

Oxidatieve stress als modulator in metaaltoxiciteit

Kelly OPDENAKKER

promotor :
dr. Ann CUYPERS

co-promotor :
Prof. dr. Jaak VANGRONSVELD

Inhoudsopgave

Afkortingenlijst	
Dankwoord	
Samenvatting	
1 Inleiding	1
1.1 Fysiologische effecten van zware metalen	1
1.1.1 Fysiologische effecten van cadmium en koper op de mens	1
1.1.2 Fysiologische effecten van cadmium en koper op de plant	2
1.2 Cellulaire effecten	3
1.2.1 Wat is oxidatieve stress?	3
1.2.2 Bronnen van ROS	5
1.3 Verdediging	7
1.3.1 Antioxidatieve verdediging	8
1.4 Doel van het onderzoek	10
2 Materiaal en methoden	12
2.1 Elementbepaling	12
2.2 Waterstofperoxide assay	12
2.3 Analyse lipidenperoxidatie	12
2.4 Metabolietbepaling	13
2.5 Bepalen van genexpressie	13
2.5.1 RNA-isolatie	13
2.5.2 Concentratiebepaling RNA	13
2.5.3 RT-PCR	13
2.5.4 Real-time PCR	14
2.6 Bepalen van enzymcapaciteit	16
2.6.1 Superoxidedismutase	16
2.6.2 Catalase	17
2.6.3 Syringaldazineperoxidase	18
2.6.4 Guajacolperoxidase	18
2.6.5 Ascorbaatperoxidase	18
2.6.6 Gluthationreductase	19
2.7 Statistische analyse	19
3 Resultaten	20
3.1 Cu/Cd-stress bij <i>Arabidopsis thaliana</i> in een multipollutiecontext	20
3.1.1 Groeiparameters van <i>Arabidopsis thaliana</i> na behandeling met 10 μ M Cu en Cd	20
3.1.2 Nutriëntenprofiel van <i>Arabidopsis thaliana</i> na behandeling met 10 μ M Cu en Cd	21
3.1.3 Effecten op oxidatieve stress gerelateerde parameters in <i>Arabidopsis thaliana</i> na behandeling met 10 μ M Cu en Cd	22
3.2 Cu-stress (range finding) bij <i>Arabidopsis thaliana</i>	29
3.2.1 Groeiparameters van <i>Arabidopsis thaliana</i> na behandeling met 0.5, 2 en 5 μ M Cu	29
3.2.2 Nutriëntenprofiel van <i>Arabidopsis thaliana</i> na behandeling met 0.5, 2 en 5 μ M Cu	29
3.2.3 Effecten op oxidatieve stress gerelateerde parameters in <i>Arabidopsis thaliana</i> na behandeling met 0.5, 2 en 5 μ M Cu	30
4 Conclusie en discussie	38
Referenties	44

Afkortingen

ABA	abscisinezuur
APOD	ascorbaatperoxidase
<i>apx 1</i>	gen van het enzym ascorbaatperoxidase 1
AsA	ascorbaat
CAT	catalase
<i>cat 1</i>	gen van het enzym catalase 1
Cd	cadmium
<i>csd 1, 2</i>	gen van het Cu/Zn-superoxidedismutase 1, 2
Cu	koper
DHA	dehydroascorbaat
<i>fsd 1</i>	gen van het enzym Fe-superoxidedismutase 1
GPOD	guajacolperoxidase
GR	glutathionreductase
GSH	glutathion
GSSG	glutathiondisulfide
HO•	hydroxylradicaal
H ₂ O	water
H ₂ O ₂	waterstofperoxide
<i>lox 1, 2</i>	gen van het enzym lipoxygenase 1, 2
LPO	lipidenperoxiden
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MDA	malondialdehyde
<i>msd 1</i>	gen van het enzym Mn-superoxidedismutase 1
O ₂	moleculair zuurstof
O ₂ • ⁻	superoxide anion
¹ O ₂	singlet zuurstof
PUFA's	poly-onverzadigde vetzuren
<i>rboh C, D, F</i>	gen van het enzym NADPH-oxidasen C, D, F
ROS	reactieve zuurstofvormen
SOD	superoxidedismutase
SPOD	syringaldazineperoxidase
TBA	thiobarbituurzuur

Dankwoord

Van deze pagina wil ik gebruik maken om alle mensen te bedanken die mij de afgelopen maanden geholpen en gesteund hebben om uiteindelijk tot dit resultaat te komen.

In de eerste plaats wil ik mijn promotor, Dr. Ann Cuypers, en copromotor, Prof. Dr. Jaco Vangronsveld, bedanken om mij te kans te geven stage te lopen in het labo Milieubiologie en mij zo voor te bereiden op een loopbaan in het wetenschappelijk onderzoek. Dr. Ann Cuypers wil ik ook bedanken om altijd voor mij klaar te staan als ik vragen had en voor het nalezen en verbeteren van mijn thesis ondanks het feit dat zij het zelf razend druk had.

Verder ben ik ongelooflijk veel dank verschuldigd aan drs. Karen Smeets want uiteindelijk heeft zij hele dagen van haar kostbare tijd aan mij opgeofferd. Zij is degene die mij alle technieken, die in dit werk aanbod komen, met veel geduld heeft aangeleerd en mij bijstond bij het verwerken van de data. Ze stond altijd klaar met haar deskundige uitleg en wist me telkens opnieuw te motiveren met haar onuitputtelijke enthousiasme. Ook het eindeloze nalezen en verbeteren van mijn thesis was voor haar nooit teveel moeite. Zonder probleem liet zij haar werk vallen om mij te helpen.

Dan wil ik ook nog de mensen van het technisch personeel, Carine Put en Ann Wijgaerts, bedanken voor hun assistentie bij het tijdrovende werk van het oogsten en hun behulpzaamheid in het labo.

Tot slot wil ik alle werknemers van milieubiologie, plantenfysiologie en dierkunde bedanken voor de gezelligheid in en naast het labo. Ook ben ik dank verschuldigd aan mijn ouders, mijn zus Stephanie en broer Glenn voor hun interesse in mijn stageonderwerp en hun steun tijdens de afgelopen zes maanden. En dan als allerlaatste een bedankje voor al mijn vrienden van Biomedische Wetenschappen voor de vier toffe jaren. We konden ook tijdens de stage bij elkaar terecht met vragen en problemen ondanks het feit dat onze stageplaatsen vaak ver uit elkaar lagen.

Samenvatting

Sinds het einde van de 19^e eeuw en het begin van de 20^e eeuw werden zware metalen wijd verspreid in de lucht, de bodem en het water als gevolg van antropogene activiteiten. Door opwaaiend stof en accumulatie in landbouwproducten kunnen ze opgenomen worden door mens en dier. Zware metalen zijn zeer toxisch en verstoren verschillende fysiologische processen bij zowel mens en dier (long-, nier-, lever- en botschade) als bij planten (verstoring van de groei en fotosynthese). Op cellulair niveau is een algemeen effect waarneembaar, namelijk oxidatieve stress. Dit is een onevenwicht in de redoxbalans waarbij het aantal geoxideerde substraten in de cel groter is dan het aantal gereduceerde. Deze geoxideerde moleculen kunnen reageren met proteïnen en DNA in de cel. Ze kunnen ook aanleiding geven tot lipidenperoxidatie waardoor de celmembranen worden aangetast. Als bescherming tegen de reactie van deze geoxideerde moleculen, activeert de cel haar antioxidatief systeem. Dit bestaat uit enzymen (catalase, superoxidedismutase, ...) en metabolieten (glutathion, ascorbaat).

In deze studie werd er gekeken naar het effect van enkele zware metalen, Cu en Cd, op oxidatieve stress gerelateerde parameters in de cel. Als een testorganisme werd gebruik gemaakt van *Arabidopsis thaliana* omdat voor deze plant een grote beschikbaarheid bestaat van moleculaire informatie en technieken. Na behandeling werd een nutriëntenprofiel opgesteld en werd het gehalte aan lipidenperoxidatieproducten en H₂O₂ bepaald. De expressie van ROS-producerende enzymen zoals de lipoxygenasen en NADPH-oxidasen werd ook nagegaan. Verder werden de effecten van zware metalen op het antioxidatieve verdedigingsmechanisme onderzocht op zowel transcriptioneel als metabolisch niveau.

Uit deze studie kan besloten worden dat blootstelling aan zware metalen, zoals Cu en Cd, leidt tot oxidatieve stress op cellulair niveau. Dit kan afgeleid worden uit de stijging in H₂O₂ en lipidenperoxidatie na toediening van Cu en Cd. De mechanismen die hiertoe leiden zijn echter verschillend voor beide metalen. Cu is een redoxactief metaal en kan via redoxcycling tussen zijn verschillende oxidatievormen hydroxylradicalen vormen, die vervolgens aanleiding kunnen geven tot oxidatieve stress. Bij Cd is het ontstaan van oxidatieve stress eerder een indirect mechanisme te wijten aan een verhoogde activiteit van NADPH-oxidasen en lipoxygenasen. Verder wordt het antioxidatief systeem aangetast op zowel transcriptioneel als metabolisch niveau.

1 Inleiding

Vervuiling door zware metalen is een groot probleem voor het milieu. Naast de metalen afkomstig van natuurlijke bronnen, die plaatselijk kunnen leiden tot verhoogde metaalgehalten in het milieu, wordt de antropogene bijdrage steeds belangrijker. Sinds de stijging in mijnbouw en industriële activiteiten, einde 19^e eeuw en begin 20^e eeuw, werden deze metalen wijd verspreid in de lucht, het water en de bodem en hebben ze geleidelijk aan meer en meer verschillende ecosystemen aangetast [1].

Zware metalen zijn metalen met een dichtheid hoger dan 5 g/cm³. Er wordt een onderscheid gemaakt tussen essentiële en niet-essentiële zware metalen [2].

Cadmium (Cd) is een niet-essentieel element dat in het milieu terechtkomt door de industrie (non-ferro metaalindustrie) en de landbouw (gebruik van fosfaatmeststoffen en sporeistoffen). Als niet-essentieel element is Cd niet noodzakelijk voor de ontwikkeling van organismen en is het al toxisch in lage concentraties vooral door zijn grote oplosbaarheid in water. Cd komt in de natuur hoofdzakelijk voor als een bivalent kation [2,3].

Koper (Cu) is een essentieel redoxactief metaal (Cu⁺, Cu⁺⁺). Het is een micronutriënt dat in planten, dieren en mensen een rol speelt als component in metaalproteïnen, als cofactor in de enzymatische katalyse en in vele andere cellulaire processen. Cu is bijgevolg noodzakelijk voor de normale groei en ontwikkeling van organismen [4].

1.1 Fysiologische effecten van zware metalen

Zware metalen interageren met veel fysiologische processen in zowel mensen als planten. Dit heeft grote gevolgen voor het functioneren van deze organismen.

1.1.1 Fysiologische effecten van cadmium en koper op de mens

Blootstelling aan Cd kan leiden tot een groot aantal gezondheidsproblemen bij organismen. De vier belangrijkste targets van Cd-toxiciteit zijn de lever, de nieren, de longen en in mindere mate het bot. Verder is Cd door de 'International Agency for Research on Cancer (IARC)' geklassificeerd als een categorie I carcinogeen. De cellulaire schade, die Cd aanricht is afhankelijk van verschillende factoren zoals de dosis en duur van de blootstelling [3,5,6].

Inhalatie van Cd-componenten kan acute en chronische effecten op het ademhalingssysteem tot gevolg hebben [11]. Bij mensen is het voornaamste effect van lange termijn blootstelling aan Cd op de longen het ontstaan van chronische niet-specifieke longziekte [7,8,9].

Blootstelling van de nieren aan Cd kan leiden tot proteïnurie, glucosurie, aminoacidurie en een aangetaste tubulaire reabsorptie van enzymen of hormonen [6,7,10,11]. Als gevolg van deze nierschade kan een verstoring in het calcium- en fosfaatmetabolisme optreden. Dit kan leiden tot de demineralisatie van bot maar ook tot de vorming van nierstenen wanneer er teveel calcium wordt uitgescheiden in de urine [6,12].

Acute toxiciteit van Cu komt voor in mensen na inname van koperzouten via de voeding. Symptomen hiervan zijn braken, lethargie, acute hemolytische anemie, nier- en leverschade. In sommige gevallen kan het leiden tot coma en sterfte. Bij arbeiders blootgesteld aan hoge concentraties koperrook kan metaalkoorts optreden [13,14].

Eén van de meest voorkomende effecten van herhaalde blootstelling aan een overmaat Cu is ziekte van het gastrointestinaal systeem. Symptomen zijn misselijkheid, braken en buikpijn. Dit komt meestal voor in gevallen van gecontamineerd drinkwater. De lever en de nieren zijn ook gevoelig voor kopertoxiciteit. Leverschade treedt op in het geval van inname van hoge doses kopersulfaat en leidt tot necrose en fibrose. In de nieren kunnen de proximale tubuluscellen aangetast worden. Cu kan eveneens irriterend zijn voor het ademhalingssysteem, gekenmerkt door hoesten, niezen, een loopneus, longfibrose en een verhoogde vasculariteit van de neusmucosa. [13,14].

1.1.2 Fysiologische effecten van cadmium en koper op de plant

Algemeen kan gesteld worden dat verhoogde gehalten aan Cd en Cu in het milieu leiden tot een verminderde biomassa-productie. Cd en Cu kunnen immers direct de groei van de plant beïnvloeden door interacties aan te gaan met polysacchariden in de celwand. Deze verlagen de celwandplasticiteit waardoor de cellen niet meer kunnen expanderen en bijgevolg de cel- en plantengroei geïnhibeerd worden [2,4,15].

Verder kunnen Cd en Cu interfereren met de fotosynthese, transpiratie en respiratie, en op die manier leiden tot een groeiachterstand van de plant. Cd en Cu inhiberen in de chloroplasten de chlorofylbiosynthese – leidt tot chlorosis - en verminderen de activiteit van enzymen betrokken bij de CO₂-fixatie. Het gevolg hiervan is dat de fotosynthesesnelheid afneemt. De transpiratiesnelheid daalt ook na blootstelling aan Cd en Cu. Dit is in de eerste plaats het

gevolg van een groeiachterstand door de plant. Hierdoor is immers het bladoppervlak verlaagd. Een tweede verklaring is dat zware metalen de concentratie aan abscisinezuur (ABA), verantwoordelijk voor de sluiting van de huidmondjes, in de cel verhogen. Verder tasten Cd en Cu de respiratie in de mitochondriën aan door inhibitie van het elektronen- en protonentransport [2,15].

Cd en Cu kunnen eveneens interfereren met de opname, het transport en het gebruik van macro- en micronutriënten door de plant. Een verminderde opname van kationen (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} en Fe^{3+}) en anionen (NO_3^-) kan optreden door interacties van zware metalen met de structuur van het membraan [2,15].

1.2 Cellulaire effecten

Naast de effecten op fysiologisch niveau, oefenen Cd en Cu ook een invloed uit op cellulair niveau. Hier bestaan er verschillende oorzaken van toxiciteit. In de eerste plaats kunnen Cd en Cu binden aan sulfhydryl- of carboxylgroepen van proteïnen. Verder kunnen ze een competitie aangaan met andere metalen zoals zink of selenium in metaalenzymen of kunnen ze interageren met calciumbindingsplaatsen in regulatoire proteïnen. Op deze manier kunnen de enzymactiviteit of eiwitfunctie geïnhibeerd worden. Een mogelijk gevolg hiervan is oxidatieve stress. Dit is een verstoring van de redoxbalans, die aanleiding kan geven tot oxidatie van lipiden, proteïnen en DNA [16,17]. Redoxactieve metalen zoals Cu zijn in staat om, via ‘redoxcycling’ tussen hun verschillende oxidatievormen, hydroxylradicalen te vormen en kunnen zo aanleiding geven tot oxidatieve stress [4]. Bij Cd-toxiciteit is het ontstaan van oxidatieve stress eerder een indirect mechanisme. Cadmium zorgt voor een depletie van glutathion en sulfhydrylgroepen van proteïnen. Hierdoor wordt een belangrijk mechanisme voor de detoxificatie van reactieve zuurstofvormen (ROS) geïnhibeerd en bijgevolg neemt de ROS-concentratie sterk toe [2,15].

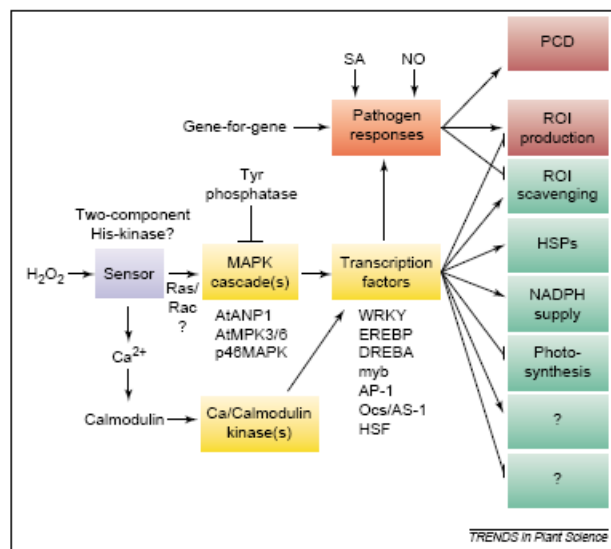
1.2.1 Wat is oxidatieve stress?

Alle levende organismen hebben molecuair zuurstof (O_2) nodig voor hun aërobe metabolisme. Zuurstof komt in zijn triplet grondstatus voor als een biradicaal. Deze vorm heeft twee ongepaarde elektronen met parallelle spin. De elektronen kunnen niet gedoneerd worden zonder een spininversie. Dit is een energie-afhankelijk proces, waarna singlet zuurstof (1O_2) gevormd wordt. Zuurstof in zijn grondstatus kan ook geactiveerd worden door het te

reduceren tot water (H_2O). Hierbij worden achtereenvolgens het superoxide anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$), waterstofperoxide (H_2O_2) en het hydroxylradicaal ($\text{HO}^{\bullet}$) gevormd [18-21].

Deze ROS zijn zeer reactief en toxisch. Onder stresscondities, zoals blootstelling aan zware metalen, kan de redoxbalans (pro-oxidanten $\leftrightarrow$ antioxidanten) zodanig verstoord worden dat ROS zich kunnen opstapelen en schade berokkenen in de cel. Deze verstoring wordt oxidatieve stress genoemd [18,19,21].

De voorbije jaren werd een nieuwe rol voor ROS ontdekt, namelijk de controle en regulatie van biologische processen zoals de celcyclus, geprogrammeerde celdood, hormonale signaling, biotische en abiotische stressresponsen en ontwikkeling (figuur 1.1) [20,22]. In deze signaling spelen de 'mitogen-activated protein kinase' (MAPK) cascades een essentiële rol. Ze kunnen geactiveerd worden door hormonen, abiotische stress en pathogenen en worden ook geactiveerd tijdens de sluiting van stomata, bij de regulatie van celexpansie en bij de plantontwikkeling. Eén van de activators van de MAPK-cascade blijkt het H_2O_2 te zijn dat geproduceerd kan worden tijdens oxidatieve stress. Het wordt ook in de apoplast gevormd door het NADPH-oxidase, de amine-oxidasen en celwandgebonden peroxidasen tijdens biotische en abiotische stressresponsen [23-26].



Figuur 1.1: Signaling door H_2O_2 in biologische processen [22].

Waterstofperoxide kan doorheen aquaporines diffunderen in de cel en de cellulaire compartimenten. De verhoogde H_2O_2 -concentratie in de cel kan vervolgens opgemerkt worden door drie verschillende sensormechanismen: redoxgevoelige transcriptiefactoren, een directe inhibitie van fosfatasen door ROS en niet-geïdentificeerde receptorproteïnen. Hierna

worden calmoduline en de MAPK-cascade geactiveerd waardoor transcriptiefactoren in de cel geactiveerd of onderdrukt kunnen worden [23-26].

De intensiteit, de duur en lokalisatie van de verschillende ROS-signalen worden bepaald door de productie en verwijdering van ROS. Verschillende verstoringen in het ROS-niveau worden opgevangen door verschillende proteïnen, enzymen of receptoren en moduleren verschillende ontwikkelings-, metabolische en verdedigingspathways [22,24].

1.2.2 Bronnen van ROS

Organellen met een hoge oxiderende metabolische activiteit of met een grote snelheid van elektronenstroom, zoals de chloroplasten en mitochondriën, zijn de grootste bron van ROS in planten [22]. Zuurstof wordt gevormd in de chloroplast door de oxidatie van H₂O in de elektronentransportketen tijdens de fotosynthese. Het kan er echter ook gebruikt worden als elektronenacceptor wat leidt tot het ontstaan van O₂^{•-}. De elektronentransportketen is eveneens de bron van ¹O₂, dat wordt geproduceerd door de chlorofylpigmenten [19,27]. Singlet zuurstof kan eveneens ontstaan als een bijproduct van de lipoxygenase activiteit. Lipoxygenasen zijn enzymen, die polyonverzadigde vetzuren (PUFA's) oxideren tot lipidehydroperoxiden (LOOHs). Deze laatste zijn betrokken in stressresponsen [28].

Ook in de mitochondriën wordt O₂^{•-} aangemaakt als een gevolg van zuurstofconsumptie door cytochroom oxidase ter vorming van H₂O. Directe reductie van O₂ tot O₂^{•-} in flavoproteïnen van het NADH-dehydrogenase of de zuurstofreductie via het ubiquinone-cytochroom in de respiratorische keten is reeds vastgesteld [19,27].

Zuurstof kan eveneens gereduceerd worden tot O₂^{•-} door NADPH-oxidasen, amine-oxidasen en celwandgebonden peroxidasen in de apoplast tijdens biotische en abiotische stresscondities [23]. Uit O₂^{•-} kan H₂O₂ gevormd worden door dismutatie (reactie 1.1). Deze reactie kan spontaan optreden maar wordt versneld door de superoxidedismutasen [19].



Omdat H₂O₂ kan diffunderen doorheen aquaporines, kan het H₂O₂ dat op een bepaalde plaats gevormd wordt, ook schade toebrengen aan andere celcomponenten [20]. H₂O₂ en O₂^{•-} brengen zelf relatief weinig schade toe aan de cel maar ze kunnen in aanwezigheid van redoxactieve metalen leiden tot de vorming van veel reactievere moleculen, zoals HO[•]. Deze

reacties worden de Fenton (reactie 1.2) en Haber-Weiss reacties (reactie 1.4) genoemd [19,21,29].



In biologische systemen kan het metaalion uit reactie 1.2 terug gereduceerd worden in aanwezigheid van een reducerend reagens zoals $\text{O}_2^{\bullet-}$ (reactie 1.3).



Voorgaande reacties (1.2 en 1.3) kunnen als volgt worden samengevat (reactie 1.4):



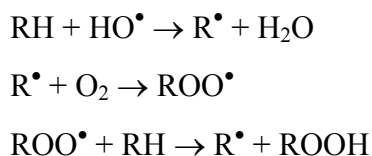
Redoxactieve metalen zoals Cu zijn in staat Fentonreacties te induceren. Aanwezigheid van het $\text{HO}^\bullet$ -radicaal kan leiden tot lipidenperoxidatie en beschadigt essentiële cellulaire componenten zoals DNA, proteïnen en andere moleculen [19,21,29].

Het hydroxylradicaal kan organische substraten oxideren via twee mogelijke mechanismen. Een eerste is een additiereactie. Hierbij wordt $\text{HO}^\bullet$ toegevoegd aan een organisch substraat en wordt een gehydroxyleerd product gevormd. Dit kan vervolgens verder geoxideerd worden tot een stabiel, geoxideerd product door een metaalion, O_2 of andere reagentia. Het gehydroxyleerde product kan ook dismuteren en gecrosslinkte producten vormen [19].

De tweede mogelijke reactie is een substractiereactie. Het $\text{HO}^\bullet$ -radicaal oxideert een organisch substraat door onttrekking van een waterstof en vormt water en een organisch radicaal. Dit laatste product beschikt over een ongepaard elektron en kan reageren met zuurstof in zijn triplet grondstatus (figuur 1.2). Hierdoor wordt een peroxyradicaal gevormd dat vervolgens een waterstof van een ander organisch molecuul kan onttrekken waardoor een tweede organisch radicaal gevormd wordt. Deze kettingreactie kan meer schade veroorzaken dan iedere andere reactie gekatalyseerd door ROS [19,29].

Het is deze substractiereactie die in celmembranen aanleiding geeft tot lipidenperoxidatie door reactie met PUFA's zoals linol- en linoleenzuren. Lipidenperoxiden (ROOH) zijn zeer onstabiel in de aanwezigheid van redoxactieve metalen en kunnen aanleiding geven tot een

Fentonreactie waarbij reactieve alkoxyradicalen ($\text{RO}^\bullet$) worden gevormd naast nieuwe $\text{HO}^\bullet$ -radicalen. Het gevormde alkoxyradicaal is even schadelijk als $\text{HO}^\bullet$ en kan een exponentiële cascade van oxidatieve reacties initiëren [19,29].



Figuur 1.2: Substractiereactie gekatalyseerd door $\text{HO}^\bullet$ -radicaal van een organisch substraat [19].

Lipidenperoxidatie in planten kan tevens gekatalyseerd worden door enzymen, zoals de lipoxygenasen en α -dioxygenase. Door deze peroxidatiereacties beschikt de plant over een groot aantal structureel verschillende oxylipinen. Dit zijn geoxideerde metabolieten van onverzadigde vetzuren. Oxylipinen spelen een rol in meerdere verdedigingsreacties als respons op aanvallen van pathogenen en herbivoren [29].

1.3 Verdediging

Planten beschikken over verschillende mechanismen om metaaltotoxiciteit te voorkomen. Eerst zijn er de mechanismen, die de opstapeling van zware metalen in de cel moeten voorkomen. Extracellulair zorgen mycorrhiza's, de celwand en extracellulaire exudaten ervoor dat zware metalen het cytosol niet kunnen bereiken. Het plasmamembraan kan de concentratie aan zware metalen in de cel laag houden door de opname van metalen te verminderen of de efflux van metalen, die het cytosol bereikt hebben, te stimuleren. In het cytosol beschikt de plant enerzijds over liganden, zoals aminozuren, organische zuren, fytochelatinen en metallothioneïnen, die de metalen kunnen binden en anderzijds over proteïnen, die schade aan structuren en macromoleculen kunnen herstellen zoals 'heat shock' proteïnen. Zware metalen gebonden aan fytochelatinen kunnen vervolgens getransporteerd worden naar de vacuolen en daar opgeslagen worden [30,31,32].

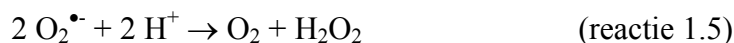
Wanneer deze mechanismen overweld worden en de concentratie aan vrije zware metalen in de cel toch toeneemt, worden de enzymen en metabolieten van het antioxidatief verdedigingssysteem geactiveerd [30].

1.3.1 Antioxidatieve verdediging

Planten beschikken over een zeer efficiënt antioxidantief systeem. Deze verdedigingsmechanismen worden niet alleen aangetroffen in het intracellulaire compartiment maar komen ook in beperkte mate voor in de apoplast [19]. Ze bestaan uit metabolieten zoals ascorbaat, glutathion, α -tocoferol en enzymen zoals de superoxidedismutasen, peroxidasen en catalasen [16,20].

Superoxidedismutase

De superoxidedismutasen (SOD's) zijn een familie van metaalenzymen, die de dismutatie van $O_2^{\bullet-}$ in O_2 en H_2O_2 katalyseren (reactie 1.5) [19].



Drie isozymen van SOD zijn bekend, nl. MnSOD, Cu/ZnSOD en FeSOD. MnSOD wordt bij planten aangetroffen in de mitochondriën en peroxisomen maar kan ook voorkomen in oplosbare cytosolaire fracties. Cu/ZnSOD is hoofdzakelijk gelokaliseerd in het cytosol alhoewel het ook in de chloroplast en de mitochondriën gevonden wordt. FeSOD wordt voornamelijk gedetecteerd in de chloroplast en in mindere mate in het cytosol, de mitochondriën en de peroxisomen [33-35].

Catalase en peroxidasen

Catalase (CAT) is een heembevattend enzym, dat zorgt voor de verwijdering van H_2O_2 met vorming van H_2O en O_2 (reactie 1.6).



Het catalase wordt in de meeste aërobe cellen aangetroffen in de peroxisomen en de mitochondriën [18,35].

De peroxidasen zijn verantwoordelijk voor de detoxificatie van H_2O_2 en organische peroxiden. H_2O_2 wordt verwijderd via de oxidatie van andere organische substraten (reactie 1.7).

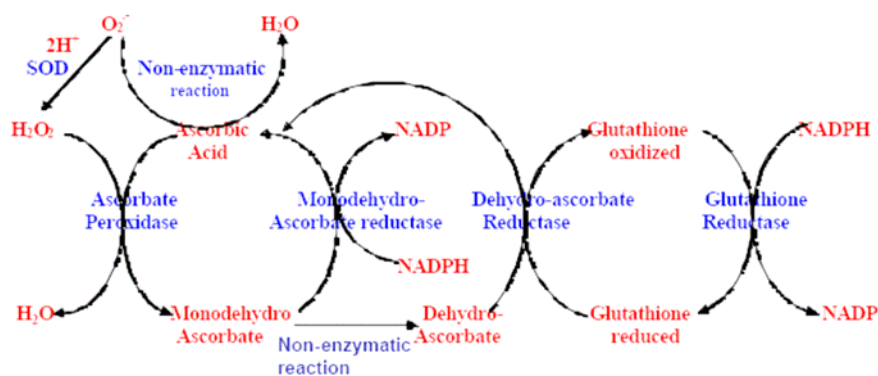


Peroxidasen worden aangetroffen in verschillende celcompartimenten waarvan de chloroplast de belangrijkste is. Een voorbeeld van een peroxidase is het ascorbaatperoxidase, dat aangetroffen wordt in de chloroplast en het cytosol en dat betrokken is in de ascorbaat-glutathionencyclus [18,36].

Ascorbaat-glutathionencyclus

Ascorbaat (vitamine C) wordt aangetroffen in de chloroplasten, het cytosol, de vacuole, de mitochondriën en de apoplastische ruimte van bladcellen. Het is één van de belangrijkste antioxidanten in de plant en zorgt net als catalase voor de reductie van H_2O_2 waarbij ascorbaat geoxideerd wordt [19,36]. Naast deze primaire functie heeft ascorbaat ook een secundaire antioxidatieve functie. De ascorbaatpool kan gebruikt worden om membraangebonden antioxidanten, zoals α -tocoferol (vitamine E) en zeaxanthine te regenereren. Deze binden lipidenperoxideradicalen en $^1\text{O}_2$ [37]. Als aanvulling op zijn antioxidantfunctie is ascorbaat ook nog een cofactor voor een heel aantal enzymen, functioneert het als een elektronendonor in het fotosynthetische en mitochondriale elektronentransport en speelt het een rol in de oxalaat- en tartraatsynthese [38].

Glutathion (GSH) is een tripeptide (γ -glutamyl-cysteïnyl-glycine). Het is wijd verspreid in plantencellen, waar het wordt gesynthetiseerd in de chloroplast en het cytosol. Het werkt als een disulfidereductans en beschermt op deze manier thiolgroepen op enzymen of detoxificeert herbiciden via conjugatie. Verder speelt het een rol in de regeneratie van ascorbaat, reageert het met $^1\text{O}_2$ en $\text{HO}^\bullet$, en reguleert het de genexpressie bij omgevingsstress en aanvallen van pathogenen [39,40].



Figuur 1.3: Ascorbaat-glutathionencyclus [19].

De reductie van H_2O_2 door ascorbaat (AsA) verloopt in twee fasen (figuur 1.3). In de eerste fase wordt H_2O_2 gereduceerd tot H_2O met behulp van het ascorbaatperoxidase (APOD) waarbij monodehydroascorbaat (MDHA) gevormd wordt. Wanneer dit niet snel terug gereduceerd wordt, wordt het niet-enzymatisch omgezet in dehydroascorbaat (DHA). Voor de regeneratie van AsA zijn twee enzymen verantwoordelijk. Het monodehydroascorbaat-reductase (MDHAR) dat gebruik maakt van NADPH als reductans en het dehydroascorbaat-reductase (DHAR) dat gekoppeld is aan GSH. DHAR linkt de reductie van AsA aan de oxidatie van GSH waarbij glutathiondisulfide (GSSG) gevormd wordt. Het GSSG wordt terug gereduceerd door het glutathionreductase (GR) met behulp van NADPH. Deze reacties worden samen de ascorbaat-glutathion (Halliwell-Foyer-Asada) cyclus genoemd [37,38].

Antioxideratieve metabolieten

Ascorbaat en glutathion zijn wateroplosbare antioxideratieve metabolieten (cfr. supra). Vitamine E is eerder membraangebonden en zal bijgevolg een belangrijke rol spelen in de bescherming van membranen [41]. Verder worden in planten twee soorten carotenoïden aangetroffen: de carotenen, die enkel uit koolwaterstoffen zijn opgebouwd, en de xanthofyllen, die één of meerdere zuurstofgroepen bevatten [42]. In de chloroplast hebben de carotenoïden belangrijke functies als lichtabsorberende pigmenten en als fotobeschermende reagentia. Ze beschermen de chloroplast tegen de absorptie van overmatige excitatie-energie van chlorofyl. Verder zijn het ook efficiënte antioxideranten [19,42].

1.4 Doel van het onderzoek

Vervuiling door zware metalen is ook in ons land een probleem. De Maasvallei in Luik en de Noorderkempen hebben af te rekenen met te hoge concentraties van deze zware metalen in het milieu. De oorzaak hiervan is hoofdzakelijk de historische vervuiling van de zinkfabrieken, die tot in de jaren '70 erg actief waren en waar er een hoge uitstoot van metalen in de omgeving is gebeurd. Wat echter nog van groter belang is, is het feit dat relatief lage concentraties van deze metalen tot kilometers uit de buurt van deze fabrieken in de bodem kunnen voorkomen. Door opwaaiend stof en accumulatie in landbouwproducten kunnen ze vervolgens worden opgenomen door mens en dier.

Daarom werd besloten om de cellulaire effecten, die hetzelfde zijn voor zowel planten, dieren als mensen, te bestuderen na blootstelling aan relatief lage concentraties Cu en Cd, die ook in de omgeving van deze fabrieken worden aangetroffen. Als een testorganisme werd gekozen

voor de plant '*Arabidopsis thaliana*'. Reden hiervoor is het feit dat er voor *Arabidopsis* een grote beschikbaarheid bestaat van moleculaire informatie en technieken. Na blootstelling aan realistische Cu- en Cd-concentraties gedurende 24 uur werden de cellulaire effecten op moleculair en biochemisch niveau onderzocht. Eerst werden enkele oxidatieve stress gerelateerde parameters zoals de waterstofperoxidecontent en de lipidenperoxidatie onderzocht. Vervolgens werd de expressie van ROS-producerende enzymen, waaronder de lipoxxygenasen en de NADPH-oxidasen, nagegaan. Verder werden de effecten van zware metalen op het antioxidatief systeem onderzocht op transcriptioneel en metabolisch niveau.

2 Materiaal en methoden

Arabidopsis thaliana zaailingen werden gekweekt op hydrocultuur (gemodificeerd Hoagland medium) aan een dag/nacht temperatuur van 22°C/18°C, 12 uren licht en 65% vochtigheid. In een eerste experiment werden de plantjes na drie weken blootgesteld aan 10 µM Cu en Cd (toegevoegd als sulfaten) gedurende 24 uur. In een tweede experiment werden drie weken oude zaailingen gedurende 24 uur blootgesteld aan verschillende concentraties Cu, namelijk 0.5, 2 en 5 µM.

2.1 Elementbepaling

Bij de oogst van het plantenmateriaal werden de wortels éénmaal gespoeld met 1mM Pb(NO₃)₂ en tweemaal met gedestilleerd H₂O gedurende 5 min om Cd en Cu gebonden aan het worteloppervlak weg te wassen. De blaadjes werden afgespoeld met gedestilleerd water. Vervolgens werden de stalen gedroogd in de droogoven bij 80°C en werd 100 mg van het staal ontsloten in een warmteblok met HNO₃ (70-71%). De concentratie aan zowel Cd, Cu als andere elementen werd in de stalen bepaald met ‘inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry’ (ICP-AES) (Perkin-Elmer, 1100B, USA).

2.2 Waterstofperoxide assay

Het gehalte aan waterstofperoxide (H₂O₂) werd bepaald in blad en wortel met behulp van de ‘Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit’ (Molecular Probes, Invitrogen). Hiervoor werden stalen van 20 mg gebruikt. De fluorescentie-intensiteit in functie van de tijd werd gemeten met de ‘PTI T-format photon-counting fluorimeter’.

2.3 Analyse lipidenperoxidatie

De graad van lipidenperoxidatie werd bepaald door het malondialdehyde (MDA)-gehalte van blad en wortel te meten met behulp van de spectrofotometer (Shimadzu, UV/Visible 1601 PC). Stalen van 100 en 200 mg werden gehomogeniseerd in respectievelijk 2 en 3 ml 0.1% trichloorazijnzuur (TCA) met behulp van mortier en stamper. Na centrifugatie werd 1 ml supernatans in duplo gepipetteerd bij 4 ml 0.5% 2-thiobarbituurzuur (TBA). Als blanco werd gebruik gemaakt van 1 ml 0.1% TCA in 4 ml 0.5% TBA. Hierna werden de stalen gedurende 30 min in een warmwaterbad op 95°C geplaatst. Vervolgens werden de stalen snel afgekoeld

in een ijsbad en werd na centrifugatie de absorptie bepaald t.o.v. de blanco bij 532 en 600 nm volgens de methode van Dhindsa et al. [43]. De absorptie bij 600 nm is de aspecifieke absorptie en hiervoor wordt later in de berekeningen gecorrigeerd.

2.4 Metabolietbepaling

Blad- en wortelstalen van 100 mg werden fijngemalen in vloeibaar stikstof. Vervolgens werd het poeder gemengd in 400 µl 6% metafosforzuur en gedurende 15 min gecentrifugeerd aan 13500 rpm bij 4°C. De concentraties aan ascorbaat en glutathion werden bepaald met 'high performance liquid chromatography' (HPLC).

2.5 Bepalen van genexpressie

2.5.1 RNA-isolatie

Blad- en wortelstalen van 100 mg werden in een Rnase-vrije mortier fijngemalen onder ijskoude omstandigheden. Het RNA werd vervolgens geëxtraheerd uit het plantenmateriaal met behulp van de 'Rneasy plant mini kit' (Qiagen, Venlo). Het bekomen RNA werd ingevroren in vloeibaar stikstof en bewaard in de diepvries bij -70°C.

2.5.2 Concentratiebepaling RNA

De hoeveelheid en de zuiverheid van het RNA werden bepaald in de hierboven verkregen extracten en werden gemeten met behulp van de NanoDrop spectrofotometer (ND-1000, Isogen Life Science). Het toestel bepaalt de absorptie van het staal bij 230, 260 en 280 nm. De absorptie van 1 unit bij 260 nm komt overeen met 40 µg RNA/ml. Verder worden de A260/A280 en A260/A230 zuiverheid-ratio's bepaald.

2.5.3 RT-PCR

Met reverse-transcriptase of RT-PCR werd het geëxtraheerde RNA omgezet in cDNA. De RT-PCR werd uitgevoerd met de 'QuantiTect Reverse Transcription Kit' (Qiagen, Venlo). Deze kit beschikt over een extra stap die genomisch DNA verwijderd en maakt gebruik van volgend RT-mengsel: 5 µl gDNA Wipeout buffer, 2.5 µl Quantiscript Reverse Transcriptase (+ RNase inhibitor), 10 µl Quantiscript RT buffer (+ Mg²⁺ en dNTP's), 2.5 µl RT-primer mix en 30 µl staal + RNase en DNase vrij water. Om goede en gelijkwaardige resultaten in de real-time PCR te bekomen, is het belangrijk om te starten met gelijke hoeveelheden RNA (2.5

µg). Tevens werden ook van enkele stalen noRT's gemaakt. Gebruik makend van de iCycler (Biorad, Nazareth) werd volgend programma gelopen voor de aanmaak van het cDNA:

- 12 min bij 42°C: het reverse-transcriptase maakt cDNA
- 3 min bij 95°C: de inactivatie van het reverse-transcriptase

Het bekomen cDNA werd bewaard bij -20°C.

2.5.4 Real-time PCR

Het hierboven bekomen cDNA werd geamplificeerd met behulp van real-time PCR en de hoeveelheid aan gevormd cDNA werd continu gevolgd in de tijd. Deze techniek kan gebruikt worden om de initiële concentratie aan RNA te bepalen. Er bestaat immers een kwantitatieve relatie tussen de hoeveelheid nucleïnezuren aanwezig aan het begin van de PCR-reactie en de hoeveelheid van het product dat geamplificeerd wordt tijdens de exponentiële fase. Bij deze methode van PCR wordt gebruik gemaakt van fluorescente probes om de amplificatie in de tijd te kunnen volgen (Taqman chemistry, Applied Biosystems, Lennik) [44,45].

Een oligonucleotide probe wordt gelabeld met een fluorescent reporter- en een niet-fluorescent quencher-molecule aan elk uiteinde. Wanneer beide labels aanwezig zijn op de probe, wordt de emissie van het reporterlabel gequenched door het quencherlabel. Dit is te wijten aan overdracht van de fluorescentie-energie van de reporter op de quencher, ook wel FRET of 'Fluorescence Resonance Energy Transfer' genoemd. Tijdens elke amplificatiecyclus wordt de reporter aan het 5' uiteinde van de probe eraf geknipt door de 5'-3' exonuclease activiteit van het TaqDNA-polymerase. De emissie van het reporterlabel wordt dan niet meer gequenched door het quencher-molecule en kan dan opgevangen worden door de ABIprism 7000 (Applied Biosystems, Lennik). De hoeveelheid fluorescentie gemeten op een bepaald moment is gerelateerd aan de hoeveelheid van het PCR-product dat wordt gemaakt. Door de hoeveelheid fluorescentie te meten tijdens elke cyclus, kan de hoeveelheid aan PCR-product continu gevolgd worden [44,45].

Een PCR-reactie bestaat uit drie verschillende fasen. Een eerste fase is de exponentiële fase. In deze fase verdubbelt het PCR-product elke cyclus. De reactie is erg specifiek en precies. Een tweede fase is de lineaire fase. Hier worden de reactiecomponenten opgebruikt, begint de reactie te vertragen en worden de producten stilaan afgebroken. Een laatste fase is de plateau fase. De reactie is dan gestopt, er worden geen producten meer aangemaakt en de bestaande

worden afgebroken. Bij voorkeur wordt er dus ook altijd gemeten in de exponentiële fase. In deze fase correleert een stijging in PCR-product met de initiële hoeveelheid bij de start. Des te hoger het aantal kopijen van het cDNA is bij de start, hoe sneller een significante stijging in fluorescentie gedetecteerd zal worden [44,45].

In real-time PCR wordt altijd een drempelwaarde (Ct) bepaald. Dit is het moment waarop een signaal, geassocieerd aan een exponentiële groei van het PCR-product, wordt gedetecteerd (boven een bepaalde detectielimiet komt). Deze drempelwaarde wordt bepaald in de log-lineaire fase na log-transformatie van de oorspronkelijke PCR-grafiek [44,45].

Tijdens elke real-time PCR-reactie wordt er gebruik gemaakt van een huishoudgen. Dit is een gen dat constant tot expressie komt tijdens het experiment. Het huishoudgen wordt gebruikt omdat tijdens elke RT-PCR bepaalde fouten geïntroduceerd worden. Deze zijn te wijten aan kleine verschillen in de starthoeveelheid RNA of verschillen in de efficiëntie van cDNA-synthese en PCR-amplificatie [44,45].

In dit experiment werd de genexpressie van een aantal enzymen, betrokken bij de antioxidatieve verdediging van de cel, nagegaan. Dit zijn catalase 1 (*cat1*), ijzersuperoxidedismutase 1 (*fsd1*), mangaansuperoxidedismutase 1 (*msd1*), koper-zinksuperoxidedismutase 1 en 2 (*csd1* en 2), ascorbaatperoxidase 1 (*apx1*) en glutathionreductase 1 (*gr1*). Ook werd de genexpressie van een tweetal ROS-producerende enzymen bepaald, namelijk lipoxygenase 1 en 2 (*lox 1* en 2) en de NADPH oxidasen C, D en F (*Rboh C, D* en *F*). Als huishoudgen werd gebruik gemaakt van actine (*act2*).

Van de stalen werd eerst een verdunning van 1/4 gemaakt (40 µl staal in 120 µl RNase-vrij water). Vervolgens werd er telkens in duplo 5 µl cDNA-staal gepipetteerd bij 20 µl reactiemix in een 96 well-plaat. De reactiemix bestaat uit: 12.5 µl Taqman Universal Master Mix (2X) (Applied Biosystems, Lennik), 1.25 µl 20X assay mix (dit is het huishoudgen of het gen waar we in geïnteresseerd zijn) (Applied Biosystems, Lennik) en 6.25 µl RNase-vrij water.

In iedere real-time PCR werden ook de noRT-stalen meegenomen, samen met enkele NTC's (non template controls). Deze laatste bevatten wel de reactiemix, maar i.p.v. 5 µl staal werd er 5 µl RNase-vrij water toegevoegd. Er is normaal gezien geen DNA aanwezig en er mag dus ook geen reactie optreden. Als dit wel gebeurt, wijst dat op een contaminatie.

Vervolgens werd de plaat met stalen ingezet in het PCR-apparaat (ABIprism 7000). Het reactievolume werd ingesteld op 25 µl en volgend programma werd gestart:

- 2 min. aan 50°C: verwijdering van dUMP-bevattende PCR-produkten
- 10 min. aan 95°C: activatie TaqDNA-polymerase
- 15 sec. aan 95°C: denaturatie
- 1 min. aan 60°C: annealing primers en extensie
- stap 3 en 4 worden 40 maal herhaald

Aan het einde van de PCR-reactie werden de Ct-waarden verkregen voor het geteste product. De Ct-waarden van het 'gene of interest' werden genormaliseerd t.o.v. het huishoudgen volgens de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -methode van Livak en Schmittgen [46]. Voor de wortelstalen behandeld met Cu was de expressie van het huishoudgen actine niet stabiel. Daarom werden voor deze stalen de ΔC_t -waarden genormaliseerd t.o.v. de cDNA-concentratie.

2.6 Bepalen van enzymcapaciteit

Blad- en wortelstalen van 200 mg werden fijngemalen in 2 ml 0.1M Tris-HCl buffer (pH 7.8), een spatelpunt onoplosbare polyvinylpyrrolidine (PVP) en zand. Vervolgens werd het mengsel afgefilterd en gecentrifugeerd gedurende 10 min aan 13500 rpm bij 4°C. De enzymcapaciteiten, m.a.w. de potentiële activiteit wanneer een overmaat substraat wordt toegevoegd, werden spectrofotometrisch gemeten in het supernatans bij 25°C. Het principe van de enzymmetingen is gebaseerd op de wet van Lambert-Beer. Deze wet stelt dat in het lineaire gebied de concentratieverandering over de tijd recht evenredig is met de absorptieverandering over de tijd mits er rekening gehouden wordt met de extinctiecoëfficiënt ϵ en de weglengte van de cuvet d .

$$\frac{\Delta C}{\Delta t} = \frac{\Delta A}{\Delta t} \cdot \frac{1}{\epsilon \cdot d}$$

De capaciteit van volgende enzymen werd bepaald: superoxidedismutase, catalase, syringaldazineperoxidase, guajacolperoxidase, ascorbaatperoxidase en glutathionreductase.

2.6.1 Superoxidedismutase

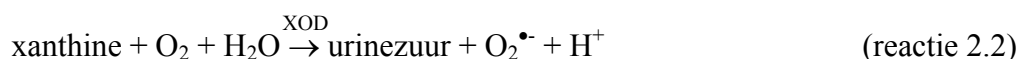
De capaciteit van superoxidedismutase (SOD) werd bepaald bij 550 nm. Het gebruikte reactiemengsel bestond uit volgende componenten: 580 μ l 50mM kaliumfosfaatbuffer (pH

7.8), 100 µl 1mM EDTA, 100 µl 0.5mM xanthine, 100 µl 0.1mM cytochroom c, 100 µl extract en 20 µl xanthine oxidase (XOD).

SOD is verantwoordelijk voor de dismutatie van $O_2^{\bullet-}$ tot H_2O_2 (reactie 2.1):



$O_2^{\bullet-}$ wordt gevormd in de cuvet door toevoeging van xanthine en XOD (reactie 2.2):



Aan de reactie wordt echter ook cytochroom c toegevoegd. Dit reagens heeft dezelfde functie als SOD, namelijk de verwijdering van $O_2^{\bullet-}$ (reactie 2.3):



De analyse van de SOD-capaciteit is gebaseerd op de inhibitie van cytochroom c en wordt berekend a.d.h.v. een blanco staal waar geen extract aan toe werd gevoegd. In het blanco staal is bijgevolg alleen cytochroom c aanwezig dat het gevormde $O_2^{\bullet-}$ kan weg reageren. De andere gemeten stalen bevatten naast het toegevoegde cytochroom c ook SOD. Hierdoor ontstaat er een competitie tussen deze twee om $O_2^{\bullet-}$ te quenchen. De capaciteit van het cytochroom c wordt dan geïnhibeerd t.o.v. het blanco staal. Deze inhibitie wordt vervolgens gevolgd in de tijd en is een maat voor de quenchingcapaciteit van SOD [47].

2.6.2 Catalase

De capaciteit van het catalase (CAT) werd bepaald bij 240 nm. Het gebruikte reactiemengsel bevatte volgende componenten: 730 µl 0.1mM kaliumfosfaatbuffer (pH 7), 170 µl 5mM H_2O_2 en 100 µl extract. Catalase zorgt voor de verwijdering van het H_2O_2 met productie van H_2O (reactie 2.4) [48].



2.6.3 Syringaldazineperoxidase

De capaciteit van het syringaldazineperoxidase (SPOD) werd gemeten aan de hand van de vorming van geoxideerd syringaldazine (SAZ) bij 530 nm. Het reactiemengsel was samengesteld uit 100 µl 10mM H₂O₂, 100 µl extract en 20 µl SAZ toegevoegd aan 780 µl 0.1M trisbuffer (pH 7.5). SPOD zorgt voor de reductie van H₂O₂ tot H₂O waarbij SAZ gebruikt wordt als een substraat dat in deze reactie geoxideerd wordt (reactie 2.5)[49].



2.6.4 Guajacolperoxidase

De capaciteit van het guajacolperoxidase (GPOD) werd bepaald bij 436 nm (vorming van geoxideerd guaiacol) en volgend reactiemengsel werd gebruikt: 750 µl 0.1M kaliumfosfaatbuffer (pH 7), 100 µl 8mM H₂O₂, 50 µl extract en 100 µl 18mM guajacol. GPOD heeft dezelfde functie als SPOD, maar maakt gebruik van guajacol als substraat (reactie 2.6)[48].



2.6.5 Ascorbaatperoxidase

De capaciteit van het ascorbaatperoxidase (APOD) werd gemeten bij 298 nm (vorming van geoxideerd Na-ascorbaat) met volgend reactiemengsel: 665 µl hepes EDTA buffer (pH 7), 100 µl 30mM Na-ascorbaat, 35 µl 20mM H₂O₂ en 200 µl extract. Na-ascorbaat is nodig voor de reductie van H₂O₂ tot H₂O door APOD waarbij het zelf geoxideerd wordt (reactie 2.7) [50].

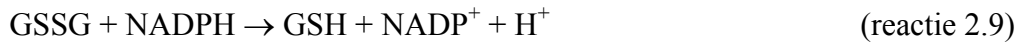


Het geoxideerde Na-ascorbaat kan vervolgens terug gereduceerd worden (reactie 2.8).



2.6.6 Gluthationreductase

De capaciteit van het glutathionreductase (GR) werd gemeten bij 340 nm (vorming van glutathion). Hiervoor werden 17.5 µl GSSG, 17.5 µl NADPH en 150 µl extract opgelost in 815 µl trisbuffer (pH 8). GR reduceert geoxideerd glutathion (GSSG) tot glutathion (GSH) (reactie 2.9) [48].



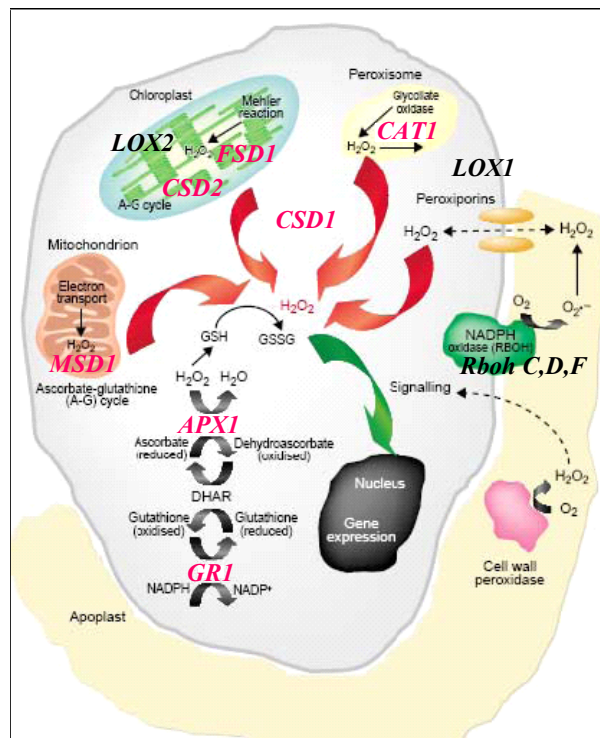
2.7 Statistische analyse

De normaliteit van de data werd nagegaan met behulp van een Shapiro-Wilk test. Wanneer er niet werd voldaan aan deze normaliteitsassumptie, werden de gegevens getransformeerd ($\log^{(x)}$, $1/x$, $\sqrt{x}$). De homoscedasticiteit werd onderzocht met behulp van een Levene test of een residuplot.

De gegevens van het Cu/Cd-experiment werden statistisch geanalyseerd op basis van een t-test. Op de data van de Cu-‘range finding’ werd een linear mixed model toegepast. De nulhypothese werd nagegaan op significantieniveau 0.1, 0.05 en 0.01.

3 Resultaten

In deze studie werden de cellulaire effecten, meer bepaald met betrekking tot oxidatieve stress, onderzocht na toediening van Cu en Cd in *Arabidopsis thaliana* zaailingen. Figuur 3.1 geeft een overzicht van de verschillende parameters die geanalyseerd werden in relatie tot oxidatieve stress waarbij eveneens de lokalisatie is weergegeven van de betrokken enzymen die later in de resultaten besproken zullen worden.



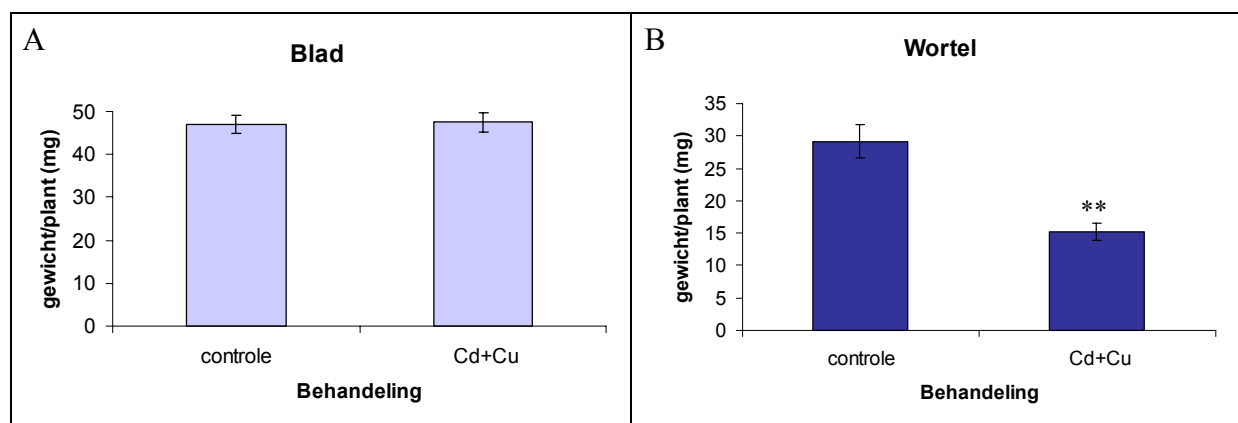
Figuur 3.1: Oxidatieve stress en antioxidatieve verdediging in de plantencel (figuur aangepast uit Neill et al., 2002) [26].

3.1 Cu/Cd-stress bij *Arabidopsis thaliana* in een multipollutiecontext

3.1.1 Groeiparameters van *Arabidopsis thaliana* na behandeling met 10 μ M Cu en Cd

Arabidopsis thaliana zaailingen werden gedurende drie weken gekweekt op hydrocultuur. Vervolgens werden ze voor een periode van 24 uur behandeld met 10 μ M Cu en Cd. Tijdens de oogst werd het gemiddelde gewicht van blaadjes en wortels berekend voor controle en blootgestelde planten (figuur 3.2). Het gewicht van de blaadjes blijkt niet significant verschillend tussen controle en behandelde planten (figuur 3.2A). In de wortels treedt er

echter een duidelijke daling van het gewicht op na blootstelling aan 10 μM Cu en Cd (figuur 3.2B). Het wortelgewicht daalt hier significant van 29 naar 15 mg per plant.



Figuur 3.2: Gewichtsverandering (mg) in blad (A) en wortel (B) van drie weken oude *A. thaliana* zaailingen na blootstelling aan 10 μM Cu en Cd gedurende 24 uur. De weergegeven waarden zijn het gemiddelde $\pm$ S.E. van minstens 16 replica's (significantieniveau: **: $P < 0.05$).

3.1.2 Nutriëntenprofiel van *Arabidopsis thaliana* na behandeling met 10 μM Cu en Cd

Om na te gaan of toediening van 10 μM Cu en Cd de membraanintegriteit aantast in *A. thaliana*, werd de concentratie aan enkele essentiële macro- en micronutriënten in blad en wortel bepaald (tabel 3.1). De concentraties aan Cu en Cd werden eveneens gemeten.

Tabel 3.1: Verandering in elementconcentratie in *A. thaliana* na blootstelling aan Cu en Cd. De concentraties van zowel essentiële macro- en micronutriënten als van Cd en Cu werden bepaald in blad en wortel van drie weken oude *A. thaliana* zaailingen na behandeling met 10 μM Cu en Cd. De concentraties werden uitgedrukt in mg kg^{-1} DG⁻¹ (DG: droog gewicht), ND: niet detecteerbaar. De weergegeven waarden zijn het gemiddelde $\pm$ S.E. van vier onafhankelijke replica's (significantieniveau's: ***: $P < 0.01$; **: $P < 0.05$).

Elementen	Blad		Wortel	
	Controle	Cu+Cd	Controle	Cu+Cd
Mg	10040 $\pm$ 424	7132 $\pm$ 115***	5977 $\pm$ 1620	7798 $\pm$ 2089
K	34857 $\pm$ 607	26649 $\pm$ 1113***	60660 $\pm$ 492	2844 $\pm$ 415***
Ca	33069 $\pm$ 2104	20588 $\pm$ 485***	10666 $\pm$ 3568	18788 $\pm$ 4756
Mn	187 $\pm$ 9	110 $\pm$ 4***	450 $\pm$ 29	213 $\pm$ 42***
Fe	287 $\pm$ 118	122 $\pm$ 12	4756 $\pm$ 1204	9298 $\pm$ 1412**
Cu	10 $\pm$ 1	19 $\pm$ 2***	49 $\pm$ 18	5646 $\pm$ 214***
Zn	54 $\pm$ 2	38 $\pm$ 3***	136 $\pm$ 6	117 $\pm$ 6**
Cd	0,8 $\pm$ 0,3	13 $\pm$ 1***	ND	2143 $\pm$ 68***

In de blaadjes is de concentratie aan Cu en Cd significant toegenomen na behandeling met deze twee metalen. De Cu-concentratie in de blaadjes is verdubbeld terwijl de concentratie

aan Cd met een factor 13 gestegen is. Verder vertonen de blaadjes na blootstelling een significante daling in alle gemeten essentiële elementen behalve voor Fe.

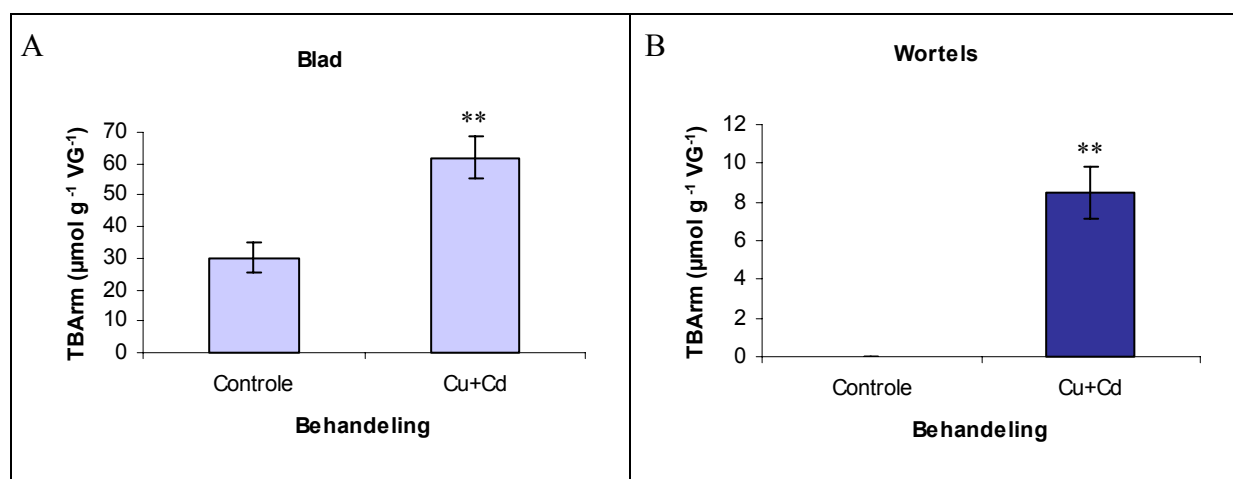
De wortels vertonen eveneens een sterk verhoogde Cu- en Cd-concentratie. De Cu-concentratie neemt significant toe met een factor 115. Voor Cd wordt een stijging opgemerkt van een niet-detecteerbaar niveau naar $2143 \text{ mg kg}^{-1} \text{ DG}^{-1}$. Verder vertoont het essentiële element Fe een significant gestegen concentratie na toediening van Cu en Cd. De concentraties aan K, Mn en Zn zijn daarentegen significant gedaald na blootstelling aan Cu en Cd. Het K-gehalte is het sterkst gedaald met een factor 21. De concentratie aan Mn is met 50% afgenomen.

3.1.3 Effecten op oxidatieve stress gerelateerde parameters in *Arabidopsis thaliana* na behandeling met $10 \mu\text{M}$ Cu en Cd

Om na te gaan hoe een organisme omgaat met metaalgeïnduceerde oxidatieve stress, werd gekeken hoe de verschillende componenten, enzymen en metabolieten, van het antioxidatieve systeem veranderen na blootstelling aan Cu en Cd. Als eerste werd in dit onderzoek de lipidenperoxidatie in blad en wortel bepaald. Vervolgens werden de genexpressie en de activiteit van antioxidatieve enzymen alsook de concentratie van metabolieten zoals ascorbaat en glutathion gemeten. Verder werd eveneens de genexpressie van een aantal ROS-producerende enzymen onderzocht.

Lipidenperoxidatie in *Arabidopsis thaliana* na behandeling met $10 \mu\text{M}$ Cu en Cd

Om de graad van lipidenperoxidatie in de blad- en wortelcellen te bepalen werd het gehalte aan TBA-reactieve componenten zoals MDA spectrofotometrisch gemeten (figuur 3.3).



Figuur 3.3: Lipidenperoxidatie in *A. thaliana* na blootstelling aan Cu en Cd. De meting van de lipidenperoxidatie is gebaseerd op het gehalte aan TBA-reactieve metabolieten in blad (A) en wortel (B), uitgedrukt in $\mu\text{mol g}^{-1}$

VG⁻¹ (VG: vers gewicht). De weergegeven waarden zijn het gemiddelde $\pm$ S.E. van 4 onafhankelijke replica's (significantienniveau's: ***: $P < 0.05$).

Zowel de blaadjes als de wortels vertonen na behandeling met 10 μM Cu en Cd gedurende 24 uur een significante stijging in het aantal TBA-reactieve metabolieten. In de bladeren verdubbelt het gehalte aan deze metabolieten (figuur 3.3A). De wortels vertonen een stijging in het aantal lipidenperoxidatieproducten tot 8.5 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{VG}^{-1}$ (figuur 3.3B). In controleplanten is de lipidenperoxidatie niet-detecteerbaar.

Metabolieten

Het effect van Cu- en Cd-stress op de cellulaire redoxstatus in *A. thaliana* werd nagegaan door de concentratie aan de metabolieten ascorbaat (AsA) en glutathion (GSH) te bepalen na blootstelling aan 10 μM Cu en Cd gedurende 24 uur. Zowel de concentratie van de gereduceerde als van de geoxideerde vorm werden gemeten. Ook de totale concentratie (gereduceerde + geoxideerde vorm) en de redoxstatus (gereduceerde / geoxideerde vorm) werden bepaald (tabel 3.2).

Tabel 3.2: Cellulaire redoxstatus in *A. thaliana* onder Cu/Cd-stress. De metabolietconcentraties ($\text{nmol g}^{-1} \text{VG}^{-1}$) werden bepaald in blad en wortel van drie weken oude *A. thaliana* zaailingen na blootstelling aan 10 μM Cu en Cd gedurende 24 uur. De totale metabolietconcentratie is de som van de gereduceerde en geoxideerde vorm van de metaboliet. De redoxstatus is de ratio tussen de gereduceerde en geoxideerde vorm (AsA: gereduceerd ascorbaat, DHA: dehydroascorbaat of geoxideerd ascorbaat, GSH: gereduceerd glutathion, GSSG: glutathiondisulfide of geoxideerd glutathion). De weergegeven waarden zijn het gemiddelde $\pm$ S.E. van vier onafhankelijke replica's (significantienniveau's: ***: $P < 0.01$; **: $P < 0.05$; *: $P < 0.1$).

Metabolieten	Blad		Wortel	
	Controle	Cu+Cd	Controle	Cu+Cd
AsA + DHA	749 $\pm$ 54	1121 $\pm$ 63 ***	144 $\pm$ 10	23 $\pm$ 0,003 ***
AsA	128 $\pm$ 37	253 $\pm$ 55	24 $\pm$ 24	ND
DHA	621 $\pm$ 39	868 $\pm$ 67 **	120 $\pm$ 31	23 $\pm$ 0,003 *
AsA / DHA	207 $\pm$ 57	305 $\pm$ 79	748 $\pm$ 748	ND
GSH + GSSG	76 $\pm$ 4	82 $\pm$ 4	28 $\pm$ 2	1 $\pm$ 1 **
GSH	0,5 $\pm$ 0,1	1 $\pm$ 0,2 *	0,066 $\pm$ 0,066	ND
GSSG	75 $\pm$ 4	81 $\pm$ 4	28 $\pm$ 2	1 $\pm$ 1 ***
GSH / GSSG	7 $\pm$ 1	15 $\pm$ 3 *	3 $\pm$ 3	ND

In de blaadjes is de concentratie aan dehydroascorbaat (DHA) significant toegenomen na behandeling met Cu en Cd. Dit uit zich ook in de totale AsA-concentratie want deze is eveneens significant verhoogd na toediening van Cu en Cd. De AsA-redoxstatus wordt niet beïnvloed door behandeling met Cu en Cd. De concentratie aan GSH is verdubbeld ($P < 0.1$) na

blootstelling aan Cu en Cd, de glutathiondisulfide (GSSG)- en de totale concentratie zijn echter niet significant toegenomen. De cellulaire redoxstatus voor GSH wordt wel aangetast onder Cu- en Cd-stress. De ratio tussen GSH en GSSG is immers met 50% toegenomen ($P < 0.1$). In de wortels treedt er een omgekeerde situatie op. De concentratie aan DHA is significant afgenomen van 120 tot 23 nmol g⁻¹ VG⁻¹. Deze verandering uit zich ook in de totale AsA-concentratie, die eveneens significant gedaald is. De AsA-redoxstatus lijkt echter niet aangetast te worden. Net als voor AsA zijn de totale GSH- en de GSSG-concentratie beiden significant gedaald met een factor 28. De GSH-redoxstatus wordt niet beïnvloed door Cu- en Cd-stress.

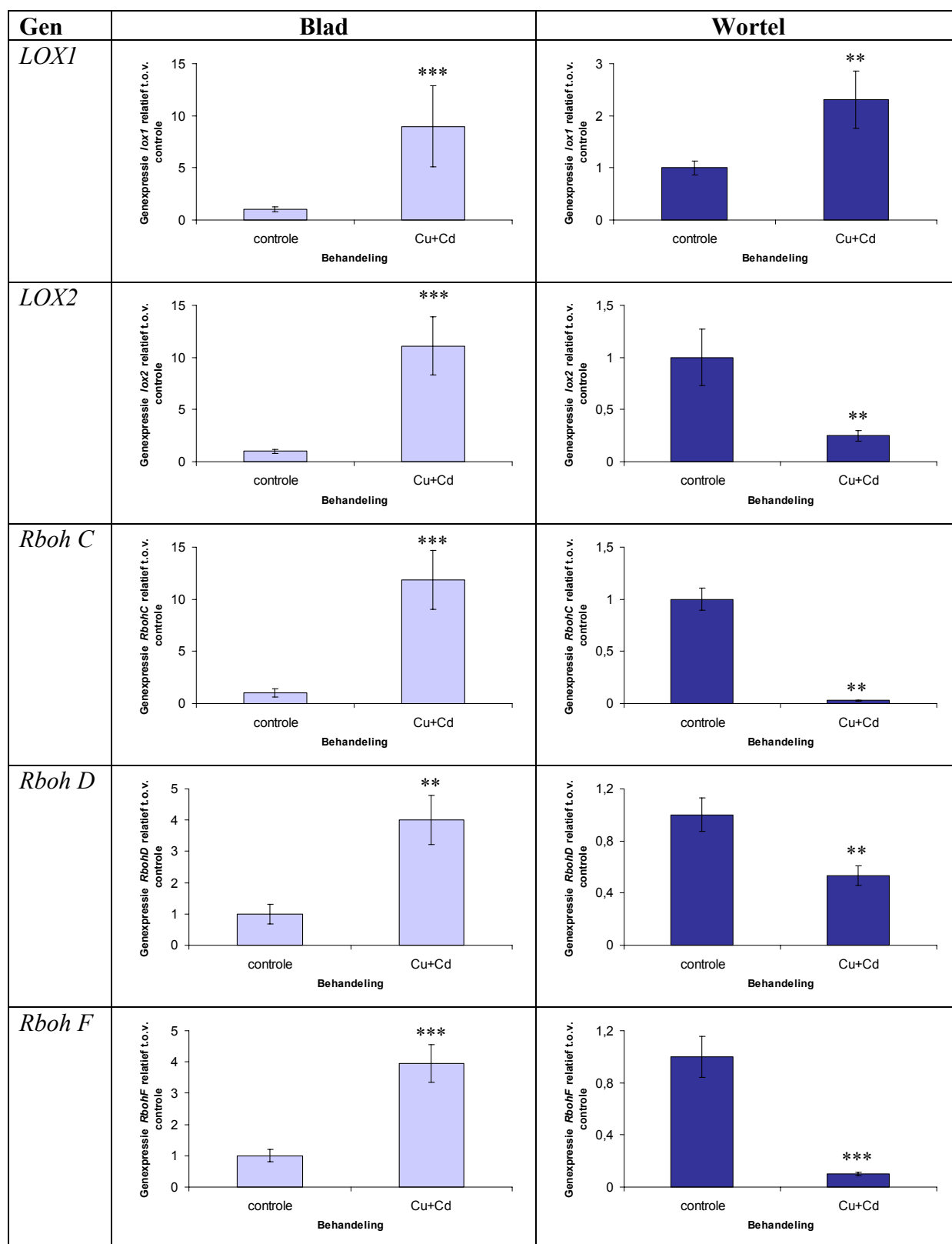
Genexpressie

De genexpressie van een aantal enzymen betrokken bij de ROS-productie en de antioxidatieve verdediging werd nagegaan na blootstelling aan Cu en Cd met behulp van real-time PCR. De genexpressie van ROS en lipidenperoxiden (LPO)-inducerende enzymen zoals de NADPH-oxidasen (*rbohC*, *rbohD*, *rbohF*) en de lipoxygenasen (*lox1*, *lox2*) werden gemeten na behandeling van *A. thaliana* zaailingen met 10 µM Cu en Cd gedurende 24 uur. Deze resultaten zijn weergegeven in figuur 3.4. In de blaadjes is de genexpressie van de ROS-producerende enzymen significant verhoogd na behandeling met Cu en Cd t.o.v. de controleplanten. De grootste stijging in expressie wordt waargenomen voor het *rbohC*- (factor 12) en het *lox2*-gen (factor 11). De expressie van *lox1* neemt toe met een factor 9, *rbohD* en *rbohF* vertonen eenzelfde stijging in expressie (factor 4 à 5).

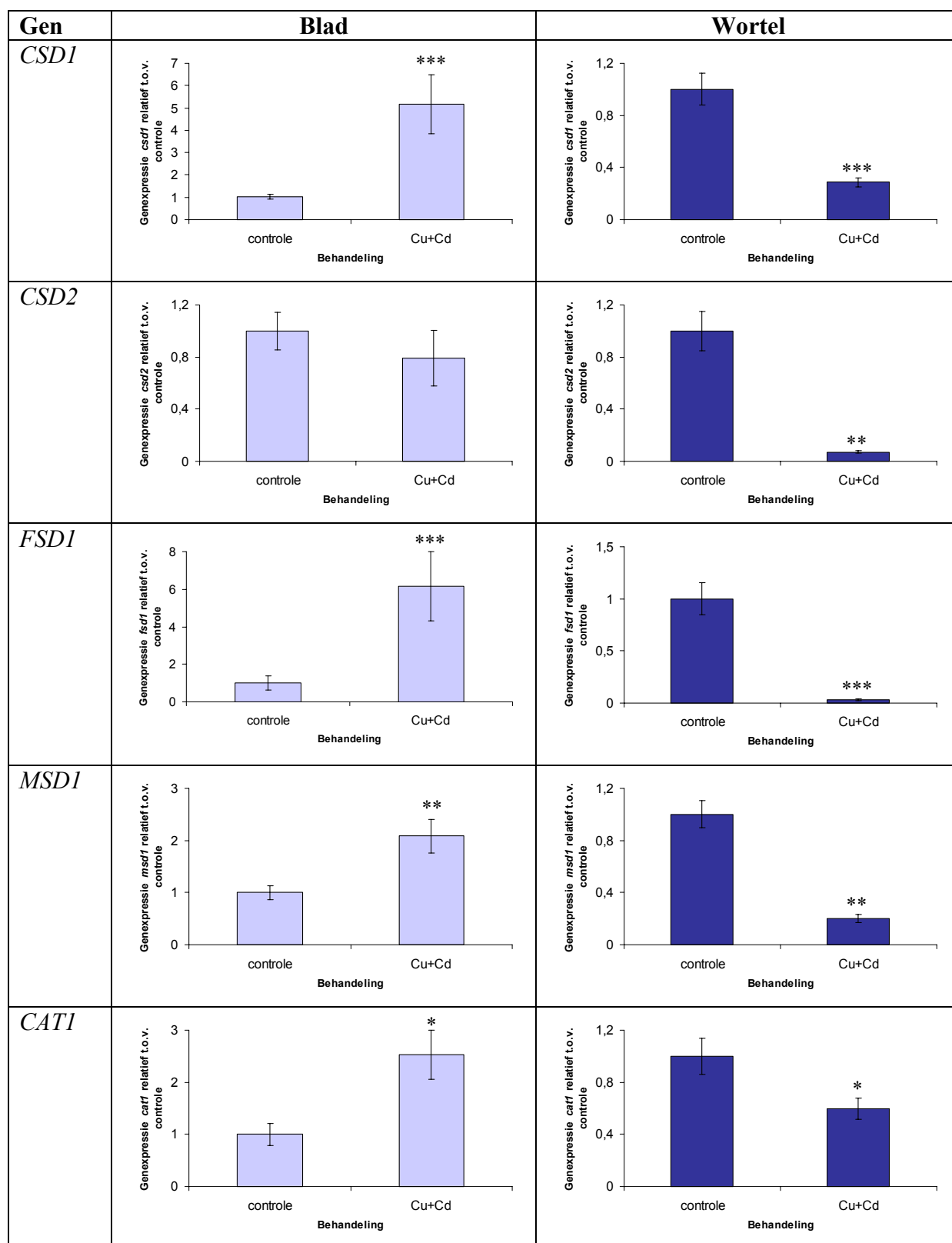
In de wortels daarentegen daalt de expressie van deze genen, behalve voor *lox1*, significant na toediening van 10 µM Cu en Cd. De *lox1*-expressie verdubbelt na behandeling in de wortels ($P < 0.05$), de expressie van *lox2* daarentegen daalt met een factor 5. Van de *rboh*-genen wordt de expressie van het *rbohC* en *F* het sterkst onderdrukt (factor 10). Het *rbohD*-gen vertoont een halvering van de expressie na blootstelling aan Cu en Cd.

Vervolgens werd de genexpressie van enkele O₂^{•-}- en H₂O₂-gevoelige enzymen onderzocht (figuur 3.5). De expressie van *csd1*, *fsd1* en *cat1* wordt sterk geïnduceerd onder Cu- en Cd-stress in de blaadjes met respectievelijk een factor 5 ($P < 0.01$), 11 ($P < 0.01$) en 2.5 ($P < 0.1$). De data tonen ook een verdubbeling in *msd1*-expressie aan ($P < 0.05$). De *csd2*-expressie blijft echter ongeveer constant. In de wortels wordt de expressie van al deze genen significant gehinderd na behandeling met Cu en Cd. De sterkste inhibitie wordt opgemerkt voor *fsd1* (0.03 t.o.v. 1) en *csd2* (0.07 t.o.v. 1). *Csd1* en *msd1* vertonen eenzelfde afname in

genexpressie na blootstelling aan Cu en Cd. Na toediening van Cu en Cd daalt de genexpressie van het *cat1* met 50%.

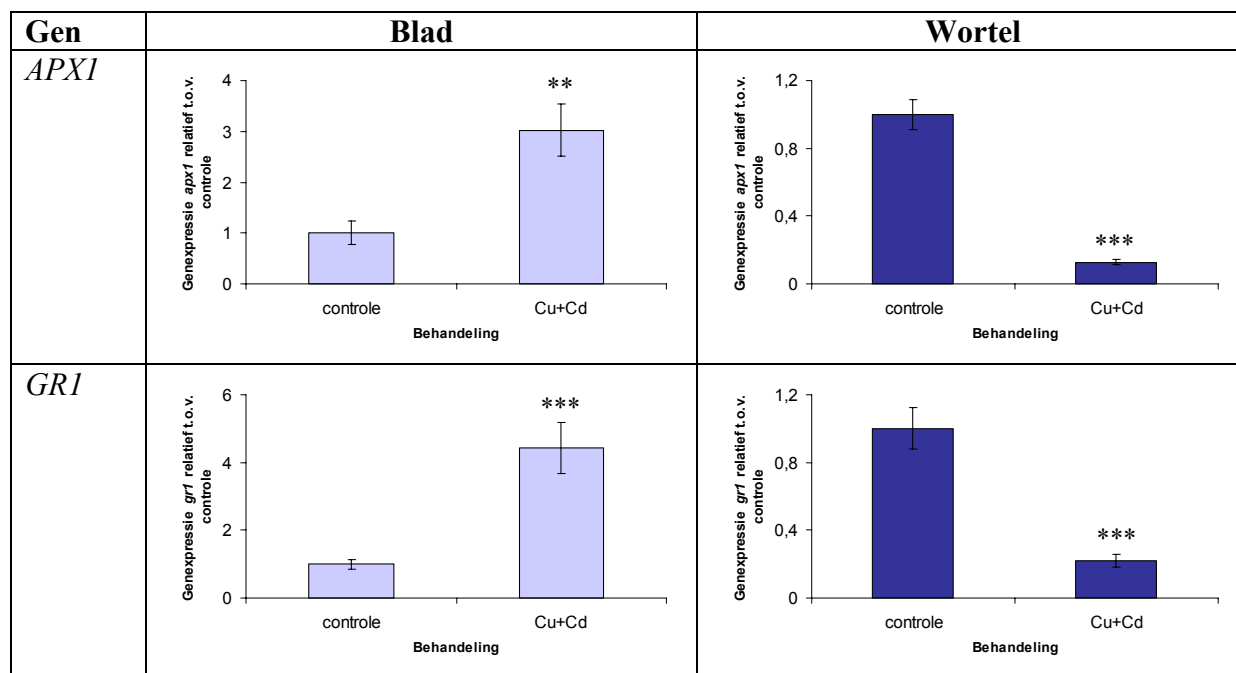


Figuur 3.4: Genexpressie van ROS-producerende enzymen na blootstelling aan Cu en Cd. De genexpressie werd nagegaan met behulp van real-time PCR in drie weken oude *A. thaliana* zaailingen na behandeling met 10 μ M Cu en Cd gedurende 24 uur (lipoxygenasen: *lox1*, *lox2*; NADPH-oxidasen: *rbohC*, *rbohD*, *rbohF*). De waarden zijn het gemiddelde $\pm$ S.E. van 5 onafhankelijke replica's (significantieniveau's: ***: $P < 0.01$; **: $P < 0.05$).



Figuur 3.5: Genexpressie van $O_2^{\bullet-}$ - en H_2O_2 -gevoelige enzymen na blootstelling aan Cu en Cd. De genexpressie werd nagegaan met behulp van real-time PCR in drie weken oude *A. thaliana* zaailingen na behandeling met 10 μ M Cu en Cd gedurende 24 uur (CuZnSOD: *csd1*, *csd2*; FeSOD: *fsd1*; MnSOD: *msd1*; CAT: *cat1*). De waarden zijn het gemiddelde $\pm$ S.E. van 5 onafhankelijke replica's (significantieniveau's: ***: $P < 0.01$; **: $P < 0.05$; *: $P < 0.1$).

Als laatste werd de genexpressie nagegaan van enzymen, die een rol spelen in de ascorbaat-glutathioncyclus (figuur 3.6). De genexpressie van *apx1* en *gr1* is significant toegenomen in de blaadjes onder behandeling met Cu en Cd. De grootste stijging wordt opgemerkt voor *gr1* (4 t.o.v. 1). In de wortels wordt voor beide genen een sterke daling in genexpressie met een factor 10 waargenomen na toediening van 10 μM Cu en Cd ($P < 0.01$).



Figuur 3.6: Genexpressie van enzymen uit de ascorbaat-glutathioncyclus na blootstelling aan Cu en Cd. De genexpressie werd nagegaan met behulp van real-time PCR in drie weken oude *A. thaliana* zaailingen na behandeling met 10 μM Cu en Cd gedurende 24 uur (APOD: *apx1*; GR: *gr1*). De waarden zijn het gemiddelde $\pm$ S.E. van 5 onafhankelijke replica's (significantieniveau's: ***: $P < 0.01$; **: $P < 0.05$).

Enzymen

De enzymcapaciteiten werden spectrofotometrisch bepaald in blad en wortel (tabel 3.3). De metingen zijn gebaseerd op de wet van Lambert-Beer.

In de blaadjes van *A. thaliana* zorgt toediening van 10 μM Cu en Cd gedurende 24 uur voor een inductie van de capaciteit van H_2O_2 -gevoelige enzymen. Hiertoe behoren het SPOD, GPOD en CAT. De capaciteit van het SPOD verdubbelt na behandeling met Cu en Cd t.o.v. de controle ($P < 0.1$). Ook het GPOD vertoont een gestegen capaciteit t.o.v. de controle, 1285 t.o.v. 934 $\text{mU g}^{-1} \text{VG}^{-1}$. Voor het CAT wordt een stijging in capaciteit met 50% van de controlewaarde opgemerkt. Deze stijgingen bleken na statistische analyse echter niet significant omwille van de relatief grote standaardfout. De capaciteit van het $\text{O}_2^{\bullet-}$ -gevoelige enzym SOD blijft constant na behandeling met Cu en Cd.

Blootstelling aan 10 μM Cu en Cd verhoogt ook de capaciteit van twee belangrijke enzymen betrokken in de ascorbaat-glutathioncyclus, namelijk APOD en GR. De APOD-capaciteit neemt toe van 21325 naar 29232 $\text{mU g}^{-1} \text{VG}^{-1}$. De capaciteit van GR stijgt van 83 tot 100 $\text{mU g}^{-1} \text{VG}^{-1}$. Deze toenames bleken eveneens niet significant na statistische analyse.

Tabel 3.3: Enzymcapaciteiten in drie weken oude *A. thaliana* zaailingen na blootstelling aan Cu en Cd. De enzymcapaciteiten werden gemeten in blad- en wortelextracten en uitgedrukt in $\text{mU g}^{-1} \text{VG}^{-1}$ (SOD: superoxidedismutase; SPOD: syringaldazineperoxidase; GPOD: guajacolperoxidase; GR: glutathionreductase; APOD: ascorbaatperoxidase; CAT: catalase). De weergegeven waarden zijn het gemiddelde $\pm$ S.E. van 4 onafhankelijke replica's (significantieniveau's: **: $P < 0.05$; *: $P < 0.1$).

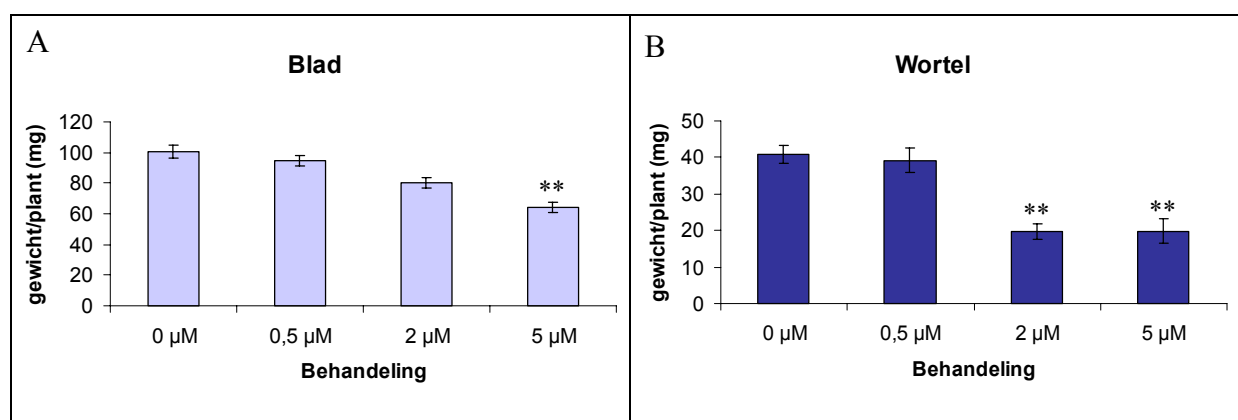
Enzym	Blad		Wortel	
	controle	Cu+Cd	controle	Cu+Cd
SOD	129775 $\pm$ 4273	148628 $\pm$ 13229	138497 $\pm$ 13451	124466 $\pm$ 8916
SPOD	3604 $\pm$ 258	7737 $\pm$ 1521*	7408 $\pm$ 889	5926 $\pm$ 409
GPOD	934 $\pm$ 187	1285 $\pm$ 217	5070 $\pm$ 664	7043 $\pm$ 510*
CAT	545 $\pm$ 81	720 $\pm$ 83	94 $\pm$ 11	71 $\pm$ 17
APOD	21325 $\pm$ 5282	29232 $\pm$ 5396	6942 $\pm$ 1740	3281 $\pm$ 450
GR	83 $\pm$ 2	100 $\pm$ 7	18 $\pm$ 1	12 $\pm$ 2**

In de wortels vertonen de H_2O_2 -gevoelige enzymen, SPOD en CAT, een daling in capaciteit na toediening van 10 μM Cu en Cd, die echter niet statistisch significant is. De GPOD-capaciteit is significant verhoogd na Cu/Cd-behandeling (7043 t.o.v. 5070 $\text{mU g}^{-1} \text{VG}^{-1}$). Het $\text{O}_2^{\bullet-}$ -gevoelige enzym SOD vertoont ook hier een constante capaciteit. De capaciteit van de twee enzymen betrokken in de ascorbaat-glutathioncyclus is eveneens gedaald in de wortel na blootstelling aan 10 μM Cu en Cd. De capaciteit van GR is significant afgenomen met één derde (18 t.o.v. 12 $\text{mU g}^{-1} \text{VG}^{-1}$) terwijl de capaciteit van APOD gehalveerd is na behandeling met Cu en Cd. Deze laatste daling is echter niet statistisch significant.

3.2 Cu-stress (range finding) bij *Arabidopsis thaliana*

3.2.1 Groeiparameters van *Arabidopsis thaliana* na behandeling met 0.5, 2 en 5 μM Cu

Arabidopsis thaliana zaailingen werden gedurende drie weken gekweekt op hydrocultuur en vervolgens voor een periode van 24 uur blootgesteld aan 0.5, 2 en 5 μM Cu. Tijdens de oogst werd het gemiddelde gewicht (mg) van blad en wortel bepaald voor controle en blootgestelde planten (figuur 3.7). Het gewicht van de blaadjes daalt geleidelijk naarmate de concentratie aan Cu toeneemt (figuur 3.7A). Na behandeling met 5 μM Cu bedraagt het gewicht van de blaadjes nog maar 64 mg per plant t.o.v. 101 mg voor de controle ($P < 0.05$). In de wortels blijft het gewicht na behandeling met 0.5 μM Cu gelijk aan het gewicht van de controle om vervolgens na blootstelling aan 2 en 5 μM te dalen tot de helft van het controlegewicht ($P < 0.05$) (figuur 3.7B).



Figuur 3.7: Gewichtsverandering (mg) in blad (A) en wortel (B) van drie weken oude *A. thaliana* zaailingen na blootstelling aan 0.5, 2 en 5 μM Cu gedurende 24 uur. De weergegeven waarden zijn het gemiddelde $\pm$ S.E. van minstens 28 replica's (significatieniveau's: **: $P < 0.05$).

3.2.2 Nutriëntenprofiel van *Arabidopsis thaliana* na behandeling met 0.5, 2 en 5 μM Cu

Na toediening van 0.5, 2 en 5 μM Cu werd nagegaan of het nutriëntenprofiel in *A. thaliana* aangetast wordt. Hiervoor werd de concentratie aan enkele essentiële macro- en micronutriënten in blad en wortel bepaald (tabel 3.4). De concentratie aan Cu werd eveneens gemeten. In de blaadjes is de Cu-concentratie na toediening van 0.5 μM Cu verdubbeld ($P < 0.01$). Na blootstelling aan 2 en 5 μM Cu is het Cu-gehalte eveneens significant gestegen. Verder vertoont het essentiële element kalium een significante daling in concentratie na behandeling met 2 en 5 μM Cu. Het gehalte aan Mg, Ca, Mn en Zn neemt significant af na

toediening van 2 en 5 μM Cu. De Fe-concentratie kent een sterke stijging met meer dan 50% na blootstelling aan 5 μM Cu ($P < 0.05$).

Tabel 3.4: Verandering in elementconcentratie in *A. thaliana* na blootstelling aan Cu en Cd. De concentraties van zowel essentiële macro- en micronutriënten als van Cd en Cu werden bepaald in blad en wortel van drie weken oude *A. thaliana* zaailingen na behandeling met 10 μM Cu en Cd. De concentraties werden uitgedrukt in $\text{mg kg}^{-1} \text{DG}^{-1}$ (DG: droog gewicht), ND: niet detecteerbaar. De weergegeven waarden zijn het gemiddelde $\pm$ S.E. van vier onafhankelijke replica's (significantieniveau's: ***: $P < 0.01$; **: $P < 0.05$; *: $P < 0.1$).

Blad				
Elementen	controle	0,5 μM Cu	2 μM Cu	5 μM Cu
Mg	7311 $\pm$ 62	7188 $\pm$ 131	6197 $\pm$ 95***	6508 $\pm$ 335
K	25609 $\pm$ 599	26368 $\pm$ 1323	21589 $\pm$ 1199*	20806 $\pm$ 583***
Ca	23311 $\pm$ 221	22292 $\pm$ 739	19543 $\pm$ 492***	20553 $\pm$ 771*
Mn	158 $\pm$ 1	158 $\pm$ 5	145 $\pm$ 4*	148 $\pm$ 7
Fe	128 $\pm$ 19	109 $\pm$ 11	130 $\pm$ 23	406 $\pm$ 187**
Cu	5 $\pm$ 0,2	12 $\pm$ 1***	8 $\pm$ 0,8**	8 $\pm$ 0,3***
Zn	38 $\pm$ 1	42 $\pm$ 2	38 $\pm$ 2	32 $\pm$ 1**

Wortel				
Elementen	controle	0,5 μM Cu	2 μM Cu	5 μM Cu
Mg	8370 $\pm$ 263	4767 $\pm$ 969*	8869 $\pm$ 310	7399 $\pm$ 352*
K	46623 $\pm$ 2644	39149 $\pm$ 655*	8049 $\pm$ 607***	3145 $\pm$ 375***
Ca	14935 $\pm$ 481	10385 $\pm$ 1890	19767 $\pm$ 653***	17509 $\pm$ 759*
Mn	403 $\pm$ 56	253 $\pm$ 8	275 $\pm$ 11	199 $\pm$ 25*
Fe	7821 $\pm$ 282	5467 $\pm$ 611	10080 $\pm$ 453	9097 $\pm$ 558
Cu	15 $\pm$ 0,1	392 $\pm$ 41**	1464 $\pm$ 44***	3307 $\pm$ 168***
Zn	110 $\pm$ 9	113 $\pm$ 12	182 $\pm$ 49	98 $\pm$ 2

De wortels vertonen eveneens een significant gestegen Cu-concentratie na behandeling met 0.5, 2 en 5 μM Cu. Na toediening van 5 μM Cu is de concentratie toegenomen met een factor 220. Van de essentiële elementen daalt het K-gehalte significant na blootstelling aan 0.5, 2 en 5 μM Cu. De concentratie aan Mn en Mg is na toediening van 5 μM Cu ook significant afgenomen. De Ca-concentratie stijgt na behandeling met 2 en 5 μM Cu significant van 14935 $\text{mg kg}^{-1} \text{DG}^{-1}$ tot 19767 en 17509 $\text{mg kg}^{-1} \text{DG}^{-1}$ respectievelijk.

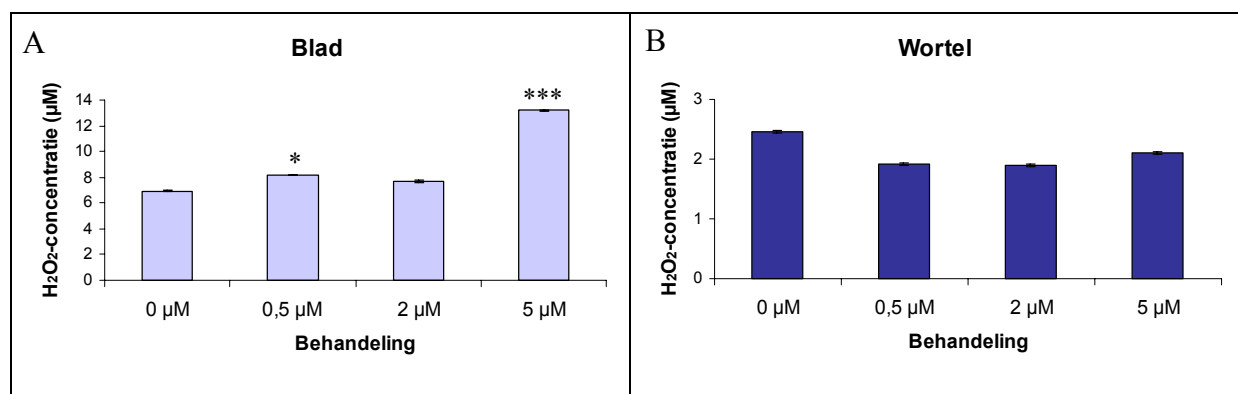
3.2.3 Effecten op oxidatieve stress gerelateerde parameters in *Arabidopsis thaliana* na behandeling met 0.5, 2 en 5 μM Cu

De waterstofperoxideconcentratie en de graad van lipidenperoxidatie werden eerst bepaald. Vervolgens werden de genexpressie en de activiteit van antioxidatieve enzymen (alsook de

concentratie van metabolieten zoals ascorbaat en glutathion) gemeten. Verder werd eveneens de genexpressie van een aantal ROS-producerende enzymen bepaald.

Waterstofperoxideconcentratie in *Arabidopsis thaliana* na behandeling met 0.5, 2 en 5 μM Cu

Na behandeling met Cu werd de concentratie aan waterstofperoxide (H_2O_2) in blad- en wortelcellen fluorimetrisch bepaald (figuur 3.8).



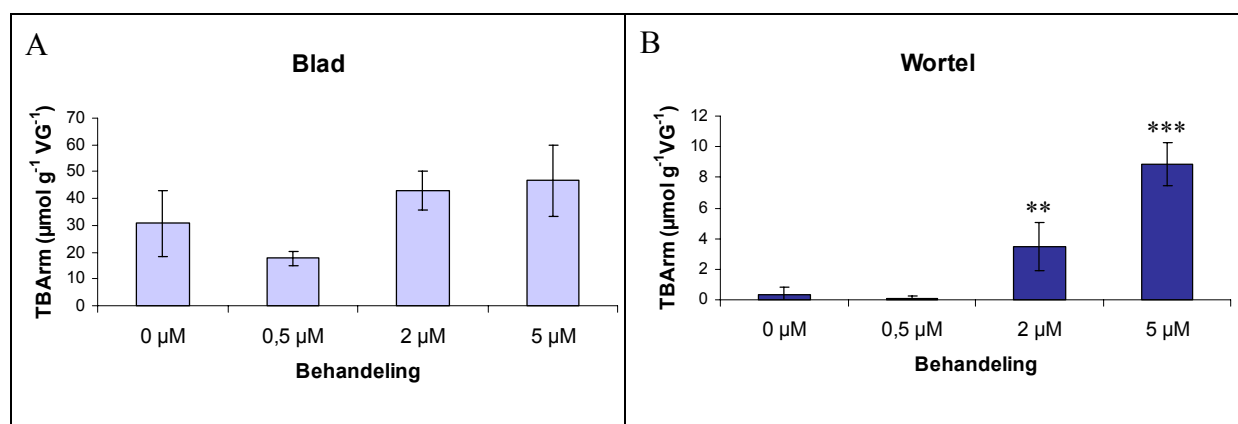
Figuur 3.8: Waterstofperoxidecontent in *A. thaliana* zaailingen na blootstelling aan 0.5, 2 en 5 μM Cu. De H_2O_2 -concentratie werd fluorimetrisch bepaald in blad (A) en wortel (B), uitgedrukt in μM . De weergegeven waarden zijn het gemiddelde $\pm$ S.E. van 3 onafhankelijke replica's (significantieniveau's: ***: $P < 0.01$; *: $P < 0.1$).

De blaadjes vertonen een lichte significante stijging in H_2O_2 -concentratie na behandeling met 0.5 μM Cu. Na blootstelling aan 5 μM verdubbelt de concentratie aan H_2O_2 in de cel ($P < 0.01$). In de wortels werden geen significante verschillen in H_2O_2 -concentratie aangetroffen na toediening van Cu.

Lipidenperoxidatie in *Arabidopsis thaliana* na behandeling met 0.5, 2 en 5 μM Cu

De lipidenperoxidatie in de blad- en wortelcellen werd bepaald door het gehalte aan TBA-reactieve componenten zoals MDA spectrofotometrisch te meten (figuur 3.9).

In de blaadjes daalt de lipidenperoxidatie na behandeling met 0.5 μM Cu met 50% (figuur 3.9A). Na toediening van 2 en 5 μM Cu stijgt het gehalte aan TBA-reactieve metabolieten tot respectievelijk 43 en 47 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{VG}^{-1}$, dit is hoger dan het aantal lipidenperoxidatieproducten in controleplanten (31 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{VG}^{-1}$). Door de relatief grote standaardfout van de controle werden er echter geen statistisch significante verschillen gevonden. De wortels vertonen nauwelijks lipidenperoxidatie in controle-omstandigheden en na behandeling met 0.5 μM Cu (figuur 3.9B). Na blootstelling aan 2 en 5 μM Cu stijgt de lipidenperoxidatie significant met respectievelijk een factor 4 en 9.



Figuur 3.9: Lipidenperoxidatie in *A. thaliana* zaailingen na blootstelling aan 0.5, 2 en 5 µM Cu. De meting van de lipidenperoxidatie is gebaseerd op het gehalte aan TBA-reactieve metabolieten in blad (A) en wortel (B), uitgedrukt in µmol g⁻¹ VG⁻¹ (VG: vers gewicht). De weergegeven waarden zijn het gemiddelde ± S.E. van 4 onafhankelijke replica's (significantieniveau's: ***: P<0.01; **: P<0.05).

Genexpressie

Met behulp van real-time PCR werd de genexpressie van een aantal enzymen betrokken in ROS-productie en de antioxidatieve verdediging onderzocht na blootstelling aan Cu. De expressie van ROS en LPO-inducerende enzymen zoals de NADPH-oxidasen (*rbohC*, *rbohD*, *rbohF*) en de lipoxygenasen (*lox1*, *lox2*) werden gemeten na behandeling met 0.5, 2 en 5 µM Cu. De resultaten hiervan zijn weergegeven in figuur 3.10.

De expressie van de lipoxygenasen *lox1* en *lox2* in de blaadjes van *A. thaliana* verhoogt significant na toediening van 2 en 5 µM Cu. Bij beide concentraties is de expressie van het *lox1* verdubbeld, de expressie van *lox2* is met een factor 4 toegenomen. De *rboh*-genen *C* en *F* vertonen geen significante verschillen in genexpressie na behandeling met Cu. De expressie van *rbohD* is daarentegen significant gestegen na Cu-toediening. Bij 0.5 µM Cu is de genexpressie verdubbeld. Na blootstelling aan 2 en 5 µM is de expressie toegenomen met een factor 4.

In de wortels wordt de genexpressie van *lox1* sterk geïnduceerd na toediening van Cu. De expressie van *lox1* stijgt significant met een factor 20 na blootstelling aan 0.5 en 5 µM Cu en met een factor 40 na toediening van 2 µM Cu. De *lox2*-expressie wordt eveneens gestimuleerd door een behandeling met 0.5 µM Cu (meer dan verdubbeld, P<0.01). Bij 2 en 5 µM Cu is de expressie echter significant gedaald. Van de *rboh*-genen wordt de expressie van het *rbohC*-gen het sterkst onderdrukt. Na toediening van 0.5 en 2 µM Cu daalt de expressie significant tot minder dan de helft van de controle. Bij 5 µM Cu wordt de genexpressie volledig geïnhibeed. De expressie van het *rbohF* blijft constant na behandeling met 0.5 µM

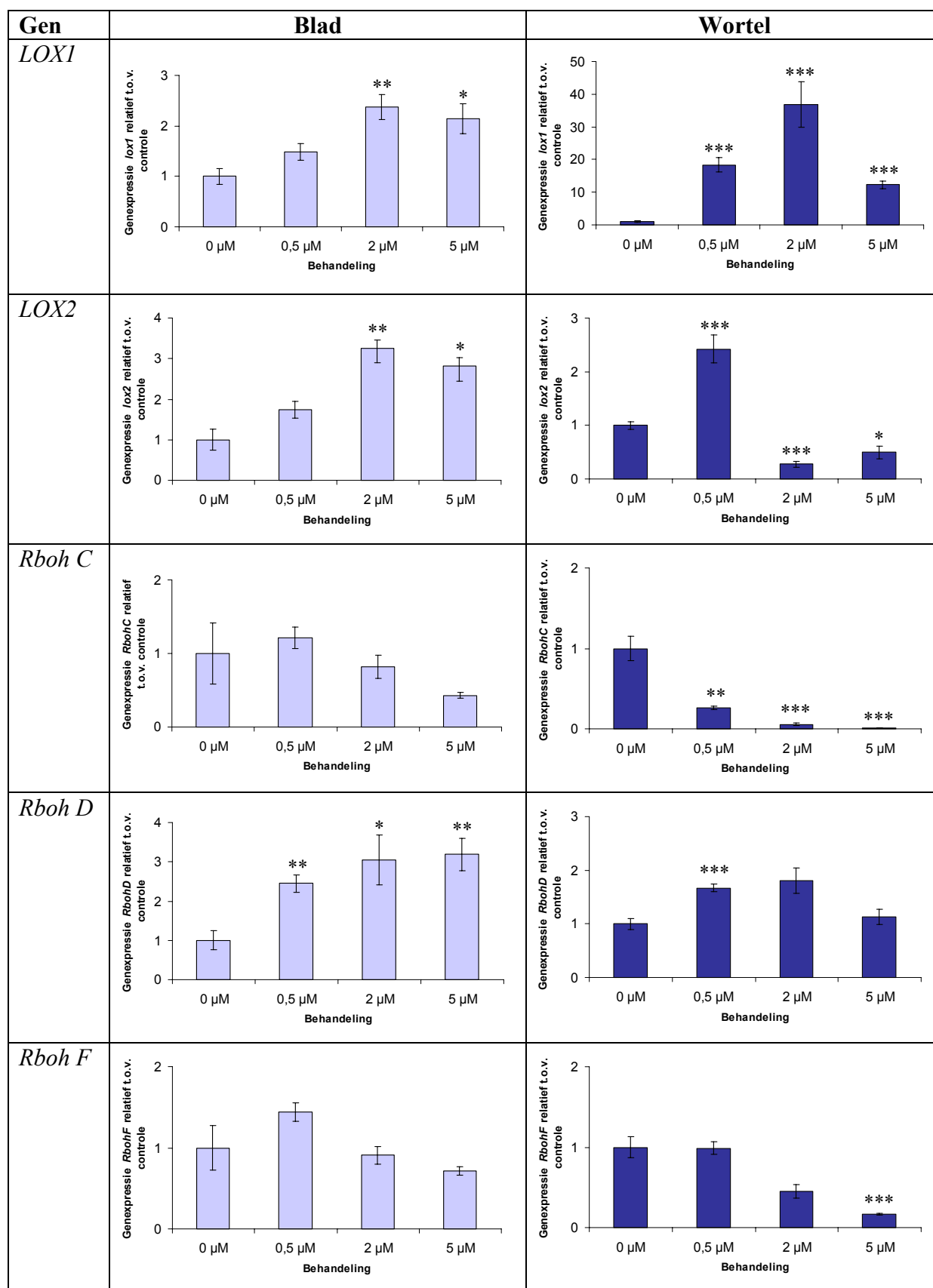
Cu. Na blootstelling aan 2 en 5 μM Cu neemt de expressie af met respectievelijk een factor 2 en 5. Enkel de gedaalde expressie na toediening van 5 μM Cu is statistisch significant. Het *rbohD* vertoont een significante toename van de expressie met de helft van de controlewaarde bij 0.5 μM Cu. Bij behandeling met 2 μM Cu wordt eveneens een stijging waargenomen, weliswaar niet significant. Na toediening van 5 μM Cu is de expressie terug gelijk aan die van de controle.

Vervolgens werd de genexpressie van enkele $\text{O}_2^{\bullet-}$ - en H_2O_2 -gevoelige enzymen onderzocht (figuur 3.11). De $\text{O}_2^{\bullet-}$ -gevoelige enzymen *csd1*, *csd2* en *msd1* vertonen in de blaadjes eenzelfde expressiepatroon na blootstelling aan Cu. Na toediening van 0.5 en 2 μM Cu stijgt de genexpressie van *csd1* significant met respectievelijk een factor 3 en 5. Bij 5 μM Cu is de expressie toegenomen met een factor 3. Deze stijging is echter niet significant wegens een te grote standaardfout. Voor *csd2* en *msd1* werden geen statistisch significante verschillen opgemerkt. Het *fsd1* daarentegen vertoont een significant onderdrukte expressie na toediening van Cu. De expressie van het H_2O_2 -gevoelige enzym, *cat1*, vertoont geen significante verschillen na behandeling met Cu.

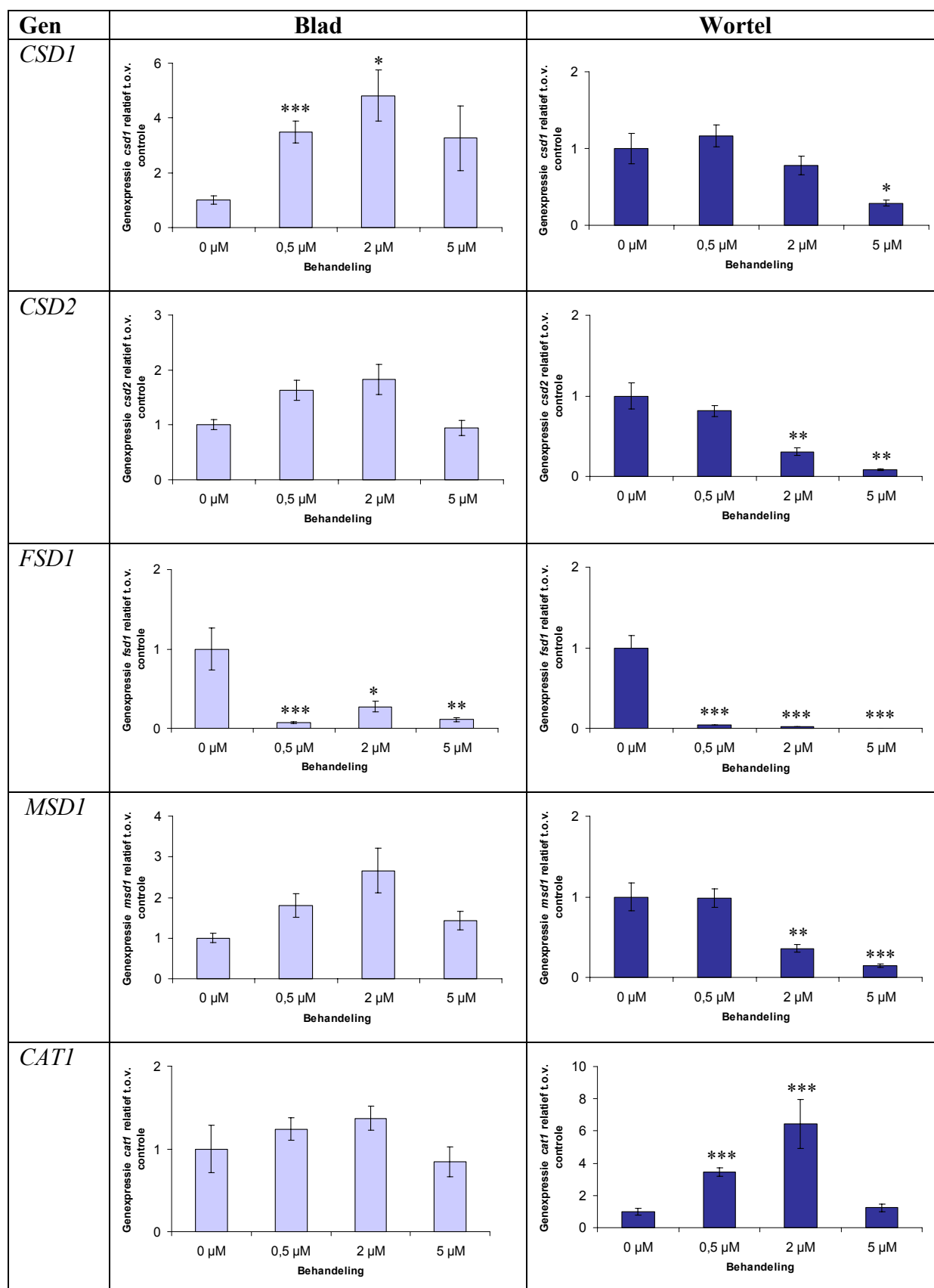
In de wortels blijft de genexpressie van *csd1*, *csd2* en *msd1* ongeveer gelijk aan de controle na toediening van 0.5 μM Cu. Bij blootstelling aan 2 en 5 μM Cu neemt de expressie van deze genen significant af. De expressie van *fsd1* wordt na behandeling met Cu volledig onderdrukt ($P < 0.01$). *Cat1* vertoont een tegengesteld expressiepatroon. De genexpressie stijgt significant met een factor 3 en 6 na toediening van respectievelijk 0.5 en 2 μM Cu. Bij 5 μM Cu blijft de expressie gelijk aan de controle.

Als laatste werd de genexpressie nagegaan van enzymen, die een rol spelen in de ascorbaat-glutathioncyclus (figuur 3.12). In de blaadjes stijgt de expressie van *apx1* significant na toediening van 2 en 5 μM Cu. *Gr1* vertoont geen statistisch significante verschillen in genexpressie na behandeling met Cu.

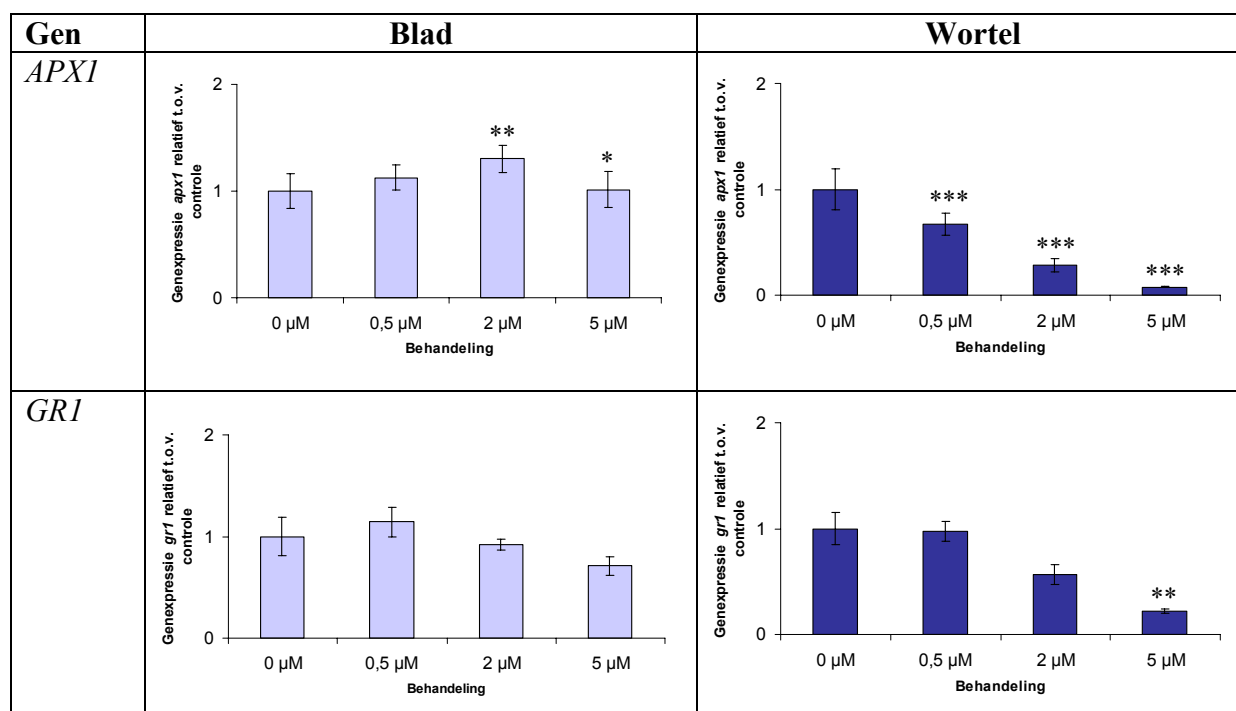
De wortels geven een gedaalde expressie van beide genen weer. Na behandeling met 2 en 5 μM Cu is de expressie van *apx1* afgenomen tot minder dan de helft van de controlewaarde. De *gr1*-genexpressie blijft constant en gelijk aan de controle na blootstelling aan 0.5 μM Cu maar daalt na behandeling met 2 en 5 μM Cu ($P < 0.05$).



Figuur 3.10: Genexpressie van ROS-producerende enzymen na blootstelling aan Cu en Cd. De genexpressie werd nagegaan met behulp van real-time PCR in drie weken oude *A. thaliana* zaailingen na behandeling met 0.5, 2 en 5 µM Cu gedurende 24 uur (lipoxygenasen: *lox1*, *lox2*; NADPH oxidasen: *rbohC*, *rbohD*, *rbohF*). De waarden zijn het gemiddelde $\pm$ S.E. van 5 onafhankelijke replica's (significantieniveau's: ***: $P < 0.01$; **: $P < 0.05$; *: $P < 0.1$).



Figuur 3.11: Genexpressie van $O_2^{\bullet-}$ - en H_2O_2 -gevoelige enzymen na blootstelling aan Cu en Cd. De genexpressie werd nagegaan met behulp van real-time PCR in drie weken oude *A. thaliana* zaailingen na behandeling met 0.5, 2 en 5 μ M Cu gedurende 24 uur (CuZnSOD: *csd1*, *csd2*; FeSOD: *fsd1*; MnSOD: *msd1*; CAT: *cat1*). De waarden zijn het gemiddelde $\pm$ S.E. van 5 onafhankelijke replica's (significantieniveau's: ***: $P < 0.01$; **: $P < 0.05$; *: $P < 0.1$).



Figuur 3.12: Genexpressie van enzymen uit de ascorbaat-glutathioncyclus na blootstelling aan Cu en Cd. De genexpressie werd nagegaan met behulp van real-time PCR in drie weken oude *A. thaliana* zaailingen na behandeling met 0.5, 2 en 5 μM Cu gedurende 24 uur (APx: *apx1*; GR: *gr1*). De waarden zijn het gemiddelde $\pm$ S.E. van 5 onafhankelijke replica's (significantienniveaus: ***: $P < 0.01$; **: $P < 0.05$; *: $P < 0.1$).

Enzymen

De enzymcapaciteiten werden spectrofotometrisch bepaald in blad en wortel (tabel 3.5). De metingen zijn gebaseerd op de wet van Lambert-Beer.

Behandeling van drie weken oude *A. thaliana* zaailingen met Cu gedurende 24 uur stimuleert de capaciteit van de H_2O_2 -gevoelige enzymen SPOD, GPOD en CAT in de blaadjes. De capaciteit van SPOD blijft na blootstelling aan 0.5 en 2 μM Cu ongeveer gelijk aan de capaciteit in controleplanten (5484 en 5866 mU g⁻¹ VG⁻¹ t.o.v. 5822 mU g⁻¹ VG⁻¹). Pas na toediening van 5 μM Cu treedt er een lichte stijging op in de capaciteit van SPOD. GPOD vertoont een lichte toename van de capaciteit na behandeling met 2 en 5 μM Cu. Deze stijgingen zijn statistisch echter niet significant. De CAT-capaciteit stijgt bij 0.5 μM Cu en is verdubbeld na blootstelling aan 2 en 5 μM Cu. Bij deze laatste concentratie is de verandering in capaciteit statistisch significant bevonden. Het $O_2^{\bullet-}$ -gevoelige enzym SOD vertoont een constante capaciteit na toediening van Cu.

De capaciteit van één enzym uit de ascorbaat-glutathioncyclus, nl. GR is eveneens verhoogd na behandeling met Cu. De GR-capaciteit blijft gelijk aan de controle na toediening van 0.5

μM en $2 \mu\text{M}$ Cu maar is significant toegenomen bij $5 \mu\text{M}$ Cu (96 t.o.v. $76 \text{ mU g}^{-1} \text{ VG}^{-1}$). APOD vertoont geen significante verschillen in capaciteit voor alle toegediende concentraties.

Tabel 3.5: Capaciteiten van antioxidatieve enzymen in *A. thaliana* zaailingen na blootstelling aan 0,5, 2 en $5 \mu\text{M}$ Cu. De enzymcapaciteiten werden gemeten in blad- en wortelextracten en uitgedrukt in $\text{mU g}^{-1} \text{ VG}^{-1}$ (SOD: superoxidedismutase; SPOD: syringaldazineperoxidase; GPOD: guajacolperoxidase; GR: glutathionreductase; APOD: ascorbaatperoxidase; CAT: catalase). De weergegeven waarden zijn het gemiddelde $\pm$ S.E. van 4 onafhankelijke replica's (significantienniveau's: ***: $P < 0.01$; **: $P < 0.05$).

Blad				
Enzym	controle	$0,5 \mu\text{M Cu}$	$2 \mu\text{M Cu}$	$5 \mu\text{M Cu}$
SOD	74363 ± 20119	90834 ± 11594	83008 ± 13651	102071 ± 16338
SPOD	5822 ± 569	5484 ± 1264	5866 ± 310	6668 ± 710
GPOD	2091 ± 278	1987 ± 383	2774 ± 93	2524 ± 166
CAT	121 ± 20	183 ± 32	237 ± 82	$244 \pm 21^{**}$
APOD	12867 ± 2701	14808 ± 2139	19423 ± 3760	16701 ± 2030
GR	76 ± 4	75 ± 5	89 ± 5	$96 \pm 2^{**}$
Wortel				
Enzym	controle	$0,5 \mu\text{M Cu}$	$2 \mu\text{M Cu}$	$5 \mu\text{M Cu}$
SOD	165828 ± 16327	176642 ± 9509	180793 ± 8210	180809 ± 13618
SPOD	10682 ± 317	11132 ± 944	15091 ± 1644	10614 ± 1392
GPOD	16612 ± 994	20760 ± 1197	9831 ± 3987	19115 ± 5823
CAT	76 ± 10	83 ± 5	53 ± 4	$31 \pm 5^{**}$
APOD	5883 ± 395	5928 ± 439	$2384 \pm 263^{***}$	$3174 \pm 350^{***}$
GR	24 ± 3	24 ± 2	25 ± 1	18 ± 2

In de wortels wordt de capaciteit van de H_2O_2 -gevoelige enzymen eveneens gestimuleerd na behandeling met Cu, hoewel niet altijd significant. De GPOD-capaciteit is gestegen bij 0,5 en $5 \mu\text{M}$ Cu. CAT vertoont een constant gebleven capaciteit na blootstelling aan $0,5 \mu\text{M}$ Cu maar bij hogere Cu-concentraties treedt er een daling op in de capaciteit die significant is bij een toediening van $5 \mu\text{M}$ Cu. Hier is de capaciteit immers met de helft gedaald. De capaciteit van het SPOD stijgt licht na toediening van $2 \mu\text{M}$ Cu. Voor het $\text{O}_2^{\bullet-}$ -neutraliserende enzym SOD blijft de capaciteit constant onder Cu-behandeling. Eén van de enzymen uit de ascorbaat-glutathioncyclus vertoont een geïnhibeerde capaciteit na blootstelling aan Cu. De APOD-capaciteit is gelijk aan de controle na blootstelling aan $0,5 \mu\text{M}$ Cu maar daalt significant tot de helft van de controlewaarde bij 2 en $5 \mu\text{M}$ Cu. De capaciteit van GR blijft constant na toediening van de verschillende concentraties Cu.

4 Conclusie en discussie

In deze studie werd gekeken naar het ontstaan en de detoxificatie van ROS in de cel onder Cu-stress enerzijds en in een multipollutiecontext samen met Cd-stress anderzijds. Hiervoor werden *Arabidopsis thaliana* zaailingen gedurende drie weken gekweekt op hydrocultuur en vervolgens behandeld met verschillende concentraties Cu en Cd. In een eerste experiment werden de plantjes gedurende 24 uur blootgesteld aan 10 μM Cu en Cd. Tijdens een tweede experiment werden ze behandeld met verschillende concentraties Cu, namelijk 0.5, 2 en 5 μM . Hierna werd de cellulaire respons van de plantjes op de metaalstress nagegaan op moleculair en biochemisch niveau.

Oxidatieve stress als modulator in Cu- en Cd-toxiciteit in een multipollutiecontext

Uit de resultaten van het Cu/Cd-experiment blijkt dat in de wortels van *A. thaliana* na behandeling met 10 μM Cu en Cd zowel de Cu-concentratie als de concentratie aan Cd in de cel enorm gestegen zijn. Toch is het gehalte aan Cu in de wortels veel meer toegenomen dan de concentratie aan Cd. In de blaadjes valt op dat de Cd-concentratie een grotere stijging ondergaat dan het gehalte aan Cu. De resultaten uit deze studie werden vervolgens vergeleken met eerdere experimenten waar 10 μM Cu en Cd afzonderlijk werden toegediend [51]. Uit deze vergelijking blijkt dat de effecten die worden opgemerkt in de wortels van *A. thaliana* vooral overeenkomen met de effecten veroorzaakt door toediening van Cu alleen in de vorige experimenten. In de blaadjes lijken de effecten op de plant vooral veroorzaakt te worden door Cd.

In de wortels van *A. thaliana* is de concentratie aan Cu enorm gestegen. Cu is een redoxactief metaal dat in staat is om de productie van ROS te katalyseren [4]. Deze ROS kunnen vervolgens reageren met PUFA's zoals linol- en linoleenzuren in celmembranen. Dit verschijnsel wordt lipidenperoxidatie genoemd [19,29]. De lipidenperoxidatie werd bepaald door het gehalte aan TBA-reactieve metaboliëten te meten. De significante stijging in het aantal lipidenperoxidatieproducten wijst op een sterk verhoogde lipidenperoxidatie na toediening van Cu en Cd. Naast ROS geïnduceerde lipidenperoxidatie, kan de gestegen lipidenperoxidatie ook gedeeltelijk enzymatisch veroorzaakt worden door lipoxygenasen [28]. Lipoxygenase 1 is een enzym dat voorkomt in het plasmamembraan en oxidatiereacties katalyseert onder stresscondities zoals aanvallen door pathogenen en contact met zware

metalen [52]. De expressie van *lox1* wordt sterk gestimuleerd onder Cu- en Cd-stress. Als gevolg van de lipidenperoxidatie, treedt er membraandestabiliteit op. Deze wordt gereflecteerd in de enorm gedaalde kaliumconcentratie in wortelcellen na behandeling met Cu en Cd. Het afgenomen kaliumgehalte wijst erop dat de membranen van de wortelcellen lek geraken door de schade afkomstig van de lipidenperoxidatie. De afname van een aantal andere essentiële elementen in de wortel ondersteunt deze verklaring maar kan ook veroorzaakt worden door een inhibitie van de genexpressie van *rbohC* onder Cu-stress. Dit enzym is een NADPH-oxidase en is verantwoordelijk voor de vorming van de wortelharen waarlangs nutriënten worden opgenomen door de plant [53]. Door de inhibitie van de genexpressie van dit enzym wordt de wortelhaarvorming verstoord en de nutriëntenopname gehinderd. Een ander gevolg van de lipidenperoxidatie is het ontstaan van oxylipinen. Deze oxylipinen en vooral degenen die behoren tot de familie van de jasmonaten hebben een belangrijke functie als inter- en intracellulaire signaalmoleculen. Zij zijn betrokken in alarmresponsen onder stresscondities. Mogelijk zijn dit belangrijke signaalroutes onder Cu- en Cd-stress [54].

De wortelcellen krijgen dus af te rekenen met een hoge concentratie aan ROS die schade berokkenen aan DNA, proteïnen en membranen. Deze geoxideerde toestand wordt verduidelijkt door de resultaten van de metaboliëtbepaling die een verstoring van de redoxbalans weergeven. Hieruit blijkt immers dat de antioxidatieve metaboliëten ascorbaat en glutathion vooral in hun geoxideerde vorm voorkomen. Vervolgens werd daarom het effect van Cu- en Cd-toediening op het antioxidatief systeem onderzocht. Hiervoor werden de capaciteit en de genexpressie van enzymen uit de antioxidatieve verdediging bepaald. Uit de resultaten van deze bepalingen blijkt dat de antioxidatieve verdediging in de wortelcellen onderdrukt wordt door toediening van Cu en Cd. Van alle enzymen blijft alleen de capaciteit van het SOD constant onder Cu- en Cd-stress. De andere enzymen uit de antioxidatieve verdediging vertonen een daling in capaciteit. Ook de genexpressie van deze enzymen wordt onderdrukt na behandeling met Cu en Cd. Uit deze resultaten kan besloten worden dat gezamenlijke toediening van Cu en Cd een duidelijk negatief effect uitoefent op het antioxidatief verdedigingsmechanisme in wortelcellen waardoor deze cellen niet meer in staat zijn de geproduceerde ROS te neutraliseren en oxidatieve beschadiging van de cellen niet voorkomen kan worden.

Cu en Cd verstoren ook het transport van elementen naar de bladeren [2,15]. Dit uit zich in een gedaalde concentratie aan essentiële elementen in de bladcellen. De Cu-concentratie neemt maar beperkt toe in de blaadjes. De Cd-concentratie kent er een grotere ‘root-to-shoot’ ratio. Bijgevolg is de productie van ROS in de blaadjes rechtstreeks door Cu lager dan in de wortels en worden ROS eveneens geproduceerd door de NADPH-oxidasen C, D en F, die gelokaliseerd zijn in het plasmamembraan [53]. De genexpressie van deze drie enzymen is namelijk significant verhoogd onder Cu- en Cd-stress. Verhoogde ROS-productie aan het plasmamembraan, leidt bijgevolg tot een toename in lipidenperoxidatie, doch in mindere mate dan in de wortels. Ook in de blaadjes wordt de gestegen lipidenperoxidatie gedeeltelijk veroorzaakt door de upregulatie van de genexpressie van de lipoxygenasen 1 en 2 [52]. Reactieve zuurstofvormen gevormd door de NADPH-oxidasen D en F spelen ook een rol in de ABA-signaling. Het resultaat hiervan is een sluiting van de huidmondjes en een inhibitie van de transpiratie [53].

Dat de ROS-productie in de blaadjes beduidend minder toeneemt onder gezamenlijke Cu- en Cd-stress dan in de wortels wordt ook duidelijk wanneer de resultaten van de metaboliëtbepaling worden bekeken. De gereduceerde vorm van het glutathion verdubbelt na behandeling met Cu en Cd terwijl het gehalte aan de geoxideerde vorm min of meer hetzelfde blijft. Voor ascorbaat is er geen verschil in de redoxbalans zichtbaar. Dit wijst erop dat de antioxidatieve verdediging van de cel nog goed functioneert en de gevormde ROS nog efficiënt geneutraliseerd kunnen worden. Bewijs hiervan wordt gevonden in de enzym- en genexpressiedata. Bij de enzymen blijft de capaciteit van SOD constant. Die van de andere enzymen stijgt. De genexpressie van alle enzymen betrokken bij de antioxidatieve verdediging wordt eveneens gestimuleerd onder Cu- en Cd-stress. Wat ook opvalt is dat de enzymcapaciteit van SOD constant blijft na behandeling met Cu en Cd maar dat er wel verschillen waar te nemen zijn voor de verschillende isozyemen op transcriptioneel niveau. De genexpressie van *csd1*, *msd1* en *fsd1* wordt gestimuleerd na blootstelling aan Cu en Cd. *Csd2* vertoont echter een expressie die gelijk blijft.

Er kan besloten worden dat na toediening van 10 μ M Cu en Cd, Cu vooral zal accumuleren in de wortels van de plant terwijl de stijging in Cd-concentratie voornamelijk tot uiting komt in de blaadjes. Bijgevolg is in de wortels vooral Cu verantwoordelijk voor de toxische cellulaire effecten op de plant. In de blaadjes worden deze effecten vooral veroorzaakt door Cd-toxiciteit en speelt Cu een minder belangrijke rol. Uit deze experimenten blijkt ook dat Cu

veel toxischer is voor de cel dan Cd. De cellulaire schade is immers veel groter in de wortels dan in de blaadjes. De toxische effecten van Cu op de cel zijn voornamelijk het gevolg van de vorming van hydroxylradicalen en de daardoor ontstane lipidenperoxidatie. Onder Cd-stress zijn vooral de ROS-productie door NADPH-oxidasen en de lipidenperoxidatie geïnitieerd door lipoxygenasen belangrijke toxiciteitsmechanismen.

Oxidatieve stress als modulator in Cu-toxiciteit

Omdat uit vorige experimenten gebleken is dat toediening van 10 μM Cu zeer toxisch is voor de cel, werd er een 'Cu-range finding' uitgevoerd. Drie weken oude *A. thaliana* zaailingen werden gedurende 24 uur blootgesteld aan 0.5, 2 en 5 μM Cu. Vervolgens werd de respons op moleculair en biochemisch niveau nagegaan.

Uit de resultaten van deze studie blijkt dat toediening van 2 en 5 μM Cu in de wortels leidt tot een sterk verhoogde lipidenperoxidatie en dus ook een toegenomen productie van ROS. De productie van ROS is voor een deel afkomstig van de reacties die Cu kan katalyseren als redoxactief metaal. Dit wordt bevestigd door de resultaten van de waterstofperoxidemetingen, die in de blaadjes een sterke stijging in H_2O_2 -concentratie aantonen na behandeling met 5 μM Cu. Dat er in de wortels geen verschil zichtbaar is in de concentratie aan H_2O_2 is waarschijnlijk te wijten aan het feit dat H_2O_2 onder de erge stress in de wortels andere reacties kan katalyseren met de productie van hydroxylradicalen. Bijgevolg zullen de ROS in de wortels vooral voorkomen in de vorm van $\text{HO}^\bullet$ -radicalen. Dit zal in de toekomst geverifieerd worden met EPR-metingen. Het NADPH-oxidase D kan echter ook gedeeltelijk verantwoordelijk zijn voor de ROS-vorming want de genexpressie van dit enzym kent een upregulatie onder Cu-stress [2]. Verder kan de stimulatie van de lipoxygenase genexpressie door Cu bijdragen tot de lipidenperoxidatie [3]. De genexpressie van het *lox1* – dit enzym is gelokaliseerd in het plasmamembraan - stijgt immers met een factor 35 na toediening van 2 μM Cu. *Lox2* –plastidaal gelokaliseerd- vertoont ook een toegenomen expressie na behandeling met 0.5 μM Cu net als *rbohD*. Deze stijging in expressie leidt echter niet tot een verhoogde lipidenperoxidatie bij deze concentratie. Waarschijnlijk is dit het gevolg van een nog goed functionerend antioxidatief verdedigingssysteem na toediening van 0.5 μM Cu.

Een gestegen lipidenperoxidatie in de wortels veroorzaakt een destabilisatie van het membraan. Dit uit zich in een sterk afgenomen kaliumconcentratie in de wortelcellen. De expressie van *rbohC*, verantwoordelijk voor de wortelhaarvorming wordt eveneens

onderdrukt na behandeling met 5 μM Cu. Hierdoor kan de vorming van de wortelharen belemmerd worden en daalt de nutriëntenopname door de wortel [53].

Lipidenperoxidatie en bijgevolg cellulaire beschadiging treedt in de wortels pas op na toediening van 2 en 5 μM Cu. Dit betekent dat de componenten van het antioxidatief systeem na behandeling met 0.5 μM Cu de geproduceerde ROS nog efficiënt kunnen neutraliseren. Bij hogere Cu-concentraties is dit echter niet meer het geval. Bij deze concentraties worden de capaciteit en genexpressie van enzymen betrokken bij de antioxidatieve verdediging van de cel onderdrukt. Wanneer deze enzymen niet meer optimaal werken om de gevormde ROS te neutraliseren, neemt de concentratie aan deze radicalen in de cel toe en kan schade niet meer voorkomen worden. Wat ook opvalt is dat de enzymcapaciteit van SOD net als in voorgaande experimenten constant blijft voor alle toegediende Cu-concentraties maar dat de genexpressie van de verschillende isozymen wel afneemt na behandeling met 2 en 5 μM Cu. Deze afname in genexpressie heeft geen gevolgen voor de capaciteit van het enzym omdat $\text{O}_2^{\bullet-}$ heel snel spontaan dismuteert tot H_2O_2 [20,24]. De concentratie aan $\text{O}_2^{\bullet-}$ in de cel hoeft dus niet sterk te stijgen na behandeling met Cu en kan vervolgens gelijk blijven aan de concentratie in controle omstandigheden. In dit geval zal er inderdaad geen verschil in de enzymcapaciteit van SOD te zien zijn. Een gelijkaardig effect is zichtbaar voor CAT. De capaciteit van dit H_2O_2 -gevoelige enzym daalt sterk na toediening van 2 en 5 μM Cu maar de genexpressie verhoogd significant bij 2 μM Cu. Dit betekent waarschijnlijk dat het aangemaakte mRNA niet vertaalt wordt naar een enzym.

In de blaadjes wordt de expressie van *rbohD* sterk verhoogd na blootstelling aan Cu en veroorzaakt een toename in de ROS-productie [53]. Dit wordt verduidelijkt door de waterstofperoxidemetingen. De resultaten tonen een verdubbelde H_2O_2 -concentratie aan na behandeling met 5 μM Cu. Het resultaat van deze verhoogde concentratie aan ROS is een gestegen lipidenperoxidatie bij 2 en 5 μM Cu. Een deel van deze lipidenperoxidatie is opnieuw gedeeltelijk te wijten aan de verhoogde genexpressie van de lipoxygenasen *lox 1* en *2* onder Cu-stress [52]. De lipidenperoxidatie in de blaadjes kent een minder sterke stijging dan deze in de wortels. Dit effect kan verwacht worden op basis van de aanwezige Cu-concentraties in de blaadjes en is verder duidelijk af te leiden uit de enzym- en genexpressie data. Deze tonen immers aan dat de antioxidatieve verdediging in de blaadjes nog goed in staat is om de geproduceerde ROS efficiënt te verwijderen. De capaciteiten van de enzymen betrokken in de antioxidatieve verdediging van de cel verhogen na toediening van 2 en 5 μM Cu. Ook de genexpressie van deze enzymen is toegenomen of blijft constant onder Cu-stress.

Opvallend is dat de capaciteit van SOD weer constant blijft na toediening van verschillende concentraties Cu. In de genexpressie van de verschillende isozyemen worden er opnieuw verschillen opgemerkt. De expressie van het *csd1*, gelokaliseerd in het cytoplasma, is significant toegenomen met een factor 3 en 5 na behandeling met respectievelijk 0.5 en 2 μ M Cu. Het *fsd1* – een plastidaal enzym – vertoont daarentegen een sterk onderdrukte genexpressie na blootstelling aan Cu. Voor *msd1* – een mitochondriaal enzym – en *csd2*, een enzym gelokaliseerd in de chloroplast, werden geen statistisch significante verschillen gevonden in genexpressie.

Uit bovenstaande gegevens en uit de resultaten van eerdere experimenten [51] kan besloten worden dat Cu na toediening vooral accumuleert in de wortels en maar een klein gedeelte terecht komt in de blaadjes. Tevens is het transport van nutriënten van de wortel naar het blad verstoord. Bijgevolg is de toxiciteit veroorzaakt door Cu groter in de wortels dan in de blaadjes. Deze toxiciteit wordt in de eerste plaats veroorzaakt door de reactieve zuurstofvormen, die Cu als redoxactief metaal kan katalyseren. De activatie van NADPH-oxidasen en lipxygenasen onder Cu-stress is een bijkomend mechanisme dat verantwoordelijk kan zijn voor de Cu-toxiciteit.

Tot slot kan gesteld worden dat Cu als redoxactief, essentieel element reeds bij lage concentraties cellulaire veranderingen in oxidatieve stress gerelateerde parameters teweeg brengt. Verder is duidelijk dat Cd via andere mechanismen oxidatieve stress induceert. In de toekomst is het dan ook van essentieel belang dat de regulatiemechanismen voor metaalstress ontrafeld worden zowel bij enkelvoudige vervuiling als in een multipollutiecontext.

Referenties

- [1] Friberg L, Elinder CG, Kjellström T, Nordberg GF. Cadmium: Uses, Occurrence and intake. In: Cadmium and Health: a toxicological and epidemiological appraisal (volume I). Boca Raton (FL): CRC Press;1985, p.23-65.
- [2] Benavides MP, Gallego SM, Tomaro ML. Cadmium toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 2005;17(1):21-34.
- [3] Nordberg GF. Cadmium and health in the 21st century – historical remarks and trends for the future. *Biometals* 2004;17:485-489.
- [4] Yruela I. Copper in plants. *Braz. J. Physiol.* 2005;17(1):145-156.
- [5] Satarug S, Baker JR, et al. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupational exposed population. *Toxicol. Lett.* 2003;137:65-83.
- [6] Järup L, Berglund M, Elinder CG, Nordberg G, Vather M. Health effects of cadmium exposure – a review of the literature and a risk estimate. *Scand. J. Work Environ. Health* 1998;24(suppl):1-52.
- [7] World Health Organization (WHO) (Geneva 1992). Environmental Health Criteria 134-Cadmium International Programme on Chemical safety (IPCS) Monograph.
- [8] Friberg L, Elinder CG, Kjellström T, Nordberg GF. Respiratory Effects. In: Cadmium and health: a toxicological and epidemiological appraisal (volume II). Boca Raton (FL): CRC Press;1985, p.1-21.
- [9] Bell RR, Soliman MMRI, Nonavinakere VK, Hammerbeck DM, Early JL. Selenium and cadmium induced pulmonary functional impairment and cytotoxicity. *Toxicol. Lett.* 1997;90:107-114.
- [10] Friberg L, Elinder CG, Kjellström T, Nordberg GF. Renal Effects. In: Cadmium and health: a toxicological and epidemiological appraisal (volume II). Boca Raton (FL): CRC Press;1985, p.21-111.
- [11] Bernard A. Renal dysfunction induced by cadmium: biomarkers of critical effects. *Biometals* 2004;17:519-523.
- [12] Kazantis G. Cadmium, osteoporosis and calcium metabolism. *Biometals* 2004;17:493-498.
- [13] Toxicologic profile for copper. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. September 2004.
- [14] World Health Organization (WHO) (Geneve, 1998). Environmental Health Criteria 200 – Copper, International Programme on Chemincal Safety (IPCS).
- [15] Das P, Samantaray S, Rout GR. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environ. Pollut.* 1997;98(1):29-36.
- [16] Schützendübel A, Polle A. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J. Exp. Bot.* 2002;53(372):1351-1365.
- [17] Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. Toxic metals and oxidative stress Part I: Mechanisms involved in metal induced oxidative damage. *Curr. Top. Med. Chem.* 2001;1:529-539.
- [18] Sorg O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *C.R. Biologies* 2004;327:649-662.
- [19] Arora A, Sairam RK, Srivastava GC. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science* 2002;82(10):1227-1238.
- [20] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 2002;7(9):405-410.
- [21] Kehrer JP. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 2000;149:43-50.

- [22] Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 2004;9(10):490-498.
- [23] Tena G, Asai T, Chiu WL, Sheen J. Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2001;4:392-400.
- [24] Jonak C, Nakagami H, Hirt H. Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium. *Plant Physiol.* 2004;136:3276-3283.
- [25] Laloi C, Apel K, Danon A. Reactive oxygen signalling : the latest news. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2004;7:323-328.
- [26] Neill S, Desikan R, Hancock J. Hydrogen peroxide signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2002;5:388-395.
- [27] Foyer CH, Noctor G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol. Plant.* 2003;119:355-364.
- [28] Skórzynska-Polit E, Pawlikowska-Pawlega B, Szczuka E, Drazkiewicz M, Zbigniew K. The activity and localization of lipoxygenases in *Arabidopsis thaliana* under cadmium and copper stress. *Plant Growth Regulation* 2006;48:29-39.
- [29] Mithöfer A, Schulze B, Boland W. Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS Lett.* 2004;566:1-5.
- [30] Hall JL. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 2002;53(366):1-11.
- [31] Zenk MH. Heavy metal detoxification in higher plants-a review. *Gene* 1996;179:21-30.
- [32] Cobbett CS. Phytochelatin and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol.* 2000;123:825-832.
- [33] Alscher RG, Erturk N, Heath LS. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 2002;53(372):1331-1341.
- [34] Alscher RG, Donahue JL, Cramer CL. Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. *Physiol. Plant.* 1997;100:224-233.
- [35] Clijsters H, Cuypr A, Vangronsveld J. Physiological responses to heavy metals in higher plants; Defence against oxidative stress. *Z. Naturforsch* 1999;54c:730-734.
- [36] Asada K. Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.* 1992;85:235-241.
- [37] Alscher RG, Hess JL. Ascorbic acid. In: *Antioxidants in Higher Plants*. Boca Raton (FL): CRC Press;1993, p.31-58.
- [38] Smirnoff N. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Ann. Bot.* 1996;78:661-669.
- [39] Alscher RG, Hess JL. Glutathione. In: *Antioxidants in Higher Plants*. Boca Raton (FL): CRC Press;1993, p.1-30.
- [40] Alscher RG. Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. *Physiol. Plantarum* 1989;77:457-464.
- [41] Alscher RG, Hess JL. Vitamine E, α -Tocopherol. In: *Antioxidants in Higher Plants*. Boca Raton (FL): CRC Press;1993, p.111-134.
- [42] Alscher RG, Hess JL. Carotenoids. In: *Antioxidants in Higher Plants*. Boca Raton (FL): CRC Press;1993, p.59-90.

- [43] Dhindsa RS, Plumb-Dhindsa P, Thorpe TA. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J. Exp. Bot.* 1981;32:93-101.
- [44] Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 2000;25:169-193.
- [45] Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* 2005;39(1):1-11.
- [46] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods* 2001;25:402-408.
- [47] McCord J, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuperein (hemocuperein). *J. Biol. Chem.* 1969;244:6049-6055.
- [48] Bergmeyer HU, Gawenn K, Grassl M. Enzymes as biochemical reagents. In: *Methods in enzymatic analysis*. Academic Press, New York;1974:p.425-522.
- [49] Imberty A, Goldberg R, Catesson AM. Tetramethylbenzidine and Para-Phenylenediamine-Pyrocatechol for peroxidase histochemistry and biochemistry – 2 new, non-carcinogenic chromogens for investigating lignification process. *Plant Science Letters* 1984;35:103-108.
- [50] Gerbling KP, Kelly GJ, Fischer KH, Latzko E. Partial purification and properties of soluble ascorbate peroxidases from pea leaves. *J. Plant Physiol.* 1984;115:59-67.
- [51] Cuypers A, Smeets K, Ruytinx J, Horemans N, Vanhoudt N, Van Sanden Suzy, et al. Oxidative stress as a modulator in Cd en Cu toxicity in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant. Physiol.* (submitted).
- [52] Porta H, Rocha-Sosa M. Plant lipoxygenases: physiological and molecular features. *Plant Physiol.* 2002;130:15-21.
- [53] Torres MA, Dangl JL. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2005;8:397-403.
- [54] Farmer EE, Alméras E, Krishnamurthy V. Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2003;6:372-378.

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 en uw akkoord te verlenen.

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

Oxidatieve stress als modulator in metaaltoxiciteit

Richting: **Master in de biomedische wetenschappen**

Jaar: **2006**

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

Deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt houdt in dat ik/wij als auteur de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij kan reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

U bevestigt dat de eindverhandeling uw origineel werk is, en dat u het recht heeft om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. U verklaart tevens dat de eindverhandeling, naar uw weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

U verklaart tevens dat u voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen hebt verkregen zodat u 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 u als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze licentie

Ik ga akkoord,

Kelly OPDENAKKER

Datum: