

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: Oxidatieve stressresponsen en regulatie in Arabidopsis thaliana na blootstelling aan cadmium en koper: de rol van ascorbaat en glutathion

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,

JOZEF CZAK, Marijke

Datum: 14.12.2009

Oxidatieve stressresponsen en regulatie in Arabidopsis thaliana na blootstelling aan cadmium en koper: de rol van ascorbaat en glutathion

Marijke Jozefczak

promotor :
Prof. dr. Ann CUYPERS

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



Senior Practical Training

Oxidatieve stressresponsen en regulatie in *Arabidopsis thaliana* na blootstelling aan cadmium en koper: de rol van ascorbaat en glutathion

Periode: 12 november 2008 – 26 juni 2009

Marijke Jozefczak, B. Sc. (0421658)
2^{de} Master Biomedische Wetenschappen
Klinische Moleculaire Wetenschappen

Promotor: Prof. Dr. Ann Cuypers
2^{de} beoordelaar: Prof. Dr. Emmy Van Kerkhove
Begeleiders: Drs. Kelly Opdenakker
Dr. Tony Remans

Departement: Scheikunde, Biologie, Geologie
Onderzoeksinstelling: Centrum voor Milieukunde
Onderzoeksgroep: Milieubiologie
Academische instelling: Universiteit Hasselt
Diepenbeek, België
School voor levenswetenschappen
transnationale Universiteit Limburg

Inhoudsopgave

Voorwoord	1
Lijst met afkortingen	2
Samenvatting	3
1 Inleiding	4
1.1 Toxische effecten van cadmium en koper in mensen	4
1.2 Cadmium in planten	5
1.2.1 Opname, opslag en translocatie van cadmium	5
1.2.2 Effecten van cadmium in de plant	5
1.3 Koper in planten	6
1.4 Oxidatieve stress	6
1.4.1 Pro-oxidanten	7
1.4.2 Negatieve effecten van reactieve zuurstofvormen	8
1.4.3 Antioxidatieve enzymen	8
1.4.4 Antioxidatieve metabolieten	9
1.4.5 Reactieve zuurstofvormen als signaalmoleculen	10
1.4.6 Regulatie van genexpressie onder metaalstress	11
1.5 Objectieven	12
2 Materialen en methoden	13
2.1 Plantenmateriaal en groeiomstandigheden	13
2.1.1 Plantcultuur op agarplaten	13
2.1.2 Hydrocultuur	14
2.2 Metaalbepalingen	14
2.3 Waterstofperoxidemetingen	15
2.4 Metingen van lipidenperoxidatie	15
2.5 Metaboliëtbepalingen	15
2.6 Genexpressie	15
2.6.1 Expressie van messenger RNA	15
2.6.2 Expressie van microRNA	16
2.7 Clusteranalyse	18
2.8 Statistische analyse	18

3	Resultaten	19
3.1	Cadmiumgevoeligheid van <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
3.1.1	Morfologische verschillen tussen de vier <i>Arabidopsis thaliana</i> -genotypes	19
3.1.2	Effect van cadmium op de groei	19
3.2	De rol van AsA en GSH in de responsen en de regulatie in <i>Arabidopsis thaliana</i> na 24 uur blootstelling aan cadmium	20
3.2.1	Cadmiumopname door de wortels en translocatie naar het blad	20
3.2.2	Productie van vrije zuurstofvormen	21
3.2.3	Integriteit van celmembranen	21
3.2.4	Cellulaire redoxstatus	22
3.2.5	Genexpressie in de wortel	22
3.2.6	Genexpressie in het blad	26
3.2.7	Clusteranalyse van de profielen op transcriptieniveau	26
3.3	De rol van AsA en GSH in de responsen en de regulatie van <i>Arabidopsis thaliana</i> na een week cadmium- of koperstress	30
3.3.1	Effect van cadmium op de groei	30
3.3.2	Effect van koper op de groei	31
3.3.3	Genexpressie bij twee verschillende metaalconcentraties na een week blootstelling	32
4	Discussie	36
4.1	Responsen van wildtype <i>Arabidopsis thaliana</i> op cadmiumstress	36
4.1.1	Korte blootstelling van wildtype <i>Arabidopsis thaliana</i> aan cadmium	36
4.1.2	Lange blootstelling van wildtype <i>Arabidopsis thaliana</i> aan cadmium en koper	39
4.1.3	Posttranscriptionele regulatie in wildtype <i>Arabidopsis</i> na cadmium- en koperstress	40
4.2	De rol van ascorbaat en glutathion in de responsen van <i>Arabidopsis thaliana</i> op metaalstress	41
4.3	Toekomstperspectieven	44
5	Synthese	45
6	Referenties	48

Voorwoord

Bij het maken van dit eindwerk heb ik kunnen rekenen op vele personen, ik zou hen bij deze graag willen bedanken. Op de eerste plaats wil ik Ann bedanken voor de mogelijkheden die ze me gegeven heeft om tijdens deze seniorstage tot unieke en indrukwekkende conclusies te komen. Hoewel ze het ontzettend druk had maakte ze tijd voor iedereen, daarom wil ik haar ook bedanken voor haar opmerkelijke begeleiding tijdens het maken van de poster en het schrijven van de thesis alsook voor haar enthousiasme naar dit jaar en volgende jaren toe. Daarnaast wil ik mijn begeleiders Kelly en Tony hartelijk bedanken voor de beste stageperiode ooit. Ik heb tijdens deze stage ontzettend veel geleerd en ik hoop dat we in de toekomst van elkaar kunnen bijleren. Ook wil ik Els heel erg bedanken voor haar steun en om mij onder haar hoede te nemen bij de technieken die ik nog niet beheerste. Heidi, Sarah, Eline en Sascha, bedankt voor de aangename werksfeer gedurende de stage en de "springuren". Ik hoop dat we met z'n allen een goed team zullen vormen. Voor de rest wil ik iedereen van het labo bedanken voor de begeleiding, de flexibele samenwerking betreffende het begeerde real-time toestel, de leuke babbels en de goede zorgen in verband met mijn beste vriend, de vloeibare stikstof.

Buiten het labo is het werk nooit gedaan, voor die momenten wil ik graag mijn ouders bedanken voor hun morele en materiële bijstand en, samen met mijn zus en familie, voor hun steun en hun begrip in de drukke perioden van mijn opleiding. Ook Thomas wil ik bedanken om gedurende mijn vijfjarige opleiding al mijn grillen te verdragen, voor zijn oneindig geduld, zijn vele troostende en oppeppende krachten. Zijn moeder wil ik bedanken voor het survivalpakket dat ik elke stagedag meekreeg alsook zijn vader en stiefmoeder om me regelmatig een hart onder de riem te steken. Niet te vergeten wil ik al mijn vrienden en vriendinnen uit Diepenbeek, Hasselt, Leuven en Oostende bedanken om er samen een onvergetelijke studententijd van te maken.

Lijst met afkortingen

APx	ascorbaatperoxidase
AsA	ascorbaat
Ca	calcium
CAT	catalase
Cd	cadmium
CDPK	cadmium afhankelijk proteïne kinase
CSD	koper/zink-superoxidedismutase
Cu	koper
DHA	dehydroascorbaat
DHAR	dehydroascorbaatreductase
Fe	ijzer
FSD	ijzer-superoxidedismutase
GPx	glutathionperoxidase
GR	glutathionreductase
GRx	glutaredoxine
GSH	glutathion
GSSG	glutathiondisulfide
H ₂ O ₂	waterstofperoxide
LOX	lipoxygenase
MAPK	mitogen geactiveerd proteïne kinase
MDHA	monodehydroascorbaat
MDHAR	monodehydroascorbaatreductase
MIR	microRNA
MKK	MAP kinase kinase
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide fosfaat
O ₂	zuurstof
O ₂ ^{•-}	superoxide
¹ O ₂	singlet zuurstof
°OH	hydroxylradicaal
OXI	oxidative signal-inducible MAPK
PC	fytochelatine
PCS	fytochelatine synthase
Prx	peroxiredoxine
ROS	reactieve zuurstofvormen
SOD	superoxidedismutase
SOS	salt overly sensitive CDPK
SPL	squamosa promotor binding protein-like
Trx	thioredoxine
Zn	zink

Samenvatting

De ontwikkeling van geavanceerde industriële en landbouwtechnieken begin vorige eeuw hebben geleid tot de huidige, wereldwijde vervuiling door metalen. De Noorderkempen van België en Nederland alsook Luikse gebieden lijden aan een belangrijke verontreiniging door onder andere cadmium (Cd). Bioaccumulatie van metalen in de voedselketen is een belangrijk probleem voor alle organismen wat ernstige gezondheidsproblemen veroorzaakt. Oxidatieve stress is een belangrijk proces in metaaltoxiciteit. Onder oxidatieve stress verstaat men een onevenwicht tussen pro- en antioxidanten, wat kan leiden tot schade of signalering via reactieve zuurstofvormen (ROS). Het antioxidatief verdedigingssysteem is cruciaal om de cellulaire redoxbalans in evenwicht te houden en bestaat uit enzymen zoals superoxidedismutasen (SOD's) en metabolieten zoals ascorbaat (AsA) en glutathion (GSH). In planten spelen beide metabolieten een belangrijke rol in de antioxidatieve responsen op metaalstress via de AsA-GSH cyclus en Cd-scavenging.

In dit project werd de cellulaire en moleculaire basis van Cd-geïnduceerde oxidatieve stress bestudeerd in wortels en blaadjes van *Arabidopsis thaliana*. Om specifiek de rol van AsA en GSH te onderzoeken in de antioxidatieve verdediging, werden naast het wildtype (Columbia ecotype) ook drie mutanten bestudeerd met een tekort aan één en/of beide metabolieten (Cad2-1, Vtc1-1 en Vtc1-1 Cad2-1). Verschillende morfologische, cellulaire en moleculaire parameters werden enerzijds beïnvloed door de metaaltoxiciteit en anderzijds door een verstoorde redoxstatus. Na 24 uur Cd-stress verdedigt de wortel zich hoofdzakelijk via SOD's [superoxide ($O_2^{\circ-}$)-scavengers] terwijl het blad voornamelijk de AsA-GSH cyclus [waterstofperoxide (H_2O_2)-scavengers] aanschakelt. Dit suggereert dat de vorming van $O_2^{\circ-}$ de hoofdoorzaak is van oxidatieve stress in de wortels terwijl H_2O_2 een belangrijke speler is in de blaadjes. Bovendien werd een intensieve crosstalk bevestigd tussen verschillende signaaltransductiecascadeën zoals ROS, oxylipinen, kinasen en transcriptiefactoren (TF's). Met betrekking tot de metabolieten wijzen de transcriptieresultaten in de richting van GSH als bepalende factor voor stressresponsen in de wortel en lijkt AsA bepalend te zijn in het blad na Cd-behandeling. Bovendien duidt een verhoogde genexpressie van lipoxygenase (LOX), een potentiële producent van oxidatieve stress, op een centrale rol van dit gen in de Cd-gerelateerde stoornissen in de redoxbalans. Meer specifiek lijkt LOX1 belangrijk te zijn in de wortel en LOX2 in het blad. De regulatie van metaalgeïnduceerde genexpressie werd eveneens verder uitgediept op het posttranscriptioneel niveau via microRNA's (miRNA's) na blootstelling aan zowel Cd als koper (Cu). De resultaten bevestigen dat *Arabidopsis* zich aanpast aan Cu-toxiciteit via de regulatie van SOD-transcripten. Bij een overmaat aan Cu wordt SOD gebruikt in de vorm van Cu/zink(Zn)SOD's (CSD's) en wordt het transcriptieniveau van ijzer-SOD (*FSD*) onderdrukt. MicroRNA398 (*MIR398*) zorgt posttranscriptioneel voor de downregulatie van de *CSD1*- en *CSD2*-expressie. Deze studie bevestigt dat *MIR398* onderdrukt wordt door Cu waardoor *CSD*'s geïnduceerd worden. Onze resultaten bevestigen enerzijds dat Cd een omgekeerd effect heeft op de SOD-transcriptie en anderzijds worden nieuwe bewijzen aangeleverd betreffende het moleculair mechanisme hierachter. (1) Cadmium induceert een *MIR398*-gestuurde posttranscriptionele downregulatie van de genexpressie van *CSD1* en *CSD2*. (2) *MIR398* staat bij Cd-toxiciteit mogelijk onder controle van de TF squamosa promotor binding protein-like 7 (*SPL7*). (3) Een verlaagde hoeveelheid GSH in de GSH-deficiënte mutanten leidt tot een sterk verhoogde transcriptiesnelheid van *CSD1* en *CSD2* zodat het *CSD*-downregulerend effect van Cd-geïnduceerd *MIR398* wordt beperkt. Deze interactie werd tot op heden nooit eerder vastgesteld. Glutathion speelt dus een belangrijke rol in de antioxidatieve verdediging van *Arabidopsis* na Cd-stress.

Verder onderzoek moet meer inzicht geven in de precieze rol van AsA en GSH in metaalgeïnduceerde cellulaire responsen.

1 Inleiding

Nieuwe ontwikkelingen in industriële en landbouwtechnieken op het einde van de 19^{de} en het begin van de 20^{ste} eeuw hebben geleid tot de huidige, **wereldwijde vervuiling door zware metalen**. Zware metalen worden gedefinieerd als metalen met een dichtheid groter dan 5.0 g/cm³. **Cadmium** (Cd), met een dichtheid van 8.64 g/cm³, is een belangrijk milieuverontreinigend metaal dat voorkomt in fossiele brandstoffen en in ertsen geassocieerd met zink (Zn), lood (Pb) of koper (Cu)¹⁻³. Emissies naar het milieu treden op bij het verwerken of verbranden van deze producten (Tabel 1). Vervolgens kunnen zware metalen onze omgeving binnendringen en het volledig ecosysteem aantasten^{2, 3}. Ten eerste kunnen metalen van verontreinigde bodems lekken naar het grondwater en in ons drinkwater terecht komen. Een tweede belangrijke bron van Cd-blootstelling is via gecontamineerde voeding. Planten, inclusief groenten en fruit, kunnen Cd en andere metalen opnemen waardoor ze in onze voedselketen terecht komen. Ook orgaanvlees, voornamelijk de nieren en lever, van vee uit vervuilde gebieden is bijgevolg een bron van metalen. Tot slot verspreiden metaalpartikels zich ook in opwaaiend stof of in sigarettenrook.

Koper, met een dichtheid van 8.96 g/cm³, is een essentieel element voor de normale groei en ontwikkeling van organismen. Het kent verscheidene toepassingen zoals in de elektrische industrie, meststoffen, huishoudelijke producten, medische onderzoeken, enzovoort. Dit metaal wordt op veel plaatsen teruggevonden in de natuur. Emissie van Cu naar het milieu ontstaat vanuit diverse bronnen zoals Cu-smelters, Cu-mijnen en het gebruik van Cu-gebaseerde fungiciden⁴.

De overmatige aanwezigheid van zowel niet-essentiële metalen zoals Cd en Pb als van essentiële metalen zoals Cu, Zn, ijzer (Fe) en mangaan (Mn) in onze omgeving kan zelfs in kleine concentraties ernstige gezondheidsproblemen veroorzaken. **Bioaccumulatie** in de voedselketen is een belangrijk hedendaags probleem voor alle organismen¹⁻³. De Noorderkempen van België en Nederland alsook Luikse gebieden lijden aan een ernstige Cd/Zn-verontreiniging ten gevolge van Zn-smelters in deze regio's⁵. Pas eind vorige eeuw schakelden zulke fabrieken over op milieuvriendelijkere productieprocessen. Hoewel Cd onder meer werd gebruikt in batterijen, verf en galvanisatie, zijn de productie en toepassingen van Cd tegenwoordig sterk afgenomen. In veel regio's is de historische verontreiniging echter nog steeds aanwezig en in ontwikkelingslanden duurt de vervuiling nog steeds voort^{2, 3}.

1.1 Toxische effecten van cadmium en koper in mensen

Een belangrijk kenmerk van **cadmium** is zijn uitzonderlijk lang biologisch halfleven (20 tot 40 jaar)². De twee belangrijkste organen waar Cd wordt opgeslagen, zijn de nieren en de lever. De nieren worden het eerst aangetast, variërend van initiële tubulaire schade tot nierfalen. Daarnaast kan Cd problemen opleveren voor het skelet, de longen en de bloeddruk. Acute blootstelling heeft gevolgen waaronder abdominale pijn, spierkrampen en bewustzijnsverlies^{2, 3, 5}.

Koper is een essentieel mineraal voor alle organismen maar in grote hoeveelheden kan het ook toxisch zijn. Blootstelling aan Cu kan leiden tot gastro-intestinale problemen, hoofdpijn, duizeligheid en irritatie aan neus, mond en ogen. Een hoge Cu-opname kan leiden tot lever- en nierschade en zelfs sterfte⁴.

Tabel 1: Antropogene emissies van Cd in 1999¹. x 10³ ton/jaar

Atmosfeer	7.57
Energieproductie	0.79
Smelting en raffinaderij	5.43
Industrie	0.60
Afvalverbranding	0.75
Bodem	21.62
Tuinbouw- en dierafval	2.20
Houtindustrie en -afval	1.10
Stadsafval	4.20
Riolering en organisch afval	0.18
Metaalindustrie	0.04
Mijnindustrie	7.20
Meststoffen en turf	0.20
Afgedankte materialen	1.20
Radioactieve neerslag	5.30
Totaal	29.19

Ondanks de kennis van deze **gezondheidsproblemen**, blijft de blootstelling aan zware metalen voortduren. Er moeten dus dringend maatregelen worden genomen om de metaalblootstelling te verminderen en de bijhorende gezondheidsrisico's te beperken^{2,3}.

1.2 Cadmium in planten

De fysiologische effecten van blootstelling aan zware metalen werden reeds grondig bestudeerd in planten. Planten hebben complexe mechanismen ontwikkeld om het niveau van essentiële metalen binnen fysiologische grenzen te houden en om niet-essentiële metalen te neutraliseren. **Metaal-plant interacties** zijn belangrijk voor de overleving van planten maar ook om de introductie van metalen in onze voedselketen tegen te gaan. Metaalopname en -opslag worden gecontroleerd door transporters en chelatoren. De verantwoordelijke genen zijn nog niet volledig gekend. Studies met lagere, realistische metaalconcentraties zijn hiervoor vereist. Recent werden enkele belangrijke stappen geïdentificeerd op moleculair niveau⁶⁻⁸.

1.2.1 Opname, opslag en translocatie van cadmium

De mate van Cd-opname in de plant hangt af van de concentratie en **biobeschikbaarheid** ervan in de omgeving. De biobeschikbaarheid van een metaal is afhankelijk van zijn oplosbaarheid in de bodem die bepaald wordt door de aanwezige organische stoffen, pH, kation-uitwisselingscapaciteit, temperatuur en de concentratie van andere elementen. Planten kunnen zelf bijdragen aan de biobeschikbaarheid van metaalionen via actieve secretie van metaalbindende componenten en verzuring van de rhizosfeer met behulp van protonpompen. Daarnaast hebben wortelkoloniserende bacteriën alsook endofyten een belangrijke impact op de biobeschikbaarheid van zware metalen^{1, 6-8}.

Na mobilisatie in de rhizosfeer worden de metalen opgenomen door de wortelcellen. Voor Cd²⁺ bestaat geen specifiek **opnamemechanisme** aangezien het een niet-essentieel metaalion is. Dankzij zijn chemische gelijknissen met calcium (Ca²⁺), Zn²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺ en kalium (K⁺) kan Cd²⁺ als divalent kation in competitie treden met deze nutriënten voor hun transmembranaire transporters. De meeste transporters zoals Zn-regulated (ZIP) transporters en Ca²⁺-kanalen kennen een brede substratspecificiteit, inclusief voor niet-essentiële metalen. Bovendien is de membraanpotential sterk negatief aan de binnenkant van het membraan (tot -200 mV), waardoor een sterke drijvende kracht de opname van kationen stimuleert^{1, 6-8}.

De meeste metalen die opgenomen worden in het cytosol worden gebonden aan **liganden**. De Cd-homeostase wordt gecontroleerd door thiol(SH)groepen omwille van de hoge affiniteit van Cd hiervoor. Thiolgroepen kunnen functionele groepen zijn van macromoleculen, liganden die continu aanwezig zijn of liganden die gesynthetiseerd worden in respons op Cd-blootstelling. De synthese van fytochelatine (PC) uit glutathion (GSH) door fytochelatine synthase (PCS) is een belangrijke respons van planten op blootstelling aan Cd omwille van de aanwezigheid van SH-groepen in deze moleculen^{7, 8}.

Het hoofdmechanisme van Cd-detoxificatie en -tolerantie in planten is **metaalsekwestratie** in de vacuole van wortelcellen. De activiteit van metaalsekwestratie in de wortels bepaalt grotendeels de translocatiesnelheid van metalen naar het blad. Voor een efficiënte translocatie worden drie processen vereist: een symplastisch transport van ionen tot aan het xyleem, een actieve opname in het xyleem via een transmembranair transport en ten slotte de beschikbaarheid van geschikte liganden in het xyleem zelf⁷.

1.2.2 Effecten van cadmium in de plant

Op **morfologisch vlak** leidt Cd tot een zichtbaar gereduceerde plantengroei. Daarnaast verstoort Cd een aantal **fysiologische processen**: fotosynthese, chlorose, transpiratie en de opname van mineralen zoals

Ca, K, Fe en fosfaat door de biobeschikbaarheid van deze nutriënten te beïnvloeden. Bovendien wordt Fe-reductase geremd wat leidt tot Fe-deficiëntie, met ernstige gevolgen voor de fotosynthese. Cadmium kan ook rechtstreeks de elektronen-transport-ketens (ETC's) verstoren in chloroplasten en mitochondria^{1, 6, 7, 9}.

Cadmium beïnvloedt eveneens een aantal **cellulaire processen** door te binden met SH- of carboxylgroepen van biomoleculen. Enzymen zijn één van de belangrijke targets van zware metalen, binding leidt tot denaturatie of verstoring van katalytisch actieve groepen^{1, 6}. Door de grote chemische gelijkheid van Cd²⁺ met Ca²⁺ en Zn²⁺ kan Cd²⁺ beide ionen vervangen en interfereren met Ca²⁺- en Zn²⁺-afhankelijke processen^{1, 7}. Cadmium induceert ook lipidenperoxidatie waardoor de membraanpermeabiliteit wordt aangetast, wat resulteert in een verstoorde water- en nutriëntenbalans^{6, 7, 10}. Bovendien kan Cd afwijkingen in DNA veroorzaken. Ondanks het vele werk op metaal toxiciteit zijn de cellulaire responsen echter nog niet volledig bekend. **Oxidatieve stress** wordt vaak aangehaald als een belangrijk effect van Cd-blootstelling aangezien metalen werken als katalysatoren in de oxidatieve degeneratie van biomoleculen^{7, 10}.

De reactie van planten op Cd-stress is een complex netwerk van parallelle en/of opeenvolgende gebeurtenissen waartoe snelle fysiologische en trage morfologische processen behoren. Een plantencel beschikt over een aantal **beschermingsmechanismen**¹: (1) de immobilisatie van Cd aan de celwand en extracellulaire koolhydraten van wortels; (2) een aspecifieke Cd-opname; (3) complexatie en vacuolaire sekwestratie; (4) de inductie van stressresponsen zoals de synthese van antioxidanten^{1, 6-8}.

De vorming van PC's is een **metaalspecifiek** beschermingsmechanisme, deze synthese wordt rechtstreeks geactiveerd in de aanwezigheid van verschillende metaalionen. Daarnaast zijn er indicaties voor Cd-responsieve genen dankzij microarray experimenten in *Arabidopsis*. De meeste genen zijn gerelateerd met de redoxstatus of signaaltransductie, de resulterende signalering is echter nog niet bekend^{7, 11}.

1.3 Koper in planten

In tegenstelling tot Cd is Cu een **essentieel** en redoxactief metaal. Koper komt voor in meerdere oxidatievormen zoals het minder stabiele Cu⁺ en het meer stabiele Cu²⁺. Hierdoor kan Cu deelnemen aan verschillende fysiologische processen zoals fotosynthetisch en mitochondriaal elektrontransport en is het een essentiële cofactor voor veel metalloproteïnen waaronder Cu/Zn-superoxidedismutasen (Cu/ZnSOD's)⁴.

De **redoxeigenschappen** die Cu een essentieel element maken, dragen echter ook bij tot zijn toxiciteit. Via de Haber Weiss reactie katalyseert Cu de productie van sterk oxiderende hydroxylradicalen (Figuur 2). Een overmaat aan Cu kan de normale ontwikkeling verstoren, een aantal symptomen zijn een gereduceerde groei, chlorose en necrose. Toxiciteit ontstaat onder meer doordat Cu op cellulair niveau bindt aan SH-groepen van biomoleculen, transportprocessen verstoort en radicalen produceert⁴.

Aangezien Cu zowel een essentiële cofactor als een toxisch element is, hebben planten verschillende strategieën ontwikkeld om zijn **homeostase** correct te reguleren. Deze strategieën moeten de accumulatie van het metaal in zijn vrije reactieve vorm voorkomen en een goede levering van dit element naar de juiste metalloproteïnen verzekeren. Hoewel deze mechanismen nog niet volledig bekend zijn, wijzen recente onderzoeken naar een rol voor metaalchelators zoals metallothioneïnes (MT's) in Cu²⁺-complexatie^{4, 12}.

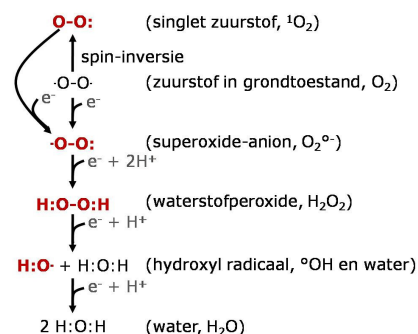
1.4 Oxidatieve stress

In normale omstandigheden bestaat de cellulaire redoxstatus uit een evenwicht tussen pro- en antioxidanten. Bij oxidatieve stress is er een verstoring van deze **redoxbalans** met een overmatige productie van vrije radicalen door pro-oxidanten en een beperkte antioxidatieve verdediging. Kleine

schommelingen in de concentraties van deze oxidanten spelen een belangrijke rol in intracellulaire signaleringscascaden. Ongecontroleerde stijgingen resulteren echter in oxidatieve stress waarbij cellen en weefsels beschadigd worden. Dit onevenwicht is van groot belang in de toxiciteit van verschillende metalen zoals Cd en Cu. Zelfs de blootstelling van organismen aan lage Cd- en Cu-concentraties kan oxidatieve stress veroorzaken¹³⁻¹⁵.

1.4.1 Pro-oxidanten

Pro-oxidanten kunnen oxidatieve stress induceren via de productie van schadelijke vrije radicalen. **Reactieve zuurstofvormen (ROS)** zijn de belangrijkste componenten die verantwoordelijk zijn voor oxidatieve stress. In plantencellen zijn de voornaamste endogene bronnen van ROS de organellen met ETC's of een sterke oxiderende capaciteit zoals chloroplasten, mitochondria en peroxisomen. Reactieve zuurstofvormen zijn gedeeltelijk gereduceerde of geactiveerde derivaten van zuurstof (O₂): singlet O₂ (¹O₂), superoxide-anion (O₂^{•-}), waterstofperoxide (H₂O₂) en hydroxyl radicaal ([•]OH) (Figuur 1). In tegenstelling tot O₂ zijn ROS erg reactief; ze reageren willekeurig met biomoleculen en kunnen leiden tot onder andere lipidenperoxidaties, eiwitdenaturatie en mutagenese. Aangezien O₂ voortdurend aanwezig is in onze omgeving is de kans op zulke destructieve oxidatieve reacties zeer groot. Aërobe organismen hebben daarom efficiënte ROS-scavenging mechanismen ontwikkeld^{13, 16-19}.

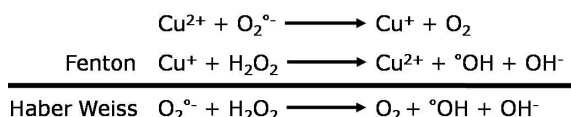


Figuur 1: Schematische weergave van spin-inversie (↑) en de univalente reductie (↓) van O₂. ROS zijn rood aangeduid. e⁻, elektron; H⁺, proton.

In zijn grondtoestand is O₂ een tweevoudig radicaal met twee ongepaarde elektronen. Omdat beide elektronen dezelfde spin hebben, kan O₂ enkel reageren met één elektron tegelijk. Door deze **spinrestrictie** kent O₂ een lage reactiviteit. Indien echter één ongepaard elektron geëxciteerd wordt en zijn spin omkeert, ontstaat het krachtig oxidant ¹O₂ (Figuur 1). Deze spin-inversie is een aanzienlijk probleem voor chloroplasten, een verkeerde energieverdeling tijdens de fotosynthese kan leiden tot de energietransfer van geëxciteerd chlorofyl naar O₂ waardoor ¹O₂ ontstaat. In deze vorm kan O₂ wel snel reageren met verbindingen^{13, 15, 16}.

Tijdens de **univalente reductie van O₂** tot H₂O worden intermediaire zuurstofvormen geproduceerd (Figuur 1). Het product van de eerste elektrontransfer naar O₂ is O₂^{•-}, de precursor van de meeste ROS en een mediator in oxidatieve kettingreacties. Dismutatie van O₂^{•-} tot H₂O₂ gebeurt spontaan of kan versneld worden door antioxidatieve SOD's. Waterstofperoxide kan op zijn beurt volledig gereduceerd worden tot H₂O en O₂ of gedeeltelijk tot [•]OH. Hydroxylradicalen behoren tot de sterkste natuurlijke radicalen, ze worden gevormd in de aanwezigheid van redoxactieve metalen zoals Cu in de Haber Weiss reactie (Figuur 2)^{13, 15, 16, 18, 19}. Geoxideerd Cu²⁺ kan opnieuw gereduceerd worden door O₂^{•-} waardoor dit radicaal belangrijk is om het proces te onderhouden. Andere redoxactieve metalen zoals Fe kunnen Cu vervangen in deze reacties²⁰.

Figuur 2: De Haber Weiss reactie, bestaande uit de oxidatie van O₂^{•-} en de Fentonreactie.

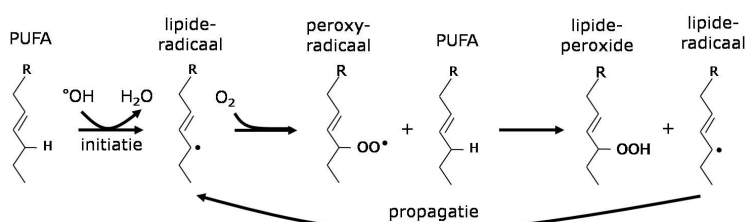


De productie van O₂^{•-} gebeurt zowel enzymatisch als niet-enzymatisch. De belangrijkste enzymatische bron is het membranair **NADPH oxidase**. Dit enzym katalyseert de reductie van O₂ tot het sterk reactief O₂^{•-} via een transmembranair elektrontransport van cellulair NADPH naar extracellulair O₂. Daarnaast katalyseren **lipoxygenasen** (LOX'en) de reductie van linol- en α-linoleenzuur, de belangrijke bouwstenen van

membranen die worden vrijgezet uit membraire fosfolipiden door fosfolipasen. In contact met O_2 kunnen deze gereduceerd worden ter vorming van bioactieve stoffen zoals jasmonaten met $O_2^{\circ-}$ als bijproduct^{18, 21, 22}. De hoofdbronnen van niet-enzymatisch intracellulair geproduceerd $O_2^{\circ-}$ zijn de **ETC's** van mitochondria en chloroplasten. De meeste ETC-stappen bestaan uit enkelvoudige elektrontransfers, dit is in het voordeel van de univalente reductie van O_2 aangezien deze elektronen regelmatig lekken uit de ETC^{15, 16}.

1.4.2 Negatieve effecten van reactieve zuurstofvormen

Op cellulair niveau induceren zowel Cd als Cu oxidatieve stress met **lipidenperoxidatie** tot gevolg. Lipidenperoxidatie, de oxidatieve degradatie van lipiden, is een belangrijk effect van ROS. In dit proces trekken vrije radicalen elektronen aan van lipiden zoals membraire polyonverzadigde vetzuren (PUFA's),



Figuur 3: Kettingreactie van lipideperoxidatie.

wat resulteert in celschade. Het proces van lipidenperoxidatie verloopt volgens een kettingreactie (Figuur 3). Eerst wordt een lipideradicaal geproduceerd door onttrekking van een waterstof(H)atoom; de initiators zijn meestal ROS zoals $^{\circ}OH$. Het gevormde lipideradicaal is onstabiel en reageert snel

met O_2 waardoor een peroxyradicaal wordt gevormd. Deze radicalen reageren snel met andere lipiden om een nieuw lipideradicaal en een lipideperoxide te produceren. Deze kettingreactie kan versneld worden door middel van redoxactieve metalen zoals Cu waarbij een alkoxyradicaal en een nieuw hydroxylradicaal ontstaan en de lipidenperoxidatie exponentieel gaat toenemen. Het volledig proces kan enkel gestopt worden wanneer twee lipideradicalen met elkaar reageren en een neutraal molecule produceren. Op deze manier worden echter biologische membranen beschadigd. De gevolgen zijn een verlaagde membraanfluiditeit, een verhoogde membraanpermeabiliteit en beschadigde membraaneiwitten^{13, 23, 24}. Naast membraire schade tasten ROS ook DNA en eiwitten aan met toxische en mutagene gevolgen.

1.4.3 Antioxidatieve enzymen

Niet alleen de productie van ROS maar ook de bescherming ertegen zijn intrinsieke karakteristieken van elke levende cel. Een verhoogde productie leidt enerzijds tot oxidatieve schade maar anderzijds activeert het ook specifieke cellulaire processen in functie van herstel zoals het **antioxidatief verdedigingssysteem**. Dit systeem bestaat enerzijds uit ROS-scavenging enzymen zoals SOD, catalase (CAT) en peroxidase (Px) en anderzijds uit metabolieten zoals ascorbaat (AsA) en GSH. Samen voorzien zij de cellen van een efficiënt systeem om ROS te neutraliseren en de hoeveelheid ROS in cellen onder controle te houden^{13, 16, 18, 21}.

Een eerste belangrijk enzym, **SOD**, staat in voor een snelle dismutatie van $O_2^{\circ-}$ tot H_2O_2 . Deze snelle reductie is noodzakelijk omwille van de sterke reactiviteit van $O_2^{\circ-}$. Aangezien $O_2^{\circ-}$ in belangrijke mate in de chloroplast wordt gevormd ten gevolge van het aëroob metabolisme, zijn hier veel actieve SOD's aanwezig. Er bestaan drie klassen SOD's in planten naargelang het metaal in hun actief centrum: FeSOD, Cu/ZnSOD en MnSOD. Vervolgens wordt H_2O_2 gereduceerd tot H_2O en O_2 door CAT, Px en de AsA-GSH cyclus. **Catalasen** vertonen een relatief lage affiniteit, maar hoge reactiesnelheid voor H_2O_2 en degraderen H_2O_2 zonder verbruik van cellulaire reducerende equivalenten¹⁵⁻¹⁹. **Ascorbaatperoxidase** (APx) speelt een hoofdrol in H_2O_2 -reductie, met een hoge specificiteit via de AsA-GSH cyclus met AsA als elektronendonor, zoals verder wordt besproken. Daarnaast zijn **peroxiredoxines** (Prx's) peroxidasen die peroxides neutraliseren waaronder H_2O_2 . Ze hebben elektronendonors zoals thioredoxine (Trx), glutaredoxine (Grx) of GSH nodig om

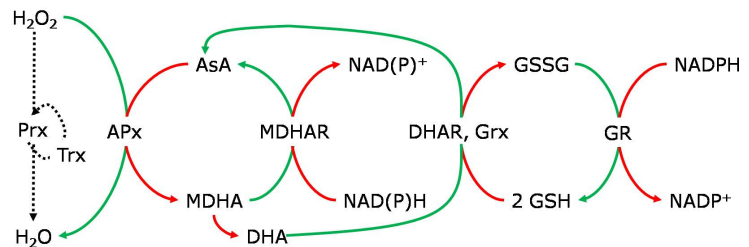
terug gereduceerd te worden^{25, 26}. Naast hun functie als H₂O₂-scavenger zijn Trx en Grx verantwoordelijk om intracellulaire eiwitten in hun gereduceerde vorm te houden. **Thioredoxine** verbreekt ROS-geïnduceerde disulfidebindingen en wordt zelf gereduceerd door NADPH-afhankelijk Trx-reductase (TrxR). **Glutaredoxine** heeft dezelfde functie als Trx maar is beperkt tot de katalysatie van GSH-disulfidebindingen met behulp van GSH-reductase (GR)^{27, 28}.

De **balans** tussen SOD's en H₂O₂-scavengingsystemen (zowel enzymatisch als de metabole AsA-GSH cyclus) is cruciaal om het dynamisch evenwicht van O₂^{•-} en H₂O₂ te bepalen. Deze balans, samen met de sekwestratie van metaalionen, voorkomt de vorming van het sterk toxisch ^oOH-radicaal^{15, 16, 19}.

1.4.4 Antioxydatieve metabolieten

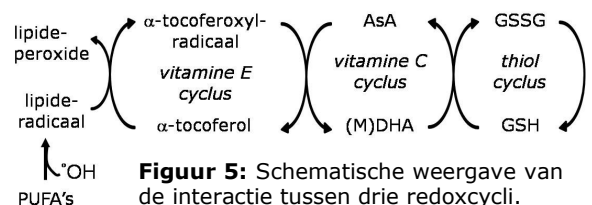
De belangrijkste antioxydatieve metabolieten in planten zijn AsA of vitamine C, vitamine E en GSH. De **AsA-GSH cyclus** (Figuur 4) is essentieel in planten voor hun normaal metabolisme en voor de verdediging tegen exogene stressfactoren zoals metalen. De cyclus kent een efficiënte werking zowel in de chloroplast als in het cytosol waarbij achtereenvolgens AsA, GSH en NADPH geoxideerd en opnieuw gereduceerd worden^{16, 18}.

Figuur 4: De ascorbaat-glutathion cyclus. De drie redoxines (Prx, Trx en Grx) zijn ook weergegeven. Rode pijlen stellen oxidaties voor en groene pijlen reducties. De stippellijn verwijst naar een mechanisme dat in planten nog niet volledig bekend is.



Ascorbaat heeft in planten enerzijds een regulerende rol in groei²⁹, celwandbiosynthese, fotosynthese, differentiatie, ... Anderzijds is het een reducerend agens dat de schade ten gevolge van oxidatieve processen vermindert met behulp van de AsA-GSH cyclus. Planten bezitten een uniek peroxidase, APx, dat AsA gebruikt als elektronendonor om H₂O₂ te reduceren tot H₂O en O₂. De oxidatie van AsA verloopt in twee stappen; eerst wordt monodehydroascorbaat (MDHA) gevormd en vervolgens volledig geoxideerd dehydroascorbaat (DHA). Monodehydroascorbaat disproporzioneert spontaan tot DHA en vervolgens tot AsA maar het kan ook rechtstreeks gereduceerd worden tot AsA via de werking van een NAD(P)H-afhankelijk MDHA-reductase (MDHAR)¹⁶⁻¹⁸.

Naast zijn rol als primair antioxidans heeft AsA ook een significante secundaire antioxydatieve functie. De AsA-pool dient als reservoir om andere membraanantioxidanten te regenereren zoals **vitamine E** (α -tocoferol). Dit antioxidans is geïncorporeerd in de fotosynthetische membranen en neutraliseert ¹O₂ en lipideperoxyderadicalen. Het gevormde tocoferoxyl-radicaal wordt op zijn beurt gereduceerd door AsA. Zo ontstaat er in het antioxidant netwerk een interactie tussen drie redoxcycli: vitamine E, vitamine C en thiol (Figuur 5)^{16, 30}.



Figuur 5: Schematische weergave van de interactie tussen drie redoxcycli.

De **thiolcyclus** is het tweede deel van de AsA-GSH cyclus, waarvan GSH de basis vormt. Gereduceerd GSH bestaat uit het tripeptide γ -glutamyl-cysteïnyl-glycine (γ -glu-cys-gly). De biosynthese gebeurt via de γ -glutamylcyclus; GSH ondergaat continu synthese en degradatie via twee opeenvolgende ATP-afhankelijke reacties. De synthese van γ -glutamylcysteïne (γ -EC) uit glutamaat en cysteïne wordt gekatalyseerd door γ -EC synthetase, gevolgd door de toevoeging van glycine met behulp van GSH-synthetase³¹. Ook aan GSH zijn verscheidene fysiologische functies toegeschreven in planten. Enerzijds speelt GSH een rol in celdeling,

genexpressie, eiwitsynthese, DNA-synthese en -herstel, sulfaatopname, ...^{29, 32} Anderzijds is GSH een ROS- en Cd-scavenger. Eén van de hoofdfuncties van GSH in de bescherming tegen ROS is de geoxideerde vorm van AsA naar zijn gereduceerde vorm recycleren. In de AsA-GSH cyclus gebruikt DHA-reductase (DHAR) GSH als elektronendonor voor de reductie van DHA tot AsA. Twee geoxideerde GSH-moleculen vormen vervolgens een disulfidebrug waardoor glutathiondisulfide (GSSG) ontstaat. Glutathion wordt in zijn gereduceerde vorm gehouden door het NADPH-afhankelijk enzym GR. De sterk gereduceerde GSH-pool is noodzakelijk voor zijn AsA-reducerende en Cd-bindende eigenschappen en voorkomt de vorming van destructieve aspecifieke disulfidebindingen tussen geoxideerd GSH en eiwitten. De twee **redoxkoppels** DHA-AsA en GSSG-GSH zijn elektronencarriers die voor een efficiënte bescherming zorgen tijdens het aëroob metabolisme^{13, 16-18}. Naast zijn functie als ROS-scavenger in de AsA-GSH cyclus is GSH ook een belangrijke **Cd-scavenger** dankzij zijn SH-groep op cysteïne. De polymerisatie van GSH ter vorming van PC maakt deze scavenging efficiënter¹⁶⁻¹⁸.

1.4.5 Reactieve zuurstofvormen als signaalmoleculen

Hoewel een verhoogde ROS-productie schadelijk kan zijn, heeft het ook een beschermende functie tegen pathogenen. De oxidatieve burst, een snelle en tijdelijke productie van grote hoeveelheden ROS, is één van de belangrijkste verdedigingsresponsen tegen micro-organismen^{16, 33, 34}. Meer recent werd aan ROS ook een belangrijke rol toegekend als signaalmolecule. Het zijn **essentiële sleutelregulatoren** van de signaaltransductie in biologische processen zoals groei, ontwikkeling, microbiële en antioxidatieve verdediging. Het gebruik van H₂O₂ en O₂^{•-} als signaalmoleculen in verschillende biologische processen toont aan dat cellen tijdens de evolutie een hoge graad van controle konden uitoefenen over ROS. Deze controle en signalering vereisen een groot netwerk van minstens 152 geïdentificeerde genen in *Arabidopsis*, dit netwerk is echter nog niet volledig opgeklaard^{13, 18, 35}. De negatieve term 'oxidatieve stress' verbergt echter de belangrijke rol van pro-oxidanten in cellulaire signalering. Daarom stellen Foyer en Noctor (2005)¹⁷ voor om het syndroom beter te omschrijven als **oxidatieve signalering**. Oxidatieve signalering is een belangrijke en essentiële functie die geassocieerd is met de mechanismen waarbij plantencellen de omgeving kunnen waarnemen en geschikte aanpassingen kunnen maken aan hun genexpressie, metabolisme en fysiologie^{17, 36}.

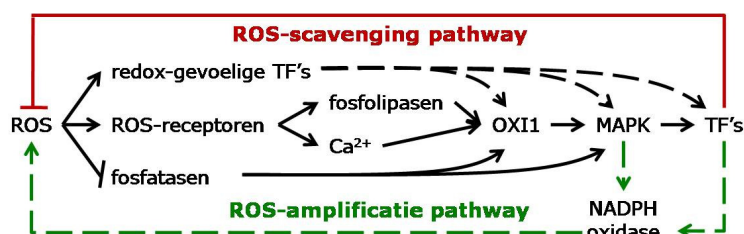
Regulatie van cellulaire processen via reversiebele (de)fosforylatie van enzymen en transcriptiefactoren (TF's) werd reeds grondig beschreven maar regulatie via reversiebele oxidatie en reductie (**redoxregulatie**) is eveneens belangrijk. Bovendien zijn beide systemen onderling met elkaar verbonden, de redoxstatus van een cel beïnvloedt fosforylatie en omgekeerd. Productie van ROS wordt vaak beschouwd als een probleem, een onvermijdbaar gevolg van elektronen die lekken uit ETC's. In een ander opzicht kunnen variaties in mitochondriale en fotosynthetische H₂O₂-productie signalen zijn voor het cytoplasma en de kern, wat leidt tot veranderingen in nucleaire genexpressie via redoxregulatie en (de)fosforylatie van TF's^{13, 17, 18}. Enerzijds kunnen ROS onrechtstreeks antioxidatieve verdedigingsmechanismen activeren door oxidatieve schade aan te richten. Anderzijds kunnen ze rechtstreeks antioxidanten induceren door bijvoorbeeld te binden aan het antioxidant responsief element (ARE), wat vaak wordt teruggevonden in de promotorregio van antioxidatieve genen³⁷. Reactieve zuurstofvormen hebben dus niet enkel nadelen, er is nood aan een **evenwicht**: antioxidanten houden de hoeveelheden aan ROS laag zodat ze nuttige biologische functies kunnen uitvoeren met minimale schade.

Ook extracellulair gevormd O₂^{•-} resulteert in een intracellulaire signaleringsrespons. Aangezien O₂^{•-} een zeer korte levensduur heeft en het celmembraan zijn vrije diffusie verhindert, zal eerder een reactieproduct verantwoordelijk zijn voor de initiatie van signaleringsresponsen. Plantencellen bevatten voornamelijk H₂O₂

waarvan de productie een onmiddellijke respons is op verhoogde metaalconcentraties. Dit molecule met enerzijds de grootste halfwaardetijd van alle ROS en anderzijds zonder vrije elektronen, kan diffunderen tussen cellen en bijgevolg schade of signalering starten via verschillende redoxreacties^{17, 21, 35}.

De plaatsen van stressgeïnduceerde veranderingen in de redoxstatus en H₂O₂-generatie worden beschouwd als **sensoren van stress**. De apoplastische H₂O₂-productie door NADPH oxidase en de intracellulaire productie in chloroplasten en mitochondria zijn bijgevolg dé kandidaten voor stressdetectie en genregulatie. Het zijn echter de antioxidanten die de specificiteit van het signaal bepalen aangezien rechtstreekse ROS-siginaaltransductie enkel bestaat indien antioxidanten ROS niet neutraliseren^{36, 38}. Ondanks de groeiende kennis over responsen op zware metalen, is informatie over de detectie, regulatie en signalering na metaalstress eerder beperkt. Studies tonen aan dat metaal toxiciteit naast oxidatieve agenten ook **signaaltransductiepathways** activeert. Metalen beïnvloeden namelijk de genexpressie en activatie van talrijke intracellulaire signaleringseiwitten inclusief TF's en kinasen. Hoewel veel oxidatieve processen beïnvloed worden door blootstelling aan metaalstress, worden ROS-productie en de geassocieerde veranderingen in de cellulaire redoxstatus voorgesteld als basis van de oxidatieve signalering^{17, 18}.

Plantencellen kunnen **ROS detecteren** via drie gekende mechanismen: ROS-receptoren, redoxgevoelige TF's en rechtstreekse inhibitie van fosfatasen (Figuur 6)¹⁸. De resulterende signalering omvat fosfolipasen, Ca²⁺-vrijzetting en 'calcium dependent protein kinases' (CDPK's)³⁹. Vervolgens wordt het



Figuur 6: Schema van ROS-detectie en -signalering.

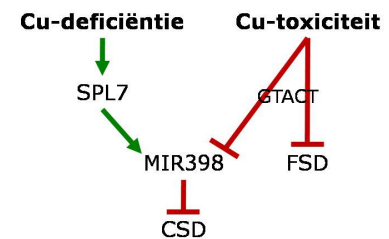
proteïne kinase 'oxidative signal-inducible 1' (OXI1) geactiveerd, wat een centrale rol speelt in ROS-detectie en de activatie van 'mitogen-activated-protein kinases' (MAPK's)^{34, 40}. Deze MAPK-cascade activeert verdedigingsmechanismen als respons op ROS-stress. Hiertoe activeren MAPK's verschillende TF's zoals WRKY en Zat. De ROS-siginaaltransductie kan vervolgens op twee manieren verlopen. Enerzijds zou een lage ROS-concentratie de amplificatie van ROS-signalering in specifieke cellulaire locaties stimuleren via NADPH oxidasen. Anderzijds zou ROS-accumulatie de ROS-scavenging pathway activeren die ROS neutraliseert¹⁸.

1.4.6 Regulatie van genexpressie onder metaalstress

Abiotische stressfactoren zoals uitdroging en extreme temperaturen reguleren de expressie van duizenden genen in planten op zowel transcriptionele als posttranscriptionele niveaus. Inductie of inhibitie van genexpressie bij metaalstress gebeurt hoofdzakelijk ter hoogte van het transcriptieniveau. Regulatie van de temporele en ruimtelijke expressiepatronen van specifieke stressgenen is een belangrijk deel van de plant zijn responsen op omgevingsstress⁴¹. Hoewel onze kennis betreffende **posttranscriptionele regulatie** erg beperkt is, werd reeds aangetoond dat microRNA's (miRNA's) hierin een belangrijke rol spelen in planten en dieren. Deze niet-coderende RNA's, met een lengte van 20 tot 24 nucleotiden, onderdrukken genen via translationele repressie of degradatie van complementair messenger RNA (mRNA). Enerzijds zijn miRNA's betrokken in verschillende cellulaire processen zoals ontwikkeling, metabolisme en veroudering, anderzijds wordt hun expressie beïnvloedt door abiotische stressfactoren inclusief zware metalen zoals Cu⁴²⁻⁴⁴.

Recent ontdekten Sunkar en zijn collega's (2006)⁴⁵ een rol voor **miRNA398** (MIR398) in de Cu-homeostase in *Arabidopsis thaliana*. Koper-geïnduceerde oxidatieve stress verlaagt transcriptioneel de expressie van *MIR398*. Dit leidt tot de verhoging van Cu/ZnSOD (CSD)-transcripten en bijgevolg de

bestrijding van oxidatieve stress. Yamasaki en zijn collega's (2007)⁴⁶ bevestigden de omgekeerde hypothese bij Cu-deficiëntie. De expressie van *MIR398* wordt in dit geval geïnduceerd, resulterend in posttranscriptionele degradatie van mRNA's die coderen voor *CSD*'s. Nagae *et al.* (2008)⁴⁷ ontdekten dat GTACT-motieven een centrale rol spelen in de Cu-responsieve transcriptionele repressie van FeSOD (*FSD*). Aangezien de *MIR398*-promotor eveneens meerdere GTACT-motieven bevat, suggereren ze dat Cu de expressie van *CSD*'s posttranscriptioneel stimuleert door de transcriptie van *MIR398* te onderdrukken via GTACT-sequenties. Deze sequenties spelen mogelijk een sleutelrol in de vervanging van *FSD* door *CSD* in respons op Cu in *Arabidopsis* via de rechtstreekse onderdrukking van *FSD*-genexpressie en de onrechtstreekse inductie van de transcriptie van *CSD*'s. Bij Cu-deficiëntie daarentegen publiceerden Yamasaki en zijn collega's (2009)⁴⁸ dat de TF squamosa promotor binding protein-like 7 (*SPL7*) essentieel is voor de respons van *MIR398*. Deze TF bindt rechtstreeks aan de promotor van genen die betrokken zijn in de Cu-homeostase. Figuur 7 geeft een overzicht van deze recente ontdekkingen.



Figuur 7: Schematische weergave van de recente hypothesen rond *MIR398*-gestuurde *CSD*-downregulatie.

1.5 Objectieven

De exacte moleculaire mechanismen en de volgorde van signaleringscomponenten na blootstelling van planten aan zware metalen zijn nog niet bekend. Dit onderzoek bestudeert deze processen ten gevolge van Cd- en Cu-stress. **Preliminair data** van onze onderzoeksgroep tonen aan dat een overmaat aan Cd of Cu in planten leidt tot oxidatieve stressgeïnduceerde veranderingen in antioxidatieve componenten. Data over de posttranscriptionele regulatie van *CSD*'s via *MIR398* doen vermoeden dat Cd een omgekeerd effect heeft dan Cu^{11, 49-51}. Dit project focust zich op de antioxidatieve metabolieten AsA en GSH omwille van hun essentiële rol in Cd-geïnduceerde oxidatieve stress. Om hun specifieke rol in oxidatieve stress te bestuderen



Figuur 8: Foto van de vier genotypes *Arabidopsis thaliana*. Van links naar rechts: wildtype, GSH-deficiënt, AsA-deficiënt, GSH- en AsA-deficiënt mutant.

worden vier genotypes van ***Arabidopsis thaliana*** gekweekt (Figuur 8); een wildtype en drie mutanten met een tekort aan AsA, GSH of beide. Op eiwitniveau heeft onze onderzoeksgroep verschillen aangetoond in de responsen van deze mutanten op Cd. Bovendien bleken de mutanten, vooral de dubbelmutant, gevoeliger te zijn voor Cd dan het wildtype^{49, 50}. Deze uitkomsten creëren toekomstperspectieven waaruit onder meer dit onderzoek voortvloeit⁴⁴⁻⁴⁶. *Arabidopsis* is één van de voornaamste en wereldwijd toegepaste modelorganismen in plantkunde. Niet enkel zijn eenvoudige cultivatie speelt hierbij een rol maar ook het feit dat zijn volledig genoom geïdentificeerd is (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) en zijn cultivatie statistisch is gevalideerd⁵².

Dit **project** tracht te bevestigen dat deficiënties in AsA en/of GSH de cellulaire redoxstatus verstoren en bijgevolg de gevoeligheid van planten voor metaalstress beïnvloeden. De moleculaire mechanismen, de AsA-GSH cyclus in detail, en bijhorende signaaltransductie worden nader bestudeerd. Dit onderzoek zal bovendien nagaan hoe de cellulaire redoxstatus de posttranscriptionele regulatie van antioxidatieve genen zal beïnvloeden via miRNA398 na Cd- en Cu-blootstelling.

Om deze doelstellingen te bereiken worden de *Arabidopsis thaliana* planten gekweekt in hydroculturen en op agarplaten en vervolgens blootgesteld aan verschillende Cd- en Cu-concentraties. Op **morfologisch**

niveau worden zowel de wortellengte als het bladoppervlak geanalyseerd. Daarnaast wordt Real-Time kwantitatieve PCR (RTqPCR) als moleculaire techniek toegepast om de **genexpressie** te meten van genen die betrokken zijn in oxidatieve stress en signalering. Additionele experimenten op verschillende **cellulaire niveaus** worden uitgevoerd om meer inzicht te krijgen in de rol van deze genen en pathways bij Cd-stress zoals metaboliet- en metaal bepalingen, lipidenperoxidatie- en H₂O₂-assays.

Dit project zal onze **fundamentele inzichten** over metaalspecifieke responsen grondig uitbreiden en leiden tot **toepassingsmogelijkheden** in de toekomst zoals nieuwe strategieën om planten meer tolerant te maken voor metaalstress. Planten die geselecteerd worden voor hun metaaltolerantie zijn interessant voor de revegetatie van verontreinigde gronden⁸. Revegetatie is voordelig omdat het onder andere winderosie reduceert en fyto-remediatie versnelt. Bovendien zijn er ook andere toepassingen mogelijk zoals het gebruik van de antioxidatieve capaciteit als maat voor voedselkwaliteit of het ontwikkelen van planten met Zn-accumulatie in eetbare delen om de voeding te verrijken met essentiële metalen⁸. Dit project, in combinatie met andere projecten betreffende Cd- en Cu-stress in *Arabidopsis thaliana*, levert nieuwe informatie voor deze onderzoeken. De kennis die uit deze studies wordt verkregen kan getransfereerd worden naar andere plantensoorten of organismen waardoor men meer gerichte studies kan uitvoeren.

2 Materialen en methoden

2.1 Plantenmateriaal en groeicondities

Als plantenmateriaal werden vier genotypes gebruikt van *Arabidopsis thaliana*, ecotype Columbia: het wildtype **Col-0** (*col*; Lehle seeds, Round Rock TX, USA) en drie AsA- en/of GSH-deficiënte mutanten. De Cd-gevoelige mutant **Cad2-1** (*cad*; Christopher Cobbett, Melbourne Universiteit, Australië) wordt beschreven in Cobbett *et al.* (1998)⁵³. Deze mutant werd blootgesteld aan 60 krad röntgenstralen en werd geselecteerd voor zijn 70 % GSH-reductie ten gevolge van een deletie van zes basenparen in het gen dat codeert voor γ -EC synthetase, een essentieel enzym in de GSH-biosynthese. De vitamine C-deficiënte mutant **Vtc1-1** [*vtc*; Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre (NASC), UK] wordt beschreven in Conklin *et al.* (1999)⁵⁴. Deze mutant ontstond ten gevolge van ethyl methaan sulfonaat (EMS) mutagenese en werd geselecteerd voor zijn 70 % AsA-reductie. De mutatie betreft een substitutie van cytosine/guanine naar thymine/adenine in het gen dat codeert voor GDP-mannose pyrofosforylase, een cruciaal enzym in de AsA-biosynthese. De dubbelmutant **Vtc1-1 Cad2-1** (*vtccad*; Mark Aarts, Universiteit Wageningen, Nederland) wordt beschreven in Clercx *et al.* (2004)⁵⁵, hij beschikt over beide mutaties en bevat 30 % van de normale GSH- en AsA-hoeveelheid.

2.1.1 Plantcultuur op agarplaten

De zaden van de vier genotypes werden gesteriliseerd volgens het protocol van Balcells⁵⁶ en vervolgens gezaaid op 1 % agar (Agar No.2 Bacteriological, Lab M Limited, Lancashire, UK) in vierkante petriplaten (120x120 mm) of op 0.7 % agar in ronde petriplaten (90x90 mm) zoals beschreven door Zhang *et al.* (1998)⁵⁷. Voor het screeningsexperiment werd B5 medium (1:50) van Gamborg *et al.* (1968)⁵⁸ gebruikt als groeimedium, verrijkt met 0.5 % sucrose (SigmaUltra, Sigma Life Science, Bornem). Dit medium bevatte 3.6 μ M FeCl₃, 2.56 mM MES (Sigma), 0.5 mM KNO₃, 0.02 mM MgSO₄, 0.02 mM CaCl₂, 0.022 mM NaH₂PO₄, 0.94 μ M MnSO₄, 0.02 mM (NH₄)₂SO₄, 90 nM KI, 0.97 nM H₃BO₃, 0.14 nM ZnSO₄, 2 nM CuSO₄, 20.6 nM

Na₂MoO₄ en 2.06 nM CoSO₄. De pH werd aangepast tot 5.7-5.8 met behulp van KOH. Het medium in de ronde platen bevatte daarenboven 0, 5, 10, 15, 20, 25 of 30 µM CdSO₄ of CuSO₄.

Voor het experiment waarbij zowel de wortelgroei als genexpressie werd gemeten, werd een nieuw medium gebruikt analoog aan Remans *et al.* (2006)⁵⁹ met een extra N-bron (NH₄)₂SO₄ en verrijkt met 0.5 % sucrose. Dit medium bevatte 0.5 mM MgSO₄, 0.5 mM CaCl₂, 1 mM KH₂PO₄, 10 mM KNO₃, 0.5 mM (NH₄)₂SO₄, 2.56 mM MES, 0.05 mM NaFeEDTA, 50 µM H₃BO₃, 12 µM MnCl₂, 1 µM CuCl₂, 1 µM ZnCl₂ en 0.03 µM NH₄Mo. De pH werd aangepast tot 5.7-5.8 met behulp van KOH. Alle platen werden gedurende drie dagen bewaard in het donker op 4°C voor een homogene kieming. Vervolgens werden ze geïncubeerd onder volgende groeicondities: 23/18°C ± 1°C, 12/12uur licht/donker en ± 100 µE verlichtingssterkte.

De ronde platen werden horizontaal geplaatst en na twee weken werden de platen gescand met een Hewlett-Packard Scanjet 3970. De bladoppervlakten werden gemeten met behulp van de Optimas beeldanalyse software (Optimas corporation, MediaCybernetics, versie 6.1, 1996). De vierkante platen werden verticaal geplaatst zodat de wortels over de agaroppervlakte konden groeien. Na een week werden zaailingen met dezelfde wortellengte overgebracht naar behandelde platen met hetzelfde groeimedium maar zonder sucrose en met 0, 5, 10, 15, 20, 25 of 30 µM CdSO₄ voor het screeningsexperiment en 0, 10, 20, 40 of 60 µM CdSO₄ of 0, 20, 30, 40, 50 µM CuSO₄ voor het experiment voor genexpressie. De platen werden willekeurig teruggeplaatst onder dezelfde groeicondities en dagelijks werd de lengte van de hoofdwortel aangeduid. Na een week werden de verticale agarplaten ingescand en de groeiparameters van de hoofdwortels bepaald met behulp van Optimas. De volgende dag werden de wortels en de blaadjes geogst, bevroren in vloeibare stikstof en bewaard bij -70°C voor genexpressie.

2.1.2 Hydrocultuur

Zaden van de vier genotypes werden gesteriliseerd volgens het protocol van Balcells⁵⁶ en vervolgens drie dagen in het donker op 4°C geïncubeerd op een vochtig filterpapier om hun kieming te synchroniseren. De zaden werden vervolgens gegroeid in een hydrocultuur onder volgende groeicondities: 22/18°C ± 1°C, 12/12uur licht/donker en 65 % relatieve vochtigheid. Deze cultivatiemethode werd recent geoptimaliseerd en statistisch gevalideerd door Smeets *et al.* (2008)⁵². De nutriëntenoplossing is gebaseerd op Hoagland-groeimedium en bevat: 505 µM KNO₃, 150 µM Ca(NO₃)₂, 100 µM NH₄H₂PO₄, 100 µM MgSO₄, 4.63 µM H₃BO₃, 0.91 µM MnCl₂, 0.03 µM CuSO₄, 0.06 µM H₂MoO₄, 0.16 mM ZnSO₄, 1.64 µM FeSO₄ en 0.81 µM Na₂-EDTA. Na drie weken werd de helft van de planten blootgesteld aan 5 µM CdSO₄ ter hoogte van de wortels, de overige planten bleven onbehandeld ter controle. Na een blootstelling van 24 uur werden de wortels en de blaadjes geogst, bevroren in vloeibare stikstof en bewaard bij -70°C voor verdere analyse. Daarnaast werden ook verse blad- en wortelstalen verzameld voor metaalbepalingen.

2.2 Metaalbepalingen

De verse stalen van de hydrocultuur werden gewassen met koud gedestilleerd water. Om de elementen te verwijderen die aan het worteloppervlak waren gebonden, werden de wortelstalen eerst gespoeld in 1 mM Pb(NO₃)₂. Een blanco- en referentiestaal (Trace elements in spinach, 1570a, Standard Reference Material, Gaithersbrug, USA) werden meegenomen ter controle. De stalen werden gedroogd en vervolgens overnacht geïncubeerd in 70 % HNO₃. Na het droogdampen van de stalen op 120°C werden ze tweemaal opgelost in 70 % HNO₃ en eenmaal in 37 % HCl. Na elke stap werden de stalen meteen drooggedampt in een blokthermostaat (VWR International, Leuven). Uiteindelijk werden de stalen bewaard in 2 % HCl op 4°C tot

de Cd-concentratie werd bepaald met behulp van een grafietoven (Atomic Absorption Spectroscopy, AAS; Perkin Elmer, Optima 3000 DV, Bedford, USA).

2.3 Waterstofperoxidemetingen

De hoeveelheid H₂O₂ in blad- en wortelstalen van de hydrocultuur werd bepaald volgens de 'Amplex[®] Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit' (Molecular Probes/Invitrogen, Merelbeke) vlak na de oogst. De bevroren stalen van 20 tot 50 mg werden fijngemalen met de Retsch MM 2000 Mixer Mill (Retsch, Haan, Duitsland) gedurende een minuut met een amplitude van 90. De stalen werden samen met een H₂O₂-standaardcurve gemeten in een spectrofluorometer [QuantaMaster[™] Model QM-6/2005, Photon Technology International (PTI), West Sussex, UK] met een excitatie- en emissiegolflengte van 540 nm en 590 nm respectievelijk.

2.4 Metingen van lipidenperoxidatie

Het membranair afbraakproduct malondialdehyde (MDA) is een thiobarbituurzuur(TBA)-reactieve metabooliet en werd gebruikt als een maat voor lipidenperoxidatie. Wortelstalen en bladstalen van de hydrocultuur werden eerst gehomogeniseerd in 0.1 % trichloorazijnzuur (TCA). Vervolgens werden de stalen geïncubeerd in een vierde hoeveelheid 0.5 % TBA en 20 % TCA gedurende 30 minuten op 95°C. De concentratie van de TBA-reactieve metaboolieten werd spectrofotometrisch gemeten met behulp van de UV-Visible Spectrofotometer (UV-1602, Shimadzu Corporation, Japan). Tussen elke stap werden de stalen gecentrifugeerd gedurende tien minuten aan 20 000 *g*. De absorptie van het supernatans werd gemeten bij 532 nm en gecorrigeerd voor specifieke absorptie bij 600 nm zoals beschreven door Dhindsa *et al.* (1981)⁶⁰.

2.5 Metaboolietbepalingen

Metaboolietbepalingen werden uitgevoerd door de Universiteit van Antwerpen in de onderzoeksgroep plantenfysiologie met behulp van een High Performance Liquid Chromatography (HPLC)-analyse zoals beschreven in Semane *et al.* (2007)⁵⁰.

2.6 Genexpressie

2.6.1 Expressie van messenger RNA

Bevroren wortel- (tot 70 mg) en bladstalen (tot 100 mg) werden fijngemalen met de Retsch MM 2000 Mixer Mill gedurende een minuut met een amplitude van 90. Vervolgens werd het RNA geëxtraheerd met behulp van de 'mirVana[™] miRNA Isolation Kit' (Ambion, Applied Biosystems, Lennik). De concentratie en de zuiverheid van het geïsoleerd RNA werd bepaald met de NanoDrop[®] ND-1000 Spectrofotometer (NanoDrop Technologies Inc, Isogen Life Science, IJsselstein, Nederland) bij 260 nm en de ratio 260/280 nm respectievelijk. De stalen werden bewaard bij -70°C tot reverse transcriptie werd uitgevoerd met behulp van de 'QuantiTect[®] Reverse Transcription Kit' (Qiagen, Venlo) in de Mastercycler[®] gradiënt (Eppendorf, Hamburg, Duitsland). Om de variatie binnen stalen te beperken werd voor elk experiment dezelfde hoeveelheid RNA gebruikt (1 µg). Het geproduceerde complementair DNA (cDNA) werd tien maal verdund in Tris-EDTA buffer (1:10) en bewaard bij -20°C.

Uiteindelijk werd de genexpressie gemeten via RTqPCR volgens het 'Fast SYBR[®] Green Master Mix Protocol' (Applied Biosystems, Lennik) in het 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Lennik) met behulp van de 7500 Fast System Sequence Detection Software (Applied Biosystems, versie 1.4,

2001-2006). De reacties verliepen in een volume van 10 µl met een constante hoeveelheid cDNA per experiment (2.5 µl) en primerconcentraties van 300 nM. Primers werden ontwikkeld met behulp van Primer Express™ 2.0 (ABI PRISM™, Applied Biosystems, versie 2.0, 1995-2001). De onderzochte genen met hun primersequenties worden weergegeven in Tabel 2. De genexpressie van elk staal werd genormaliseerd ten opzichte van drie referentiegenen volgens de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -methode van Livak *et al.* (2001)⁶¹. Deze referentiegenen zijn *AT2G28390*, een eiwit van de SAND-familie, *AT5G08290*, het 'yellow-leaf-specific gene' (*YLS8*) dat betrokken is bij mitose en *AT5G15710*, een F-box eiwit. Deze referentiegenen werden geselecteerd door Remans *et al.* (2008)⁶² omwille van hun hoge expressiestabiliteit in *Arabidopsis thaliana* na Cd- en Cu-behandeling.

2.6.2 Expressie van microRNA

Om de genexpressie te meten van miRNA's werd RNA-extractie op dezelfde manier uitgevoerd als in 2.6.1. De miRNA-concentratie werd bepaald aan de hand van de Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Duitsland, 2001, 2003-2007). Vervolgens werd de 'Multiplex RT for TaqMan® MicroRNA Assay' (Applied Biosystems, Lennik) toegepast. In de eerste stap van deze assay, 'Multiplex Reverse Transcription', werd cDNA gesynthetiseerd in de Mastercycler® gradiënt. Om de variatie binnen stalen te beperken werd voor elk experiment 20 ng miRNA gebruikt in een reactievolume van 20 µl waarvan 1 µl MultiScribe™ Reverse Transcriptase en 4 µl van een 5X Multiplex RT primerpool. Deze pool bevatte drie primers, elk met een concentratie van 62.5 nM. De twee genen die onderzocht werden zijn *MIR398a* en *MIR398bc*, de primer voor dit laatste miRNA herkent zowel miRNA398b als miRNA398c. MicroRNA172a werd eveneens toegevoegd aan deze primerpool als referentiegen. Het geproduceerde cDNA werd tien maal verdund in RNase-vrij water en bewaard bij -20°C.

In de tweede stap van de MicroRNA Assay, 'TaqMan Assay', werd genexpressie gemeten in het 7500 Fast Real-Time PCR System in de 9600 emulation modus. De reacties verliepen in een volume van 10 µl met een constante hoeveelheid cDNA per experiment (2.5 µl) en specifieke primers. De genexpressie van elk staal werd genormaliseerd ten opzichte van het referentiegen MIR172a volgens de $2^{-\Delta Ct}$ -methode⁶¹.

Tabel 2: Overzicht van de onderzochte genen met hun volledige naam, locus en ontwikkelde forward en reverse primer.

Gen	Locus	Forward primer	Reverse primer
APX1 (ascorbaat peroxidase 1)	At1g07890	TGCCACAAGGATAGGTCTGG	CCTTCTTCTCTCCGCTCAA
APX2 (ascorbaat peroxidase 2)	At3g09640	TTGCTGTTGAGATCACTGGAGGA	TGAGGCAGACGACCTCAGG
APX3 (ascorbaat peroxidase 3)	At4g35000	TTGAGCATCATAGGTTCCAGCA	CCGTGAGCTCCGTCTCTCAT
APX4 (ascorbaat peroxidase 4)	At4g09010	CTCGAAGTTGATTTGCTGTCCTAAG	CCGTGAAACCGTATCTCAGACTG
APX5 (ascorbaat peroxidase 5)	At4g35970	TGCAGTGAGGTTACTGGCG	TGGATTTGGAAGTTCTCCATCGT
APX6 (ascorbaat peroxidase 6)	At4g32320	CGGCCCAACAATTCCAGTAGT	CGAGGCACTCAGGGTTTCTG
APX7 (ascorbaat peroxidase 7)	At1g33660	CCTTTTGTAGCATCAGGGAGACG	TCATTTCCACCCTGAAGAGAGG
AT1G03850 (glutaredoxine-eiwit)	At1g03850	GGCCACTCCATCAAGATTCG	GCTTCTTACGCTATTCTCACCAGC
AT2G28390 (referentie eiwit van de SAND-familie)	At2g28390	AACTCTATGCAGCATTGATCCACT	TGATTGCATATCTTTATCGCCATC
AT5G08290 (referentie eiwit YLS8)	At5g08290	TTACTGTTTCGGTTGTTCTCCATTT	CACTGAATCATGTTCTGAAGCAAGT
AT5G15710 (referentie F-box eiwit)	At5g15710	TTTCGGCTGAGAGGTTTCGAGT	GATTCCAAGACGTAAAGCAGATCAA
ATHM3 (thioredoxine M-type 3)	At2g15570	GAGCAGCTGAAGTTACACAACGATC	CCGCACCAACTCGTGTAAGAATT

Gen	Locus	Forward primer	Reverse primer
ATTRX2 (thioredoxine H-type 2)	At5g39950	AAGTTTAGCTCTTCCGCTCGGT	ACCATGAGGCCGAGAAATCA
CAT1 (catalase 1)	At1g20630	AAGTGCTTCATCGGGAAGGA	CTTCAACAAAACGCTTCACGA
CAT2 (catalase 2)	At4g35090	AACTCCTCCATGACCGTTGGA	TCCGTTCCCTGTGCAAAATG
CAT3 (catalase 3)	At1g20620	TCTCCAACAACATCTTCCCTCA	GTGAAATTAGCAACCTTCTCGATCA
CDPK1 (calcium dependent proteïne kinase 1)	At1g18890	CAAAGCTGGGCTTCAGAAGG	AAACCCATTTCCATCGACATC
CSD1 (koper/zink- superoxidedismutase 1)	At1g08830	TCCATGCAGACCCTGATGAC	CCTGGAGACCAATGATGCC
CSD2 (koper/zink- superoxidedismutase 2)	At2g28190	GAGCCTTTGTGGTTCACGAG	CACACCACATGCCAATCTCC
DHAR1 (dehydroascorbaat reductase 1)	At4g32320	CCAGATTCACCTCTTTTCGTCAA	TTACATCTCTGTTTCCGCC
DHAR2 (dehydroascorbaat reductase 2)	At1g33660	ATCAGATGGGTCTTGTAGGGAAGC	GTGCTCCTGATGTTCTCGGC
DHAR3 (dehydroascorbaat reductase 3)	At4g08390	AACTCTTCCCGGCGATAA	CTGAATTTGCCTCTGTTGGCTC
FSD1 (ijzer- superoxidedismutase 1)	At4g25100	CTCCCAATGCTGTGAATCCC	TGGTCTTCGGTTCTGGAAGTC
GME (GDP-mannose epimerase)	At5g28840	GTTACCCGGCTCACGGAAAT	TGGGCTTCAGACCCGTTCTT
GR1 (glutathionreductase 1)	At3g24170	CTCAAGTGTGGAGCAACCAAAG	ATGCGTCTGGTCACTGC
GR2 (glutathionreductase 2)	At3g54660	GCCCAGATGGATGGAACAGAT	TAGGGTTGGAGAATGTTGGCG
GRX480 (glutaredoxine-eiwit)	At1g28480	GGGAAACGGCGAGAGAGTTC	CCTCACCACATGACACATGCA
GSH1 (glutamaat cysteïne ligase)	At4g23100	CCCTGGTGAAGTGCCTTCA	CATCAGCACCTCTCATCTCCA
GSH2 (glutathion synthetase)	At5g27380	GGACTCGTCGTTGGTGACAA	TCTGGGAATGCAGTTGGTAGC
LOX1 (lipoxygenase 1)	At1g55020	TTGGCTAAGGCTTTTGTCCG	GTGGCAATCACAAACGGTTC
LOX2 (lipoxygenase 2)	At3g45140	TTTGCTCGCCAGACACTTG	GGGATCACCATAAACGGCC
MDHAR1 (monodehydro- ascorbaatreductase 1)	At1g07890	TGCACCAACCCCACTATCAC	CACAGCTCAGCCAAATGGAGAG
MDHAR2 (monodehydro- ascorbaatreductase 2)	At3g09640	CCCAATTCAGCAGCAACAT	TCCATATGAGCGTCTGCACT
MDHAR3 (monodehydro- ascorbaatreductase 3)	At4g35000	AAATGATTGCGAGTTCACCAGG	TACGTGATCATTGGAGGTGGTGT
MDHAR4 (monodehydro- ascorbaatreductase 4)	At4g09010	GGTTACGCAGCTCTCGAATTCA	AGGCCTCTCATACGGTGCAA
MDHAR5 (monodehydro- ascorbaatreductase 5)	At4g35970	TAGTAGAAAGCGGATCGCCTGA	GCGCTTGCGAGTTTAGCCTT
MKK2 (mitogen-activated proteïne kinase kinase 2)	At4g29810	GGATCCAAACAGTCAAGCTC	TGCATCTGTGAAGTAGGACGC
OXI1 (oxidative signal-inducible 1)	At3g25250	CGATTATTGTCCGGGACAGA	CTAATACAAGCTCCGCCGC
PCS1 (fytochelatine synthase)	At5g44070	TGGTGTGAATGCTCTTCTATCG	GGTTCGCAGCAATCCAACAT
hn-CSD1 (heteronucleair CSD1)	At1g08830	ACTGTTGGAGATGATGGTATGCCT	GAGAGAGTAGCGAAATTTGATGCAA
hn-CSD2 (heteronucleair CSD2)	At2g28190	TCACTATGACTTAGGCTGCGATTG	GATGGTCCGAATTTGCGATTAA
hn-MIR398a (hetero- nucleair microRNA398a)	At2g03445	AGAAGAAGAGAAGAACAACAGGAGGTG	ATTAGTAAGGTGAAAAAATGGAACAGG
hn-MIR398b (hetero- nucleair microRNA398b en c)	At5g14545	TAACAAGAAGATATCAATATATCATG	ACCATTTGGTAAATGAGTAAAAGCCAGCC
PrxB (2-cys peroxiredoxine B)	At5g06290	TTCACTTTTGTCTGCCCACTG	CAGAGACCCCTAATACTCGGTGTT
PrxD (type 2 peroxiredoxine D)	At1g60740	ATCTCAAGGACAAGGGTCTTGGT	ACCATTTTCGACATTGGCTACAG
RbohA (NADPH oxidase A)	At5g07390	CATTTTCGCTAGGCCAAACTG	TTCACTAACCCAGCTGCTCCA
RbohB (NADPH oxidase B)	At1g09090.2	GATCGCGACAACCTCGGATA	CGGAAGATGGACTGTTATTTGATTG

Gen	Locus	Forward primer	Reverse primer
RbohC (NADPH oxidase C)	At5g51060	TCACCAGAGACTGGCACAATAAA	GATGCTCGACCTGAATGCTC
RbohD (NADPH oxidase D)	At5g47910	AACTCTCCGCTGATTCCAACG	TGGTCAGCGAAGTCTTTAGATTCTT
RbohE (NADPH oxidase E)	At1g19230	GTGATGCAAGATCAACCCTGA	GCCTTGCAAAATGTGTTCTCA
RbohF (NADPH oxidase F)	At1g64060	GGTGTGTCATGAACGAAGTTGCA	AATGAGAGCAGAACGAGCATCA
SAPX (stromaal ascorbaatperoxidase)	At4g08390	GGACACCAGAGTGGCTGAAGTT	GCATCAGTGGGTAGGACAAGGAG
SOS1 (salt overly sensitive 1)	At2g01980	ACGCCAAACAACAACAAGAGA	ACACATTAACCATGCTGCCG
SOS2 (salt overly sensitive 2)	At5g35410	ATTATCTTCGATCAAGGCCGG	GTTTCACCAGCAGCCTTTCTT
SOS3 (salt overly sensitive 3)	At5g24270	CGTCTTTCACGAATCCGA	TCGTTTTTGCGGTCTGCTT
SPL7 (squamosa promoter binding protein-like 7)	At5g18830	GAGCTGGAGGGCTATATCCG	GGAAGAGGCTCGATGACTGT
TAPX (thylakoïd ascorbaatperoxidase)	At1g77490	ATTCTCTTGGGAAGCGTCGCAT	CTCGTGCTCGTCCATTGAT
VTC1 (GDP-mannose pyrofosforylase)	At2g39770	TCTCAGTTTTCCCAAAGCCCC	TTCATCAACTCCAAGTGCCTAAGA
WRKY25	At2g30250	GAAAGATCCGCAGCAGACG	TCCAATAATTTACAGAGCG
ZAT12	At5g59820	GTGCGAGTCACAAGAAGCCTAACA	GCGACGACGTTTTTACCTTCTTCA

2.7 Clusteranalyse

Clusteranalyse werd uitgevoerd om genen te identificeren die tijdens een bepaalde behandeling samen gereguleerd worden. Met behulp van de GenEx Software (Genex, MultiD Analyses AB, versie 4.3, 2001-2007) werd deze analyse gebaseerd op vier algoritmen: Unweighted pairs, Ward's Algorithm, Complete en Single linkage. Enkel bij terugkerende patronen in alle algoritmen spreken we over clusters.

2.8 Statistische analyse

Om statistische verschillen aan te tonen tussen verschillende genotypes en/of behandelingen werd eerst bepaald of de data normaal verdeeld waren en een gelijke variantie vertoonden (homoscedasticiteit). De normaliteit van de data werd getest met behulp van vier testen: Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Cramer-von Mises en Anderson-Darling. De homoscedasticiteit werd gecontroleerd aan de hand van de residu's of de G-plot. Indien de data niet voldeden aan deze voorwaarden, werden ze getransformeerd volgens volgende berekeningen: logtransformatie, vierkantswortel, inverse of tweede machtsverheffing. Vervolgens werden de data geanalyseerd met de parametrische tweeweg-ANOVA test met behulp van SAS 9.2. Indien geen normaliteit werd verkregen, werd de normaliteit analoog getest voor eenweg-ANOVA en werden deze testen toegepast in SAS 9.2. Aangezien voor de statistische analyse van de wortellengte ook hier geen normaliteit werd verkregen, werd hiervoor de niet-parametrische Kruskal-Wallis en een post hoc multiple comparison test gebruikt met behulp van Excel (Microsoft Office, 2007)⁶³.

Om significante (p-waarde kleiner dan 0.05) uitschieters te detecteren en elimineren werd de Grubbs' test of de Extreme Studentized Deviate (ESD; GraphPad QuickCalcs Software, 2002-2005) toegepast. Alle data met uitzondering van de uitschieters werden vervolgens op drie significantieniveaus getest: 0.01, 0.05 en 0.1. Indien de p-waarde kleiner was dan 0.05 werden de verschillen significant beschouwd. De weergegeven data zijn de gemiddelden \pm de standaarderror (SE).

3 Resultaten

Metaalvervuiling in de omgeving heeft nefaste gevolgen voor alle organismen. Een belangrijke respons van organismen is de inductie van oxidatieve stress, die sterk bepaald wordt door de aanwezigheid van antioxidanten in de cellen zoals AsA en GSH. Om de effecten van verhoogde metaalgehalten op planten te bestuderen en het belang van beide antioxidanten in deze responsen te achterhalen, werden drie experimenten opgezet. In eerste instantie werd de Cd-gevoeligheid getest van vier genotypes van *Arabidopsis thaliana* (*col*, *cad*, *vtc* en *vtccad*) op basis van de wortel- en bladgroei. Vervolgens werden de responsen op Cd-toxiciteit (5 μM) na 24 uur nader onderzocht: Cd-opname en -translocatie, ROS-productie, membraanintegriteit, redoxstatus en genexpressie. Na vergelijking van onze gegevens met de literatuur wat betreft de expressie en regulatie van *CSD*-genen, werd een omgekeerde respons vastgesteld tussen blootstelling aan Cd en Cu. Hieruit werd besloten om vervolgens zowel de groei alsook de antioxidatieve responsen te vergelijken na blootstelling aan beide metalen.

3.1 Cadmiumgevoeligheid van *Arabidopsis thaliana*

Om de rol van AsA en GSH in de Cd-gevoeligheid van *Arabidopsis thaliana* te onderzoeken, werden vier genotypes (*col*, *cad*, *vtc* en *vtccad*) blootgesteld aan een reeks Cd-concentraties: 0, 5, 10, 15, 20, 25 en 30 μM Cd. De morfologische parameters die werden onderzocht zijn wortel- en bladgroei.

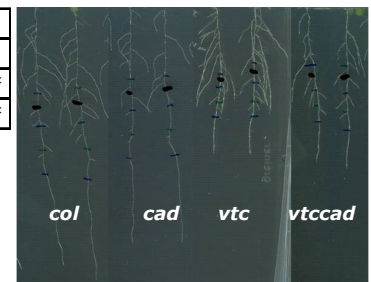
3.1.1 Morfologische verschillen tussen de vier *Arabidopsis thaliana*-genotypes

Tussen de vier genotypes zijn morfologische verschillen aanwezig in de wortellengte en -structuur. De AsA-deficiënte en de dubbelmutant vertonen een significant kleinere wortellengte dan het wildtype (Tabel 3). Daarnaast beschikt de *vtc*-mutant over een beter ontwikkelde laterale wortelgroei in vergelijking met de andere genotypes (Figuur 9). Op basis van de bladgroei zijn geen significante verschillen gevonden tussen de verschillende genotypes (Figuur 11).

Tabel 3: De relatieve waarden van de wortellengte van de mutanten ten opzichte van het wildtype na een groeiperiode van een week op onbehandelde nutriëntrijke verticale agarplaten. Het gemiddelde wordt weergegeven \pm SE (n = 25). Significantiënniveau volgens Kruskal-Wallis: ** p < 0.01.

Col0	1.00 \pm 0.01
Cad	0.95 \pm 0.01
Vtc	0.62 \pm 0.01**
VtcCad	0.58 \pm 0.01**

Figuur 9: De wortels van de vier genotypes op verticale agarplaten na twee weken groei op onbehandelde nutriëntrijke bodems. Van links naar rechts liggen per twee planten volgende genotypes: *col*, *cad*, *vtc* en *vtccad*. De horizontale streepjes zijn de dagelijkse markeringen van de wortellengte.

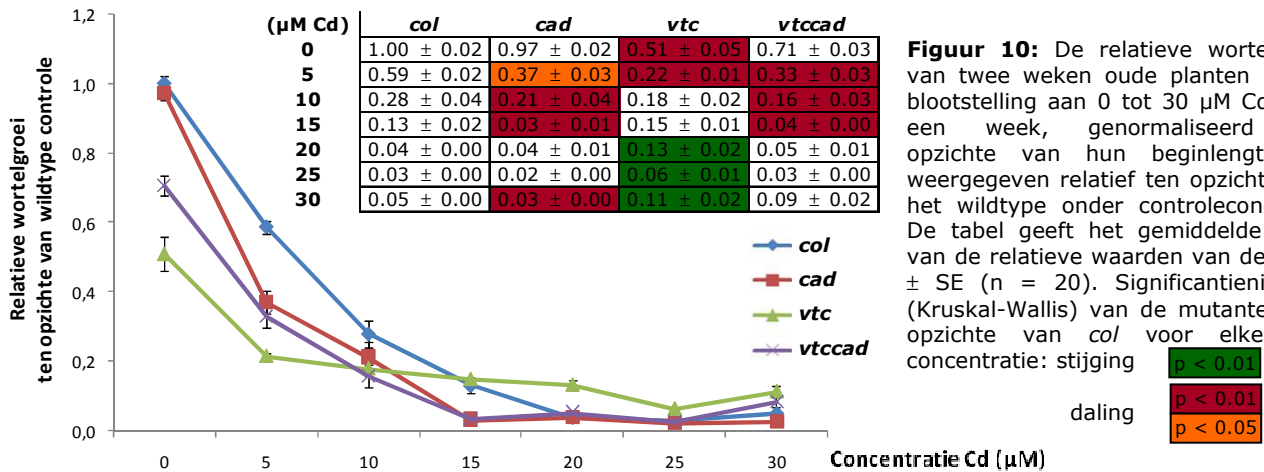


3.1.2 Effect van cadmium op de groei

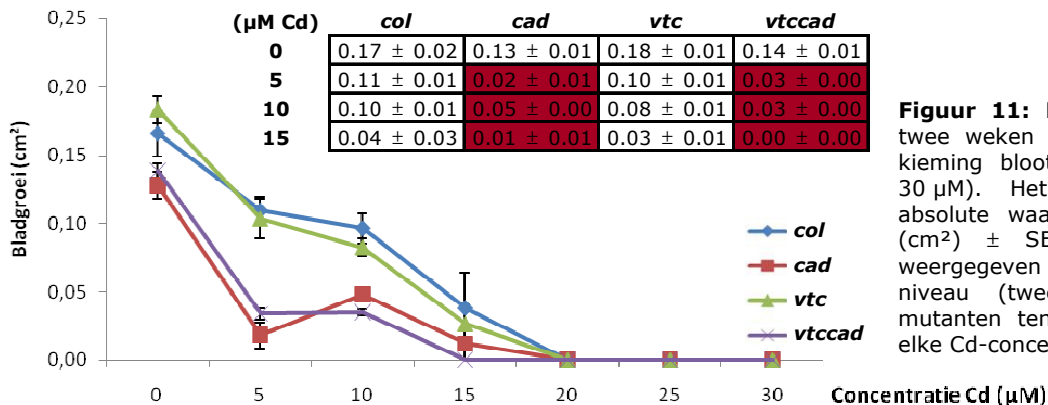
Na een groei van twee weken onder controlecondities (0 μM Cd) vertoont *vtc* nog steeds een significant kleinere wortelgroei dan *col* (Figuur 10). Enerzijds kennen de curven van *col* en *cad* een gelijkaardig dalend verloop, anderzijds lopen de groeicurven van *vtc* en *vtccad* analoog. Bij de laagste concentratie (5 μM Cd) is er een sterke daling in de wortelgroei bij alle genotypes (45 tot 65 %). De *vtc*-curve stabiliseert reeds vanaf 5 μM Cd terwijl de curven van de overige genotypes blijven dalen en stabiliseren pas vanaf 15 of 20 μM Cd. De curven van *cad* en *vtccad* liggen significant lager dan de *col*-curve tussen 5 en 15 μM Cd. Bij hogere concentraties is er geen verschil meer met *col*. De *vtc*-curve daarentegen ligt enkel tussen 0 en 5 μM Cd

significantant lager dan de *col*-curve. Doordat de *vtc*-curve zich reeds bij lage concentraties stabiliseert, is de wortelgroei van *vtc* vanaf 20 μM Cd significant groter dan de wortelgroei van *col*.

In de bladgroei vertonen enerzijds de curven van *col* en *vtc* en anderzijds van *cad* en *vtccad* een gelijkaardig dalend verloop (Figuur 11). Bij 5 μM Cd is er een significante daling in de bladgroei bij alle mutanten, *col* daalt pas significant bij 10 μM Cd. De daling bij 5 μM Cd is significant groter bij *cad* en *vtccad* (74 tot 80 %) dan bij *col* en *vtc* (30 tot 50 %). Vanaf 20 μM Cd is er een totale groei-inhibitie voor alle genotypen, die zelfs eerder kan waargenomen worden bij de *vtccad*-mutant na een blootstelling aan 15 μM Cd. Er zijn geen significante verschillen in de bladgroei tussen *col* en *vtc*.



Figuur 10: De relatieve wortelgroei van twee weken oude planten na de blootstelling aan 0 tot 30 μM Cd voor een week, genormaliseerd ten opzichte van hun beginlengte en weergegeven relatief ten opzichte van het wildtype onder controlecondities. De tabel geeft het gemiddelde weer van de relatieve waarden van de groei \pm SE (n = 20). Significantienniveaus (Kruskal-Wallis) van de mutanten ten opzichte van *col* voor elke Cd-concentratie: stijging $p < 0.01$ daling $p < 0.01$ $p < 0.05$



Figuur 11: De totale bladgroei van twee weken oude planten, vanaf de kieming blootgesteld aan Cd (0 tot 30 μM). Het gemiddelde van de absolute waarden van de bladgroei (cm^2) \pm SE (n = 2-10) wordt weergegeven in de tabel. Significantienniveau (tweeweg-ANOVA) van de mutanten ten opzichte van *col* voor elke Cd-concentratie: daling $p < 0.01$

3.2 De rol van AsA en GSH in de responsen en de regulatie in *Arabidopsis thaliana* na 24 uur blootstelling aan cadmium

Aangezien AsA- en/of GSH-deficiëntie de cellulaire redoxstatus verstoort, werd nagegaan of dit eveneens veranderingen in responsen teweegbrengt na blootstelling van *Arabidopsis thaliana*-zaailingen aan een verhoogde Cd-concentratie. Hiervoor werden vier genotypes van *Arabidopsis* (*col*, *cad*, *vtc* en *vtccad*) gekweekt gedurende drie weken in een hydrocultuur en vervolgens 24 uur blootgesteld aan 0 of 5 μM Cd ter hoogte van de wortels. De experimenten die uitgevoerd werden op dit plantenweefsel zijn metaalbepalingen, H_2O_2 -metingen, TBA-metingen, metaboliëtbepalingen en genexpressie.

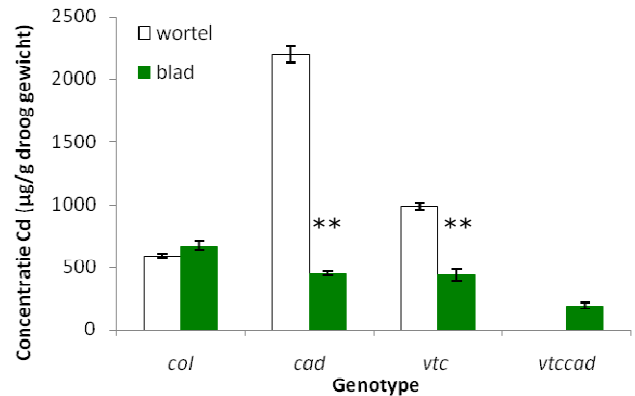
3.2.1 Cadmiumopname door de wortels en translocatie naar het blad

De *cad*- en *vtc*-mutanten hebben een hogere Cd-concentratie in hun wortels dan *col*, *cad* heeft zelfs significant meer Cd in zijn wortels dan *vtc* ($p < 0.01$) (Figuur 12). Van *vtccad* waren geen wortelstalen beschikbaar aangezien ze een erg kleine wortelgroei vertoonden na behandeling. In de blaadjes daarentegen

is er significant minder Cd aanwezig in de drie mutanten dan in *col*. De dubbelmutant heeft bovendien een significant lagere Cd-inhoud dan *cad* en *vtc* ($p < 0.01$). In *col* is er geen verschil in de Cd-inhoud tussen het blad en de wortel terwijl er bij *cad* en *vtc* minder Cd aanwezig is in het blad dan in de wortel.

Figuur 12: De Cd-inhoud van drie weken oude planten na 24 uur blootstelling aan 5 μM Cd. Er waren geen wortelstalen beschikbaar van *vtccad*. Significantieniveaus (tweeweg-ANOVA) binnen genotypes: ** $p < 0.01$. De tabel geeft het gemiddelde weer van de absolute waarden van de Cd-concentratie ($\mu\text{g Cd/g}$ droog gewicht) \pm SE ($n = 3-4$). Significantieniveaus (tweeweg-ANOVA) van de mutantten ten opzichte van *col*: stijging $\text{p} < 0.01$ daling $\text{p} < 0.05$

orgaan	<i>col</i>	<i>cad</i>	<i>vtc</i>	<i>vtccad</i>
wortel	592 \pm 17	2199 \pm 63	985 \pm 32	
blad	668 \pm 39	447 \pm 16	437 \pm 42	190 \pm 23

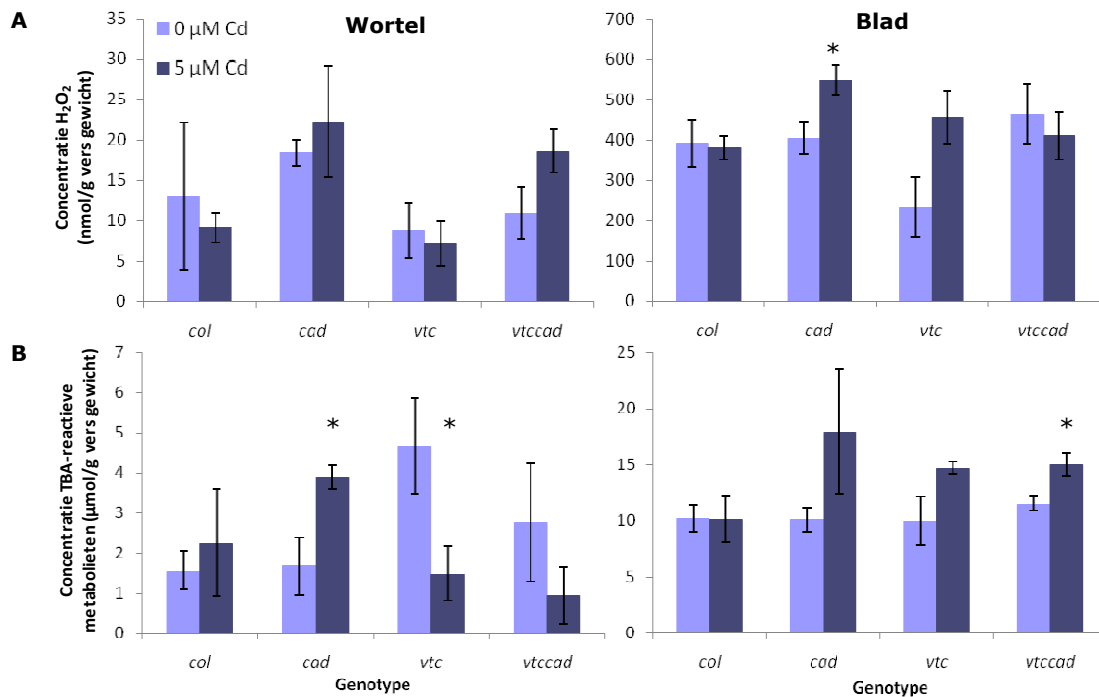


3.2.2 Productie van vrije zuurstofvormen

De H_2O_2 -concentratie werd gemeten als indicatie voor de hoeveelheid ROS-productie. Er zijn geen significante verschillen in de H_2O_2 -concentratie in de wortels (Figuur 13A). In het blad wordt een stijging gevonden in de H_2O_2 -concentratie in *cad* na 5 μM Cd ten opzichte van 0 μM Cd. De *vtc*-mutant vertoont dezelfde trend. De H_2O_2 -concentraties liggen voor alle genotypes duidelijk hoger in het blad dan in de wortel.

3.2.3 Integriteit van celmembranen

Membraanschade werd gemeten aan de hand van TBA-reactieve metabolieten, die vrijkomen ten gevolge van lipidenperoxidatie (Figuur 13B). In de wortel is een significante stijging waar te nemen bij *cad* terwijl *vtc* na Cd-behandeling een lagere concentratie heeft. In het blad is er enkel een significante stijging bij *vtccad* na behandeling hoewel er voor *cad* en *vtc* ook een stijgende trend is na Cd-behandeling.



Figuur 13: Het gemiddelde van (A) het H_2O_2 -gehalte (nmol/g vers gewicht) en (B) de concentratie TBA-reactieve metabolieten ($\mu\text{mol/g}$ vers gewicht) \pm SE van drie weken oude planten na blootstelling aan 0 of 5 μM Cd voor 24 uur ($n = 2-5$). Significantieniveaus (eenweg-ANOVA) binnen genotypes: * $p < 0.05$.

3.2.4 Cellulaire redoxstatus

Om de cellulaire redoxstatus van AsA en GSH te bepalen werd de inhoud van beide metabolieten bepaald in drie weken oude *Arabidopsis*-planten na blootstelling aan 0 of 5 μM Cd gedurende 24 uur (Tabel 4). De redoxstatus van beide metabolieten wordt uiteindelijk uitgedrukt als de verhouding tussen de geoxideerde en gereduceerde vorm. Na behandeling zijn er geen verhoogde metabolietconcentraties zichtbaar in het **wildtype**. De *cad*-mutant vertoont echter wel een verhoogde totale AsA-concentratie in zijn wortels en de *vtc*-mutant heeft een hogere GSH-concentratie in zijn blaadjes. Daarnaast zijn er heel wat significante genotype-effecten van de drie mutanten ten opzichte van het wildtype. De *cad*-mutant heeft een significant lagere GSH-inhoud en een significant hogere cellulaire redoxstatus van GSH in zijn wortels. In zijn blaadjes heeft *cad* zowel een verlaagde inhoud van GSH als van GSSG waardoor de redoxstatus niet verandert. De *vtc*-mutant daarentegen vertoont een trend voor een lagere AsA-concentratie in de wortel en een significant lagere concentratie van AsA en DHA in het blad. Bovendien heeft *vtc* een verhoogde totale GSH-inhoud en een verhoogde cellulaire redoxstatus van GSH in zijn blaadjes. Er waren geen wortelstalen beschikbaar van *vtccad* onder controlecondities. In zijn blaadjes heeft deze dubbelmutant een significante reductie in de inhoud van beide metabolieten in beide vormen (AsA, DHA, GSH en GSSG).

Tabel 4: Metabolietconcentraties in wortels en blaadjes van drie weken oude planten na 24 uur blootstelling aan 0 of 5 μM Cd. Het gemiddelde van de absolute waarden wordt weergegeven (nmol/g vers gewicht) \pm SE (n = 2-6). De redoxstatus is de verhouding tussen de geoxideerde vorm (DHA of GSSG) van de metaboliet en zijn gereduceerde vorm (AsA of GSH). Significatieniveaus (twee-weg ANOVA); verschillen tussen de mutanten en het wildtype: stijging $p < 0.01$ $p < 0.05$ daling $p < 0.01$; verschillen binnen de genotypes voor en na Cd-behandeling: ** $p < 0.01$ en * $p < 0.05$.

WORTEL									
metabolieten	<i>col</i>		<i>cad</i>		<i>vtc</i>		<i>vtccad</i>		
	0 μM Cd	5 μM Cd	0 μM Cd	5 μM Cd	0 μM Cd	5 μM Cd	0 μM Cd	5 μM Cd	
AsA + DHA	343 \pm 60	546 \pm 40	485 \pm 29	824** \pm 80	157 \pm 13	152 \pm 5		226 \pm 17	
AsA	159 \pm 34	345 \pm 76	238 \pm 37	255 \pm 94	56 \pm 13	0 \pm 0		58 \pm 35	
DHA	140 \pm 6	201 \pm 43	248 \pm 57	569 \pm 46	110 \pm 12	152 \pm 5		168 \pm 25	
DHA/AsA	1.22 \pm 0.45	0.45 \pm 0.13	1.33 \pm 0.51	4.15 \pm 1.49	1.92 \pm 0.40			0.78 \pm 0.10	
GSH + GSSG	88 \pm 9	91 \pm 6	33 \pm 3	47 \pm 11	96 \pm 5	79 \pm 3		53 \pm 10	
GSH	44 \pm 4	51 \pm 4	3 \pm 1	6 \pm 1	42 \pm 4	40 \pm 7		2 \pm 2	
GSSG	44 \pm 6	45 \pm 2	30 \pm 3	42 \pm 12	55 \pm 4	39 \pm 7		51 \pm 11	
GSSG/GSH	1.03 \pm 0.12	0.90 \pm 0.07	29.95 \pm 13.49	5.12 \pm 1.11	1.37 \pm 0.17	1.33 \pm 0.50			

BLAD									
metabolieten	<i>col</i>		<i>cad</i>		<i>vtc</i>		<i>vtccad</i>		
	0 μM Cd	5 μM Cd	0 μM Cd	5 μM Cd	0 μM Cd	5 μM Cd	0 μM Cd	5 μM Cd	
AsA + DHA	2522 \pm 18	2367 \pm 89	2505 \pm 366	2812 \pm 140	812 \pm 88	884 \pm 38	690 \pm 50	1000 \pm 103	
AsA	371 \pm 150	820 \pm 160	490 \pm 155	1014 \pm 168	63 \pm 3	78 \pm 9	80 \pm 20	96 \pm 10	
DHA	2095 \pm 182	1547 \pm 209	2015 \pm 250	1798 \pm 113	750 \pm 86	806 \pm 46	608 \pm 48	904 \pm 111	
DHA/AsA	10.18 \pm 5.40	2.54 \pm 0.86	7.09 \pm 3.27	2.14 \pm 0.56	11.86 \pm 1.13	10.98 \pm 1.54	8.03 \pm 1.27	10.07 \pm 1.82	
GSH + GSSG	267 \pm 8	226 \pm 18	93 \pm 11	78 \pm 7	414 \pm 13	388 \pm 7	102 \pm 10	84 \pm 10	
GSH	192 \pm 7	155 \pm 18	56 \pm 2	54 \pm 11	176 \pm 9	127* \pm 10	48 \pm 10	41 \pm 7	
GSSG	77 \pm 5	71 \pm 13	52 \pm 12	24 \pm 6	238 \pm 4	257 \pm 19	54 \pm 10	43 \pm 5	
GSSG/GSH	0.41 \pm 0.04	0.51 \pm 0.12	0.77 \pm 0.19	0.30 \pm 0.08	1.36 \pm 0.05	2.09 \pm 0.37	1.20 \pm 0.24	1.10 \pm 0.15	

3.2.5 Genexpressie in de wortel

Het transcriptieniveau van vijf groepen van genen werd bestudeerd in de wortels op basis van hun functie gerelateerd met de AsA- of GSH-biosynthese, O_2^- -scavenging, H_2O_2 -scavenging en de AsA-GSH cyclus, ROS-productie en signalering (Tabel 5). Effecten van de mutanten bij 0 μM Cd ten opzichte van het wildtype (genotype-effecten) werden bestudeerd alsook Cd-effecten bij 5 μM Cd ten opzichte van hetzelfde genotype bij 0 μM Cd.

Genotype-effecten

De drie mutanten vertonen een aantal genotypische verschillen op transcriptieniveau in de wortel. De *cad*-mutant heeft enerzijds een significant verhoogde genexpressie van *VTC1*, *CAT2*, *CAT3* en *RbohB* en anderzijds een significant lagere genexpressie van *GRX480* en *OXI1* in de wortel. De *vtc*-mutant heeft enkel

een verhoogde genexpressie van *AT1G03850* en *APX2* en, samen met de dubbelmutant, een lagere expressie van *VTC1*. Daarnaast heeft *vtccad* eveneens een verlaagde genexpressie van *APX4*, *PrxD*, *RbohA* en *WRKY25* en een verhoogde expressie van *MIR398bc*.

Cadmiumeffecten

In de wortel vertonen *col* en *vtc* enerzijds en *cad* en *vtccad* anderzijds een gelijkaardig patroon. Beide GSH-deficiënte mutanten induceren zo goed als alle bestudeerde genen ten gevolge van Cd-toxiciteit. Ten eerste induceren beide mutanten de genexpressie van alle vijf onderzochte **biosynthesegenen** (*GSH1*, *GSH2*, *PCS1*, *VTC1* en *GME*) en alle **catalasen** (*CAT1*, *CAT2* en *CAT3*) terwijl er bij *col* en *vtc* niets verandert voor de transcripten van deze genen. Ten tweede is het **SOD-expressieprofiel** erg verschillend; nagenoeg alle onderzochte genen worden geïnduceerd in de vier genotypes (*FSD1*, *CSD1*, *CSD2*, *hn-CSD1*, *hn-CSD2*, *MIR398a*, *MIR398bc* en *SPL7*) terwijl *CSD1*, *CSD2* en *hn-CSD1* enkel in *col* en *vtc* een lagere expressie hebben ten gevolge van Cd-toxiciteit. Ten derde induceren de GSH-deficiënte mutanten bijna alle onderzochte genen die betrokken zijn in de **AsA-GSH cyclus** (AsA-peroxidasen, AsA- en GSH-reductasen, glutaredoxines, peroxiredoxines en thioredoxines). De *vtc*-mutant heeft daarentegen enkel lagere expressies of geen expressieveranderingen van deze genen. Het wildtype heeft eveneens voornamelijk lagere transcriptieniveaus, met uitzondering van *AT1G03850* en *ATTRX3* waarvan de expressie geïnduceerd wordt. Ten vierde is er weinig verschil op transcriptioneel vlak van de **ROS-producerende genen** met uitzondering van *RbohD* en *LOX1* waarvan de genexpressie opvallend sterker geïnduceerd wordt door *cad* en *vtccad*. Ten slotte induceren de GSH-deficiënte mutanten meer genen die betrokken zijn bij **signalering** [TF's (*WRKY25* en *ZAT12*), MAPK's (*OXI1* en *MKK2*) en CDPK's (*CDPK1*, *SOS1*, *SOS2* en *SOS3*)] ten opzichte van de andere twee genotypes die ongeveer de helft van deze genen induceren.

Tabel 5: Het transcriptieniveau van vijf groepen van genen in de wortels van drie weken oude planten na 24 uur blootstelling aan 0 of 5 μM Cd. Het gemiddelde van de relatieve waarden wordt weergegeven \pm SE (n = 5). De significanties en de waarden in de kolommen 'Genotype-effect' zijn de relatieve gemiddelden van de genotypes bij 0 μM Cd ten opzichte van het wildtype bij 0 μM Cd. De significanties en de waarden in de kolommen 'Cadmiumeffect' zijn de relatieve gemiddelden van de genotypes bij 5 μM Cd ten opzichte van hetzelfde genotype bij 0 μM Cd. Significantieniveaus (eenweg-ANOVA): stijging p < 0.01 p < 0.05 p < 0.1 daling p < 0.01 p < 0.05 p < 0.1

Genotype-effect in de wortel Genotype 0 μM Cd				Gen	Cadmiumeffect in de wortel Genotype 5 μM Cd			
<i>col</i>	<i>cad</i>	<i>vtc</i>	<i>vtccad</i>		<i>col</i>	<i>cad</i>	<i>vtc</i>	<i>vtccad</i>
Biosynthese								
1.00 \pm 0.05	1.04 \pm 0.02	0.97 \pm 0.05	0.84 \pm 0.20	GSH1	0.92 \pm 0.02	3.32 \pm 0.12	0.90 \pm 0.04	4.79 \pm 0.16
1.00 \pm 0.10	1.21 \pm 0.05	1.01 \pm 0.11	0.79 \pm 0.29	GSH2	1.04 \pm 0.06	3.29 \pm 0.08	1.04 \pm 0.09	5.52 \pm 0.28
1.00 \pm 0.17	1.20 \pm 0.05	1.16 \pm 0.14	1.19 \pm 0.17	PCS1	1.17 \pm 0.07	3.50 \pm 0.18	1.52 \pm 0.15	4.24 \pm 0.30
1.00 \pm 0.02	1.52 \pm 0.07	0.64 \pm 0.09	0.52 \pm 0.14	VTC1	1.15 \pm 0.10	2.08 \pm 0.10	1.17 \pm 0.18	3.12 \pm 0.23
1.00 \pm 0.03	1.03 \pm 0.03	1.10 \pm 0.03	1.10 \pm 0.11	GME	0.94 \pm 0.04	1.86 \pm 0.08	1.03 \pm 0.06	1.96 \pm 0.18
O₂⁻-scavenging								
1.00 \pm 0.16	2.21 \pm 0.29	1.44 \pm 0.25	1.82 \pm 0.44	FSD1	7.26 \pm 0.59	2.43 \pm 0.24	7.39 \pm 1.10	9.56 \pm 0.50
1.00 \pm 0.07	1.02 \pm 0.04	1.04 \pm 0.03	0.67 \pm 0.22	CSD1	0.51 \pm 0.02	2.50 \pm 0.08	0.50 \pm 0.05	3.08 \pm 0.16
1.00 \pm 0.04	1.02 \pm 0.03	1.10 \pm 0.03	0.77 \pm 0.21	CSD2	0.76 \pm 0.03	1.75 \pm 0.10	0.63 \pm 0.04	1.73 \pm 0.14
1.00 \pm 0.01	0.90 \pm 0.05	1.12 \pm 0.11	0.71 \pm 0.26	hn-CSD1	0.82 \pm 0.04	9.67 \pm 0.41	0.72 \pm 0.02	16.6 \pm 0.84
1.00 \pm 0.08	1.25 \pm 0.01	1.42 \pm 0.14	1.01 \pm 0.34	hn-CSD2	1.03 \pm 0.07	5.36 \pm 0.42	1.11 \pm 0.05	7.87 \pm 0.88
1.00 \pm 0.13	0.70 \pm 0.12	0.80 \pm 0.08	1.24 \pm 0.14	MIR398a	4.72 \pm 0.08	3.32 \pm 0.43	5.03 \pm 0.78	3.35 \pm 0.26
1.00 \pm 0.16	1.78 \pm 0.26	1.95 \pm 0.21	3.27 \pm 0.35	MIR398bc	10.6 \pm 0.84	2.53 \pm 0.25	6.15 \pm 0.84	3.36 \pm 0.11
1.00 \pm 0.25	0.51 \pm 0.18	1.77 \pm 0.74	0.67 \pm 0.44	hn-MIR398a	2.88 \pm 0.48	12.5 \pm 5.01	1.04 \pm 0.14	10.9 \pm 2.54
1.00 \pm 0.08	1.34 \pm 0.05	1.10 \pm 0.11	0.84 \pm 0.20	SPL7	1.24 \pm 0.07	1.18 \pm 0.06	1.05 \pm 0.10	1.73 \pm 0.11
H₂O₂-scavenging/AsA-GSH cyclus								
1.00 \pm 0.09	0.90 \pm 0.10	1.07 \pm 0.13	0.64 \pm 0.14	CAT1	0.87 \pm 0.05	6.29 \pm 0.35	0.93 \pm 0.02	9.36 \pm 1.11
1.00 \pm 0.09	2.36 \pm 0.26	2.30 \pm 0.40	1.90 \pm 0.46	CAT2	1.18 \pm 0.15	2.26 \pm 0.09	0.96 \pm 0.19	2.15 \pm 0.12
1.00 \pm 0.28	3.16 \pm 0.28	1.11 \pm 0.24	1.18 \pm 0.42	CAT3	0.97 \pm 0.11	2.02 \pm 0.10	1.51 \pm 0.35	2.43 \pm 0.23
1.00 \pm 0.08	1.42 \pm 0.08	1.29 \pm 0.11	1.00 \pm 0.32	APX1	0.84 \pm 0.05	1.61 \pm 0.03	0.94 \pm 0.06	2.61 \pm 0.15
1.00 \pm 0.13	1.03 \pm 0.09	1.70 \pm 0.07	0.85 \pm 0.04	APX2	2.28 \pm 0.93	14.7 \pm 2.62	0.59 \pm 0.08	49.1 \pm 5.26
1.00 \pm 0.12				APX3	1.14 \pm 0.11			
1.00 \pm 0.15	0.96 \pm 0.11	0.63 \pm 0.06	0.46 \pm 0.16	APX4	0.54 \pm 0.07	0.71 \pm 0.07	0.72 \pm 0.07	0.99 \pm 0.12
1.00 \pm 0.10				APX5	0.60 \pm 0.03			
1.00 \pm 0.11				APX6	1.21 \pm 0.08			
1.00 \pm 0.02				APX7	0.82 \pm 0.06			
1.00 \pm 0.09				SAPX	0.72 \pm 0.03			
1.00 \pm 0.15				TAPX	0.74 \pm 0.08			

Genotype-effect in de wortel Genotype 0 μM Cd				Gen	Cadmiumeffect in de wortel Genotype 5 μM Cd			
<i>col</i>	<i>cad</i>	<i>vtc</i>	<i>vtccad</i>		<i>col</i>	<i>cad</i>	<i>vtc</i>	<i>vtccad</i>
H₂O₂-scavenging/AsA-GSH cyclus								
1.00 \pm 0.07				MDHAR1	1.02 \pm 0.05			
1.00 \pm 0.10				MDHAR2	1.20 \pm 0.02			
1.00 \pm 0.13				MDHAR3	0.97 \pm 0.11			
1.00 \pm 0.08				MDHAR4	1.34 \pm 0.14			
1.00 \pm 0.11	0.96 \pm 0.03	1.32 \pm 0.06	0.84 \pm 0.26	MDHAR5	0.70 \pm 0.06	1.05 \pm 0.08	0.82 \pm 0.03	1.27 \pm 0.07
1.00 \pm 0.06				DHAR1	1.06 \pm 0.02			
1.00 \pm 0.10				DHAR2	1.24 \pm 0.11			
1.00 \pm 0.08	0.94 \pm 0.03	0.74 \pm 0.04	0.59 \pm 0.18	DHAR3	0.71 \pm 0.02	1.13 \pm 0.05	0.80 \pm 0.03	1.89 \pm 0.23
1.00 \pm 0.20	0.76 \pm 0.11	1.14 \pm 0.15	0.73 \pm 0.26	GR1	1.42 \pm 0.10	3.64 \pm 0.11	1.04 \pm 0.04	5.07 \pm 0.36
1.00 \pm 0.07	1.15 \pm 0.02	1.20 \pm 0.11	0.99 \pm 0.28	GR2	0.96 \pm 0.05	1.37 \pm 0.07	0.91 \pm 0.06	1.53 \pm 0.07
1.00 \pm 0.41	0.05 \pm 0.01	0.14 \pm 0.04	0.26 \pm 0.08	GRX480	0.22 \pm 0.03	8.54 \pm 1.30	1.46 \pm 0.26	4.76 \pm 0.31
1.00 \pm 0.26	1.88 \pm 0.13	2.47 \pm 0.52	0.97 \pm 0.36	AT1G03850	3.75 \pm 0.87	4.13 \pm 0.24	0.41 \pm 0.11	5.24 \pm 0.44
1.00 \pm 0.12	1.17 \pm 0.05	0.88 \pm 0.06	0.71 \pm 0.19	PrxB	1.00 \pm 0.03	0.66 \pm 0.03	1.04 \pm 0.08	2.09 \pm 0.13
1.00 \pm 0.03	1.04 \pm 0.02	1.06 \pm 0.08	0.31 \pm 0.05	PrxD	0.76 \pm 0.05	1.43 \pm 0.05	0.67 \pm 0.04	4.70 \pm 0.77
1.00 \pm 0.03	1.08 \pm 0.03	1.11 \pm 0.04	0.91 \pm 0.14	ATTRX2	1.16 \pm 0.03	1.74 \pm 0.04	1.08 \pm 0.02	2.39 \pm 0.07
1.00 \pm 0.04	1.13 \pm 0.07	0.97 \pm 0.08	0.92 \pm 0.12	ATHM3	0.93 \pm 0.02	1.30 \pm 0.05	0.99 \pm 0.03	1.86 \pm 0.07
ROS-productie								
1.00 \pm 0.07	0.85 \pm 0.06	1.03 \pm 0.06	0.73 \pm 0.06	RbohA	1.52 \pm 0.12	2.56 \pm 0.10	1.57 \pm 0.13	3.79 \pm 0.44
1.00 \pm 0.14	1.97 \pm 0.05	1.14 \pm 0.21	0.84 \pm 0.26	RbohB	2.30 \pm 0.23	2.83 \pm 0.23	1.43 \pm 0.22	3.71 \pm 0.43
1.00 \pm 0.10	1.16 \pm 0.06	1.16 \pm 0.16	0.80 \pm 0.16	RbohC	1.38 \pm 0.07	0.83 \pm 0.05	1.38 \pm 0.13	1.67 \pm 0.13
1.00 \pm 0.25	1.26 \pm 0.07	1.00 \pm 0.28	1.14 \pm 0.43	RbohD	1.30 \pm 0.14	6.82 \pm 0.33	2.17 \pm 0.55	7.10 \pm 0.86
1.00 \pm 0.09	1.15 \pm 0.07	1.15 \pm 0.12	0.93 \pm 0.18	RbohE	2.11 \pm 0.16	2.21 \pm 0.18	1.82 \pm 0.12	3.10 \pm 0.20
1.00 \pm 0.10	1.06 \pm 0.03	1.09 \pm 0.10	1.01 \pm 0.21	RbohF	1.61 \pm 0.14	2.61 \pm 0.10	1.43 \pm 0.06	3.39 \pm 0.19
1.00 \pm 0.14	1.34 \pm 0.12	1.28 \pm 0.10	0.98 \pm 0.38	LOX1	2.64 \pm 0.29	49.1 \pm 2.62	1.57 \pm 0.25	70.6 \pm 6.22
Signalering								
1.00 \pm 0.16	0.81 \pm 0.03	0.64 \pm 0.11	0.38 \pm 0.13	WRKY25	1.46 \pm 0.12	2.81 \pm 0.14	1.85 \pm 0.14	8.91 \pm 0.97
1.00 \pm 0.40	0.19 \pm 0.08	0.12 \pm 0.04	0.13 \pm 0.08	ZAT12	0.48 \pm 0.10	194 \pm 3.62	1.17 \pm 0.37	362 \pm 31.7
1.00 \pm 0.28	0.27 \pm 0.03	0.41 \pm 0.11	0.41 \pm 0.16	OXI1	1.32 \pm 0.06	43.6 \pm 3.05	2.52 \pm 0.28	49.8 \pm 3.71
1.00 \pm 0.04	0.86 \pm 0.01	1.18 \pm 0.10	0.80 \pm 0.22	MKK2	1.38 \pm 0.06	2.52 \pm 0.10	1.45 \pm 0.05	3.56 \pm 0.19
1.00 \pm 0.08	0.89 \pm 0.03	1.01 \pm 0.06	0.74 \pm 0.19	CDPK1	1.21 \pm 0.09	2.56 \pm 0.14	1.22 \pm 0.05	4.57 \pm 0.33
1.00 \pm 0.08	1.75 \pm 0.10	1.53 \pm 0.24	1.19 \pm 0.27	SOS1	1.28 \pm 0.06	1.07 \pm 0.06	1.04 \pm 0.16	1.45 \pm 0.10
1.00 \pm 0.03	1.00 \pm 0.04	0.95 \pm 0.06	0.68 \pm 0.19	SOS2	1.13 \pm 0.05	1.25 \pm 0.04	1.11 \pm 0.03	2.07 \pm 0.10
1.00 \pm 0.13	1.17 \pm 0.09	1.26 \pm 0.16	0.97 \pm 0.13	SOS3	1.59 \pm 0.15	1.90 \pm 0.16	1.25 \pm 0.05	2.73 \pm 0.08

3.2.6 Genexpressie in het blad

In de blaadjes werd analoog met de wortels de genexpressie bestudeerd van vijf groepen van genen op basis van hun functie gerelateerd met de AsA- of GSH-biosynthese, O₂[°]-scavenging, H₂O₂-scavenging en de AsA-GSH cyclus, ROS-productie en signalering (Tabel 6). Effecten van de mutanten bij 0 µM Cd ten opzichte van *col* (genotype-effecten) en Cd-effecten bij 5 µM Cd ten opzichte van hetzelfde genotype bij 0 µM Cd werden bestudeerd.

Genotype-effecten

Op het vlak van genexpressie vertonen de drie mutanten ook een aantal genotypische verschillen in het blad. De *cad*-mutant heeft een significant lagere genexpressie van *RbohC*, en samen met de andere twee mutanten, heeft *cad* een significant verhoogde genexpressie van *DHAR2*. De AsA-deficiënte mutanten hebben allebei een lagere genexpressie van *VTC1* en een hogere expressie van *MDHAR3* en *GRX480*. Verder heeft enkel de dubbelmutant een verhoogde genexpressie van *FSD1*, *AT1G03850*, *PrxD*, *ATTRX2* en beide MAPK's (*OXI1* en *MKK2*) en een verlaagde expressie van *GSH2*, beide *CSD*'s en *SOS3*.

Cadmiumeffecten

In het blad vertonen enerzijds *col* en *cad* en anderzijds *vtc* en *vtccad* een vergelijkbaar expressiepatroon. Het wildtype en *cad* induceren duidelijk meer genen bij Cd-stress dan de AsA-deficiënte mutanten. Ten eerste worden alle GSH-**biosynthesegenen** geïnduceerd door *col* en *cad* en *VTC1* eveneens door het wildtype. Van de overige twee mutanten induceert enkel *vtc* de genexpressie van *PCS1* maar tegelijk verlaagt Cd de genexpressie van *GSH1*. Ten tweede zijn er verschillen in het **SOD-transcriptieprofiel**. Aan de ene kant vertoont de dubbelmutant een lagere of ongewijzigde genexpressie van alle gerelateerde genen en wordt enkel de genexpressie van *hn-MIR398a* en *MIR398bc* geïnduceerd bij *vtc*. Aan de andere kant induceren *col* en *cad* de genexpressie van *CSD1*, *MIR398a* en hun primaire transcripten evenals van *SPL7* terwijl *CSD2* en zijn primair transcript een lager transcriptieniveau hebben. Ten derde induceren *col* en *cad* de expressie van de meeste onderzochte genen uit de **AsA-GSH cyclus**. De *vtc*-mutant heeft daarentegen zowel verhoogde als verlaagde transcriptieniveaus van deze genen terwijl *vtccad* enkel lagere genexpressies heeft. Tot slot induceren *col* en *cad* alle genen die betrokken zijn in **ROS-productie** of **signalering** terwijl *vtc* amper de helft van deze genen induceert en de dubbelmutant alleen de transcriptiefactor *ZAT12*.

3.2.7 Clusteranalyse van de profielen op transcriptieniveau

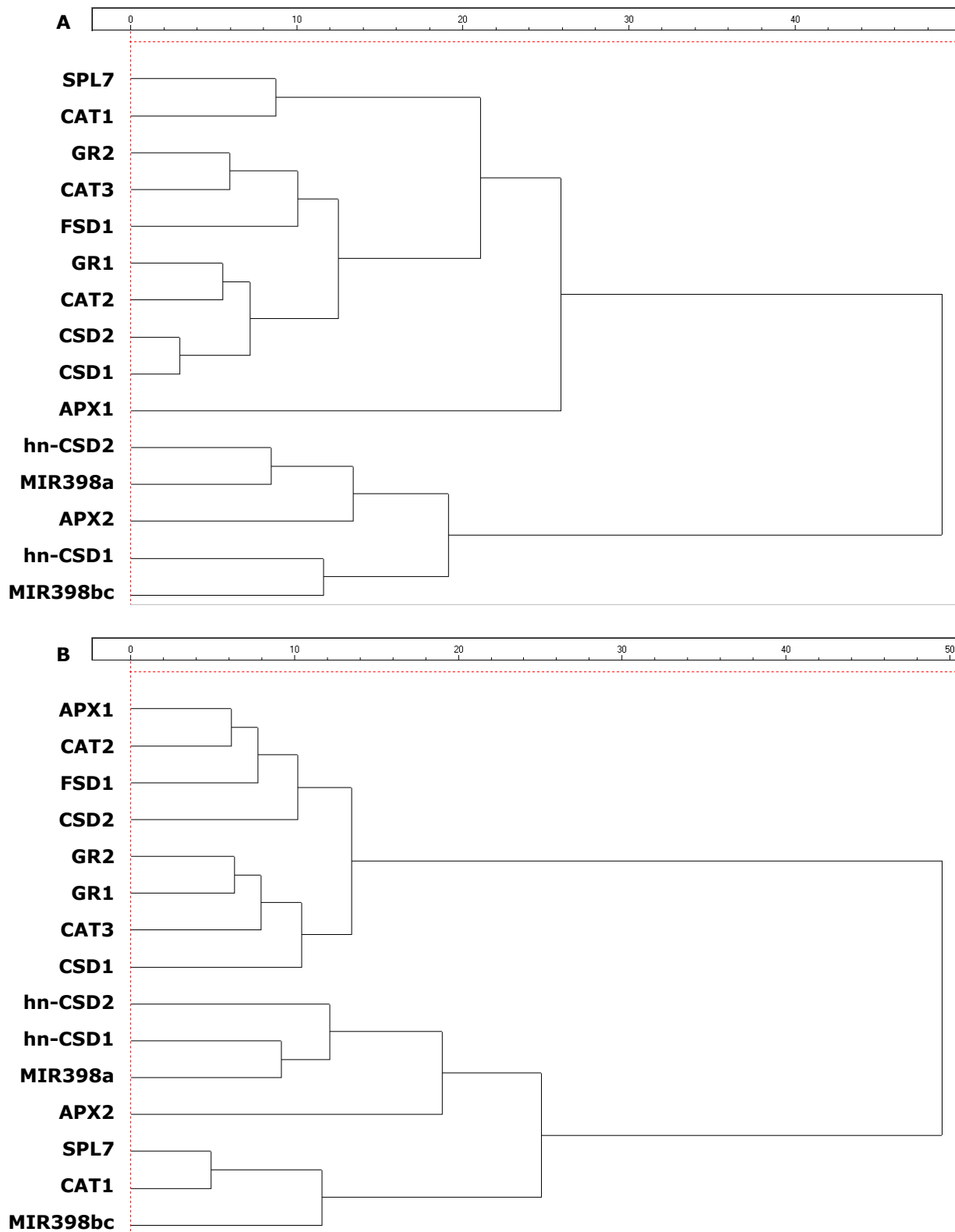
De clusteranalyse werd uitgevoerd op de genexpressieresultaten van alle genotypes samen (Figuur 14). Enkel de genen die betrokken zijn in de antioxidatieve verdediging werden hiervoor geselecteerd. Er zijn duidelijke verschillen tussen de wortel en het blad. In de wortel bestaan twee grote clusters die volledig van elkaar gescheiden zijn. Eén van deze clusters bestaat uit *hn-CSD2*, *MIR398a*, *APX2*, *hn-CSD1* en *MIR398bc*. Deze cluster bevat twee subclusters waarin enerzijds *hn-CSD1* en *MIR398bc* samenclusteren en anderzijds *hn-CSD2* en *MIR398a*. De andere cluster bevat de overige antioxidatieve genen.

In het blad bestaan eveneens twee grote gescheiden clusters. Eén van deze clusters bevat twee gelijkwaardige subclusters waarvan de subcluster met *APX1*, *CAT2*, *FSD1* en *CSD2* opvalt. Bovendien groeperen *CAT2* en *APX1* zich binnen deze subcluster. De andere grote cluster heeft geen gelijke subclusters. Tot slot hebben de wortel en het blad een kleine cluster gemeen: *SPL7* en *CAT1*.

Tabel 6: Het transcriptieniveau van vijf groepen van genen in de blaadjes van drie weken oude planten na blootstelling aan 0 of 5 μM Cd gedurende 24 uur. Het gemiddelde van de relatieve waarden wordt weergegeven \pm SE (n = 4-5). De significanties en de waarden in de kolommen 'Genotype-effect' zijn de relatieve gemiddelden van de genotypes bij 0 μM Cd ten opzichte van het wildtype bij 0 μM Cd. De significanties en de waarden in de kolommen 'Cadmiumeffect' zijn de relatieve gemiddelden van de genotypes bij 5 μM Cd ten opzichte van hetzelfde genotype bij 0 μM Cd. Significantieniveaus (eenweg-ANOVA): stijging $p < 0.01$ $p < 0.05$ $p < 0.1$ daling $p < 0.01$ $p < 0.05$ $p < 0.1$

Genotype-effect in het blad Genotype 0 μM Cd				Gen	Cadmiumeffect in het blad Genotype 5 μM Cd			
col	cad	vtc	vtccad		col	cad	vtc	vtccad
Biosynthesegenen								
1.00 \pm 0.01	1.02 \pm 0.05	0.96 \pm 0.04	0.82 \pm 0.08	GSH1	1.31 \pm 0.12	2.64 \pm 0.19	0.86 \pm 0.03	0.87 \pm 0.15
1.00 \pm 0.05	0.93 \pm 0.09	0.85 \pm 0.03	0.74 \pm 0.10	GSH2	1.50 \pm 0.10	4.34 \pm 0.67	0.98 \pm 0.04	1.26 \pm 0.33
1.00 \pm 0.17	0.85 \pm 0.04	1.25 \pm 0.22	1.43 \pm 0.20	PCS1	4.50 \pm 0.75	1.49 \pm 0.15	2.21 \pm 0.44	1.14 \pm 0.26
1.00 \pm 0.04	1.08 \pm 0.04	0.47 \pm 0.04	0.50 \pm 0.06	VTC1	1.71 \pm 0.03	1.04 \pm 0.10	1.20 \pm 0.09	0.85 \pm 0.03
1.00 \pm 0.19	0.80 \pm 0.04	1.02 \pm 0.15	0.80 \pm 0.07	GME	0.95 \pm 0.10	1.01 \pm 0.05	1.28 \pm 0.31	0.86 \pm 0.16
O₂⁻-scavenging								
1.00 \pm 0.36	1.45 \pm 0.26	1.99 \pm 0.38	2.47 \pm 0.38	FSD1	1.70 \pm 0.36	0.87 \pm 0.14	1.22 \pm 0.20	0.51 \pm 0.13
1.00 \pm 0.11	0.94 \pm 0.03	0.75 \pm 0.13	0.47 \pm 0.08	CSD1	1.45 \pm 0.18	2.63 \pm 0.20	0.74 \pm 0.17	0.40 \pm 0.05
1.00 \pm 0.12	0.90 \pm 0.07	0.70 \pm 0.14	0.36 \pm 0.09	CSD2	0.48 \pm 0.14	0.35 \pm 0.06	0.55 \pm 0.15	0.22 \pm 0.03
1.00 \pm 0.11	0.85 \pm 0.08	0.70 \pm 0.14	0.73 \pm 0.05	hn-CSD1	1.72 \pm 0.13	2.04 \pm 0.17	1.08 \pm 0.08	0.88 \pm 0.11
1.00 \pm 0.18	0.94 \pm 0.12	1.06 \pm 0.14	1.07 \pm 0.15	hn-CSD2	0.47 \pm 0.05	1.10 \pm 0.06	0.77 \pm 0.02	0.48 \pm 0.09
1.00 \pm 0.30	1.30 \pm 0.17	1.29 \pm 0.31	0.99 \pm 0.15	MIR398a	1.95 \pm 0.37	1.62 \pm 0.11	1.43 \pm 0.31	1.76 \pm 0.50
1.00 \pm 0.33	1.41 \pm 0.12	1.17 \pm 0.29	1.27 \pm 0.13	MIR398bc	1.40 \pm 0.26	1.24 \pm 0.12	1.81 \pm 0.25	1.87 \pm 0.32
1.00 \pm 0.40	1.62 \pm 0.20	2.93 \pm 0.73	2.48 \pm 0.19	hn-MIR398a	259 \pm 47.1	7.23 \pm 0.84	7.57 \pm 2.37	0.93 \pm 0.24
1.00 \pm 0.11	0.94 \pm 0.08	1.16 \pm 0.07	1.25 \pm 0.09	SPL7	1.28 \pm 0.02	1.51 \pm 0.08	1.32 \pm 0.15	0.73 \pm 0.10
H₂O₂-scavenging/AsA-GSH cyclus								
1.00 \pm 0.17	1.08 \pm 0.22	0.93 \pm 0.19	0.78 \pm 0.07	CAT1	1.54 \pm 0.27	2.17 \pm 0.16	0.91 \pm 0.08	0.62 \pm 0.08
1.00 \pm 0.22	0.86 \pm 0.12	1.33 \pm 0.27	1.02 \pm 0.11	CAT2	1.17 \pm 0.14	1.07 \pm 0.14	1.16 \pm 0.21	0.49 \pm 0.11
1.00 \pm 0.24	1.34 \pm 0.29	1.01 \pm 0.28	1.09 \pm 0.25	CAT3	1.10 \pm 0.19	1.37 \pm 0.25	1.31 \pm 0.16	0.77 \pm 0.14
1.00 \pm 0.01	1.25 \pm 0.11	1.24 \pm 0.05	1.27 \pm 0.03	APX1	2.03 \pm 0.28	2.56 \pm 0.25	1.06 \pm 0.09	0.63 \pm 0.14
1.00 \pm 0.09	2.57 \pm 0.61	1.05 \pm 0.14	0.85 \pm 0.12	APX2	2.60 \pm 0.65	44.8 \pm 10.8	1.93 \pm 0.38	4.29 \pm 2.59
1.00 \pm 0.04				APX3	0.99 \pm 0.06			
1.00 \pm 0.03	1.27 \pm 0.10	1.06 \pm 0.04	1.01 \pm 0.10	APX4	0.33 \pm 0.06	0.22 \pm 0.02	0.66 \pm 0.07	0.48 \pm 0.12
1.00 \pm 0.03				APX5	0.70 \pm 0.04			
1.00 \pm 0.05				APX6	0.90 \pm 0.04			
1.00 \pm 0.03				APX7	1.77 \pm 0.22			
1.00 \pm 0.04				SAPX	1.31 \pm 0.04			
1.00 \pm 0.04				TAPX	0.64 \pm 0.11			

Genotype-effect in het blad Genotype 0 μM Cd				Gen	Cadmiumeffect in het blad Genotype 5 μM Cd			
<i>col</i>	<i>cad</i>	<i>vtc</i>	<i>vtccad</i>		<i>col</i>	<i>cad</i>	<i>vtc</i>	<i>vtccad</i>
H₂O₂-scavenging/AsA-GSH cyclus								
1.00 ± 0.04				MDHAR1	1.48 ± 0.12			
1.00 ± 0.11				MDHAR2	7.61 ± 1.02			
1.00 ± 0.27	0.97 ± 0.40	6.29 ± 1.32	15.5 ± 3.92	MDHAR3	210 ± 31.9	41.6 ± 8.09	9.82 ± 2.19	1.13 ± 0.26
1.00 ± 0.03				MDHAR4	0.95 ± 0.05			
1.00 ± 0.03	1.22 ± 0.08	1.19 ± 0.05	1.18 ± 0.10	MDHAR5	0.65 ± 0.04	0.95 ± 0.05	0.81 ± 0.03	0.58 ± 0.12
1.00 ± 0.04	1.14 ± 0.01	1.21 ± 0.06	1.19 ± 0.08	DHAR1	0.65 ± 0.08	0.52 ± 0.03	0.85 ± 0.03	0.70 ± 0.13
1.00 ± 0.03	1.42 ± 0.12	1.56 ± 0.05	2.16 ± 0.20	DHAR2	2.31 ± 0.12	4.13 ± 0.64	1.64 ± 0.16	1.14 ± 0.18
1.00 ± 0.06				DHAR3	2.56 ± 0.68			
1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.10	1.13 ± 0.10	1.19 ± 0.05	GR1	3.38 ± 0.22	3.78 ± 0.13	1.43 ± 0.23	0.75 ± 0.12
1.00 ± 0.06	1.01 ± 0.05	1.04 ± 0.11	0.92 ± 0.11	GR2	0.84 ± 0.09	0.69 ± 0.02	0.93 ± 0.08	0.79 ± 0.04
1.00 ± 0.34	0.67 ± 0.25	7.12 ± 2.49	15.3 ± 2.85	GRX480	224 ± 38.0	46.7 ± 8.48	8.88 ± 3.60	1.94 ± 0.85
1.00 ± 0.26	0.66 ± 0.06	1.64 ± 0.46	3.30 ± 0.33	AT1G03850	6.32 ± 1.26	10.5 ± 2.39	2.65 ± 0.61	0.61 ± 0.16
1.00 ± 0.03	1.01 ± 0.07	0.97 ± 0.02	0.91 ± 0.13	PrxB	0.61 ± 0.10	0.37 ± 0.02	0.78 ± 0.03	0.52 ± 0.11
1.00 ± 0.05	1.05 ± 0.08	1.22 ± 0.02	1.33 ± 0.06	PrxD	1.61 ± 0.11	1.86 ± 0.05	1.20 ± 0.13	0.80 ± 0.10
1.00 ± 0.04	1.03 ± 0.07	1.28 ± 0.11	1.53 ± 0.15	ATTRX2	2.59 ± 0.23	2.90 ± 0.16	1.39 ± 0.17	0.96 ± 0.09
1.00 ± 0.03	0.93 ± 0.05	1.00 ± 0.05	1.04 ± 0.06	ATHM3	1.97 ± 0.12	2.16 ± 0.21	1.36 ± 0.13	1.07 ± 0.08
ROS-productie								
1.00 ± 0.26	0.19 ± 0.09	0.46 ± 0.12	0.45 ± 0.14	RbohC	61.5 ± 9.15	95.4 ± 34.4	8.03 ± 4.39	15.1 ± 9.14
1.00 ± 0.07	0.82 ± 0.07	1.06 ± 0.06	0.98 ± 0.16	RbohD	4.20 ± 0.25	5.73 ± 0.77	2.39 ± 0.43	1.56 ± 0.27
1.00 ± 0.16	0.84 ± 0.09	0.90 ± 0.08	1.33 ± 0.22	RbohE	6.18 ± 1.00	9.44 ± 0.61	2.57 ± 0.45	2.02 ± 0.45
1.00 ± 0.09	1.01 ± 0.10	1.40 ± 0.16	1.39 ± 0.07	RbohF	4.15 ± 0.12	2.14 ± 0.18	1.67 ± 0.36	0.90 ± 0.14
1.00 ± 0.09	0.88 ± 0.05	1.08 ± 0.09	1.06 ± 0.14	LOX1	2.15 ± 0.58	9.14 ± 1.32	0.99 ± 0.09	0.70 ± 0.09
1.00 ± 0.29	1.92 ± 0.10	1.47 ± 0.33	1.70 ± 0.22	LOX2	10.8 ± 2.08	3.14 ± 0.47	1.81 ± 0.14	1.42 ± 0.43
Signalering								
1.00 ± 0.26	0.57 ± 0.08	1.63 ± 0.42	2.15 ± 0.56	WRKY25	10.9 ± 0.65	11.8 ± 0.90	3.33 ± 0.69	1.16 ± 0.21
1.00 ± 0.24	1.06 ± 0.32	0.54 ± 0.19	0.63 ± 0.15	ZAT12	96.3 ± 17.4	124 ± 43.8	13.6 ± 4.71	3.47 ± 0.80
1.00 ± 0.09	1.01 ± 0.15	1.40 ± 0.13	2.13 ± 0.28	OXI1	207 ± 30.9	186 ± 31.6	23.0 ± 9.72	10.4 ± 6.22
1.00 ± 0.08	1.07 ± 0.05	1.66 ± 0.30	2.08 ± 0.31	MKK2	3.55 ± 0.21	2.74 ± 0.18	1.63 ± 0.25	0.81 ± 0.10
1.00 ± 0.07	0.86 ± 0.05	1.13 ± 0.08	1.32 ± 0.24	CDPK1	6.78 ± 0.43	3.70 ± 0.29	2.36 ± 1.06	0.9 ± 0.18
1.00 ± 0.03	1.03 ± 0.01	1.09 ± 0.03	0.96 ± 0.11	SOS1	1.96 ± 0.13	1.78 ± 0.13	1.18 ± 0.07	1.00 ± 0.10
1.00 ± 0.04	1.10 ± 0.06	1.03 ± 0.04	1.17 ± 0.03	SOS2	1.47 ± 0.06	1.63 ± 0.09	1.17 ± 0.06	0.81 ± 0.14
1.00 ± 0.06	0.87 ± 0.15	0.67 ± 0.02	0.63 ± 0.04	SOS3	1.54 ± 0.22	2.06 ± 0.27	1.33 ± 0.08	0.81 ± 0.15



Figuur 14: Groepering van de patronen van de gemeten genexpressieresultaten betreffende de antioxidatieve verdediging (**A**) in de wortels en (**B**) in de blaadjes van drie weken oude planten (*col*, *cad*, *vtc* en *vtccad*) na blootstelling aan 0 of 5 μM Cd gedurende 24 uur. Deze groepering gebeurde volgens hiërarchische clustering met behulp van GenEx (Unweighted pairs linkage).

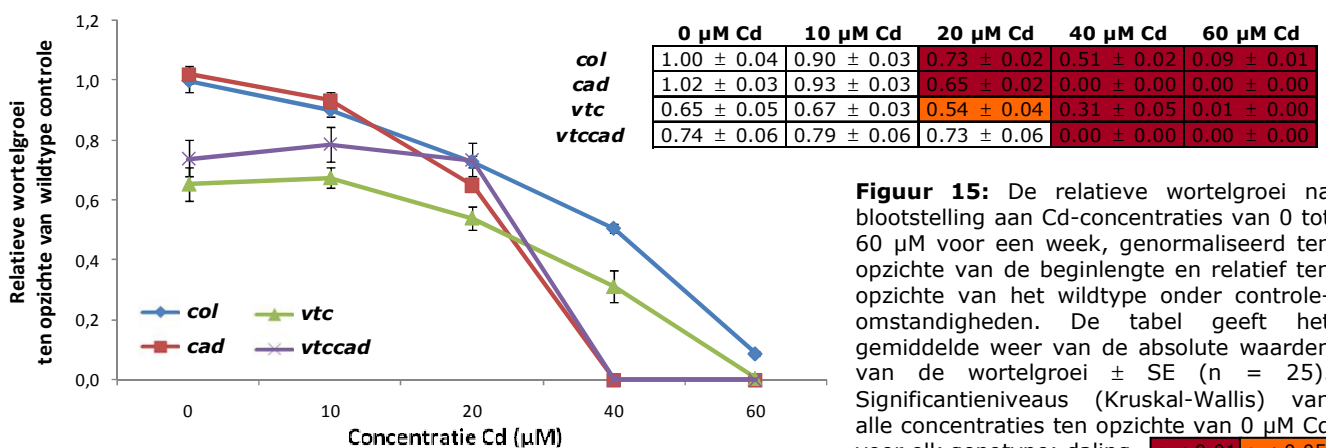
3.3 De rol van AsA en GSH in de responsen en de regulatie van *Arabidopsis thaliana* na een week cadmium- of koperstress

Om de rol van AsA en GSH in de responsen en de regulatie van *Arabidopsis* te onderzoeken bij meerdere Cd-concentraties, werden de vier genotypes (*col*, *cad*, *vtc* en *vtccad*) gedurende een week blootgesteld aan een reeks concentraties: 0, 10, 20, 40 en 60 μM Cd. Wegens de opmerkelijke resultaten omtrent de genexpressie van *CSD1* en *CSD2* en hun posttranscriptionele regulatie, werd dit experiment eveneens uitgevoerd met verschillende Cu-concentraties (0, 20, 30, 40 en 50 μM) aangezien er van Cu reeds geweten is dat deze regulatie blijkbaar omgekeerd werkt. De wortelgroei werd onderzocht om een goede selectie te maken van de condities die vervolgens werden getest op genexpressieniveau. De planten werden gekweekt op verticale agarplaten met een nutriëntrijke agar en na een week getransfereerd naar behandelde platen. Aangezien een nieuw medium werd gebruikt kunnen de resultaten betreffende Cd afwijken van het vorig experiment met Cd-behandelde agarplaten. Na de transfer werd de wortelgroei dagelijks geanalyseerd en na een week werden de wortels en de blaadjes geoogst voor genexpressie.

Naast de wortelgroei werd eveneens de bladgroei onderzocht om de Cu-gevoeligheid van *Arabidopsis thaliana* te testen bij de volgende concentraties: 0, 5, 10, 15, 20, 25 en 30 μM Cu.

3.3.1 Effect van cadmium op de groei

Cadmium heeft een significant genotype-afhankelijk effect op de wortelgroei (Figuur 15). Onder controlecondities hebben zowel *vtc* als *vtccad* een kleinere wortelgroei dan *col*. Het wildtype, *cad* en *vtc* vertonen reeds een significante daling in hun wortelgroei vanaf 20 μM Cd terwijl dit bij *vtccad* pas vanaf 40 μM Cd is. De hoofdwortel stopt met groeien vanaf 40 μM Cd in *cad* en *vtccad* terwijl de hoofdwortel blijft groeien bij de andere twee genotypes, zelfs bij 60 μM Cd. Tussen 0 en 20 μM Cd volgen *col* en *cad* enerzijds en *vtc* en *vtccad* anderzijds een gelijkaardig verloop terwijl bij hogere concentraties *col* en *vtc* enerzijds en *cad* en *vtccad* anderzijds een gelijkaardig patroon vertonen.

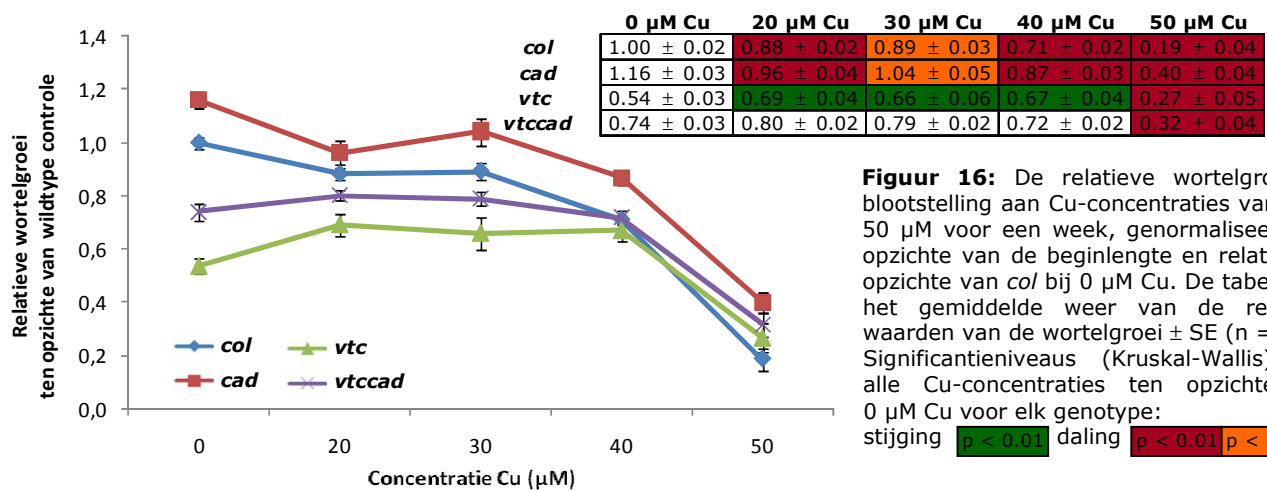


Figuur 15: De relatieve wortelgroei na blootstelling aan Cd-concentraties van 0 tot 60 μM voor een week, genormaliseerd ten opzichte van de beginlengte en relatief ten opzichte van het wildtype onder controleomstandigheden. De tabel geeft het gemiddelde weer van de absolute waarden van de wortelgroei \pm SE (n = 25). Significantieniveaus (Kruskal-Wallis) van alle concentraties ten opzichte van 0 μM Cd voor elk genotype: daling $p < 0.01$ $p < 0.05$

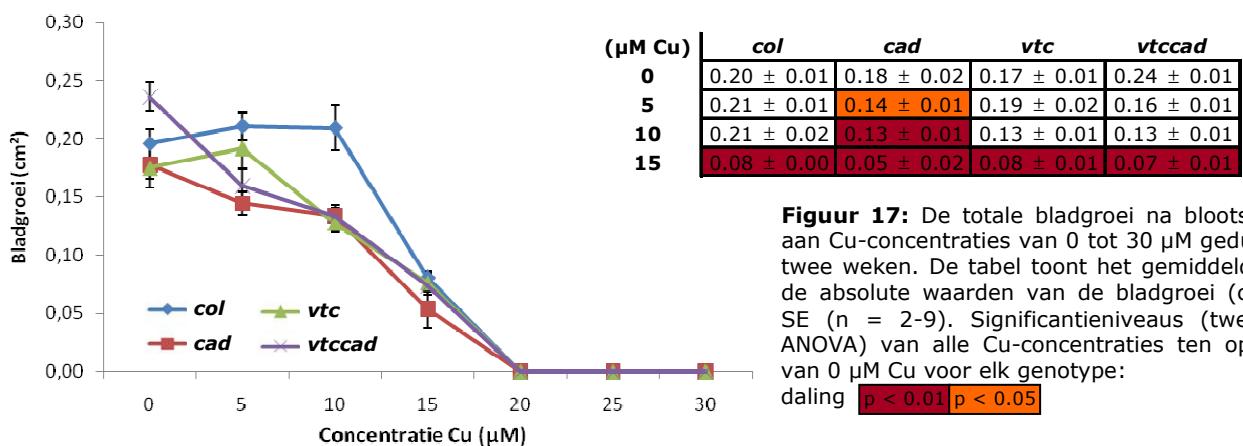
3.3.2 Effect van koper op de groei

Koper heeft net als Cd een significant genotype-afhankelijk effect op de wortel- en bladgroei. Onder controlecondities hebben zowel *vtc* als *vtccad* een kleinere wortelgroei dan *col* (Figuur 16). Het wildtype en *cad* vertonen reeds een significante daling in hun wortelgroei vanaf 20 μM Cu terwijl dit bij *vtc* en *vtccad* pas vanaf 50 μM Cu gebeurt. De wortelgroei in *vtc* is significant groter tussen 20 en 40 μM Cu in vergelijking met zijn controleconditie. De dubbelmutant vertoont hetzelfde patroon maar zonder significante stijgingen. Enerzijds lopen de groeicurven van *col* en *cad* analoog, anderzijds hebben de *vtc*- en *vtccad*-curven een gelijkaardig verloop.

In de bladgroei zijn er geen significante verschillen tussen de genotypes onder controleomstandigheden (Figuur 17). Er is een stijgende trend bij *col* en *vtc* bij 5 μM Cu, de *cad*-curve daarentegen vertoont meteen een significante daling en *vtccad* heeft eveneens een dalende trend in de bladgroei. Het wildtype blijft echter stabiel bij 10 μM terwijl *vtc* reeds daalt. Vanaf 15 μM Cu wordt de daling in de bladgroei bij alle genotypes significant. Alle curven vallen op 0 vanaf 20 μM Cu.



Figuur 16: De relatieve wortelgroei na blootstelling aan Cu-concentraties van 0 tot 50 μM voor een week, genormaliseerd ten opzichte van de beginlengte en relatief ten opzichte van *col* bij 0 μM Cu. De tabel geeft het gemiddelde weer van de relatieve waarden van de wortelgroei \pm SE (n = 25). Significatieniveaus (Kruskal-Wallis) van alle Cu-concentraties ten opzichte van 0 μM Cu voor elk genotype: stijging $p < 0.01$ daling $p < 0.01$ $p < 0.05$



Figuur 17: De totale bladgroei na blootstelling aan Cu-concentraties van 0 tot 30 μM gedurende twee weken. De tabel toont het gemiddelde van de absolute waarden van de bladgroei (cm^2) \pm SE (n = 2-9). Significatieniveaus (tweeweg-ANOVA) van alle Cu-concentraties ten opzichte van 0 μM Cu voor elk genotype: daling $p < 0.01$ $p < 0.05$

3.3.3 Genexpressie bij twee verschillende metaalconcentraties na een week blootstelling

Twee Cd-concentraties (10 en 20 μM) en twee Cu-concentraties (20 en 30 μM) werden geselecteerd om samen met de controlecondities te analyseren op transcriptieniveau. De expressie van drie groepen van genen werd bestudeerd in de wortels en in de blaadjes op basis van hun functie gerelateerd met $\text{O}_2^{\circ-}$ -scavenging, H_2O_2 -scavenging en meer specifiek GSH-reductie.

Genotype-effecten

Na een groei van twee weken op agarplaten vertonen de mutanten soms andere genotype-effecten dan na drie weken in een hydrocultuur. Een overeenkomend effect is de verlaagde genexpressie van *CSD2* in het blad van de dubbelmutant (data niet weergegeven).

Cadmiumeffecten

In de wortel vertoont het wildtype een significante onderdrukking van de genexpressie van *FSD1*, *CSD2* en *APX1* na Cd-blootstelling (Tabel 7). De drie mutanten daarentegen hebben enkel stijgingen in de genexpressies van de onderzochte genen en dit hoofdzakelijk bij 20 μM Cd; *cad* induceert *FSD1*, *CSD1*, *MIR398bc*, *APX2* en *GR1* terwijl *vtccad* zich beperkt tot *CSD1*, *MIR398bc* en *GR1* en *vtc* enkel *MIR398bc* en *GR1* induceert. In het blad wordt de genexpressie van *FSD1*, *CSD2*, *CAT1*, *CAT3* en *APX1* onderdrukt in alle genotypes bij beide Cd-concentraties met uitzondering van de *CSD2*- en *CAT3*-genexpressie in de *cad*-mutant. Daarnaast wordt enkel in *vtccad* de genexpressie van *CSD1* onderdrukt en van *MIR398bc* geïnduceerd. Het wildtype onderdrukt bovendien als enige de genexpressie van *CAT2*. Tot slot wordt de genexpressie van *APX2* significant onderdrukt bij beide concentraties in *cad* en enkel bij 10 μM Cd in *vtc*.

Kopereffecten

Hoewel alle genotypes een significante onderdrukking in de genexpressie van *FSD1* vertonen bij beide Cu-concentraties in de wortel, reageren enerzijds *col* en *cad* en anderzijds *vtc* en *vtccad* gelijkaardig voor de rest van de genen (Tabel 8). In *col* en *cad* wordt de genexpressie van *MIR398a*, *MIR398bc*, *SPL7*, *CAT2*, *CAT3*, *APX1* en *GR2* onderdrukt terwijl die van *MIR398bc*, *SPL7*, *CAT1*, *CAT2* en *GR2* is verlaagd in *vtccad* en enkel de genexpressie van *MIR398bc* in *vtc*. Daarnaast wordt de genexpressie van *CAT1* en *GR1* geïnduceerd door de *cad*-mutant. In het blad reageren alle genotypes gelijkaardig; de genexpressie van *FSD1*, *MIR398a* en *MIR398bc* wordt onderdrukt terwijl *CSD1* en *CSD2* worden geïnduceerd bij alle onderzochte Cu-concentraties.

Clusteranalyse

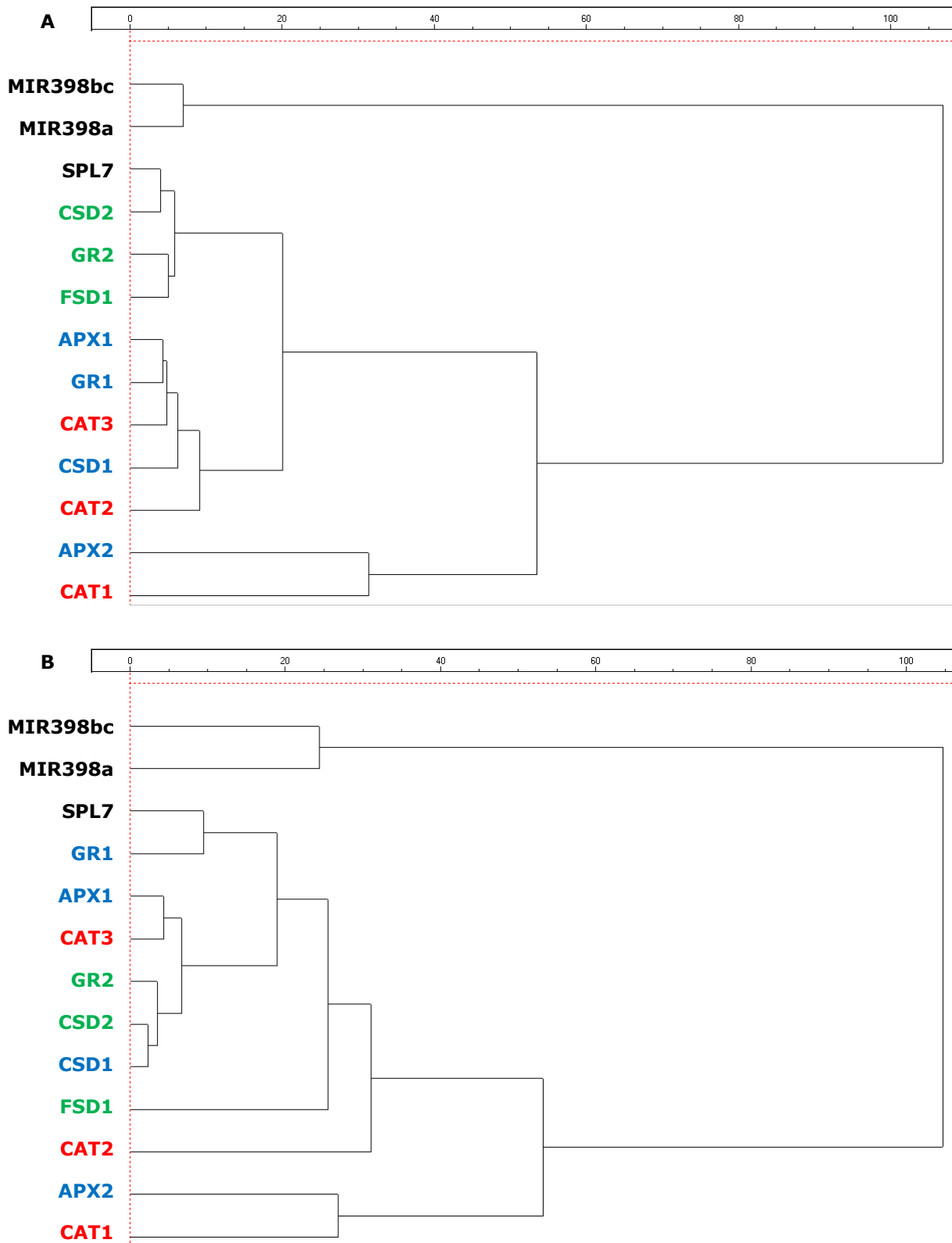
De clusteranalyse vertoont duidelijke verschillen tussen de wortel en het blad. Elk orgaan apart vertoont dezelfde clusters bij zowel Cd- als Cu-behandelde planten voor alle genotypes (Figuur 18). In de wortel bestaan er vier clusters. Eén cluster hiervan bevat twee subclusters bestaande uit *SPL7*, *CSD2*, *GR2* en *FSD1* enerzijds en *APX1*, *GR1*, *CAT3*, *CSD1* en *CAT2* anderzijds. In de Cu-behandelde planten verdwijnt *FSD1* uit de cluster. In het blad bestaan drie gescheiden clusters na behandeling door beide metalen. Een opmerkelijke cluster bestaat uit *APX1*, *CAT3*, *GR2*, *CSD2* en *CSD1* met *APX1* en *CAT3* in een subcluster. Tot slot hebben de wortel en het blad één cluster gemeen: *MIR398a* en *MIR398bc*.

Tabel 7: Het transcriptieniveau van drie groepen van genen in de wortels en de blaadjes van twee weken oude planten na blootstelling aan 0, 10 of 20 µM Cd gedurende een week. Het gemiddelde van de relatieve waarden van de genotypes bij 10 of 20 µM Cd ten opzichte van hetzelfde genotype bij 0 µM Cd wordt weergegeven ± SE (n = 4). Significantieniveaus (tweeweg-ANOVA): stijging $p < 0.01$ $p < 0.05$ $p < 0.1$ daling $p < 0.01$ $p < 0.05$ $p < 0.1$

	WORTEL	col			cad			vtc			vtccad		
		10 µM Cd		20 µM Cd	10 µM Cd		20 µM Cd	10 µM Cd		20 µM Cd	10 µM Cd		20 µM Cd
		0 µM Cd	1.00 ± 0.11	0.47 ± 0.04	0.81 ± 0.01	1.00 ± 0.15	0.91 ± 0.15	1.95 ± 0.30	1.32 ± 0.23	1.45 ± 0.10	1.32 ± 0.23	1.00 ± 0.06	1.63 ± 0.15
O ₂ ⁻ scavenging	Gen	1.00 ± 0.11	0.47 ± 0.04	0.81 ± 0.01	1.00 ± 0.15	0.91 ± 0.15	1.95 ± 0.30	1.32 ± 0.23	1.45 ± 0.10	1.32 ± 0.23	1.00 ± 0.06	1.63 ± 0.15	1.41 ± 0.02
	FSD1	1.00 ± 0.07	0.67 ± 0.05	0.74 ± 0.04	1.00 ± 0.14	1.28 ± 0.12	2.13 ± 0.19	0.91 ± 0.06	0.80 ± 0.03	0.91 ± 0.06	1.00 ± 0.04	2.57 ± 0.65	1.84 ± 0.04
	CSD1	1.00 ± 0.10	0.64 ± 0.03	0.60 ± 0.05	1.00 ± 0.09	0.67 ± 0.06	1.02 ± 0.06	0.79 ± 0.10	0.66 ± 0.06	0.79 ± 0.10	1.00 ± 0.06	0.63 ± 0.07	0.79 ± 0.10
H ₂ O ₂ scavenging	MIR398a	1.00 ± 0.15		0.76 ± 0.08	1.00 ± 0.17		2.16 ± 0.38	0.93 ± 0.09		0.93 ± 0.09	1.00 ± 0.19		1.74 ± 0.36
	MIR398b/c	1.00 ± 0.13		1.12 ± 0.06	1.00 ± 0.13		6.47 ± 0.46	2.22 ± 0.25		1.00 ± 0.34			8.90 ± 0.33
	SPL7	1.00 ± 0.07	0.88 ± 0.08	0.99 ± 0.11	1.00 ± 0.15	1.31 ± 0.14	1.59 ± 0.32	1.11 ± 0.12	1.33 ± 0.18	1.11 ± 0.12	1.00 ± 0.09	1.04 ± 0.16	0.81 ± 0.06
GR	CAT1	1.00 ± 0.10	0.47 ± 0.02	0.69 ± 0.05	1.00 ± 0.14	0.64 ± 0.11	1.89 ± 0.42	0.69 ± 0.08	0.55 ± 0.08	0.69 ± 0.08	1.00 ± 0.04	0.68 ± 0.17	1.04 ± 0.12
	CAT2	1.00 ± 0.13	0.76 ± 0.10	0.84 ± 0.12	1.00 ± 0.19	0.68 ± 0.03	1.16 ± 0.24	0.84 ± 0.12	1.09 ± 0.28	0.84 ± 0.12	1.00 ± 0.04	0.89 ± 0.22	0.66 ± 0.08
	CAT3	1.00 ± 0.07	0.72 ± 0.12	0.81 ± 0.14	1.00 ± 0.06	0.86 ± 0.10	1.13 ± 0.28	0.87 ± 0.10	0.98 ± 0.06	0.87 ± 0.10	1.00 ± 0.11	1.30 ± 0.10	0.91 ± 0.06
scavenging	APX1	1.00 ± 0.08	0.43 ± 0.03	0.47 ± 0.03	1.00 ± 0.12	0.77 ± 0.08	1.42 ± 0.19	0.74 ± 0.04	0.71 ± 0.02	0.74 ± 0.04	1.00 ± 0.14	0.99 ± 0.09	0.86 ± 0.08
	APX2	1.00 ± 0.09	0.58 ± 0.20	0.46 ± 0.06	1.00 ± 0.31	0.71 ± 0.27	4.28 ± 1.65	0.26 ± 0.05	0.43 ± 0.06	0.26 ± 0.05	1.00 ± 0.28	2.01 ± 0.31	1.72 ± 0.26
	GR1	1.00 ± 0.11	0.98 ± 0.13	1.13 ± 0.14	1.00 ± 0.11	1.37 ± 0.08	2.23 ± 0.09	1.61 ± 0.18	1.37 ± 0.13	1.61 ± 0.18	1.00 ± 0.12	1.45 ± 0.09	1.73 ± 0.17
GR	GR2	1.00 ± 0.01	0.99 ± 0.07	1.08 ± 0.05	1.00 ± 0.09	0.93 ± 0.04	1.34 ± 0.02	1.18 ± 0.07	1.20 ± 0.08	1.18 ± 0.07	1.00 ± 0.07	0.90 ± 0.12	0.82 ± 0.04
	BLAD												
	Gen	1.00 ± 0.10	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.00	1.00 ± 0.25	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.09 ± 0.03	0.01 ± 0.00	0.09 ± 0.03	0.01 ± 0.00	1.00 ± 0.08	0.03 ± 0.00
O ₂ ⁻ scavenging	FSD1	1.00 ± 0.09	1.08 ± 0.08	1.08 ± 0.09	1.00 ± 0.03	0.91 ± 0.07	0.78 ± 0.03	0.95 ± 0.03	0.93 ± 0.04	0.95 ± 0.03	1.00 ± 0.10	0.77 ± 0.04	0.55 ± 0.06
	CSD1	1.00 ± 0.04	0.78 ± 0.03	0.70 ± 0.03	1.00 ± 0.07	0.78 ± 0.06	0.61 ± 0.04	0.91 ± 0.04	1.16 ± 0.02	0.91 ± 0.04	1.00 ± 0.07	0.62 ± 0.02	0.36 ± 0.04
	CSD2	1.00 ± 0.02		0.70 ± 0.06	1.00 ± 0.30		1.65 ± 0.38	0.60 ± 0.08		0.60 ± 0.08	1.00 ± 0.06		1.48 ± 0.04
H ₂ O ₂ -scavenging	MIR398a	1.00 ± 0.03		0.20 ± 0.13	1.00 ± 0.26		1.41 ± 0.38	0.26 ± 0.07		0.26 ± 0.07	1.00 ± 0.07		1.34 ± 0.47
	MIR398b/c	1.00 ± 0.07	1.13 ± 0.08	1.01 ± 0.14	1.00 ± 0.23	0.93 ± 0.11	0.98 ± 0.08	0.90 ± 0.04	0.76 ± 0.02	0.90 ± 0.04	1.00 ± 0.09	1.21 ± 0.06	1.29 ± 0.11
	SPL7	1.00 ± 0.01	0.34 ± 0.05	0.43 ± 0.02	1.00 ± 0.04	0.34 ± 0.02	0.31 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.31 ± 0.00	0.30 ± 0.01	1.00 ± 0.04	0.30 ± 0.04	0.26 ± 0.03
scavenging	CAT1	1.00 ± 0.07	0.67 ± 0.08	0.85 ± 0.06	1.00 ± 0.11	1.26 ± 0.04	1.02 ± 0.09	0.65 ± 0.03	0.79 ± 0.11	0.65 ± 0.03	1.00 ± 0.10	1.08 ± 0.11	0.87 ± 0.04
	CAT2	1.00 ± 0.15	0.52 ± 0.12	0.36 ± 0.05	1.00 ± 0.24	0.23 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.25 ± 0.02	0.37 ± 0.10	0.25 ± 0.02	1.00 ± 0.06	0.29 ± 0.03	0.26 ± 0.02
	CAT3	1.00 ± 0.13	0.21 ± 0.02	0.28 ± 0.01	1.00 ± 0.10	0.24 ± 0.01	0.18 ± 0.00	0.21 ± 0.04	0.27 ± 0.05	0.21 ± 0.04	1.00 ± 0.10	0.22 ± 0.02	0.19 ± 0.02
GR	APX1	1.00 ± 0.09	0.95 ± 0.26	1.27 ± 0.27	1.00 ± 0.20	0.17 ± 0.02	0.28 ± 0.06	0.58 ± 0.10	0.22 ± 0.04	0.58 ± 0.10	1.00 ± 0.18	0.68 ± 0.11	1.30 ± 0.07
	APX2	1.00 ± 0.14	0.76 ± 0.13	0.55 ± 0.19	1.00 ± 0.20	0.53 ± 0.03	0.57 ± 0.10	0.63 ± 0.11	0.70 ± 0.06	0.63 ± 0.11	1.00 ± 0.06	0.88 ± 0.12	0.86 ± 0.09
	GR1	1.00 ± 0.05	0.82 ± 0.05	0.93 ± 0.04	1.00 ± 0.04	1.06 ± 0.03	0.97 ± 0.04	0.80 ± 0.02	0.84 ± 0.07	0.80 ± 0.02	1.00 ± 0.05	0.99 ± 0.05	0.88 ± 0.01

Tabel 8: Het transcriptieniveau van drie groepen van genen in de wortels en de blaadjes van twee weken oude planten na blootstelling aan 0, 20 of 30 μM Cu gedurende een week. Het gemiddelde van de relatieve waarden van de genotypes bij 20 of 30 μM Cu ten opzichte van hetzelfde genotype bij 0 μM Cu wordt weergegeven \pm SE (n = 4). Significantieniveaus (tweeweg-ANOVA): stijging $p < 0.01$ | $p < 0.05$ | $p < 0.1$ daling $p < 0.01$ | $p < 0.05$ | $p < 0.1$

	WORTEL	col			cad			vtc			vtccad		
		20 μM Cu		30 μM Cu	20 μM Cu		30 μM Cu	20 μM Cu		30 μM Cu	20 μM Cu		30 μM Cu
		0 μM Cu	1.00 \pm 0.06	0.03 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.08	0.06 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00	1.00 \pm 0.05	0.06 \pm 0.02	0.02 \pm 0.00	1.00 \pm 0.05	0.07 \pm 0.01
O_2^- scavenging	FSD1	1.00 \pm 0.04	1.06 \pm 0.07	0.96 \pm 0.02	1.00 \pm 0.10	0.90 \pm 0.05	1.00 \pm 0.03	1.00 \pm 0.11	0.93 \pm 0.03	0.94 \pm 0.04	1.00 \pm 0.10	1.10 \pm 0.05	1.00 \pm 0.06
	CSD1	1.00 \pm 0.01	0.84 \pm 0.05	0.72 \pm 0.07	1.00 \pm 0.12	0.75 \pm 0.04	0.78 \pm 0.04	1.00 \pm 0.13	0.94 \pm 0.02	0.86 \pm 0.07	1.00 \pm 0.05	1.24 \pm 0.21	0.88 \pm 0.01
	CSD2	1.00 \pm 0.07		0.31 \pm 0.03	1.00 \pm 0.14		0.22 \pm 0.03	1.00 \pm 0.17		0.56 \pm 0.11	1.00 \pm 0.12		0.35 \pm 0.16
H_2O_2^- scavenging	MIR398a	1.00 \pm 0.07		0.01 \pm 0.00	1.00 \pm 0.15		0.02 \pm 0.01	1.00 \pm 0.19		0.02 \pm 0.01	1.00 \pm 0.10		0.08 \pm 0.01
	MIR398b/c	1.00 \pm 0.05	0.45 \pm 0.04	0.53 \pm 0.02	1.00 \pm 0.04	0.44 \pm 0.01	0.53 \pm 0.02	1.00 \pm 0.07	0.83 \pm 0.10	0.82 \pm 0.10	1.00 \pm 0.06	0.56 \pm 0.03	1.03 \pm 0.10
	SPL7	1.00 \pm 0.02	0.65 \pm 0.05	0.85 \pm 0.06	1.00 \pm 0.06	0.52 \pm 0.07	0.53 \pm 0.04	1.00 \pm 0.14	0.68 \pm 0.07	0.64 \pm 0.19	1.00 \pm 0.16	0.49 \pm 0.06	0.59 \pm 0.03
GR	CAT1	1.00 \pm 0.06	0.38 \pm 0.03	0.39 \pm 0.02	1.00 \pm 0.05	0.29 \pm 0.02	0.33 \pm 0.01	1.00 \pm 0.11	0.64 \pm 0.11	0.63 \pm 0.08	1.00 \pm 0.15	0.31 \pm 0.04	0.80 \pm 0.10
	CAT2	1.00 \pm 0.07	0.65 \pm 0.05	0.94 \pm 0.09	1.00 \pm 0.09	0.65 \pm 0.04	0.74 \pm 0.04	1.00 \pm 0.10	0.81 \pm 0.05	0.96 \pm 0.02	1.00 \pm 0.11	0.80 \pm 0.03	0.86 \pm 0.06
	CAT3	1.00 \pm 0.07	0.60 \pm 0.02	0.54 \pm 0.08	1.00 \pm 0.09	0.55 \pm 0.01	0.56 \pm 0.03	1.00 \pm 0.11	0.78 \pm 0.04	0.74 \pm 0.10	1.00 \pm 0.08	0.61 \pm 0.07	0.68 \pm 0.09
GR	APX1	1.00 \pm 0.10	0.80 \pm 0.14	0.45 \pm 0.07	1.00 \pm 0.17	0.99 \pm 0.05	1.42 \pm 0.14	1.00 \pm 0.30	1.04 \pm 0.19	0.71 \pm 0.24	1.00 \pm 0.08	0.62 \pm 0.12	0.71 \pm 0.18
	APX2	1.00 \pm 0.01	1.08 \pm 0.10	0.60 \pm 0.08	1.00 \pm 0.05	0.65 \pm 0.06	0.66 \pm 0.07	1.00 \pm 0.06	1.03 \pm 0.14	0.84 \pm 0.09	1.00 \pm 0.08	0.65 \pm 0.09	0.95 \pm 0.08
	GR2	1.00 \pm 0.03	0.66 \pm 0.03	0.67 \pm 0.01	1.00 \pm 0.04	0.62 \pm 0.03	0.68 \pm 0.02	1.00 \pm 0.05	0.93 \pm 0.06	0.91 \pm 0.05	1.00 \pm 0.08	0.61 \pm 0.13	0.98 \pm 0.07
O_2^- scavenging	BLAD	col			cad			vtc			vtccad		
	Gen	0 μM Cu	20 μM Cu	30 μM Cu	0 μM Cu	20 μM Cu	30 μM Cu	0 μM Cu	20 μM Cu	30 μM Cu	0 μM Cu	20 μM Cu	30 μM Cu
	FSD1	1.00 \pm 0.07	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.07	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.08	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.16	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
H_2O_2^- scavenging	CSD1	1.00 \pm 0.06	1.49 \pm 0.03	1.57 \pm 0.14	1.00 \pm 0.08	1.38 \pm 0.05	1.48 \pm 0.02	1.00 \pm 0.08	1.16 \pm 0.06	1.33 \pm 0.08	1.00 \pm 0.02	1.62 \pm 0.04	1.72 \pm 0.10
	CSD2	1.00 \pm 0.04	1.35 \pm 0.06	1.35 \pm 0.07	1.00 \pm 0.08	1.48 \pm 0.04	1.54 \pm 0.03	1.00 \pm 0.06	1.37 \pm 0.08	1.31 \pm 0.03	1.00 \pm 0.02	1.74 \pm 0.03	1.82 \pm 0.01
	MIR398a	1.00 \pm 0.11		0.28 \pm 0.03	1.00 \pm 0.20		0.18 \pm 0.02	1.00 \pm 0.26		0.21 \pm 0.02	1.00 \pm 0.22		0.12 \pm 0.01
GR	MIR398b/c	1.00 \pm 0.11		0.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.16		0.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.31		0.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.13		0.00 \pm 0.00
	SPL7	1.00 \pm 0.05	0.98 \pm 0.07	1.04 \pm 0.06	1.00 \pm 0.07	0.98 \pm 0.04	1.07 \pm 0.06	1.00 \pm 0.03	0.99 \pm 0.05	1.03 \pm 0.01	1.00 \pm 0.07	1.05 \pm 0.07	0.97 \pm 0.05
	CAT1	1.00 \pm 0.02	0.95 \pm 0.12	1.16 \pm 0.22	1.00 \pm 0.04	1.29 \pm 0.21	0.81 \pm 0.11	1.00 \pm 0.04	0.85 \pm 0.06	0.84 \pm 0.09	1.00 \pm 0.05	0.97 \pm 0.06	0.82 \pm 0.08
GR	CAT2	1.00 \pm 0.11	0.97 \pm 0.14	0.89 \pm 0.10	1.00 \pm 0.09	0.73 \pm 0.09	0.84 \pm 0.09	1.00 \pm 0.11	1.04 \pm 0.16	0.93 \pm 0.08	1.00 \pm 0.10	1.05 \pm 0.10	1.03 \pm 0.11
	CAT3	1.00 \pm 0.05	0.96 \pm 0.23	1.49 \pm 0.30	1.00 \pm 0.06	1.50 \pm 0.23	1.06 \pm 0.22	1.00 \pm 0.07	1.06 \pm 0.16	1.07 \pm 0.11	1.00 \pm 0.08	1.15 \pm 0.10	0.95 \pm 0.12
	APX1	1.00 \pm 0.16	0.67 \pm 0.09	0.62 \pm 0.05	1.00 \pm 0.13	1.09 \pm 0.12	0.80 \pm 0.02	1.00 \pm 0.07	1.49 \pm 0.34	1.25 \pm 0.16	1.00 \pm 0.17	1.02 \pm 0.11	0.71 \pm 0.13
GR	APX2	1.00 \pm 0.32	1.13 \pm 0.20	2.04 \pm 0.88	1.00 \pm 0.30	0.37 \pm 0.06	0.45 \pm 0.10	1.00 \pm 0.12	1.31 \pm 0.35	2.45 \pm 0.61	1.00 \pm 0.29	0.88 \pm 0.28	1.39 \pm 0.39
	GR1	1.00 \pm 0.15	1.55 \pm 0.15	1.21 \pm 0.04	1.00 \pm 0.37	0.95 \pm 0.14	0.91 \pm 0.14	1.00 \pm 0.15	0.94 \pm 0.00	1.34 \pm 0.11	1.00 \pm 0.13	1.03 \pm 0.13	1.18 \pm 0.13
	GR2	1.00 \pm 0.04	1.05 \pm 0.05	1.07 \pm 0.06	1.00 \pm 0.04	0.87 \pm 0.02	0.92 \pm 0.03	1.00 \pm 0.06	1.01 \pm 0.07	1.03 \pm 0.07	1.00 \pm 0.06	1.04 \pm 0.04	1.03 \pm 0.08



Figuur 18: Groepering van de patronen van de gemeten genexpressieresultaten **(A)** in de wortels en **(B)** in de blaadjes van twee weken oude planten (*col*, *cad*, *vtc* en *vtccad*) na blootstelling aan 0, 10 of 20 μM Cd gedurende een week. Deze groepering gebeurde volgens hiërarchische clustering met behulp van GenEx (Unweighted pairs linkage). De kleur van het lettertype van de genen representeert de lokalisatie van het eiwit in de cel: plastiden (groen), cytosol (blauw), peroxisomen en mitochondriën (rood).

4 Discussie

Verhoogde concentraties van **zware metalen in het milieu** veroorzaken wereldwijd gezondheidsproblemen voor alle organismen en significante verliezen in de productie en kwaliteit van gewassen. De algemene respons van planten op zware metaalblootstelling is gelijkaardig voor verschillende metalen: een gereduceerde groei, chlorose en verstoringen in fysiologische processen zoals fotosynthese en respiratie³. Desondanks is het van groot belang om onze kennis uit te breiden met betrekking tot de cellulaire en moleculaire processen die beïnvloed worden door metaal toxiciteit en vervolgens leiden tot deze responsen. Oxidatieve stress is van groot belang in de toxiciteit van metalen zoals Cd en Cu en veroorzaakt metaalspecifieke veranderingen in de antioxidatieve componenten. De antioxidatieve capaciteit bepaalt mee de kwaliteit van planten en bijgevolg ook de kwaliteit van onze voeding. Het onderzoeken van fundamentele principes van cellulaire metaalstress kan leiden tot de ontdekking van metaalspecifieke responsen en potentiële biomerkers. Deze informatie is enerzijds bruikbaar om de voedselkwaliteit te bepalen en anderzijds om strategieën te ontwikkelen of aan te passen om niet-eetbare gewassen te kweken op gecontamineerde landbouwgronden, al dan niet met het doel tot fytoremediatie⁸.

Dit project bestudeert de cellulaire en moleculaire basis van **Cd- en Cu-geïnduceerde oxidatieve stress** en meer specifiek de rol van de metaboliëten AsA en GSH hierin. Oxidatieve stress is een verstoring van de cellulaire redoxhomeostase en komt voor in verschillende stress-situaties. Hoewel oxidatieve stress vaak bestudeerd wordt, is de kennis over zijn onderliggende mechanismen binnen metaal toxiciteit eerder beperkt. In deze studie werden vier genotypes van *Arabidopsis thaliana* blootgesteld aan verschillende metaalconcentraties om de responsen te bestuderen in de wortel en in het blad.

4.1 Responsen van wildtype *Arabidopsis thaliana* op cadmiumstress

In een eerste luik van de discussie zullen de responsen en de regulatie van het wildtype *Arabidopsis thaliana* besproken worden bij een korte Cd-blootstelling (24 uur) en een langdurige blootstelling (een week) aan meerdere Cd- en Cu-concentraties. Het tweede luik omvat het gebruik van de mutanten met als doel de rol van AsA en GSH te ontrafelen in cellulaire responsen op metaal toxiciteit.

4.1.1 Korte blootstelling van wildtype *Arabidopsis thaliana* aan cadmium

Een onmiddellijke respons op metaalstress is de **productie van ROS**, de belangrijkste componenten verantwoordelijk voor oxidatieve stress. Plantencellen produceren hoofdzakelijk H₂O₂, een molecule dat gemakkelijk kan diffunderen over membranen en bijgevolg kan signaleren of schade veroorzaken op subcellulair niveau²¹. Bij Cd-stress wordt deze productie waarschijnlijk veroorzaakt via indirecte mechanismen zoals interactie met het oxidatief systeem of inductie van lipidenperoxidatie.

In dit project werd wildtype *Arabidopsis* drie weken gekweekt in een hydrocultuur en gedurende 24 uur blootgesteld aan een realistische Cd-concentratie van 5 µM ter hoogte van de wortels. Verhoogde externe Cd-concentraties leiden tot een gestegen Cd-inhoud in de wortels en in de blaadjes (Figuur 12). In beide organen is er een opmerkelijke inductie van de genexpressie van de bestudeerde **pro-oxidatieve genen** (*Rboh* en *LOX*). Organismen proberen ROS tegen te gaan door hun antioxidatief verdedigingssysteem te activeren. Signalering door ROS wordt gecontroleerd door zijn productie, in samenwerking met zijn scavenging door antioxidanten. Zowel de O₂^{•-}- als de H₂O₂-scavengers werden onderzocht in dit project.

Opvallend is dat de wortel zich hoofdzakelijk verdedigt via SOD's ($O_2^{\circ-}$ -scavengers) en het blad voornamelijk via de AsA-GSH cyclus (H_2O_2 -scavengers).

Membranaire **NADPH oxidasen** (*Rboh*'s) en **LOX1** zijn belangrijke bronnen van oxidatieve stress ($O_2^{\circ-}$) in de wortels waar de rechtstreekse blootstelling aan Cd plaatsvindt. Hoewel LOX'en verantwoordelijk zijn voor lipidenperoxidatie, wordt echter geen significante stijging in lipidenperoxidatie vastgesteld na blootstelling aan 5 μ M Cd (Figuur 13B). Dit bevestigt de resultaten van andere onderzoeken die aantonen dat een significante stijging in de TBA-reactieve metabolieten enkel werd gedetecteerd bij hogere Cd-concentraties terwijl de *LOX1*-genexpressie reeds geïnduceerd was bij 5 μ M Cd¹¹. Een mogelijke verklaring is dat lipidenperoxidatie een secundair effect is van de verstoorde redoxstatus door Cd, die na 24 uur nog niet wordt waargenomen in de wortels (Tabel 4). Naast lipidenperoxidatie zijn LOX'en verantwoordelijk voor de productie van oxylipinen, waaronder jasmonaten. Kacperska (2004)³⁸ suggereert een potentiële rol voor jasmonaat als belangrijke inter- en intracellulaire signaalcomponent bij verdedigingsreacties zoals metaalstress.

Veranderingen in de **SOD-genexpressie**, als antioxidatieve verdediging, gebeuren voornamelijk ter hoogte van de wortels. De genexpressie van *FSD1* wordt geïnduceerd met een factor groter dan 7 (Tabel 5). Deze sterke inductie kan enerzijds de hoge graad van oxidatieve stress reflecteren ten gevolge van $O_2^{\circ-}$ of anderzijds compenseren voor de sterke daling in *CSD*-genexpressie die wordt vastgesteld. Dit suggereert dat $O_2^{\circ-}$ vooral de oorzaak is van oxidatieve stress in de wortel ten gevolge van Cd-stress. Een clusteranalyse van de genexpressieresultaten geeft boeiende informatie betreffende de coregulatie van genen. In de wortel zijn er twee interessante subclusters van de primaire *CSD*-transcripten en de miRNA's (Figuur 14A). Sunkar en zijn collega's (2006)⁴⁵ toonden reeds aan dat *CSD1*- en *CSD2*-genexpressie wordt geregeld door *MIR398*-gestuurde mRNA-degradatie. De cluster doet vermoeden dat *MIR398bc* samen met *hn-CSD1* de genexpressie van *CSD1* reguleert terwijl zowel *MIR398a* als *hn-CSD2* instaan voor de regulatie van *CSD2*.

In het blad kan oxidatieve stress, geproduceerd door **NADPH oxidasen** en **LOX2**, ontstaan via twee wegen: rechtstreeks door Cd via translocatie naar het blad of onrechtstreeks via interorgaansignalering door bijvoorbeeld H_2O_2 of jasmonaat. Bovendien speelt de chloroplast een belangrijke rol in stress-sensing en het verder reguleren van de responsen³⁸. Aangezien *LOX2* in de chloroplast gelegen is, kan een belangrijke rol voor dit enzym bij metaalstress verondersteld worden. In tegenstelling tot de wortels vertonen de blaadjes inducties van een heel aantal genen van de **AsA-GSH cyclus**, inclusief de biosynthesegenen van beide metabolieten, waardoor de ROS-concentraties onder controle worden gehouden. Dit wijst op een belangrijke rol voor H_2O_2 in de productie van oxidatieve stress in het blad. De chloroplast wordt eveneens beschouwd als het centrale punt van het ROS-metabolisme, het is een grote producent van $O_2^{\circ-}$ en H_2O_2 tijdens fotosynthese en bevat bijgevolg veel ROS-scavengingmechanismen. Zo is cytosolair APX1 rechtstreeks betrokken in H_2O_2 -scavenging in het cytosol en speelt het een essentiële rol om de chloroplast te beschermen tijdens fotosynthese tegen H_2O_2 dat kan diffunderen vanuit het cytosol, de mitochondriën en peroxisomen⁶⁴. Deze regulerende eigenschappen van APX1 in chloroplasten leiden tot het feit dat voornamelijk de antioxidatieve componenten van dit organel onder invloed van APX1 werken. Dit wordt bevestigd door de geïdentificeerde cluster in het blad waarbij de genexpressie van *APX1* samen met die van *CAT2*, *FSD1* en *CSD2* gereguleerd wordt (Figuur 14B). Bovendien spelen *CAT2* en *APX1* een belangrijke rol in senescentie en worden hun genen zeer sterk gecoreguleerd na een blootstelling aan Cd gedurende 24 uur^{67, 68}.

Ondanks de Cd-geïnduceerde stijging in de genexpressie van *GSH1*, *GSH2* en *PCS1* in het blad, zijn de **metabolietconcentraties** niet significant gestegen noch in het blad, noch in de wortel (Tabel 4). Mogelijks wordt een deel van het geproduceerd GSH gepolymeriseerd ter vorming van PC's zodat Cd efficiënter gescavenged kan worden en naar de vacuole kan worden getransloceerd. De genexpressie van *PCS1*, verantwoordelijk voor PC-synthese, die met een grotere factor geïnduceerd wordt dan *GSH1* en *GSH2* ondersteunt deze hypothese. Daarnaast is enkel de genexpressie van *VTC1* geïnduceerd na Cd-behandeling. Zonder de inductie van de genexpressie van *GME* leidt dit niet tot een verhoging van de AsA-concentratie, mogelijks omdat dit gen verantwoordelijk is voor de snelheidsbepalende stap in de AsA-biosynthese⁵⁴. Hieruit kan geconcludeerd worden dat het wildtype voldoende metabolieten heeft om de AsA-GSH cyclus aan te schakelen maar dat er extra GSH nodig is om naast H₂O₂ ook Cd²⁺ rechtstreeks te scavengen via PC's.

Oxidatieve stress kan antioxidatieve verdedigingsmechanismen rechtstreeks activeren via ROS maar ook onrechtstreeks via redoxgevoelige TF's of de activatie van kinasen, die op hun beurt TF's activeren^{18, 19}. De **MAPK-pathways** worden gesuggereerd als centrale signaleringscascades in meerdere stress-situaties waaronder metaalstress⁴⁰. De sterke transcriptionele inductie van *OXI1* in het blad, tot 207 keer ten opzichte van controlecondities, demonstreert zijn centrale en primaire rol in de oxidatieve stress-signalering. Het is mogelijk dat onder Cd-stress een signaal zoals H₂O₂ de genexpressie van *OXI1* induceert, wat leidt tot de initiatie van de MAPK-cascade. Voorgaande studies tonen een sterke inductie aan van zowel de genexpressie als de activiteit van *OXI1* door H₂O₂⁶⁵. Dit impliceert een essentiële link tussen oxidatieve H₂O₂-signalen en downstream responsen. De MAPK kinase MKK2 wordt eveneens geactiveerd door Cd maar de upstream componenten zijn nog niet geïdentificeerd⁴⁰. De **redoxgevoelige TF's** *Zat12* en *WRKY25* kunnen geactiveerd worden door verschillende componenten van de MAPK-cascade of rechtstreeks door H₂O₂¹⁸. Zowel *ZAT12* als *WRKY25* spelen mogelijk een rol in de activatie van antioxidatieve mechanismen in het blad tijdens Cd-toxiciteit aangezien beide transcriptieniveaus sterk geïnduceerd worden met een factor groter dan 96 en 10 respectievelijk. Studies beschrijven de vereiste van *Zat12* voor *APX1*-genexpressie tijdens oxidatieve stress⁶⁴. Deze hypothese wordt ondersteund door de resultaten aangezien de genexpressie van *APX1*, net zoals van *ZAT12*, wordt geïnduceerd in het blad en geen van beide in de wortel ten gevolge van Cd-stress. Een tweede groep van cascaden die belangrijk is in de regulatie tijdens Cd-toxiciteit zijn de **Ca²⁺-gerelateerde transductiepathways**⁶⁶. Verschillende Ca²⁺-bindende componenten zijn betrokken in stress-situaties, meer specifiek de CDPK- en de SOS-familie. Deze hypothese wordt bevestigd aangezien in de wortel *SOS1* en *SOS3* worden geïnduceerd en in het blad alle onderzochte genen van beide families.

Algemeen kan worden vastgesteld dat een korte blootstelling aan een lage realistische Cd-concentratie het antioxidatief systeem in verschillende cellulaire compartimenten activeert, zowel in de wortel als in het blad. Secundaire messengers zoals H₂O₂ en oxylipinen induceren de transcriptie van signalisatie- en verdedigingsmechanismen. Een sterke simultane inductie van ROS-producerende, antioxidatieve en regulatoire mechanismen wijst op een transcriptionele coregulatie onder Cd-stress. Het is duidelijk dat signaaltransductiepathways in planten niet alleen werken maar dat er een intensieve crosstalk bestaat. Naast H₂O₂ en jasmonaat zijn ook TF's, *OXI1* en CDPK's belangrijk in de Cd-geïnduceerde cellulaire responsen. Sterke veranderingen op genexpressieniveau van verschillende genen zijn aangetoond, maar niet alle genen vertonen een gelijkaardige respons in de wortel en in het blad. Dit suggereert dat het onderliggend mechanisme van oxidatieve stress verschillend is in beide organen. De resultaten steunen de hypothese van Smeets (2008)¹¹ dat de vorming van O₂^{•-} de hoofdoorzaak is van oxidatieve stress in de wortels terwijl H₂O₂ een belangrijke speler is in de blaadjes.

4.1.2 Lange blootstelling van wildtype *Arabidopsis thaliana* aan cadmium en koper

Om de responsen in *Arabidopsis thaliana* bij verschillende metalen en meerdere concentraties te onderzoeken werd een kweek opgezet van het wildtype op agarplaten. De planten werden blootgesteld aan zowel Cd als Cu. Op morfologisch vlak is er een **dosisafhankelijke groeireductie** na Cd-stress in zowel de wortel als het blad (Figuren 10, 11 en 15). Hetzelfde wordt vastgesteld voor planten blootgesteld aan Cu (Figuren 16 en 17). Koper is echter een essentieel metaal en is in lage hoeveelheden belangrijk voor het metabolisme van de plant.

Na een week groei en een week behandeling op verticale agarplaten werd het **transcriptieniveau** bepaald van een aantal **antioxidatieve genen**. De selectie van deze genen gebeurde op basis van resultaten bekomen uit de hydrocultuur. Twee metaalconcentraties werden geselecteerd aan de hand van de wortelgroei (10-20 μM Cd en 20-30 μM Cu). Opvallend is dat in de Cd-behandelde planten in beide organen geen enkel gen meer significant geïnduceerd wordt na een week (Tabel 7). Analoog aan de Cd-kweek is er voor beide Cu-concentraties geen significante inductie meer van genen in de wortel. Wanneer we de resultaten van de wortelgroei (Figuren 15 en 16) vergelijken met de genexpressie in de wortel, is de antioxidatieve capaciteit van de plant sterk gedaald bij een toediening van de verschillende metaalconcentraties. De morfologische effecten in de wortelgroei zijn echter pas zichtbaar bij de hoogste concentraties (20 μM Cd en 30 μM Cu). Hoewel er geen verschil is in kwantiteit (= biomassa), is er wel een significant verschil in de kwaliteit van *col* na blootstelling aan 10 μM Cd of 20 μM Cu gedurende een week. De kwaliteit is blijkbaar een gevoeliger parameter dan de biomassa-productie en wordt nefast beïnvloed door metaalstress. De coregulatie van de genen vertoont een erg afwijkend beeld na een lange blootstelling (Figuur 18) ten opzichte van 24 uur blootstelling. In de wortels gaan genen clusteren die in hetzelfde compartiment gelegen zijn zoals de plastidale genen (*CSD2*, *GR2* en *FSD1*) met *SPL7* en de cytosolaire genen (*APX1*, *GR1*, *CSD1*) met *CAT2* en *CAT3*. Waar er in de wortel een duidelijke coregulatie van genen uit hetzelfde compartiment wordt waargenomen, gaat dit volledig verloren in het blad. Wat wel overeenkomt met blootstelling na 24 uur is enerzijds de clustering van beide *MIR398*'s en anderzijds van *APX1* met catalasen voor het senescentieproces in het blad. In *Arabidopsis thaliana* gaat dit verouderingsproces gepaard met een sterke verhoging in H_2O_2 door de uitschakeling van H_2O_2 -scavengers zoals catalasen en AsA peroxidasen. De activiteit van *CAT2* wordt als eerste geremd zodat een verhoogde H_2O_2 -concentratie zorgt voor de inactivatie van *APX1*. Hierdoor neemt de H_2O_2 -concentratie nog sterker toe waardoor de genexpressie en activiteit van *CAT3* wordt geïnduceerd. Dit catalase reduceert H_2O_2 met een herstel van de *APX1*-activiteit en een daling in de H_2O_2 -concentratie tot gevolg^{67, 68}. Na een blootstelling van 24 uur vertoont het blad een cluster van *CAT2* en *APX1* terwijl na een week blootstelling *CAT3* en *APX1* clusteren. Dit is te verklaren doordat het senescentieproces reeds verder gevorderd is na een week metaalstress en *CAT3* pas in een latere fase wordt geactiveerd.

Hoewel in het blad van Cd-behandelde planten enkel een verlaging wordt vastgesteld voor de genexpressie van antioxidatieve genen, wordt de genexpressie van *CSD1* en *CSD2* daarentegen geïnduceerd in Cu-behandelde planten.

4.1.3 Posttranscriptionele regulatie in wildtype *Arabidopsis thaliana* na cadmium- en koperstress

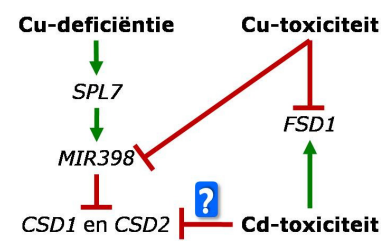
De regulatie van metaalgeïnduceerde genexpressie kan naast ROS- en kinasecascaden ook gebeuren op het **posttranscriptioneel niveau** door miRNA's. Figuur 19 geeft een overzicht weer van de recente ontwikkelingen betreffende metaal toxiciteit in het SOD-genexpressieprofiel. Sunkar en zijn collega's (2006)⁴⁵ toonden reeds een rol aan voor *MIR398* in de regulatie van *CSD*'s tijdens Cu-stress in het wildtype van *Arabidopsis thaliana*. Het moleculair mechanisme hierachter is echter nog niet uitgeklaard. Nagae *et al.* (2008)⁴⁷ stelden vast dat GTACT-motieven in de promotor van *FSD1* zorgen voor een Cu-responsieve transcriptionele repressie. Aangezien deze

motieven ook terug te vinden zijn in *MIR398*-promotorsequenties, is het mogelijk dat Cu via hetzelfde mechanisme de *MIR398*-genexpressie reduceert. Dit is echter nog niet onderzocht. In het geval van Cu deficiëntie ontdekten Yamasaki en zijn collega's (2009)⁴⁸ de essentiële rol van de transcriptiefactor *SPL7* voor een inductie van de genexpressie van *MIR398* wat leidt tot een reductie in *CSD*-genexpressie. Deze TF bindt rechtstreeks aan de promotor van genen die betrokken zijn in de Cu-homeostase. De effecten van *SPL7* bij Cu- en Cd-toxiciteit zijn tot op heden nog niet beschreven. Smeets *et al.* (2008)⁵¹ toonden aan dat Cd een tegenovergesteld effect heeft dan Cu op SOD-genexpressie. Het mechanisme hierachter is nog niet gekend. Het huidige project levert indicaties van deze hypothesen en additionele bewijzen van het onderliggend mechanisme van de tegenovergestelde regulatie onder Cd-stress. Een overzicht van de resultaten is weergegeven in Figuur 20.

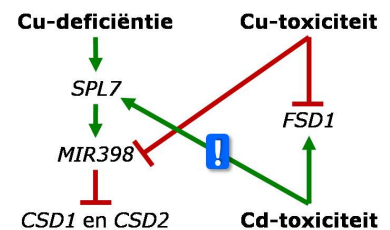
In het **SOD-genexpressieprofiel** worden opmerkelijke metaal- en orgaanspecifieke patronen vastgesteld. Terwijl *CSD*'s belangrijk zijn in de antioxidatieve verdediging na een week Cu-toxiciteit in het blad, wordt een tegengesteld effect waargenomen na 24 uur Cd-stress in de wortel. Deze metaal- en orgaanspecifieke patronen bevestigen resultaten van voorgaand onderzoek¹¹. Onze resultaten van **Cu-behandelde planten** bevestigen de volledige pathway die beschreven

is in de literatuur. Voorgaande studies tonen aan dat *Arabidopsis thaliana* wisselt van SOD-type om zich aan te passen aan Cu-deficiëntie⁴⁸. Bij een tekort aan Cu verlaagt *Arabidopsis* de transcriptie van *CSD1* en *CSD2* en wordt dit vervangen door een inductie van *FSD1*-transcripten. Op deze manier wordt de beperkte hoeveelheid Cu gespaard en wordt hij voornamelijk getransfereerd naar plastocyanine, een essentieel enzym in de fotosynthese. Wanneer dit vertaalt wordt naar de huidige resultaten, is het mogelijk dat de plant bij een overmaat aan Cu zoveel mogelijk van dit metaal wil gebruiken in zijn antioxidatieve verdediging in de vorm van *CSD*'s. Het mechanisme achter de inductie van de *CSD*-genexpressie in het blad is de sterke transcriptionele onderdrukking van beide *MIR398*-isovormen na Cu-toxiciteit. Het is geweten dat Cu erg toxisch is voor de wortels en zijn translocatie naar het blad erg beperkt is. Een blootstelling van 24 uur levert geen verhoging van het Cu-gehalte in het blad¹¹. Na een week kan men verwachten dat er toch een beperkte verhoging van de hoeveelheid Cu in het blad aanwezig is⁷⁰, wat voldoende kan zijn om de directe transcriptionele onderdrukking van *MIR398* via de GTACT-motieven in de promotor te bewerkstelligen.

In de **Cd-behandelde wortels** daarentegen wordt de genexpressie van *FSD1* sterk geïnduceerd en van *CSD1* en *CSD2* geremd na 24 uur blootstelling (Tabel 5). De inhibitie van de *CSD*-genexpressie is een gevolg van de inductie van de genexpressie van *MIR398a* en *MIR398bc* in de wortel onder Cd-stress. Bovendien



Figuur 19: Overzicht van de recente ontwikkelingen omtrent Cu en Cd in het genexpressieprofiel van SOD's.



Figuur 20: Overzicht van de resultaten van dit project omtrent het SOD-genexpressieprofiel.

ondersteunen de resultaten de hypothese dat *SPL7* zorgt voor een inductie van *MIR398*-genexpressie in de wortels; Cd-stress leidt tot een inductie van de genexpressie van *SPL7* met in de wortels een inductie van de *MIR398*-transcripten tot gevolg. In de blaadjes verandert het SOD-genexpressieprofiel niet zo eenduidig als in de wortel. Uit de andere metingen blijkt dat hier eerder de AsA-GSH cyclus wordt aangeschakeld ten gevolge van Cd-stress. Samengevat functioneert miRNA398 als een regulator van de antioxidatieve verdediging bij zowel Cu-stress als Cd-toxiciteit. Bovendien staat *MIR398* mogelijk onder controle van *SPL7* maar uitgebreider onderzoek moet dit verder verduidelijken.

4.2 De rol van ascorbaat en glutathion in de responsen van *Arabidopsis thaliana* op metaalstress

Ascorbaat- en glutathiondeficiënte mutanten werden samen met het wildtype gekweekt op verticale en ronde agarplaten om respectievelijk de wortel- en bladgroei te bestuderen. Volgens Cobbett *et al.* (1998)⁵³ vertoont de GSH-deficiënte mutant, *cad*, geen fenotypische verschillen met *col* in de afwezigheid van metalen. Dit toont aan dat ondanks de GSH-reductie van ongeveer 70 %, voldoende GSH gesynthetiseerd wordt voor een normale groei en een normaal metabolisme van deze mutant. De resultaten van de huidige studie ondersteunen deze hypothese (Tabel 3). Veljovic-Jovanovic *et al.* (2001)⁷¹ beschreven daarentegen dat de AsA-deficiënte mutant, *vtc*, een tragere groei van de wortels en van de blaadjes heeft in vergelijking met het wildtype. Ook dit wordt in onze studie bevestigd voor de wortelgroei van *vtc* en *vtccad* (Tabel 3 en Figuur 11). Vitamine C is essentieel voor de plantengroei via zijn regulerende rol in de celdeling en -groei²⁹. Een verstoorde regulatie hiervan ten gevolge van een tekort aan AsA ligt dus aan de basis van deze groeireductie. Op welke manier de redoxstatus de ontwikkelings- en groeiprocessen precies beïnvloedt, dient nog verder onderzocht te worden.

Cadmium is een niet-redoxactief metaal maar induceert toch oxidatieve stress, zelfs bij lage concentraties¹⁴. Deze stress leidt tot macroscopisch zichtbare schade zoals de gereduceerde wortel- en bladgroei na langdurige blootstelling aan Cd op agarplaten. Opvallend is dat in de wortelgroei het wildtype en de GSH-deficiënte mutant enerzijds en de AsA-deficiënte mutanten anderzijds hetzelfde patroon volgen (Figuren 10 en 15). De bladgroei daarentegen verloopt analoog voor het wildtype en de AsA-deficiënte mutant enerzijds en *cad* en *vtccad* anderzijds (Figuur 11). Zowel *col* als *cad* vertonen een dosisafhankelijke wortelgroeireductie terwijl de AsA-deficiënte mutanten, en hoofdzakelijk *vtc*, minder sterke dalingen in hun groei hebben. De *vtc*-mutant is zelfs bij hogere concentraties minder gevoelig voor Cd dan de overige drie genotypes. Wat opvalt is dat GSH de bepalende factor is voor de groeireductie na Cd-stress in beide organen bij hogere concentraties. De dubbelmutant volgt *vtc* bij lage concentraties maar bij hogere metaal toxiciteit is het GSH-tekort in *vtccad* te groot en volgt deze de GSH-deficiënte mutant. In het blad daarentegen is er een dosisafhankelijke groei-inhibitie in alle genotypes maar *col* en *vtc* zijn significant minder gevoelig voor Cd dan *cad* en *vtccad* bij alle concentraties. Dit is te verklaren door de GSH-deficiëntie die we detecteren in deze twee mutanten en dat GSH ook belangrijk is in de rechtstreekse chelatie van Cd, zoals reeds eerder is aangetoond voor het wildtype in Cd-behandelde blaadjes. Een tekort aan deze metaboliet leidt dus rechtstreeks tot meer vrij Cd²⁺ en bijgevolg meer oxidatieve stress en schade.

Koper is een essentieel redoxactief metaal, net zoals bij blootstelling aan Cd kennen *col* en *cad* enerzijds en *vtc* en *vtccad* anderzijds een gelijkaardig verloop in de wortelgroei (Figuur 16). Uit de bladgroei blijkt dat *cad* gevoeliger is voor Cu en reeds bij de laagste concentratie een significante groeireductie ondervindt terwijl de overige genotypes pas later een verminderde groei vertonen (Figuur 17). Samengevat is *vtc* de

mutant die het minst gevoelig is voor beide metalen, *vtccad* geniet mee van *vtc* zijn groeivoordeel door hun gemeenschappelijk AsA-tekort maar bij hoge Cd-concentraties verliest *vtccad* dit voordeel wegens zijn bijkomend gebrek aan GSH.

Om het belang van AsA en GSH bij een **blootstelling aan Cd op korte termijn** te bestuderen werden de drie mutanten samen met het wildtype gekweekt in een hydrocultuur en na drie weken blootgesteld aan 5 M Cd gedurende 24 uur. Zowel op transcriptieniveau als in de metabolietconcentraties werden een aantal opvallende **genotype-effecten** gevonden waarin de mutanten verschillen van het wildtype onder controlecondities (Tabellen 4, 5 en 6). De **cad-mutant** vertoont een hogere genexpressie van enkele antioxidatieve genen onder controlecondities, wat wijst op het feit dat de *cad*-mutant stress ondervindt en reeds onder controleomstandigheden zich probeert aan te passen. Het is echter opvallend dat de GSSG/GSH-ratio sterk verhoogd is in de wortel van deze mutant onder controlecondities. Deze ratio is onder normale omstandigheden klein dankzij GR die GSH in zijn gereduceerde toestand houdt⁵⁰. Deze geoxideerde toestand van GSH toont aan dat de plant in een gestresseerde toestand verkeert waardoor de AsA-GSH cyclus geremd kan worden omdat er weinig GSH ter beschikking wordt gesteld door de cel om DHA terug te reduceren.

In tegenstelling tot *cad* vertonen beide **AsA-deficiënte mutanten**, *vtc* en *vtccad*, een lagere expressie van hun gemuteerd gen, *VTC1*, zowel in de wortel als in het blad. Volgens de literatuur hebben *vtc*-mutanten een normale hoeveelheid mRNA en is enkel de enzymactiviteit verstoord waardoor de AsA-biosynthese daalt⁷¹. De *vtc*-mutant heeft in zijn blaadjes een significante stijging van de totale GSH-concentratie terwijl er geen hogere expressie is van de GSH-biosynthesegenen. Net als *cad* heeft *vtc* een verhoogde GSSG/GSH-ratio maar in minder grote mate (1.36 ten opzichte van 29.95). Bovendien is de genexpressie van het cytosolair *APX2* verhoogd in de *vtc*-mutant. Ascorbaatdeficiëntie zou verantwoordelijk zijn voor een verschuiving van de APX-activiteit in chloroplasten naar cytosolaire APX-activiteit⁷¹. De *vtccad*-mutant heeft, net als *cad*, een verhoogde genexpressie van een aantal antioxidatieve genen, voornamelijk H₂O₂-scavengers, evenals MAPK's in het blad. Dit impliceert dat de cellulaire redoxstatus nauw samenwerkt met andere signaaltransductiewegen.

Blootstelling aan Cd gedurende 24 uur na een groeiperiode van drie weken in een hydrocultuur leidt tot significante Cd-accumulaties in de wortel en in het blad van *col*, *cad*, *vtc* en *vtccad* (Figuur 12). Er blijkt een duidelijk verminderde translocatie naar het blad te zijn in de mutanten, wat overeenkomt met eerdere bevindingen⁴⁹. Planten reageren op een verhoogde Cd-blootstelling door mechanismen te activeren die betrokken zijn in de reductie van vrij cellulair Cd²⁺ en in de verdediging tegen oxidatieve stress. Dit project focust zich op twee antioxidanten met een sleutelrol in de plant zijn verdediging: AsA en GSH. Beide metabolieten staan centraal in H₂O₂-scavenging via de AsA-GSH cyclus en bovendien heeft Cd een hoge affiniteit voor GSH en induceert bijgevolg zijn biosynthese^{7, 8}. De deficiëntie van een van beide metabolieten in de mutanten is de basis om de **rol van AsA en GSH in de oxidatieve verdediging** en Cd-detoxificatie verder te ontrafelen.

Enerzijds vertonen *col* en *vtc* en anderzijds *cad* en *vtccad* gelijkaardige responsen op moleculair niveau in de **wortel** (Tabel 5). **Glutathiondeficiëntie** impliceert dat de cellen een beperkte capaciteit hebben om Cd te complexeren, waardoor er onmiddellijk oxidatieve stress ontstaat. Het is duidelijk dat beide GSH-deficiënte mutanten dit trachten te compenseren door de expressie van nagenoeg alle onderzochte genen sterk te induceren bij Cd-stress, in tegenstelling tot *col* en *vtc*. Via de inductie van de genexpressie

van de GSH-biosynthesegenen proberen *cad* en *vtccad* hun GSH-tekort tevergeefs aan te vullen, hetgeen bevestigd wordt door de verlaagde GSH-concentratie in beide mutanten (Tabel 4). De *cad*-mutant heeft een mutatie in γ -EC synthetase waardoor de activiteit van dit essentieel enzym in de GSH-biosynthese is verlaagd. Daarnaast induceren beide mutanten de biosynthese van AsA. Enkel de stimulatie van de AsA-biosynthese in *cad* heeft een effect op de hoeveelheid beschikbare metabolieten zoals blijkt uit de toegenomen AsA-concentratie na behandeling. Dit levert *cad* een grotere antioxidatieve capaciteit op. De dubbelmutant heeft echter ook een mutatie in een cruciaal enzym in de AsA-biosynthese, GDP-mannose pyrofosforylase waardoor deze biosynthese niet efficiënt is, zowel de AsA- als GSH-concentratie blijft lager in *vtccad* ten opzichte van *col*. Een mogelijke verklaring waarom *col* en *vtc* de biosynthese van beide metabolieten niet activeren is dat in de wortel eerder $O_2^{\circ-}$ -scavengers geactiveerd worden bij deze lage Cd-concentratie en dat beide metabolieten voldoende kunnen worden aangemaakt om de redoxbalans te onderhouden. Zo vertoont *vtc* een verhoogde GSH-concentratie zonder een inductie in de genexpressie van GSH-biosynthesegenen. Een tekort aan GSH is dus duidelijk nefast voor planten, ze worden gedwongen om alternatieve antioxidatieve mechanismen aan te schakelen zoals de AsA-GSH cyclus die normaal enkel in het blad actief is alsook de CSD's die normaal onder Cd-toxiciteit geïnhibeerd worden. Een tekort aan AsA daarentegen levert geen significante verschillen op met het wildtype en vertoont bij deze lage Cd-concentratie geen onmiddellijke nadelen.

In het **blad** daarentegen volgen *col* en *cad* enerzijds en *vtc* en *vtccad* anderzijds een analoog expressiepatroon (Tabel 6). In tegenstelling tot de **AsA-deficiënte mutanten** induceren *col* en *cad* bijna alle onderzochte genen op transcriptieniveau met uitzondering van de $O_2^{\circ-}$ -scavengers die meer in de wortel actief zijn. Een eerste verschil met *vtc* en *vtccad* is de inductie van de genexpressie van GSH-biosynthesegenen door *col* en *cad*. Hoewel de GSH-biosynthese niet zo efficiënt verloopt, probeert *cad* tevergeefs zijn GSH-tekort aan te vullen zoals in de wortel. Het wildtype induceert tevens de genexpressie van de AsA-biosynthesegenen en bezorgt *col* een grotere antioxidatieve capaciteit. Deze antioxidatieve capaciteit stijgt enkel op transcriptieel niveau aangezien de concentratie van beide metabolieten niet is gestegen na Cd-behandeling. Mogelijks is 24 uur te kort in *col* om reeds een significante stijging te zien in de metabolieten. Op langere termijn kan de stijging in de transcripten ook leiden tot een verhoging in de metabolieten zoals eerder werd waargenomen door Semane *et al.* (2007)⁵⁰ na een week blootstelling. Aangezien AsA de primaire metaboliet is in het functioneren van de AsA-GSH cyclus, zullen *vtc* en *vtccad* andere pathways activeren om zich tegen de metaalgeïnduceerde stress te beschermen. Deze pathways zijn echter nog niet ontdekt.

Samengevat wijzen de resultaten van de genexpressie na Cd-behandeling in de richting van GSH als bepalende factor voor stressresponsen in de wortel en lijkt het alsof AsA bepalend is voor stressresponsen in de blaadjes. Mogelijks is er een interactie tussen de metabolieten en **lipoxygenasen**, die een belangrijke rol blijken te spelen in de inductie van oxidatieve stressresponsen na Cd-blootstelling. In de wortels van *cad* en *vtccad* wordt de genexpressie van *LOX1* significant meer geïnduceerd dan in *col* en *vtc*. In het blad daarentegen wordt de genexpressie van *LOX2* sterker geïnduceerd ($p < 0.01$) in *col* en *cad* ten opzichte van de AsA-deficiënte mutanten.

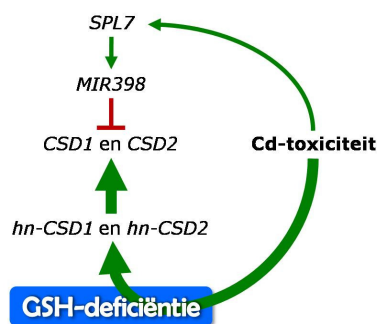
Niet enkel de effecten van korte duur werden bestudeerd maar ook de effecten van zowel **Cd** als **Cu na een week blootstelling** aan twee concentraties. Opvallend is dat Cd in het blad en Cu in de wortel gereduceerde genexpressiepatronen veroorzaken in alle genotypes en bij beide concentraties. In de wortels van Cd-behandelde planten, volgt echter enkel *col* dit patroon en schakelen de drie mutanten wel een aantal verdedigingsmechanismen aan waaronder zowel $O_2^{\circ-}$ - als H_2O_2 -scavengers. In Cu-behandelde blaadjes daarentegen wordt enkel de genexpressie van *CSD1* en *CSD2* geïnduceerd.

Niet alleen in het wildtype maar ook in de drie mutanten worden opmerkelijke patronen teruggevonden in het **SOD-genexpressieprofiel**. Deze patronen zijn dus niet alleen metaal- en orgaanspecifiek maar ook genotype-afhankelijk. In de blaadjes van alle genotypes die een week blootgesteld werden aan **Cu** komt hetzelfde patroon voor als in het wildtype (Figuur 20): een sterke inhibitie van de genexpressie van *FSD1* en een inductie van de *CSD1*- en *CSD2*-genexpressie ten gevolge van een sterk gereduceerde *MIR398a*- en *MIR398bc*-genexpressie. In de wortels van alle genotypes die blootgesteld werden aan **Cd** gedurende 24 uur worden twee mogelijke responsen waargenomen. Aan de ene kant volgt *vtc* het wildtype (Figuur 20): de inductie van de *FSD1*-genexpressie wordt vergezeld van een *MIR398a*- en *MIR398bc*-gereguleerde *CSD1*- en *CSD2*-downregulatie onder leiding van *SPL7*. Aan de andere kant vertonen beide GSH-deficiënte mutanten, *cad* en *vtccad*, een onverwachte inductie van alle genexpressies gerelateerd aan $O_2^{\circ-}$ -scavenging (*FSD1*, *CSD1*, *CSD2*, *MIR398a*, *MIR398bc*, *hn-MIR398a* en *SPL7*).

De onverwachte inductie van de genexpressie van alle SOD's en gerelateerde genen in *cad* en *vtccad* induceren de vraag waarom de specifieke miRNA's de *CSD*-transcripten in deze mutanten niet downreguleren onder Cd-stress. Een verklaring werd gevonden in de verhoogde transcriptieniveaus van de **primaire transcripten** van *CSD1* en *CSD2* (*hn-CSD1* en *hn-CSD2*) in *cad* en *vtccad* (Tabel 5). Hierdoor is de transcriptiesnelheid van beide *CSD*'s enorm toegenomen in deze mutanten zodat dit het *CSD*-downregulerend effect van de Cd-geïnduceerde *MIR398*'s beperkt. Een gebrek aan GSH heeft dus een positieve invloed op de transcriptiesnelheid van *CSD1* en *CSD2* waardoor onmiddellijk alternatieve antioxidatieve mechanismen worden aangeschakeld door deze planten na Cd-blootstelling. Een overzicht van deze ontdekking wordt voorgesteld in Figuur 21. Sunkar *et al.* (2004)⁴³ suggereert een potentiële rol voor ROS als onderliggend mechanisme voor de regulatie van *MIR398*-transcripten. Dit geeft aanwijzingen voor crosstalk tussen ROS enerzijds en de cellulaire redoxbalans anderzijds, wat belangrijk is voor de regulatie van moleculaire responsen.

4.3 Toekomstperspectieven

In de nabije toekomst is het belangrijk dat de experimenten aangevuld worden op verschillende gebieden. Het is aangewezen om de experimentele opzet gelijk te stemmen voor beide behandelingen. Om het SOD-genexpressieprofiel nader te onderzoeken dient de hydrocultuur herhaald te worden met blootstelling aan een realistische Cu-concentratie van 2 μ M. Een uitbreiding naar meerdere concentraties, een combinatie van beide metalen alsook een kinetisch verloop van de responsen kan interessant zijn om een blootstelling van 24 uur verder uit te diepen. Niet enkel AsA en GSH zijn interessante componenten om te meten maar zeker ook cysteïnes, als snelheidsbepalende factor voor de GSH-biosynthese, en PC's waarvan GSH de bouwsteen is.



Figuur 21: Schematische weergave van de nieuwe ontdekkingen in dit project betreffende het SOD-genexpressieprofiel bij GSH-deficiëntie.

De culturen op agarplaten zijn boeiend om de metaalgevoeligheid te combineren met de metaalresponsen. Naast genexpressie is het echter aangewezen om ook een aantal biochemische analyses uit te voeren op deze stalen zoals een nutriëntenbepaling voor de mate van metaalopname alsook metaboliëtbepalingen, H₂O₂- en TBA-metingen.

Aangezien de resultaten in verband met de genexpressie van *SPL7* onze werkhypothese niet volledig ondersteunen, is het interessant om de betrokkenheid van deze transcriptiefactor in Cd-toxiciteit verder te bestuderen. Hoewel uit de huidige studie een duidelijk werkmodel voor Cd- en Cu-toxiciteit naar voren komt, kan dit versterkt worden indien het bevestigd wordt op eiwitniveau. Aangezien ook miRNA's meer en meer belangrijk blijken te zijn in het complex netwerk van cellulaire signalering, is het van groot belang om de additionele upstream en downstream targets van specifieke oxidatieve stressgerelateerde miRNA's zoals miRNA398 verder te ontrafelen.

In tegenstelling tot een verminderde hoeveelheid antioxidanten in de mutanten is het eveneens interessant om in de toekomst te werken met mutanten die een overmaat hebben aan deze metaboliëten om metaboliëten exogeen toe te dienen.

5 Synthese

In deze studie werden cellulaire responsen van *Arabidopsis thaliana* op metaalstress onderzocht. **Koper** kan als essentieel, redoxactief zwaar metaal rechtstreeks ROS induceren en oxidatieve stress veroorzaken. **Cadmium** daarentegen is een niet-essentieel en niet-redoxactief zwaar metaal dat oxidatieve stress via indirecte manieren kan induceren. Hoewel de plant mechanismen bevat om de metaalhomeostase te bewaren, kunnen niet alle metaalionen gecomplexed worden. Hierdoor kunnen vrije Cu²⁺- en Cd²⁺-ionen cellulaire responsen veroorzaken zoals oxidatieve schade en signalering. Zowel morfologische als moleculaire responsen met betrekking tot de cellulaire redoxstatus en signalering werden bestudeerd in wortels en blaadjes van *Arabidopsis thaliana* na blootstelling aan Cd of Cu.

Beide metalen zorgen voor een dosisafhankelijke **groei-inhibitie** van *Arabidopsis thaliana* maar de onderliggende moleculaire en cellulaire mechanismen vertonen duidelijke verschillen. Een externe toediening van Cd gedurende 24 uur ter hoogte van de wortels leidt tot een significante Cd-opname en translocatie naar het blad. Veranderingen in de cellulaire redoxstatus die vervolgens optreden, zijn belangrijk in signalering en worden onder andere gecontroleerd door **ROS-productie en -scavenging**. De wortel en het blad van *Arabidopsis* vertonen inducties in de genexpressie van genen die verantwoordelijk zijn voor beide processen. In de wortel ligt de nadruk op NADPH oxidasen en cytosolair LOX1 voor de ROS-productie en zorgen O₂^{•-}-scavengers voor ROS-scavenging. Het blad daarentegen wijst op een belangrijke rol voor LOX2 naast NADPH oxidasen in de productie van ROS terwijl eerder H₂O₂-scavengers, inclusief de genen van de AsA-GSH cyclus, geactiveerd worden voor scavenging. Verder wordt de regulerende rol van cytosolair APX1 in de antioxidatieve verdediging in de blaadjes bevestigd, alsook de betrokkenheid ervan in de Cd-geïnduceerde senescentie samen met catalasen. Naast de cellulaire redoxbalans zijn ook **redoxgevoelige TF's en kinasen** belangrijk in de regulatie van cellulaire verdedigingsresponsen na blootstelling aan metalen. De resultaten wijzen op een belangrijke rol voor MAPK's en CDPK's alsook Zat12 en WRKY25 in het blad onder Cd-stress. De resultaten na blootstelling aan metalen (Cd of Cu) gedurende een week op agarplaten levert

een heel ander beeld op transcriptieniveau. Verhoogde metaalgehalten inhiberen de genexpressie van de antioxidatieve verdediging behalve in het blad bij Cu-blootstelling.

Naast algemene stresseffecten werden ook nieuwe **metaalspecifieke effecten** ontdekt. Enerzijds wordt de downregulatie van *MIR398*-genexpressie onder Cu-stress bevestigd met een inductie van *CSD1*- en *CSD2*-transcriptie tot gevolg en anderzijds ook de Cu-geïnduceerde reductie van *FSD1*-genexpressie. Bovendien worden de Cd-geïnduceerde transcriptionele veranderingen bevestigd in de wortel: een stijging in *FSD1* en een daling in *CSD1* en *CSD2*. Volgende hypothese werd verondersteld om het onderliggend mechanisme voor de repressie van de *CSD*-transcripten bij Cd-toxiciteit te verklaren. Cadmium leidt tot een inductie in de transcriptie van *MIR398* met bijgevolg een gereduceerde *CSD1*- en *CSD2*-genexpressie. Bovendien ondersteunen de resultaten een nieuwe hypothese dat *SPL7*, net zoals onder Cu-deficiëntie, ook onder Cd-toxiciteit verantwoordelijk is voor de inductie van *MIR398*-genexpressie. Samengevat veroorzaken Cd en Cu volledig tegenovergestelde effecten met betrekking tot de posttranscriptionele regulatie van *CSD*-transcripten.

Het uiteindelijke doel van dit project is om de rol van de **antioxidatieve metabolieten, AsA en GSH**, te onderzoeken in de antioxidatieve verdediging van *Arabidopsis thaliana* na metaalstress. Hiertoe werden naast het Columbia wildtype (*col*) ook drie *Arabidopsis*-mutanten onderzocht die deficiënt zijn in GSH (*cad*), AsA (*vtc*) of beide (*vtccad*). Reeds onder controlecondities vertonen deze drie mutanten afwijkende kenmerken ten opzichte van het wildtype. Hoewel de wortel van de *cad*-mutant morfologisch niet verschilt van *col*, ondervindt hij een zeer hoge GSSG/GSH-ratio. Bovendien induceert *cad* reeds onder controleomstandigheden de genexpressie van antioxidanten om zo zijn antioxidatieve capaciteit te vergroten. Doordat *cad* volwaardige wortels heeft, kan hij efficiënt voedingsstoffen opnemen, inclusief zware metalen. De combinatie van een verhoogde Cd-opname samen met een verlaagde GSH-inhoud maken dat deze mutant het meest gevoelig is voor Cd, alsook voor Cu-stress, in vergelijking met de andere genotypes. De *vtc*-mutant daarentegen vertoont een significante vertraging in zijn wortelgroei door het gebrek aan AsA. Dit impliceert dat deze mutant minder Cd opneemt dan *cad*. Na blootstelling aan metalen blijkt deze mutant het minst gevoelig te zijn voor Cu vanaf de laagste concentratie en voor Cd vanaf hogere concentraties. Een mogelijke verklaring is de verhoogde GSH-concentratie in het blad van de *vtc*-mutant, wat belangrijk is voor complexatie van de metalen. De *vtccad*-mutant heeft eveneens een vertraagde wortelgroei. Ten gevolge van zijn klein wortelstelsel neemt hij minder metalen op dan *cad*, waardoor *vtccad* minder gevoelig is dan *cad*. Hij is echter wel gevoeliger dan *vtc* voor beide metalen wegens zijn bijkomend tekort aan GSH.

Op **genexpressieniveau** in de wortel na **24 uur Cd**-behandeling induceert *vtc* net als *col* enkel de genexpressie van $O_2^{\circ-}$ -scavengers. Ze beschikken over voldoende metabolieten om de redoxstatus in evenwicht te houden. Beide mutanten met GSH-deficiëntie daarentegen zijn beperkt in Cd-complexatie en induceren bovendien de genexpressie van *LOX1* en *RbohD* zeer sterk in vergelijking met de andere mutanten. Bijgevolg gaan deze planten alternatieve pathways activeren om zich aan te passen aan de Cd-geïnduceerde oxidatieve stress zoals via *CSD*'s en de AsA-GSH cyclus. In het blad staat de inductie van de *LOX2*-genexpressie centraal in de inductie van oxidatieve stress bij zowel de *cad*-mutant als het wildtype. De AsA-deficiënte mutanten activeren duidelijk minder pathways. Blijkbaar worden de wortelresponsen vooral bepaald door het GSH-gehalte, waar deze in de blaadjes vooral door het AsA-gehalte worden beïnvloed.

Een belangrijke ontdekking betreft het **SOD-genexpressieprofiel**. Dit is niet enkel metaal- en orgaanspecifiek maar ook afhankelijk van de cellulaire redoxstatus. Waar Cd-behandeling normaal leidt tot

een posttranscriptionele reductie in *CSD*-transcripten ten gevolge van een Cd-geïnduceerde *MIR398*-genexpressie, wordt een inductie van alle betrokken genen waargenomen in de GSH-deficiënte mutanten. Hoewel de hoeveelheid *MIR398*-transcripten onder alle condities behouden blijft, wordt de transcriptiesnelheid van de *CSD*'s zeer sterk verhoogd bij GSH-deficiënte mutanten met als nettoresultaat een inductie van de *CSD*-transcripten. Deze interactie tussen het enzymatisch en metabool antioxidatief verdedigingssysteem werd tot op heden nooit eerder vastgesteld en beschreven in Cd-behandelde planten.

Ter **conclusie** kunnen we stellen dat AsA en GSH een belangrijke rol spelen in de metaalgeïnduceerde oxidatieve stress bij *Arabidopsis thaliana*. Hun functie is hierbij tweevoudig: 1) direct als antioxidant en 2) in de regulatie van de antioxidatieve respons. Het is duidelijk dat planten zich kunnen aanpassen aan veranderende omgevingscondities met betrekking tot metaalstress en dat de redoxbalans hierin essentieel is. Verder onderzoek zal meer inzicht geven in de rol van beide metabolieten onder metaalstress alsook in de volgorde van de gebeurtenissen tussen het blootstellen aan metalen en de cellulaire responsen die erop volgen.

6 Referenties

1. Sanita di Toppi L, Gabbrielli R. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, 1999. 41(26): p. 105-130.
2. WHO Regional Office for Europe. Chapter 6.3 Cadmium. In: *Air Quality Guidelines*. 2nd ed. 2000.
3. Järup L. Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, 2003. 68: p. 167-182.
4. Yruela I. Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 2005. 17(1): p. 145-156.
5. Lauwerys R, Amery A, Bernard A, Bruaux P, Buchet JP, Claeys F, De Plaen P, Ducoffre G, Fagard R, Lijnen P, Nick L, Roels H, Rondia D, Saint-Remy A, Sartor F, Staessen J. Health effects of environmental exposure to cadmium: objectives, design and organization of the Cadmibel Study: a cross-sectional morbidity study carried out in Belgium from 1985 to 1989. *Environmental Health Perspectives*, 1990. 87: p. 283-289.
6. Benavides M, Gallego S, Tomaro M. Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 2005. 17(1): p. 21-34.
7. Clemens S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*, 2006. 88(11): p. 1707-1719.
8. Clemens S, Palmgren MG, Kramer U. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends Plant Science*, 2002. 7(7): p. 309-315.
9. Perfus-Barbeoch L, Leonhardt N, Vavasseur A, Forestier C. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *The Plant Journal*, 2002. 32: p. 539-548.
10. Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine*, 1995. 18(2): p. 321-336.
11. Smeets K. Oxidative stress as a modulator in cellular responses during cadmium and copper toxicity in *Arabidopsis thaliana*. PhD dissertation in Biology at Centre for Environmental Sciences, 2007.
12. Guo WJ, Meetam M, Goldsbrough PB. Examining the specific contributions of individual *Arabidopsis* metallothioneins to copper distribution and metal tolerance. *Plant Physiology*, 2008. 146(4): p. 1697-1706.
13. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 2006. 141(2): p. 312-322.
14. 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: p. 437-444.
15. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology*, 2003. 552(2): p. 335-344.
16. Adams WW, Alscher RG, Demmings-Adams B, Foyer CH, Hausladen A, Hess JL, Lewis NG, Pallet KE, Young AJ. *Antioxidants in Higher Plants*. 1st ed. Alscher RG and Hess JL, editors. 1993, London: CRC Press.
17. Foyer C, Noctor G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment*, 2005. 28: p. 1056-1071.
18. Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Science*, 2004. 9(10): p. 490-498.
19. Scandalios JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*, 2005. 38(7): p. 995-1014.
20. Arora A, Sairam R, Srivastava G. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*, 2002. 82(10): p. 1227-1238.
21. Hancock JT, Desikan R, Neill SJ. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochemical and Biomedical Aspects of Oxidative Modification*, 2001. 29: p. 345-350.
22. Kim C, Kim JY, Kim JH. Cytosolic phospholipase A(2), lipoxygenase metabolites, and reactive oxygen species. *BMB Reports*, 2008. 41(8): p. 555-559.
23. Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research*, 1999. 424(1-2): p. 83-95.
24. Skorzynska-Polit E, Krupa Z. Lipid peroxidation in cadmium-treated *Phaseolus coccineus* plants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2006. 50(4): p. 482-487.
25. Dietz KJ, Jacob S, Oelze ML, Laxa M, Tognetti V, de Miranda SM, Baier M, Finkemeier I. The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 2006. 57(8): p. 1697-1709.

26. Rouhier N, Gelhaye E, Gualberto JM, Jordy MN, De Fay E, Hirasawa M, Duplessis S, Lemaire SD, Frey P, Martin F, Manieri W, Knaff DB, Jacquot JP. Poplar peroxiredoxin Q. A thioredoxin-linked chloroplast antioxidant functional in pathogen defense. *Plant Physiology*, 2004. 134(3): p. 1027-1038.
27. Gelhaye E, Rouhier N, Navrot N, Jacquot JP. The plant thioredoxin system. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2005. 62(1): p. 24-35.
28. Meyer Y, Verdoucq L, Vignols F. Plant thioredoxins and glutaredoxins: identity and putative roles. *Trends Plant Science*, 1999. 4(10): p. 388-394.
29. Potters G, Gara LD, Asard H, Horemans N. Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiology and Biochemistry*, 2002. 40: p. 537-548.
30. Hahnel D, Beyer K, Engelmann B. Inhibition of peroxyl radical-mediated lipid oxidation by plasmalogen phospholipids and alpha-tocopherol. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999. 27(9-10): p. 1087-1094.
31. Noctor G, Arisi AM, Jouanin L, Kunert KJ, Rennenberg H, Foyer C. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *Journal of Experimental Botany*, 1998. 49(321): p. 623-647.
32. May M, Vernoux T, Leaver C, Montagu MV, Inzé D. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *Journal of Experimental Botany*, 1998. 49(321): p. 649-667.
33. Bolwell G P, Wojtaszek P. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence - a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1997. 51: p. 347-366.
34. Pitzschke A, Hirt H. Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species signaling in plants. *Plant Physiology*, 2006. 141(2): p. 351-356.
35. Fisher AB. Redox Signaling Across Cell Membranes. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2008. p. 1-28.
36. Heyno E, Kloese C, Krieger-Liszka A. Origin of cadmium-induced reactive oxygen species production: mitochondrial electron transfer versus plasma membrane NADPH oxidase. *New Phytologist*, 2008. 179(3): p. 687-699.
37. Lyakhovich VV, Vavilin VA, Zenkov NK, Menshchikova EB. Active defense under oxidative stress. The antioxidant responsive element. *Biochemistry*, 2006. 71(9): p. 962-974.
38. Kacperska A. Sensor types in signal transduction pathways in plant cells responding to abiotic stressors: do they depend on stress intensity? *Physiologia Plantarum*, 2004. 122: p. 159-168.
39. Cheng SH, Willmann MR, Chen HC, Sheen J. Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiology*, 2002. 129: p. 469-485.
40. 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): p. 3276-3283.
41. Chen W, Provart N, Glazebrook J, Katagiri F, Chang H-S, Eulgem T, Mauch F, Luan S, Zou G, Whitham SA, Budworth PR, Tao Y, Xie Z, Chen X, Lam S, Kreps JA, Harper JF, Si-Ammour A, Mauch-Mani B, Heinlein M, Kobayashi K, Hohn T, Dangl JL, Wang X, Zhu T. Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggest their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell*, 2002. 14: p. 559-574.
42. Bartel D. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004. 116: p. 281-297.
43. Sunkar R, Zhu JK. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2004. 16(8): p. 2001-2019.
44. Zhou Y, Ferguson J, Chang JT, Kluger Y. Inter- and intra-combinatorial regulation by transcription factors and microRNAs. *BMC Genomics*, 2007. 8(396): p. 1-10.
45. 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. *Plant Cell*, 2006. 18(8): p. 2051-2065.
46. Yamasaki H, Abdel-Ghany S, Cohu C, Kobayashi Y, Shikanai T, Pilon M. Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 2007. 282(22): p. 16369-16378.
47. 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): p. 1687-1696.
48. Yamasaki H, Hayashi M, Fukazawa M, Kobayashi Y, Shikanai T. SQUAMOSA promoter binding protein-like7 is a central regulator for copper homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2009. 21: p. 347-361.
49. Semane B. Role of ascorbate and glutathione in cellular defence against cadmium exposure in *Arabidopsis thaliana*. PhD dissertation in Biology at Centre for Environmental Sciences, 2007.
50. 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: p. 519-528.

51. 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: p. 1-8.
52. 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): p. 212-218.
53. Cobbett CS, May MJ, Howden R, Rolls B. The glutathione-deficient, cadmium-sensitive mutant, *cad2-1*, of *Arabidopsis thaliana* is deficient in gamma-glutamylcysteine synthetase. *The Plant Journal*, 1998. 16(1): p. 73-78.
54. Conklin PL, Norris SR, Wheeler GL, Williams EH, Smirnov N, Last RL. Genetic evidence for the role of GDP-mannose in plant ascorbic acid (vitamin C) biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999. 96(7): p. 4198-4203.
55. Clercx EJM, Blankestijn-De Vries H, Ruys GJ, Groot SPC, Koornneef M. Genetic differences in seed longevity of various *Arabidopsis* mutants. *Physiologia Plantarum*, 2004. 121: p. 448-461.
56. Balcells L. A method for sterilising *Arabidopsis* seeds. In: *Arabidopsis: The complete guide*. Flanders D, Dean C, editors. 1992. Version 1.4.
57. Zhang H, Forde BG. An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science*, 1998. 279(5349): p. 407-409.
58. Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 1968. 50(1): p. 151-158.
59. Remans T, Nacry P, Pervent M, Girin T, Tillard P, Lepetit M, Gojon A. A central role for the nitrate transporter NRT2.1 in the integrated morphological and physiological responses of the root system to nitrogen limitation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2006. 140: p. 909-921.
60. Dhinsa R, Plumbdhinsa P, Thorpe T. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase. *Journal of Experimental Botany*, 1981. 32(126): p. 93-101.
61. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods*, 2001. 25(4): p. 402-408.
62. 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): p. 1343-1349.
63. Lehmann E, d'Abreu H. The Kruskal-Wallis Test. *Nonparametrics: statistical methods based on ranks*. Bulletin of the American Mathematical Society, 1977. 5(83): p. 967-973.
64. Davletova S, Rizhsky L, Liang H, Shengqiang Z, Oliver DJ, Coutu J, Shulaev V, Schlauch K, Mittler R. Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2005. 17(1): p. 268-281.
65. 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): p. 858-861.
66. Garnier L, Simon-Plas F, Thuleau P, Agnel JP, Blein JP, Ranjeva R, Montillet JL. Cadmium affects tobacco cells by a series of three waves of reactive oxygen species that contribute to cytotoxicity. *Plant, Cell and Environment*, 2006. 29(10): p. 1956-1969.
67. 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): p. 1049-1060.
68. Zentgraf U. Oxidative stress and leaf senescence. In: *Senescence processes in plants: Annual Plant Reviews*. S Gan, editor. Blackwell Publishing, Frankrijk, 2007. Volume 26: p. 70-86.
69. Cuypers A, Vangronsveld J, H C. Biphasic effect of copper on the ascorbate-glutathione pathway in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* seedlings during the early stages of metal assimilation. *Physiologia Plantarum*, 2000. 110: p. 512-517.
70. Veljovic-Jovanovic SD, Pignocchi C, Noctor G, Foyer CH. Low ascorbic acid in the *vtc-1* mutant of *Arabidopsis* is associated with decreased growth and intracellular redistribution of the antioxidant system. *Plant Physiology*, 2001. 127(2): p. 426-435.

