrepantie van deze data met de data verkregen uit planten gekweekt op het traditionele groeimedium is vermoedelijk te wijten aan de armere samenstelling ervan, die een sterkere negatieve invloed heeft op de wortelontwikkeling van de *lox1*-mutanten in vergelijking met het wildtype. Naar de toekomst toe is het van belang om de invloed van de nutriëntensamenstelling op de wortelontwikkeling van *Arabidopsis thaliana* en de rol van LOX1 hierin verder te ontrafelen.

Tijdens **metaalbehandeling** vertonen de primaire wortels van beide genotypes een betere groei op het nieuwe rijkere groeimedium. Een mogelijke reden hiervoor is de verhoogde aanwezigheid van nutriënten. Deze kunnen ervoor zorgen dat een grotere hoeveelheid Cd of Cu gecomplexed wordt in het medium, waardoor de fractie biobeschikbare metalen afneemt. Ook kunnen aanwezige nutriënten in

competitie treden voor opname met de extra hoeveelheid toegediende zware metalen. De planten nemen dus mogelijk minder Cd of Cu op, waardoor ze over het algemeen beter groeien. Dit effect treedt op in zowel het wildtype als de *lox1*-mutanten en komt overeen met het minder steile verloop van de groeicurven na behandeling met Cd of Cu in vergelijking met de groei op het traditionele medium. De wortels van planten zonder functionele LOX1-enzymen blijken uit dit experiment minder gevoelig voor Cd, maar enkel indien het metaal in lage concentraties wordt toegediend. Het is mogelijk dat lage metaalconcentraties de regulatie van de wortelontwikkeling verstoren, waarbij LOX1 een rol speelt en waardoor de groei van de primaire wortel verandert. Bij hogere, toxische Cd-concentraties echter zal een groot aandeel van de beschikbare energiereserves van de plant gebruikt worden om zich te verdedigen tegen de metalen via metaalgeïnduceerde cellulaire responsen; dit kan de groei volledig remmen. De exacte mechanismen verantwoordelijk voor de geobserveerde verhoogde wortelgroei van Cd-behandelde *lox1*-mutanten ten opzichte van het wildtype moeten in de toekomst verder uitgediept worden.

Blootstelling aan Cu veroorzaakt een gelijkaardig verminderde primaire wortelgroei in beide genotypes, wat erop kan wijzen dat LOX1 niet betrokken is bij het signaleren van Cu-pollutie. Toch zijn de wortels van de mutant iets groter bij lage Cu-concentraties, maar enkel indien de planten beschikken over voldoende voedingsstoffen. In de blaadjes keert deze trend zich echter volledig om; wildtype planten liggen qua bladoppervlak over de hele lijn hoger dan *lox1*-mutanten tot de hoogste Cu-concentraties toegediend werden. Bovenstaande resultaten suggereren dat planten zonder LOX1-functie minder gevoelig zijn voor Cd dan voor Cu. In de toekomst moet het experiment met betrekking tot de bladoppervlakte herhaald worden met planten gekweekt op het verrijkte groeimedium omwille van eerder aangehaalde redenen.

In conclusie kan gesteld worden dat het bestuderen van de rol van LOX1 en de overige lipoxygenasen in de wortel- (zowel primaire als laterale wortels) en bladontwikkeling van *Arabidopsis thaliana* planten verder onderzocht moet worden. Hierbij is het van belang niet enkel te focussen op single pollutie, maar ook de effecten van multipollutie (Cd, Cu en/of Zn ...) in wildtype planten te onderzoeken en de geobserveerde responsen te vergelijken met deze in planten die meerdere lipoxygenasen missen.

3.3 Metaalspecifieke lange-termijn effecten op de antioxidatieve verdediging van wildtype versus *lox1* mutante planten

Uit voorgaande experimenten is gebleken dat blootstelling aan Cd op korte termijn reeds specifieke cellulaire responsen induceert in *Arabidopsis thaliana*. Zoals Tabel 3.1 en 3.2 aangeven, zijn de verschillen in transcriptionele respons tussen wildtype en *lox1* mutante planten subtiel aanwezig. Vooral het enzymatische antioxidatieve verdedigingssysteem lijkt op transcriptioneel niveau in beide genotypes anders te reageren op de metaalblootstelling. Om deze verschillen verder uit te diepen, werden één week oude wildtype en *lox1* mutante planten blootgesteld aan een reeks Cd-concentraties (10, 20, 40 of 60 μM) gedurende één week of gegroeid onder controleomstandigheden. Vervolgens werd de genexpressie van *LOX1* en de belangrijkste antioxidatieve enzymen (de superoxidisedismutasen, ascorbaatperoxidasen en catalasen) van *Arabidopsis thaliana* bepaald via real-time PCR. Deze proefopzet maakt het mogelijk de transcriptionele responsen op korte termijn (24 uur, Tabel 3.1 en 3.2) te vergelijken met deze van planten die langere tijd (één week) met metaalvervuiling hebben moeten omgaan. Daar waar metaalblootstelling gedurende 24 uur voornamelijk acute transcriptionele effecten zal aantonen, kunnen de planten na één week terug een cellulair evenwicht bereiken. De planten blootgesteld aan de hoogste Cd-concentratie vertoonden een sterk verminderde wortelgroei en een verkleurd en aanzienlijk verkleind bladoppervlak. Daarom werden deze planten uit de genexpressie-

analyse geweerd. Om metaalspecifieke effecten te kunnen detecteren, werden de planten eveneens blootgesteld aan een reeks Cu-concentraties (20, 30, 40 of 50 μM) of gegroeid onder controleomstandigheden. Ook hier werden de planten blootgesteld aan de hoogste Cu-concentratie niet gebruikt in de verdere analyse. De gebruikte concentraties variëren van weinig effectief tot zeer effectief betreffende de inhibitie van cellulaire processen, wortelgroei en dus plantengroei en -ontwikkeling in het algemeen. In Tabel 3.3 en 3.4 worden de gemeten niveaus van genexpressie in respectievelijk de wortels en blaadjes van Cd- en Cu-behandelde wildtype planten vergeleken met deze in de *lox1*-mutant.

Tabel 3.3: Genexpressie van *LOX1* en de belangrijkste antioxidatieve enzymen in de **wortels** van wildtype (Col-0) en *lox1* mutante (*lox1*) *Arabidopsis thaliana* planten blootgesteld aan Cd (A; 10, 20 of 40 μM) of Cu (B; 20, 30 of 40 μM). De eerste kolom geeft aan om welk gen het gaat, tot welke klasse dit gen behoort en de reactie die de bijhorende antioxidatieve enzymen katalyseren. Per genotype wordt de genexpressie relatief ten opzichte van de eigen controle (0 μM bij Col-0 en *lox1*; $1.00 \pm \text{S.E.}$) aangegeven. De analyse vond plaats in de wortels van twee weken oude *Arabidopsis thaliana* plantjes blootgesteld aan Cd of Cu gedurende één week of gegroeid onder controleomstandigheden. De waarden zijn het gemiddelde \pm S.E. van vier biologisch onafhankelijke replica's. Afkortingen: LOX, lipoxygenase; CSD, Cu/Zn-superoxidodismutase; FSD, Fe-superoxidodismutase; APX, ascorbaatperoxidase; CAT, catalase. Significantieniveaus: en : $p < 0.1$; en : $p < 0.05$; en : $p < 0.01$ voor respectievelijk verhoogde en verlaagde transcriptie (ANOVA).

A. CADMIUM						
Gen	Col-0			<i>lox1</i>		
	10 μM Cd	20 μM Cd	40 μM Cd	10 μM Cd	20 μM Cd	40 μM Cd
<i>LOX1</i>	1.21 \pm 0.17	1.30 \pm 0.18	2.19 \pm 0.06	0.52 \pm 0.02	0.68 \pm 0.07	0.67 \pm 0.05
SUPEROXIDEDISMUTASEN ($2 \text{O}_2^{\cdot-} + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$)						
<i>CSD1</i>	0.85 \pm 0.10	0.71 \pm 0.05	0.87 \pm 0.03	0.86 \pm 0.06	0.82 \pm 0.03	0.86 \pm 0.05
<i>CSD2</i>	0.58 \pm 0.06	0.61 \pm 0.08	0.68 \pm 0.06	0.51 \pm 0.03	0.57 \pm 0.04	0.62 \pm 0.07
<i>FSD1</i>	0.79 \pm 0.09	0.77 \pm 0.12	1.16 \pm 0.01	0.87 \pm 0.07	0.76 \pm 0.02	1.10 \pm 0.09
ASCORBAATPEROXIDASEN ($2 \text{ascorbaat} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{monodehydroascorbaat} + 2 \text{H}_2\text{O}$)						
<i>APX1</i>	0.45 \pm 0.04	0.41 \pm 0.02	0.56 \pm 0.07	0.52 \pm 0.00	0.41 \pm 0.01	0.55 \pm 0.06
<i>APX2</i>	0.55 \pm 0.14	0.29 \pm 0.07	1.11 \pm 0.38	0.59 \pm 0.08	0.39 \pm 0.01	0.80 \pm 0.26
CATALASEN ($2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$)						
<i>CAT1</i>	0.33 \pm 0.04	0.53 \pm 0.06	0.86 \pm 0.00	0.42 \pm 0.09	0.47 \pm 0.08	0.73 \pm 0.07
<i>CAT2</i>	1.11 \pm 0.22	1.08 \pm 0.19	0.85 \pm 0.03	1.30 \pm 0.18	0.85 \pm 0.01	0.77 \pm 0.01
<i>CAT3</i>	0.67 \pm 0.05	0.63 \pm 0.04	0.49 \pm 0.04	0.86 \pm 0.02	0.58 \pm 0.01	0.51 \pm 0.06
B. KOPER						
Gen	Col-0			<i>lox1</i>		
	20 μM Cu	30 μM Cu	40 μM Cu	20 μM Cu	30 μM Cu	40 μM Cu
<i>LOX1</i>	0.86 \pm 0.06	0.84 \pm 0.06	0.85 \pm 0.12	0.86 \pm 0.08	0.65 \pm 0.05	0.86 \pm 0.23
SUPEROXIDEDISMUTASEN ($2 \text{O}_2^{\cdot-} + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$)						
<i>CSD1</i>	1.18 \pm 0.10	1.11 \pm 0.12	1.10 \pm 0.11	1.07 \pm 0.04	1.08 \pm 0.10	0.88 \pm 0.07
<i>CSD2</i>	1.35 \pm 0.14	1.16 \pm 0.05	0.95 \pm 0.14	1.21 \pm 0.08	1.36 \pm 0.25	0.84 \pm 0.05
<i>FSD1</i>	0.05 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.02 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
ASCORBAATPEROXIDASEN ($2 \text{ascorbaat} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{monodehydroascorbaat} + 2 \text{H}_2\text{O}$)						
<i>APX1</i>	1.07 \pm 0.07	0.99 \pm 0.07	0.64 \pm 0.09	0.91 \pm 0.02	0.86 \pm 0.05	0.56 \pm 0.03
<i>APX2</i>	0.77 \pm 0.06	0.79 \pm 0.14	0.83 \pm 0.11	0.70 \pm 0.16	0.84 \pm 0.20	0.79 \pm 0.23
CATALASEN ($2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$)						
<i>CAT1</i>	0.99 \pm 0.01	1.22 \pm 0.16	0.80 \pm 0.09	1.06 \pm 0.11	1.09 \pm 0.13	0.83 \pm 0.17
<i>CAT2</i>	0.81 \pm 0.05	0.94 \pm 0.12	1.02 \pm 0.17	0.82 \pm 0.03	0.83 \pm 0.04	0.88 \pm 0.02
<i>CAT3</i>	0.97 \pm 0.07	1.19 \pm 0.17	1.12 \pm 0.13	0.82 \pm 0.12	0.62 \pm 0.01	0.71 \pm 0.07

3.3.1 Speelt *LOX1* op lange termijn nog steeds een rol?

Daar waar 24 uur blootstelling aan 5 of 10 μM Cd de *LOX1*-genexpressie in de **wortels** van zowel wildtype als *lox1* mutante planten aanzienlijk verhoogt (Tabel 3.1), is de inductie van *LOX1*-transcriptie na één week beduidend lager in het wildtype. In de *lox1*-mutant vertoont de *LOX1*-genexpressie zelfs een dalende trend, die enkel significant is bij 10 μM Cd (Tabel 3.3A). Ook Cu leidt in de wortels niet tot een verhoogde transcriptie van het gen coderend voor lipoxygenase 1 (Tabel 3.3B), wat het wel doet na 24 uur [26]. Ook in de blaadjes stijgt de genexpressie van *LOX1* zeer licht na blootstelling aan Cd enkel in het wildtype (Tabel 3.4A); in de *lox1*-mutant treden geen significante effecten op (Tabel 3.4A).

Blootstelling aan Cu heeft geen effect op de *LOX1*-transcriptie in de blaadjes (Tabel 3.4B). Deze resultaten zijn in lijn met de effecten geobserveerd in de wortels (Tabel 3.3).

3.3.2 De antioxidatieve verdediging: transcriptionele inhibitie door Cd in de wortels

De effecten op de genexpressie van de drie groepen antioxidatieve verdedigingsenzymen verschillen in de wortels sterk voor Cd en Cu. Blootstelling aan verhoogde Cd-concentraties leidt bijna uniform tot een (al dan niet significante) verlaagde transcriptie van de gemeten enzymen in beide genotypes (Tabel 3.3A). Opvallend is dat de expressie van *CSD1*, *FSD1*, *APX2* en *CAT2* in beide genotypes niet significant beïnvloed wordt, maar wel een dalende trend vertoont (Tabel 3.3A). Behandeling met verhoogde Cu-concentraties heeft – in tegenstelling tot Cd – geen overwegend inhiberend effect op de transcriptie van de gemeten antioxidatieve enzymen in de wortels van wildtype versus *lox1* mutante planten. Wel opvallend is de sterk verlaagde *FSD1*-genexpressie, zelfs bij blootstelling aan de laagste Cu-concentratie (Tabel 3.3B). Wat betreft de enzymen die H₂O₂ scavengen, daalt de expressie van *APX1* significant in wildtype en *lox1* mutante planten blootgesteld aan 40 μM Cu. De expressie van *APX2* en de catalasen wordt door Cu nauwelijks beïnvloed in beide genotypes (Tabel 3.3B).

Tabel 3.4: Genexpressie van *LOX1* en de belangrijkste antioxidatieve enzymen in de blaadjes van wildtype (Col-0) en *lox1* mutante (*lox1*) *Arabidopsis thaliana* planten blootgesteld aan Cd (A; 10, 20 of 40 μM) of Cu (B; 20, 30 of 40 μM). De eerste kolom geeft aan om welk gen het gaat, tot welke klasse dit gen behoort en de reactie die de bijhorende antioxidatieve enzymen katalyseren. Per genotype wordt de genexpressie relatief ten opzichte van de eigen controle (0 μM bij Col-0 en *lox1*; 1.00 ± S.E.) aangegeven. De analyse vond plaats in de wortels van twee weken oude *Arabidopsis thaliana* plantjes blootgesteld aan Cd of Cu gedurende één week of gegroeid onder controleomstandigheden. De waarden zijn het gemiddelde ± S.E. van vier biologisch onafhankelijke replica's. Afkortingen: LOX, lipoxygenase; CSD, Cu/Zn-superoxidedismutase; FSD, Fe-superoxidedismutase; APX, ascorbaatperoxidase; CAT, catalase. Significantieniveaus: en : p<0.1; en : p<0.05; en : p<0.01 voor respectievelijk verhoogde en verlaagde transcriptie (ANOVA).

A. CADMIUM						
Gen	Col-0			<i>lox1</i>		
	10 μM Cd	20 μM Cd	40 μM Cd	10 μM Cd	20 μM Cd	40 μM Cd
<i>LOX1</i>	1.15 ± 0.06	1.49 ± 0.10	1.48 ± 0.17	1.17 ± 0.19	1.71 ± 0.27	1.49 ± 0.04
SUPEROXIDEDISMUTASEN (2 O₂^{•-} + 2 H⁺ → O₂ + H₂O₂)						
<i>CSD1</i>	0.93 ± 0.02	1.00 ± 0.05	0.99 ± 0.04	0.87 ± 0.02	0.78 ± 0.04	0.76 ± 0.05
<i>CSD2</i>	0.71 ± 0.02	0.61 ± 0.04	0.57 ± 0.01	0.72 ± 0.05	0.55 ± 0.07	0.51 ± 0.03
<i>FSD1</i>	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ASCORBAATPEROXIDASEN (2 ascorbaat + H₂O₂ → 2 monodehydroascorbaat + 2 H₂O)						
<i>APX1</i>	0.12 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.03	0.26 ± 0.06	0.15 ± 0.02	0.11 ± 0.02
<i>APX2</i>	0.64 ± 0.17	0.91 ± 0.17	0.77 ± 0.19	1.29 ± 0.36	1.35 ± 0.29	1.24 ± 0.22
CATALASEN (2 H₂O₂ → 2 H₂O + O₂)						
<i>CAT1</i>	0.45 ± 0.09	0.51 ± 0.05	0.46 ± 0.02	0.44 ± 0.03	0.43 ± 0.03	0.40 ± 0.04
<i>CAT2</i>	0.61 ± 0.07	0.53 ± 0.08	0.52 ± 0.07	0.68 ± 0.05	0.54 ± 0.08	0.52 ± 0.08
<i>CAT3</i>	0.40 ± 0.05	0.27 ± 0.03	0.25 ± 0.02	0.64 ± 0.07	0.35 ± 0.05	0.30 ± 0.02
B. KOPER						
Gen	Col-0			<i>lox1</i>		
	20 μM Cu	30 μM Cu	40 μM Cu	20 μM Cu	30 μM Cu	40 μM Cu
<i>LOX1</i>	0.99 ± 0.05	1.04 ± 0.05	1.15 ± 0.09	0.86 ± 0.01	1.06 ± 0.11	0.97 ± 0.11
SUPEROXIDEDISMUTASEN (2 O₂^{•-} + 2 H⁺ → O₂ + H₂O₂)						
<i>CSD1</i>	1.49 ± 0.05	1.89 ± 0.19	1.54 ± 0.09	1.45 ± 0.05	1.40 ± 0.10	1.13 ± 0.15
<i>CSD2</i>	1.63 ± 0.12	2.17 ± 0.31	1.32 ± 0.03	1.52 ± 0.08	1.57 ± 0.20	1.11 ± 0.08
<i>FSD1</i>	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ASCORBAATPEROXIDASEN (2 ascorbaat + H₂O₂ → 2 monodehydroascorbaat + 2 H₂O)						
<i>APX1</i>	0.66 ± 0.07	1.09 ± 0.10	0.35 ± 0.03	0.83 ± 0.08	0.80 ± 0.10	0.34 ± 0.05
<i>APX2</i>	1.30 ± 0.34	2.24 ± 0.46	4.38 ± 0.22	1.50 ± 0.36	1.91 ± 0.31	6.14 ± 1.11
CATALASEN (2 H₂O₂ → 2 H₂O + O₂)						
<i>CAT1</i>	0.66 ± 0.05	0.82 ± 0.07	0.41 ± 0.04	0.84 ± 0.14	0.70 ± 0.01	0.41 ± 0.06
<i>CAT2</i>	0.97 ± 0.09	1.31 ± 0.15	1.13 ± 0.05	0.96 ± 0.09	1.15 ± 0.11	1.01 ± 0.17
<i>CAT3</i>	0.77 ± 0.07	0.97 ± 0.07	0.46 ± 0.04	0.70 ± 0.02	0.81 ± 0.04	0.39 ± 0.08

3.3.3 Metaalspecifieke responsen van de antioxidatieve verdediging in de blaadjes

Wat betreft de enzymen die $O_2^{\circ-}$ dismuteren, heeft Cd geen invloed op de *CSD1*-expressie in het wildtype, terwijl zowel *CSD2* als *FSD1* transcriptioneel onderdrukt worden in de blaadjes van beide genotypes. Blootstelling aan Cd heeft eveneens een overwegend negatief effect op de genexpressie van beide gemeten groepen van H_2O_2 -scavenging enzymen (Tabel 3.4A). Enkel *APX2* wordt niet beïnvloed in de blaadjes van beide genotypes. Blootstelling aan Cu leidt tot een verhoogde genexpressie van zowel *CSD1* als *CSD2*, terwijl alle Cu-concentraties de *FSD1*-genexpressie sterk onderdrukken in beide genotypes (Tabel 3.4B). Dit effect treedt ook op in de wortels (Tabel 3.3B). Daar waar *APX1* transcriptioneel wordt onderdrukt, neemt de expressie van *APX2* toe onder invloed van 40 μ M Cu. Tenslotte worden *CAT1* en *CAT3* op transcriptioneel niveau onderdrukt (Tabel 3.4B). Deze effecten verschillen niet voor het wildtype en de mutant (Tabel 3.4).

3.3.4 Integratie van metaalspecifieke responsen op lange termijn

De potentiële rol van *LOX1* als signaalmolecule tijdens metaalstress wordt op lange termijn onduidelijk. Immers; de genexpressie van dit enzym neemt niet of in mindere mate toe tengevolge van Cd- of Cu-blootstelling. Deze resultaten suggereren dat de planten na één week blootgesteld te zijn aan Cd of Cu, zowel in wortel als blad een gedeeltelijk cellulair evenwicht bereiken. De sterke inductie van *LOX1*-transcriptie treedt dus enkel op na 24 uur, wat erop kan wijzen dat dit effect zeer acuut en kortdurend is. In de wortels van de Cd-behandelde *lox1*-mutant treedt zelfs een significante daling op wat betreft de transcriptie van *LOX1*. Momenteel wordt in de onderzoeksgroep de exacte lokalisatie van de *LOX1*-promotoractiviteit bepaald via constructen waarbij de promotor van het *LOX1*-gen gefuseerd wordt met het reporter-gen *GUS*. Ook deze resultaten bevestigen bovenstaande effecten; de promotoractiviteit neemt af gedurende langdurige Cd- of Cu-blootstelling [Remans, mondelinge communicatie].

Het feit dat de genexpressie van *LOX1* niet meer sterk wordt geïnduceerd na langdurige blootstelling aan Cd of Cu, impliceert echter niet dat de rol van *LOX1* zou zijn uitgespeeld. Immers, zoals reeds eerder vermeld bereiken de planten vermoedelijk een gedeeltelijk cellulair evenwicht na één week metaalblootstelling, terwijl in het hydropoon systeem gefocust wordt op de effecten van acute blootstelling (24 uur). Op dat moment worden de planten pas geconfronteerd met metaalstress en treden allerhande cellulaire en moleculaire reacties op om zich te verdedigen tegen de metaaluitgelokte oxidatieve stress. Hierbij lijkt *LOX1* een belangrijke rol te spelen; de verhoogde transcriptie werd immers bevestigd in dit project na 24 uur blootstelling aan Cd. Na verlengde metaalblootstelling is het mogelijk dat de effecten zich op een ander niveau afspelen dan genexpressie. Zo toonden Skórzyńska-Polit *et al.* (2006) aan dat de *LOX*-activiteit in de blaadjes van mature *Arabidopsis thaliana* planten die gedurende zeven dagen blootgesteld werden aan Cd of Cu (5 of 50 μ M) hoger is dan in de blaadjes van controleplanten. De enzymactiviteit – gemeten bij pH 8.0 – was voornamelijk hoog wanneer linoleenzuur als substraat gebruikt werd. Een mogelijke reden voor deze toegenomen *LOX*-activiteit zou kunnen zijn dat er meer *LOX*-eiwitten aanwezig zijn in behandelde planten. Echter, dit werd niet bevestigd in de studie, waar zware metalen leidden tot een verminderde hoeveelheid enzymatisch eiwit in vergelijking met de controleplanten [30]. Mogelijks worden veranderingen in *LOX*-activiteit gemoduleerd door de cellulaire redoxbalans. Immers; opdat *LOX*en actief zijn, is geoxideerd Fe (Fe^{3+}) vereist. Skórzyńska-Polit *et al.* (2006) experimenteerden met commercieel sojaboon lipoxygenase; de activiteit van dit enzym verandert onder invloed van verschillende concentraties aan GSH, Asc en H_2O_2 [30]. In de toekomst is het van belang niet alleen de genexpressie, maar ook de eiwithoeveelheid en -activiteit van de verschillende lipoxygenasen in wortel en blad van Cd- of Cu-behandelde planten te bepalen. Bijkomend

moet gefocust worden op de cellulaire redoxbalans, waarbij de hoeveelheid H_2O_2 , lipidenperoxidatie en antioxidatieve metabolieten na verlengde metaalblootstelling in beide genotypes zeker bestudeerd moet worden. Dit kan bijdragen tot een beter begrip van metaalgeïnduceerde responsen op lange termijn, evenals de rol van LOX1, de overige LOX-isovormen en de cellulaire redoxbalans in dit proces.

Blootstelling aan Cd leidt zowel in wortel als blad tot een uniforme inhibitie van de transcriptie van het enzymatisch antioxidatieve verdedigingssysteem. Een opmerkelijk verschil tussen beide plantorganen betreft de respons van *FSD1*-transcriptie, die in de blaadjes sterk wordt onderdrukt. Dit is in lijn met de eerder geobserveerde orgaanspecifieke effecten voor dit gen [25,26]. Echter, na 24 uur blootstelling leidt Cd tot een sterke toename van *FSD1*-genexpressie in de wortels, terwijl dit in de blaadjes niet gebeurt. Het verschil in respons (daling versus toename) is waarschijnlijk te wijten aan de verschillende duur van blootstelling aan het metaal (één week versus 24 uur). De oorzaak van de sterke inhibitie van *FSD1*-genexpressie door Cd kan gezocht worden in het induceren van Fe-deficiëntie, wat eerder reeds beschreven werd [1]. Een verminderde Fe-concentratie kan de genexpressie van *FSD1* negatief beïnvloeden, aangezien dit enzym Fe als cofactor vereist. Op korte termijn (na 24 uur Cd-blootstelling) werd geen Fe-deficiëntie gedetecteerd [2], waardoor de *FSD1*-transcriptie in de wortels toch kan verhogen. In de blaadjes echter treedt dan al een dalende trend op, die op lange termijn sterker en significant wordt. Ook in de wortels blijft de eerder geobserveerde stijging in *FSD1*-transcriptie na één week achterwege. Dit is mogelijks het gevolg van Fe-deficiëntie die na langere Cd-blootstelling optreedt.

De uniforme inhibitie van het antioxidatief verdedigingssysteem op transcriptieel niveau is een respons die verder onderzocht moet worden. Naar de toekomst toe moeten meerdere oxidatieve stressgerelateerde parameters zoals het niveau van antioxidatieve metabolieten en hun redoxstatus geanalyseerd worden in Cd-behandelde wildtype versus *lox1* mutante planten. Er moet eveneens nagegaan worden of de inhibitie van de transcriptie van de gemeten antioxidatieve enzymen niet het gevolg is van metaalblootstelling. Dit zou impliceren dat de planten helemaal geen gebalanceerde redoxstatus hebben, maar nog steeds lijden onder de gevolgen van oxidatieve stress omwille van toxische Cd-concentraties. In de toekomst is het zeker aangeraden deze hypothesen te bestuderen door naast de opgenomen metaalconcentraties ook de concentratie H_2O_2 (en eventueel ook andere ROS) en het niveau van lipidenperoxidatie, te bestuderen in Cd-behandelde wildtype versus *lox1* mutante planten.

Omwille van zijn redoxactieve eigenschappen wordt Cu vaak beschouwd als meer toxisch dan Cd. Wat betreft de antioxidatieve enzymen die $O_2^{\circ-}$ scavengen, wordt vooral duidelijk dat Cu in de wortels een sterker negatief effect heeft op de genexpressie van *FSD1* in vergelijking met Cd. Nagae *et al.* (2008) identificeerden in *Barbula unguiculata*, een mossoort, negatieve cis-acterende elementen (GTACT-motieven) in het gen coderend voor Fe-superoxidedismutase 1 die als respons op Cu de genexpressie van dit enzym sterk inhiberen. De moleculaire mechanismen voor deze Cu-responsieve transcriptionele repressie lijken eveneens aanwezig in hogere plantensoorten. Immers, ook het *FSD1*-gen van *Arabidopsis thaliana* bevat drie GTACT-sequenties en wordt transcriptieel gereguleerd door Cu [59]. Anderzijds wordt de transcriptie van *CSD2* in dezelfde plant verhoogd door Cu [60], wat hier enkel in de blaadjes significant is. Echter, de Cu-afhankelijke regulatie van het niveau van *CSD2*-transcriptie gebeurt voor dit gen op posttranscriptieel niveau, met name via microRNAs. MicroRNAs zijn regulerende 'small' RNA-species die na transcriptie de expressie van bepaalde genen kunnen beïnvloeden door mRNA te klieven of de translatie tot eiwitten te verhinderen [61]. Sunkar *et al.* (2006) toonden aan dat het microRNA miR398 de expressie van *CSD2* negatief reguleert [62]. Het mechanisme voor de eerder geobserveerde Cu-afhankelijke inductie van *CSD2*-transcriptie zou mogelijk de repressie van miR398-transcriptie zijn,

aangezien in de promotorsequenties van dit microRNA meerdere GTACT-sequenties gevonden werden [59]. Nagae *et al.* (2008) hypothetiseren dat GTACT-sequenties belangrijk zijn voor het vervangen van FeSOD door Cu/ZnSOD als respons op Cu door de *FSD*-transcriptie direct te inhiberen, terwijl indirect ook de *CSD*-genexpressie wordt gestimuleerd in *Arabidopsis thaliana*. De resultaten in dit project zijn consistent met deze eerder geobserveerde effecten, wat de metaalspecifieke respons bevestigt. In de toekomst zou het meten van de miR398-transcriptie kunnen aantonen of deze transcriptionele regulatie van *CSD/FSD* ook optreedt in *lox1* mutante planten. Eveneens is het erg van belang te bepalen of deze effecten op transcriptioneel niveau zich doordrukken op het niveau van eiwitexpressie en enzymactiviteit. In het verleden werd in de onderzoeksgroep de totale SOD-activiteit reeds bepaald na 24 uur blootstelling aan Cd of Cu. Daaruit bleek dat noch Cd, noch Cu de totale SOD-activiteit verandert in wortel of blad [26]. Het is zeer belangrijk om de activiteit van specifieke SOD-isovormen ook na verlengde metaalstress te bepalen door middel van gelelektroforese, wat in de toekomst zal bijdragen tot betere inzichten betreffende de sterke inhibitie van *FSD1* geobserveerd in deze experimenten.

Niet enkel bij de $O_2^{\circ-}$ -scavenging enzymen leiden Cd en Cu tot verschillende responsen. Een opmerkelijk verschil tussen de effecten van Cd en Cu betreft de genexpressie van *APX1*, die door Cd sterk wordt verlaagd in de wortels van beide genotypes. Blootstelling aan Cu daarentegen leidt pas bij de hoogste concentratie tot een daling van de transcriptie van dit H_2O_2 -scavenging enzym. Ook heeft Cu weinig effect op de genexpressie van de overige enzymen die verantwoordelijk zijn voor het neutraliseren van H_2O_2 , wat bij Cd wel het geval is. De vraag is nu waarom Cd over het algemeen beide klassen van ROS-scavenging enzymen inhibeert, terwijl Cu zelfs nauwelijks een effect heeft op de H_2O_2 -scavenging enzymen. Een mogelijke verklaring is dat de planten zich op een andere manier dan via antioxidatieve enzymen verdedigen tegen verhoogde Cd-concentraties, zoals via metaalcomplexatie.

Een laatste conclusie is dat zowel in de wortels als in de blaadjes Cd over het algemeen de gemeten enzymen transcriptioneel onderdrukt, terwijl Cu vooral in de blaadjes de expressie van enkele genen stimuleert, waaronder *CSD1*, *CSD2* en *APX2*. Dit is mogelijk te wijten aan de beperkte translocatie van Cu vanuit de wortel naar het blad [63]. Dit kan impliceren dat na één week blootstelling de transcriptionele inductie van antioxidatieve verdedigingsenzymen nog steeds zichtbaar is bij Cu in tegenstelling tot Cd. De verhoogde Cd-concentraties leggen immers de transcriptie van de antioxidatieve verdedigingsenzymen volledig lam, mogelijks omdat de toegediende Cd-concentraties toxisch zijn voor zowel wildtype als *lox1* mutante planten. Echter, de primaire wortelgroei van beide genotypes wordt na één week blootstelling aan 40 μM Cd slechts met de helft geïnhibeerd. Waarschijnlijk gebruiken de planten andere mechanismen om te overleven, zoals fytochelatinen en metallothioneïnen. Deze metaalbindende peptiden voorkomen dat de vrije concentratie metaalionen in de plantencel te hoog wordt, zodat de cellulaire homeostase behouden blijft. Fytochelatinen worden niet-translationeel gesynthetiseerd op basis van GSH. Door de centrale cysteïnegroepen aanwezig in fytochelatinen kunnen Cd-thiolaat (Cd-S) complexen gevormd worden, wat metaaldetoxicatie induceert [64,65].

4 Conclusie en Synthese

In dit project werden de moleculaire en cellulaire effecten van zware metaalblootstelling in *Arabidopsis thaliana* bestudeerd. Op cellulair niveau induceren Cd en Cu oxidatieve stress, waarbij de onderliggende signalisatiemechanismen nog niet zijn opgehelderd. Eerdere onderzoeksresultaten wijzen lipoxygenasen aan als potentieel belangrijke signaaltransductiemoleculen tijdens metaalstress. Immers, deze enzymen worden zowel transcriptioneel als enzymatisch sterk verhoogd onder invloed van Cd en Cu, vooral opvallend bij isovorm 1 (LOX1). Om de mogelijke rol van LOX1 tijdens metaalgeïnduceerde signaaltransductie te bestuderen, werd in dit project gebruik gemaakt van *Arabidopsis thaliana* planten zonder functionele LOX1-enzymen (*lox1*-mutanten). Zowel deze mutante als wildtype planten werden gekweekt via hydrocultuur en 24 uur blootgesteld aan Cd, waarna een globale screening van oxidatieve stressgerelateerde responsen werd uitgevoerd. De H₂O₂-concentratie, mate van lipidenperoxidatie en transcriptie van enzymen betrokken bij de cellulaire redoxstatus en signaaltransductie werd bepaald en vergeleken voor beide genotypes. In een tweede fase werd door middel van een ander kweekstelsel de focus gelegd op de invloed van zowel Cd als Cu op de groei van wortels en blaadjes bij beide genotypes. Hierbij werden de planten gedurende een langere periode blootgesteld aan beide metalen. Aangezien de antioxidatieve enzymen transcriptioneel de meeste verschillen vertoonden na 24 uur Cd-blootstelling, werd in een laatste fase ook de invloed van langdurige metaalstress op hun genexpressie bestudeerd.

Een eerste belangrijke observatie is dat een **gebrek aan LOX1 onder controleomstandigheden** leidt tot verschillende niveaus van lipidenperoxidatie enerzijds en transcriptie van de gemeten enzymen anderzijds. Zo vertonen de wortels van onbehandelde *lox1*-mutanten een verhoogde lipidenperoxidatie ten opzichte van wildtype planten, een patroon dat omkeert in de blaadjes. Mogelijks is LOX1 belangrijk voor het behoud van de membranen van de wortel, onder andere via de synthese van oxylipines die al dan niet rechtstreeks de membranen beschermen. Ook opvallend is dat de gemeten pro- en antioxidatieve enzymen en enzymen betrokken bij signaaltransductie in de wortels van onbehandelde *lox1*-mutanten qua transcriptie lager liggen ten opzichte van wildtype, een patroon dat eveneens omkeert in de blaadjes. Deze resultaten suggereren dat LOX1 voornamelijk belangrijk zou kunnen zijn voor signalling in de wortel en van de wortel naar het blad, maar dat in het blad zelf andere mechanismen kunnen optreden. Hier schuilt eveneens een mogelijke verklaring voor de geobserveerde verhoogde lipidenperoxidatie in de wortels van de *lox1*-mutant. Immers, een verlaagde genexpressie van beschermende antioxidatieve enzymen kan hiertoe leiden. Het is dan enkel de vraag welke van beide responsen direct het gevolg is van het gebrek aan functionele LOX1-enzymen. Ook morfologisch vertonen onbehandelde wildtype en *lox1* mutante planten enkele karakteristieke verschillen. Zo vertonen de primaire wortels van de mutant een verbeterde groei ten opzichte van deze van het wildtype. Het feit dat de primaire wortel beter groeit bij een gebrek aan LOX1, wijst er vermoedelijk op dat dit enzym een van de vele factoren is die mee de wortelontwikkeling in *Arabidopsis thaliana* bepaalt en/of beperkt. Aangezien LOX1 sterker tot expressie komt in de wortels, is dit enzym mogelijks minder van belang voor de ontwikkeling van de blaadjes. Een belangrijke conclusie die uit bovenstaande data getrokken kan worden, is dat een gebrek aan LOX1-genexpressie en/of -activiteit voor de plant enkele basale gevolgen voor het metabolisme (groei, cellulaire redoxstatus en signalisatie) met zich meebrengt. Toch moet rekening gehouden worden met het feit dat verschillen op transcriptioneel niveau zich niet noodzakelijk uiten op niveau van eiwitexpressie en/of -activiteit. In de toekomst kan het bestuderen van pro- en antioxidatieve enzymen, evenals enzymen betrokken bij signaaltransductie, op andere biologische

niveaus bijdragen aan een beter begrip van de geobserveerde verschillen tussen wildtype en *lox1* mutante planten onder controleomstandigheden.

De belangrijke rol die LOX1 lijkt te spelen in onbehandelde planten, wordt niet altijd teruggevonden bij planten blootgesteld aan **zware metalen**. Zeker op niveau van genexpressie van enzymen betrokken bij de cellulaire redoxstatus en metaalgeïnduceerde signaaltransductie vertonen wildtype en mutante planten geen grote verschillen. Wel wordt de rol van NADPH-oxidasen en verschillende signalling componenten tijdens metaalstress bevestigd in dit project; de genexpressie van deze componenten neemt immers meestal toe tengevolge van een korte termijnblootstelling aan 5 of 10 μM Cd. De *LOX1*-transcriptie neemt na 24 uur behandeling nog steeds toe in de mutant, voornamelijk in de wortels. Dit wijst erop dat de promotor van het LOX1-gen nog steeds Cd-responsief is. Echter, indien de planten gedurende één week worden blootgesteld aan Cd of Cu, wordt de genexpressie van *LOX1* niet of in mindere mate verhoogd. De sterke inductie van *LOX1*-transcriptie treedt dus enkel op bij kortstondige metaalstress, wat erop zou kunnen wijzen dat LOX1 enkel in de initiële fase van metaalgeïnduceerde signalling een rol speelt. Ook opvallend is dat langdurige blootstelling aan Cd in zowel de wortels als de blaadjes van wildtype en *lox1* mutante planten het antioxidatief verdedigingssysteem transcriptioneel inhibeert, terwijl bij Cu toch nog enkele enzymen qua genexpressie verhogen. De respons op Cd is mogelijk het gevolg van toxische metaalconcentraties, waarbij het in de toekomst zeker niet onbelangrijk is om ook de daadwerkelijk opgenomen hoeveelheid Cd in wortel en blad te bepalen. Deze parameter samen met een kinetisch verloop van de responsen kan aantonen of de gebruikte concentraties effectief toxisch zijn voor het antioxidatieve verdedigingssysteem en/of de volledige plant. De geobserveerde responsen bij blootstelling aan Cu zijn vermoedelijk te wijten aan zijn direct redoxactieve eigenschappen, een belangrijk verschil tussen Cd en Cu wat de cellulaire respons op beide metalen duidelijk verandert. Ook hier treden niet veel verschillen op tussen de responsen van wildtype en *lox1* mutante planten op transcriptioneel niveau. Dit stimuleert verder onderzoek op andere biologische niveaus, zoals eiwitexpressie en/of -activiteit.

In conclusie kan gesteld worden dat LOX1 een belangrijk enzym is voor de plantencel onder controleomstandigheden. Echter, tijdens metaalstress vertonen zowel wildtype als *lox1* mutante planten voornamelijk op transcriptioneel niveau dezelfde respons. Toch reageert vooral de cellulaire redoxstatus in beide genotypes op een verschillende manier op kortdurende Cd-blootstelling, wat wijst op een potentiële rol van LOX1 tijdens metaalstress. De subtiele verschillen qua genexpressie van de gemeten antioxidatieve enzymen tussen wildtype en *lox1* mutante planten verdwijnen echter tijdens langdurige blootstelling aan Cd en ook Cu. Dit stimuleert verder onderzoek op korte termijn en suggereert dat de oxidatieve stressrespons voornamelijk van belang is voor de regulatie van een acute, snelle respons op zware metaalblootstelling. Een kinetische benadering van het onderzoek, waarbij de gemeten parameters in dit project worden gevolgd op geregelde ogenblikken onmiddellijk na metaaltoediening en gedurende enkele dagen, zou het inzicht betreffende deze regulatie kunnen vergroten. Aangezien de geobserveerde verschillen tussen wildtype en *lox1* mutante *Arabidopsis thaliana* planten tijdens acute blootstelling aan Cd subtiel aanwezig zijn, is het mogelijk dat de planten compenseren voor een gebrek aan functionele LOX1-enzymen door andere, functionele signalisatie- en/of verdedigingsmechanismen. In de toekomst kan deze hypothese benaderd worden door gebruik te maken van combinatiemutanten met meerdere niet-functionele lipoxygenasen (bijvoorbeeld LOX2 en/of LOX3).

Referenties

1. Sanità di Toppi L, Gabbrielli R. Response to Cadmium in Higher Plants. *Environmental and Experimental Botany* 1999; 41(2): 105-130 (review).
2. Smeets K. Oxidative Stress as a Modulator in Cellular Responses during Cadmium and Copper Toxicity in *Arabidopsis thaliana*. Doctoraatsproefschrift Faculteit Wetenschappen, Universiteit Hasselt, 2008.
3. Smeets K, Cuypers A, Lambrechts A, Semane B, Hoet P, Van Laere A, Vangronsveld J. Induction of Oxidative Stress and Antioxidative Mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd Application. *Plant Physiology and Biochemistry* 2005; 43(5): 437-444.
4. Benavides MP, Gallego SM, Tomaro ML. Cadmium Toxicity in Plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 2005; 17(1): 21-34.
5. Yruela I. Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 2005; 17(1): 145-156.
6. Nawrot T, Den Hond E, Staessen JA. Milieutoxicologische Metingen, een Synopsis voor de Algemene Practicus. Deel 3: Toxicologie en Biomonitoring van Lood en Cadmium. *Tijdschrift voor Geneeskunde* 2002; 58(6): 427-434.
7. Hogervorst J, Plusquin M, Vangronsveld J, Nawrot T, Cuypers A, Van Hecke E, Roels HA, Carleer R, Staessen JA. House Dust as Possible Route of Environmental Exposure to Cadmium and Lead in the Adult General Population. *Environmental Research* 2007; 103(1): 30-37.
8. Järup L, Berglund M, Elinder CG, Nordberg G, Vahter M. Health Effects of Cadmium Exposure – a Review of the Literature and a Risk Estimate. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 1998; 24(suppl): 1-52 (review).
9. Kazantzis G. Cadmium, Osteoporosis and Calcium Metabolism. *Biometals* 2004; 17(5): 493-498.
10. Nawrot T, Plusquin M, Hogervorst J, Roels HA, Celis H, Thijs L, Vangronsveld J, Van Hecke E, Staessen JA. Environmental Exposure to Cadmium and Risk of Cancer: a Prospective Population-based Study. *The Lancet Oncology Journal* 2006; 7(2): 119-126.
11. Bell RR, Soliman MMRI, Nonavinakere VK, Hammerbeck DM, Early JL. Selenium and Cadmium Induced Pulmonary Functional Impairment and Cytotoxicity. *Toxicology Letters* 1997; 90(2-3): 107-114.
12. World Health Organization (WHO). Environmental Health Criteria 200 – Copper. In: International Programme on Chemical Safety. Chemical Safety Information from Intergovernmental Organizations. 1998. URL: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc200.htm>
13. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Copper. In: Toxicological Profiles. U.S. Department of Health and Human Services. 2004. URL: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp132.pdf>
14. Clemens S. Molecular Mechanisms of Plant Metal Tolerance and Homeostasis. *Planta* 2001; 212(4): 475-486 (review).
15. Clemens S. Toxic Metal Accumulation, Responses to Exposure and Mechanisms of Tolerance in Plants. *Biochimie* 2006; 88(11): 1707-1719.
16. Puig S, Andrés-Colás N, García-Molina A, Peñarrubia L. Copper and Iron Homeostasis in *Arabidopsis*: Responses to Metal Deficiencies, Interactions and Biotechnological Applications. *Plant, Cell and Environment* 2007; 30(3): 271-290.
17. Maksymiec W. Signaling Responses in Plants to Heavy Metal Stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 2007; 29(3): 177-187.
18. Zhu R, Macfie SM, Ding Z. Cadmium-induced Plant Stress Investigated by Scanning Electrochemical Microscopy. *Journal of Experimental Botany* 2005; 56(421): 2831-2838.
19. Das P, Samantaray S, Rout GR. Studies on Cadmium Toxicity in Plants: a Review. *Environmental Pollution* 1997; 98(1): 29-36 (review).
20. Hall JL. Cellular Mechanisms for Heavy Metal Detoxification and Tolerance. *Journal of Experimental Botany* 2002; 53(366): 1-11 (review).
21. Van Assche F, Clijsters H. Effects of Metals on Enzyme Activity in Plants. *Plant, Cell and Environment* 1990; 13(3): 195-206.
22. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd edition. New York, U.S.: Oxford University Press Inc., 1999.
23. Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. Reactive Oxygen Gene Network of Plants. *TRENDS in Plant Science* 2004; 9(10): 490-498 (review).

24. Arora A, Sairam RK, Srivastava GC. Oxidative Stress and Antioxidative System in Plants. *Current Science* 2002; 82(10): 1227-1238 (review).
25. Smeets K, Ruytinx J, Semane B, Van Belleghem F, Remans T, Van Sanden S, Vangronsveld J, Cuypers A. Cadmium-induced Transcriptional and Enzymatic Alterations Related to Oxidative Stress. *Environmental and Experimental Botany* 2008; 63(1-3): 1-8.
26. Cuypers A, Smeets K, Opdenakker K, Keunen E, Ruytinx J, Remans T, Horemans N, Vanhoudt N, Van Sanden S, Semane B, Van Belleghem F, Guisez Y, Colpaert J, Vangronsveld J. The Cellular Redox State as a Modulator in Cd and Cu Responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *New Phytologist*. Ingediend.
27. Feussner I, Wasternack C. The Lipoxygenase Pathway. *Annual Review of Plant Biology* 2002; 53(1): 275-297.
28. Liavonchanka A, Feussner I. Lipoxygenases: Occurrence, Functions and Catalysis. *Journal of Plant Physiology* 2006; 163(3): 348-357.
29. Porta H, Rocha-Sosa M. Plant Lipoxygenases. Physiological and Molecular Features. *Plant Physiology* 2002; 130(1): 15-21.
30. Skórzyńska-Polit E, Pawlikowska-Pawłęga B, Szczuka E, Drażkiewicz M, Krupa Z. The Activity and Localization of Lipoxygenases in *Arabidopsis thaliana* under Cadmium and Copper Stresses. *Plant Growth Regulation* 2006; 48(1): 29-39.
31. Chehab EW, Perea JV, Gopalan B, Theg S, Dehesh K. Oxylipin Pathway in Rice and *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Plant Biology* 2007; 49(1): 43-51 (invited review).
32. Wasternack C. Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. *Annals of Botany* 2007; 100(4): 681-697 (invited review).
33. Shan XY, Wang ZL, Xie D. Jasmonate Signal Pathway in *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Plant Biology* 2007; 49(1): 81-86 (invited review).
34. Schaller F. Enzymes of the Biosynthesis of Octadecanoid-derived Signalling Molecules. *Journal of Experimental Botany* 2001; 52(354): 11-23 (review).
35. Vellosillo T, Martínez M, López MA, Vicente J, Cascón T, Dolan L, Hamberg M, Castresana C. Oxylipins Produced by the 9-Lipoxygenase Pathway in *Arabidopsis* Regulate Lateral Root Development and Defense Responses through a Specific Signalling Cascade. *The Plant Cell* 2007; 19(3): 831-846.
36. Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley SD, Koornneef M. *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Science* 1998; 282(5389): 662, 679-682 (review).
37. Smeets K, Ruytinx J, Van Belleghem F, Semane B, Lin D, Vangronsveld J, Cuypers A. Critical Evaluation and Statistical Validation of a Hydroponic Culture System for *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* 2008; 46(2): 212-218.
38. Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells. *Experimental Cell Research* 1968; 50(1): 151-158.
39. Zhang HM, Forde BG. An *Arabidopsis* MADS Box Gene That Controls Nutrient-induced Changes in Root Architecture. *Science* 1998; 279(5349): 407-409.
40. Amplex[®] Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (A22188) Product Information. Molecular Probes, Invitrogen. 2004.
41. Dhindsa RS, Plumb-Dhindsa P, Thorpe TA. Leaf Senescence: Correlated with Increased Levels of Membrane Permeability and Lipid Peroxidation, and Decreased Levels of Superoxide Dismutase and Catalase. *Journal of Experimental Botany* 1981; 32(126): 93-101.
42. mirVana[™] miRNA Isolation (Cat #1560,1561) Instruction Manual. Ambion. 2006.
43. NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer V3.5 User's Manual. NanoDrop Technologies, Inc. 2007.
44. Agilent RNA 6000 Nano Kit Guide. Agilent Technologies, Inc. 2001, 2003-2006.
45. QuantiTect[®] Reverse Transcription Handbook. Qiagen. 2005.
46. Gachon C, Mingam A, Charrier B. Real-time PCR: What Relevance to Plant Studies? *Journal of Experimental Botany* 2004; 55(402): 1445-1454 (review).
47. Remans T, Smeets K, Opdenakker K, Mathijsen D, Vangronsveld J, Cuypers A. Normalisation of Real-time RT-PCR Gene Expression Measurements in *Arabidopsis thaliana* Exposed to Increased Metal Concentrations. *Planta* 2008; 227(6): 1343-1349.
48. Fast SYBR[®] Green Master Mix Protocol. Applied Biosystems. 2007.

49. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate Normalization of Real-time Quantitative RT-PCR Data by Geometric Averaging of Multiple Internal Control Genes. *Genome Biology* 2002; 3(7): research0034.1-0034.11.
50. Somashekaraiah BV, Padmaja K, Prasad ARK. Phytotoxicity of Cadmium Ions on Germinating Seedlings of Mung Bean (*Phaseolus vulgaris*): Involvement of Lipid Peroxides in Chlorophyll Degradation. *Physiologia Plantarum* 1992; 85(1): 85-89.
51. Mithöfer A, Schulze B, Boland W. Biotic and Heavy Metal Stress Response in Plants: Evidence for Common Signals. *FEBS Letters* 2004; 566(1-3): 1-5.
52. Jonak C, Nakagami H, Hirt H. Heavy Metal Stress. Activation of Distinct Mitogen-activated Protein Kinase Pathways by Copper and Cadmium. *Plant Physiology* 2004; 136(2): 3276-3283.
53. Rentel MC, Lecourieux D, Ouaked F, Usher SL, Petersen L, Okamoto H, Knight H, Peck SC, Grierson CS, Hirt H, Knight MR. OXI1 Kinase is Necessary for Oxidative Burst-mediated Signalling in *Arabidopsis*. *Nature* 2004; 427(6977): 858-861.
54. Takahashi F, Yoshida R, Ichimura K, Mizoguchi T, Seo S, Yonezawa M, Maruyama K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. The Mitogen-activated Protein Kinase Cascade MKK3-MPK6 is an Important Part of the Jasmonate Signal Transduction Pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 2007; 19(3): 805-818.
55. Panchuk II, Zentgraf U, Volkov RA. Expression of the Apx Gene Family during Leaf Senescence of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 2005; 222(5): 926-932.
56. Zimmermann P, Heinlein C, Orendi G, Zentgraf U. Senescence-specific Regulation of Catalases in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Cell and Environment* 2006; 29(6): 1049-1060.
57. Anthony RG, Khan S, Costa J, Pais MS, Bogre L. The *Arabidopsis* Protein Kinase PTI1-2 is Activated by Convergent Phosphatidic Acid and Oxidative Stress Signalling Pathways Downstream of PDK1 and OXI1. *Journal of Biological Chemistry* 2006; 281(49): 37536-37546.
58. Sasaki Y, Asamizu E, Shibata D, Nakamura Y, Kaneko T, Awai K, Amagai M, Kuwata C, Tsugane T, Masuda T, Shimada H, Takamiya K, Ohta H, Tabata S. Monitoring of Methyl Jasmonate-responsive Genes in *Arabidopsis* by cDNA Macroarray: Self-activation of Jasmonic Acid Biosynthesis and Crosstalk with Other Phytohormone Signaling Pathways. *DNA Research* 2001; 8(4): 153-161.
59. Nagae M, Nakata M, Takahashi Y. Identification of Negative cis-Acting Elements in Response to Copper in the Chloroplastic Iron Superoxide Dismutase Gene of the Moss *Barbula unguiculata*. *Plant Physiology* 2008; 146(4): 1687-1696.
60. Abdel-Ghany SE, Müller-Moulé P, Niyogi KK, Pilon M, Shikanai T. Two P-type ATPases are Required for Copper Delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *The Plant Cell* 2005; 17(4): 1233-1251.
61. Jones-Rhoades MW, Bartel DP. Computational Identification of Plant MicroRNAs and Their Targets, Including a Stress-induced miRNA. *Molecular Cell* 2004; 14(6): 787-799.
62. Sunkar R, Kapoor A, Zhu JK. Posttranscriptional Induction of Two Cu/Zn Superoxide Dismutase Genes in *Arabidopsis* is Mediated by Downregulation of miR398 and Important for Oxidative Stress Tolerance. *The Plant Cell* 2006; 18(8): 2051-2065.
63. Cuypers A, Vangronsveld J, Clijsters H. Peroxidases in Roots and Primary Leaves of *Phaseolus vulgaris*. Copper and Zinc Phytotoxicity: a Comparison. *Journal of Plant Physiology* 2002; 159(8): 869-876.
64. Semane B, Cuypers A, Smeets K, Van Belleghem F, Horemans N, Schat H, Vangronsveld J. Cadmium Responses in *Arabidopsis thaliana*: Glutathione Metabolism and Antioxidative Defence System. *Physiologia Plantarum* 2007; 129(3): 519-528.
65. Schützendübel A, Polle A. Plant Responses to Abiotic Stresses: Heavy Metal-induced Oxidative Stress and Protection by Mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* 2002; 53(372): 1351-1365.