

Cadmium-geïnduceerde oxidatieve stress

De rol van ascorbaatperoxidase 1

Milan Geybels

promotor :
Prof. dr. Ann CUYPERS

Inhoudsopgave

1	Inleiding.....	1
1.1	Cadmium in planten	1
1.1.1	Biobeschikbaarheid.....	1
1.1.2	Opname en distributie	2
1.1.3	Translocatie	2
1.1.4	Symptomen van toxiciteit	3
1.2	Redoxbiologie.....	4
1.2.1	Zuurstofradicalen en verwante vormen	4
1.2.2	Productie van reactieve zuurstofvormen.....	4
1.2.3	Schade door vrije radicalen en andere reactieve zuurstofvormen	5
1.2.4	Detoxificatie van reactieve zuurstofvormen.....	6
1.2.5	Signaalgeving door ROS.....	7
1.3	Ascorbaatperoxidase 1	8
1.4	Onderzoeksvragen en objectieven.....	8
2	Materiaal en methoden	10
2.1	Plantenmateriaal	10
2.2	Groeiexperiment op verticale agarplaten.....	10
2.3	Groei in hydrocultuur	10
2.4	Analyse van genexpressie van pro- en antioxidatieve genen	11
2.4.1	Clusteranalyse	12
2.5	Analyse van activiteiten van antioxidatieve enzymen.....	12
2.6	Analyse van redoxkoppels met een centrale rol in het antioxidatief systeem.....	13
2.6.1	Opmerkingen bij de recent beschreven methode voor analyse van redoxkoppels.....	15
2.7	Statistische analyse	16
3	Resultaten.....	17
3.1	Groeiexperiment op verticale agarplaten.....	17
3.2	Testexperiment groei in hydrocultuur.....	18
3.3	Analyse van genexpressie van pro- en antioxidatieve genen	18
3.4	Clusteranalyse	23
3.5	Analyse van activiteiten van antioxidatieve enzymen.....	24
3.6	Analyse redoxkoppels met een centrale rol in het antioxidatief systeem	25
4	Discussie	27
4.1	Effect van cadmium-geïnduceerde oxidatieve stress op wildtype <i>Arabidopsis thaliana</i>	27

4.2	De rol van ascorbaatperoxidase 1 tijdens cadmium-geïnduceerde oxidatieve stress	30
4.2.1	Wortelgroei en biomassa bovengrondse delen	31
4.2.2	De oxidatieve stresssignatuur	31
4.3	Coregulatie van genen tijdens cadmiumstress	35
4.4	Verder onderzoek.....	36
5	Conclusie	37

Lijst met afkortingen

$^1\text{O}_2$: singlet zuurstof
AO: ascorbaatoxidase
ADH: alcoholdehydrogenase
APX: ascorbaatperoxidase
ASA: ascorbaat
ATP: adenosinetriphosfaat
CAT: catalase
cDNA: copy DNA
Col: Columbia
CSD: CuZnSOD
DCPIP: dichlorophenolindophenol
DHA: dehydroascorbaat
DHAR: dehydroascorbaatreductase
DNA: desoxyribonucleïnezuur
DTNB: 5,5'-dithiobis(2-nitro-benzoic acid)
DTT: dithiothreitol
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
Epje: Eppendorf®-buisje
FSD: FeSOD
Glucose-6-fosfaat: G6P
Glucose-6-fosfaat-dehydrogenase: G6PDH
GR: glutathionreductase
GSH: glutathion
GSSG: glutathiondisulfide
 H_2O_2 : waterstofperoxide
HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HSP: heat shock protein
KO: knock-out. In deze tekst wordt met 'KO' de KO-*apx1* bedoeld.
LOX: lipoxygenase
MES: 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
MDAR: monodehydroascorbaatreductase
MDHA: monodehydroascorbaat
MSD: MnSOD
NAD: nicotinamide adenine dinucleotide
NADP: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NTB: 2-nitro-5-thiobenzoate
 $\text{O}_2^{\cdot-}$: superoxide radicaal
 OH^{\cdot} : hydroxylradicaal
ONOOH: salpeterzuur
PC: fytochelatine
PMS: phenazinemethosulfaat
PUFA: polyonverzadigde vetzuren
RBOH: respiratory burst oxidase homologue of NADPH oxidase
 RO_2^{\cdot} : peroxy
ROS: reactieve zuurstofvormen
Rpm: omwentelingen per minuut
SN: significantieniveau
SOD: superoxide dismutase
Tris: tris(hydroxymethyl)aminomethane
UV: ultraviolet
VIS: zichtbaar licht
VPD: 2-vinylpyridine
WS: Wassilewskija
WT: wildtype
XOD: xanthineoxidase
ZIP: ZRT1/IRT1-like proteïns

Dankwoord

Deze eindverhandeling is het resultaat van heel wat praktisch werk, waarbij ik heb kunnen samenwerken met verschillende personen. Via deze weg wil ik hen kort bedanken.

Ik heb het geluk gehad om op heel wat 'begeleiders' te kunnen rekenen. Marijke, Els, Kelly, Heidi en Tony, bedankt om steeds tijd vrij te maken om te antwoorden op mijn vele vragen en voor de uitstekende begeleiding in het labo.

Uiteraard ben ik mijn promotor, Prof. dr. Ann Cuypers, ook erg dankbaar. Ann, bedankt voor het vertrouwen, de vele goede tips en de steeds boeiende vergaderingen.

Tot slot wil ik alle overige collega's binnen het CMK (medestudenten, laboranten, promovendi, ...) bedanken voor deze fijne en boeiende tijd. Het zijn er, en dat doet me veel plezier, teveel om op te noemen.

Milan, 10 juni 2010

Abstract

Reactieve zuurstofvormen (ROS) zijn deels gereduceerde vormen van zuurstof en niet-radicalen derivaten van zuurstof. Hun gehalte wordt onder controle gehouden door het antioxidatief systeem dat bestaat uit enzymen en metabolieten. Biotische en abiotische stress kan ROS-homeostase verstoren wat kan leiden tot oxidatieve stress en cellulaire schade.

Cadmium is een wijdverspreid en niet-essentieel zwaar metaal dat via een indirect mechanisme kan leiden tot oxidatieve stress. In dit project werd onderzocht op welke manier blootstelling aan realistische cadmium-concentraties het pro- en antioxidatief systeem en de redoxstatus van blaadjes van wildtype *Arabidopsis thaliana* kan verstoren. Daarnaast werd onderzocht op welke manier deze parameters worden beïnvloed bij *Arabidopsis thaliana* met geïnactiveerd ascorbaatperoxidase 1 en welk effect het verlies van dit antioxidatief enzym heeft op de cadmium-gevoeligheid. Via deze proefopzet werd getracht te achterhalen wat het belang is van dit enzym tijdens cadmium-geïnduceerde oxidatieve stress.

Uit de analyse van de respons van het wildtype op cadmium blijkt dat het antioxidatief systeem een dynamisch en redundant systeem is dat, afhankelijk van de concentratie cadmium en de blootstellingstijd, verschillende mechanismen kan aanspreken om ROS-homeostase te handhaven. Bij een subtiele en relatief korte verstoring van het systeem van enkele uren lijken een aantal mechanismen samen homeostase te handhaven. Bij een meer drastische blootstelling aan cadmium gedurende één of drie dagen lijken de ascorbaat-glutathion-cyclus in het cytosol en/of mitochondrium samen met catalase erg belangrijk te zijn in de verdediging tegen cadmium-geïnduceerde oxidatieve stress.

De vergelijking tussen het wildtype en de mutant geeft aan dat het antioxidatief systeem, tijdens en zonder externe stress door cadmium, op verschillende niveaus compenseert voor het verlies van APX1. Dit toont aan dat dit cytosolisch enzym een brede taak te vervullen heeft en ook een rol speelt in de antioxidatieve verdediging binnen andere celorganellen zoals de chloroplast, het mitochondrium en het peroxisoom. Mogelijke compensatiemechanismen voor het verlies van APX1 zijn het verminderen van de productie van ROS, stimulatie van catalase, een verhoogde activiteit van de ascorbaat-glutathion-cyclus in het cytosol en een verhoogde activiteit van de ascorbaat-glutathion-cyclus in de chloroplast en/of het mitochondrium. Deze efficiënte inductie van compensatiemechanismen ligt mogelijk aan de grondslag van een verminderde cadmiumgevoeligheid, een verminderde productie van het superoxide radiaal en een verlaagde glutathionsynthese.

1 Inleiding

Cadmium (Cd) is een scheikundig element met atoomnummer 48. Het is een zilvergrijs overgangsmetaal dat behoort tot de groep van de zware metalen omwille van een dichtheid van meer dan 5 g/cm^3 ($8,64 \text{ g/cm}^3$) [1]. In de natuur komt het voor in erts samen met zink, lood en koper. Vanaf de 20^e eeuw werd Cd als bijproduct van de zinkindustrie geproduceerd waardoor aanzienlijke hoeveelheden Cd in het milieu terecht kwamen. Ook afvalverbrandingsovens en het gebruik van fossiele brandstoffen en commerciële meststoffen maken dat Cd in verhoogde concentraties in het milieu worden gebracht [1,2,3]. In België is een gebied in het noordoosten van de Kempen, nabij Lommel, Overpelt en Balen, sterk vervuild met Cd door historische pollutie afkomstig van zinksmelters. Het gaat over een gebied met een totale oppervlakte van ongeveer 300 km^2 en een gemeten concentratie Cd in de bodem van 0,8 tot 17 mg/kg [4].

Voedsel is de belangrijkste bron van blootstelling bij niet-rokers [3]. Naar schatting is meer dan 80% van het Cd dat via de voeding wordt opgenomen afkomstig van groenten, granen en aardappelen [5]. Tabaksplanten (*Nicotiana tabacum*) kunnen erg hoge concentraties Cd accumuleren waardoor roken een andere belangrijke bron is waarbij mensen worden blootgesteld aan Cd [1,2].

Cadmium accumuleert bij een chronische blootstelling efficiënt in de nieren (halfwaardetijd van 10 tot 30 jaar) en is nefrotoxisch. Initieel leidt het tot schade aan de tubulus [3]. Bij langdurige blootstelling en/of blootstelling aan hoge concentraties kan dit overgaan in schade aan de glomerulus met een verminderde glomerulaire filtratie wat uiteindelijk kan leiden tot nierfalen [6,7]. Daarnaast kan Cd ook leiden tot botschade. Dit kan ontstaan via een direct effect op het botweefsel [8,9] of indirect door het slecht functioneren van de nieren [10, 11]. In 1993 werd Cd door het 'International Agency for Research on Cancer' (IARC) ingedeeld bij de kankerverwekkende stoffen (groep 1) [12]. Verschillende studies hebben aangetoond dat arbeiders die beroepsmatig worden blootgesteld aan Cd een verhoogd risico hebben op ondermeer longkanker [13]. Verder tonen recente gegevens aan dat Cd in het milieu gepaard gaat met een verhoogd risico op kanker [4,14] en een verhoogde mortaliteit [14,15].

1.1 Cadmium in planten

Om een toxisch effect te hebben op de plant, moeten metalen uit de bodem of het grondwater worden opgenomen. Weinig of geen metalen worden immers direct uit de atmosfeer opgenomen. Biobeschikbaarheid, de activiteit van opname en distributie en de efficiëntie van translocatie zijn bepalend voor het gehalte aan blootstelling aan metalen en metaalaccumulatie in planten [16].

1.1.1 Biobeschikbaarheid

Verschillende metalen kennen een verschillende mate van (bio-)beschikbaarheid voor opname door plantenwortels [16]. Sommige metalen zoals tin, zilver en chroom zijn vrijwel niet biobeschikbaar omwille van hun lage oplosbaarheid in de bodem. Kwik vertoont naast een lage oplosbaarheid ook sterke interacties met bodempartikels. Cadmiumionen zijn zeer biobeschikbaar en interageren relatief weinig met bodempartikels wat maakt dat ze erg efficiënt worden opgenomen door planten [17].

Plantenwortels kunnen metaalionen meer beschikbaar maken voor opname door de wortel door het verzuren van de rhizosfeer m.b.v. protonenpompen en ook door de secretie van metaalchelatoren [16].

1.1.2 Opname en distributie

Omdat Cd een niet-essentieel metaalion is, kent het geen specifieke opnamemechanismen, maar wordt het opgenomen via opnamesystemen voor essentiële kationen. De ZIP-familie (ZRT1/IRT1-like proteins) van metaaltransporters zijn opnamesystemen voor ijzerionen (Fe^{2+}) in de wortels van *Arabidopsis thaliana* (figuur 1). Connolly *et al.* (2002) beschreven dat *A. thaliana* met overexpressie van IRT1 meer zink (Zn) en Cd accumuleren in de wortels bij blootstelling aan lage concentraties Fe [18]. Grotz *et al.* (1998) beschreven dat de Zn-opnameactiviteit van *A. thaliana* ZIP1, ZIP2, en ZIP3 in *Saccharomyces cerevisiae* deels geblokkeerd wordt door Cd [19]. Deze experimenten geven aan dat ZIP-transporters zoals IRT1 daadwerkelijk instaan voor Cd-influx in wortelcellen. Ook wordt Cd opgenomen door opnamemechanismen andere dan de ZIP-transporters. Zo bewezen Perfus-Barbeoch *et al.* (2002) a.d.h.v. een electrofysiologisch experiment dat calcium (Ca)-kanalen van sluitcellen permeabel zijn voor Cd [20] (figuur 1).

De meeste overgangsmetaalionen die worden opgenomen in plantencellen zijn niet aanwezig als gehydrateerde ionen, maar zijn gebonden aan liganden [16]. Potentiële cytosolische bindingspartners voor Cd-ionen in planten zijn glutathion (GSH) en GSH-afgeleide derivaten zoals fytochelatine (PC) (figuur 1). Fytochelatines worden aangemaakt in respons op blootstelling aan verschillende metaalionen. Deze respons is afhankelijk van het type zwaar metaal en Cd-ionen leiden tot een zeer sterke respons [16]. Fytochelatine wordt niet-ribosomaal gesynthetiseerd, vertrekkende van GSH, in een transpeptidasereactie gekatalyseerd door fytochelatinesynthase. Een verminderde productie van PC gaat gepaard met een gereduceerde accumulatie van Cd [21].

Het wordt algemeen aangenomen dat de belangrijkste plaats van metaalsekwestratie de vacuolen in de wortelcellen zijn. Experimenten met *Schizosaccharomyces pombe* toonden aan dat PC-Cd-complexen in de vacuole worden gebracht door Hmt1, een 'ATP binding cassette-type (ABC) transporter' [22] (figuur 1). In de vacuole worden deze complexen met lage molecuulmassa omgezet in complexen met een hoge molecuulmassa. Het wordt aangenomen dat een gelijkaardig mechanisme bestaat voor planten, hoewel nog geen proteïne hiervoor verantwoordelijk werd geïdentificeerd. Een tweede mogelijk mechanisme voor Cd-opname in de vacuole is de 'Cd/H-antiporter' op de tonoplast [23] (figuur 1). Een proteïne dat hiervoor verantwoordelijk kan zijn in *A. thaliana* is 'cation/ H^+ -transporter 2' (CAX2) [24] (figuur 1).

Een andere familie metaaltransporters die instaat voor Cd-transport over de tonoplast is de Nramp-familie (figuur 1). AtNramp3 zou instaan voor het opnieuw beschikbaar maken van Fe, mangaan (Mn) en Zn. Thomine *et al.* (2000) beschreven dat overexpressie van AtNramp3 in *A. thaliana* gepaard gaat met Cd-hypersensitiviteit wat aangeeft dat deze metaaltransporter ook Cd kan accepteren als substraat [25].

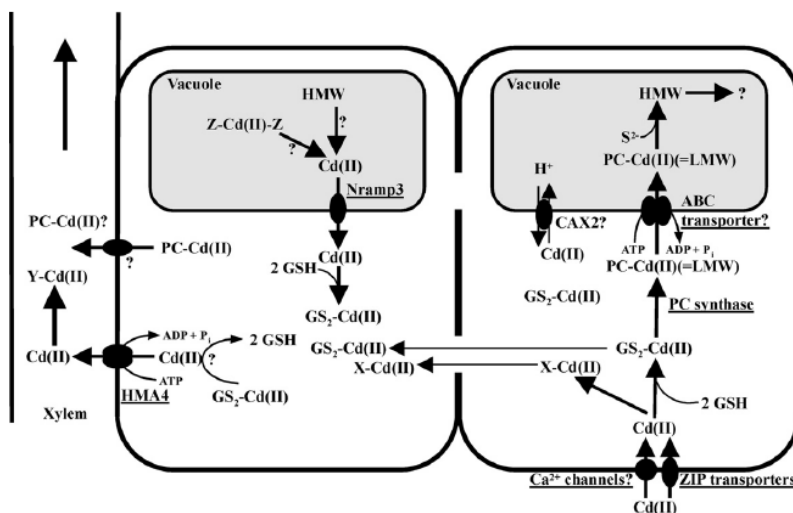
1.1.3 Translocatie

In vergelijking met andere toxische metalen en metalloïden (e.c. As) heeft Cd de eigenschap om ook te accumuleren in weefsels andere dan de wortels [17]. Toch blijft steeds meer Cd aanwezig in de wortels dan in de bladeren. Cuypers *et al.* (2009) beschreven een wortel-scheut-ratio van 5 à 6 voor

Cd voor *A. thaliana* in tegenstelling tot koper (Cu) dat zo goed als niet accumuleert in de blaadjes [26].

Fytochelatine zou betrokken zijn bij de translocatie van Cd (figuur 1). Expressie van TaPCS1 van tarwe in de PC-deficiënte *A. thaliana* mutant *cad1-3*, onder controle van een wortel-specifieke promotor, leidde tot de detectie van PC en Cd in de scheuten en een verminderde Cd-concentratie in de wortels [27]. Het gebruik van een scheutspecifieke promotor voor de expressie van TaPCS1, resulteerde in het transport in de omgekeerde richting [28].

Voor het transport van metalen uit het cytosol van wortelcellen naar het vasculair weefsel moet transport over celmembranen plaatsvinden. Goede kandidaten voor zulk transport zijn P-type ATPases van de 1_B -subfamilie die ook wel 'heavy metal transporting P-type ATPases' (HMA) worden genoemd [29] (figuur 1). Binnen de HMA-familie wordt onderscheid gemaakt tussen de Cu/Ag-transporters en de Zn/Cd/Co/Pb-transporters. Planten beschikken over beide. *A. thaliana* HMA2 en HMA4 zijn belangrijk voor de translocatie van Zn. Cadmium is mogelijk ook een substraat voor deze metaalpompen. Zo toonden Verret *et al.* (2004) aan dat overexpressie van *AtHMA4* gepaard gaat met een verhoogd gehalte Zn en Cd in de bladeren [30] (figuur 1).



Figuur 1: Een schematische weergave van de processen, beschreven in hoofdstuk 1.1, betrokken bij de opname, distributie en translocatie van Cd in plantenwortels [16]. De wortelcel rechts staat in verbinding met de rhizosfeer en de wortelcel links staat in verbinding met het xyleem. Beide cellen staat in verbinding met elkaar via plasmodesmate. Cd wordt in de cel gebracht door Fe/Zn-transporters van de ZIP-familie en mogelijk ook via Ca-transporters. In het cytosol vindt chelatie plaats door GSH en mogelijk andere onbekende mechanismen (X-Cd(II)). GS_2 -Cd(II) kan PC-synthese activeren, wat tot vorming van PC-Cd(II) (complexen met lage molecuulmassa (LMW)) kan leiden. Een onbekende ABC-transporter brengt Cd in de vacuole, waar complexen met hoge molecuulmassa (HMW) worden gevormd. Een tweede mogelijk mechanisme, voor transport over de tonoplast, is Cd/H-antiporter. HMW of Cd gebonden aan onbekende liganden (Z-Cd(II)-Z) kunnen terug in het cytosol gebracht worden via *AtNramp3*. Mobiele liganden zoals GS_2 -Cd(II) en X-Cd(II) zijn nodig voor symplastisch transport. *AtHMA4* kan Cd in het xyleem brengen voor translocatie (gebonden aan onbekend ligand (Y-Cd(II))). Ook zijn er aanwijzingen dat PC-Cd(II) in het xyleem kan worden getransporteerd.

1.1.4 Symptomen van toxiciteit

De symptomen van metaaltoxiciteit bij planten zijn uitgebreid bestudeerd. Cadmium is het best bestudeerde metaal in deze context. In de meeste experimenten worden planten blootgesteld aan zeer hoge Cd-concentraties en wordt er dus acute Cd-stress bestudeerd [16]. Zichtbare effecten van blootstelling aan hoge concentraties Cd zijn groei-inhibitie en chlorose van de bladeren. Ook worden de waterbalans, het openen van de huidmondjes en de fotosynthese verstoord [16].

Omwillen van de chemische gelijkheid kan Cd Zn vervangen op Zn-afhankelijke en Zn-bindende moleculen en kunnen Zn-afhankelijke processen worden verstoord [31]. Ook kan Cd binden op Ca-bindende proteïnen zoals calmoduline en op die manier intracellulaire signaalketens verstoren [16].

Oxidatieve stress wordt vaak aangehaald als primair effect van blootstelling aan Cd en wordt gedefinieerd als een toestand waarbij de balans tussen reactieve zuurstofvormen en antioxidanten is verstoord. Omdat Cd geen redoxactief metaal is, leidt het indirect tot het ontstaan van oxidatieve stress door het induceren van NADPH-oxidasen, het binden aan thiolgroepen en het vervangen van Fentonmetalen op de actieve plaats van moleculen [32].

1.2 Redoxbiologie

Een vrij radicaal is een ion, atoom of molecuul dat onafhankelijk kan bestaan en één of meer ongepaarde elektronen bevat [33]. Een ongepaard elektron omvat op zich een volledig atomisch of moleculair orbitaal. Radicalen kunnen ontstaan door additie van een elektron aan een niet-radicaal. Een andere manier is het verbreken van een covalente verbinding waarbij één elektron van het paar achterblijft op elk atoom (homolytische fessie).

1.2.1 Zuurstofradicalen en verwante vormen

Er bestaan verschillende groepen vrije radicalen. Eén voorname groep zijn de zuurstofradicalen. Zuurstof (O_2) is zelf een vrij radicaal, omdat het beschikt over twee ongepaarde elektronen. Deze hebben hetzelfde 'spinkwantumgetal'. Omdat een elektronenpaar in een atomisch of moleculair orbitaal over tegenovergestelde spins ($+\frac{1}{2}$, $-\frac{1}{2}$) beschikt, kan O_2 steeds maar één elektron per keer accepteren. Door deze 'spinbeperking' reageert O_2 slecht met niet-radicalen. Daar tegenover staat dat het meestal uitermate goed reageert met andere radicalen door enkelvoudige elektrontransfers [33].

Een meer reactieve vorm van zuurstof is singlet zuurstof (1O_2). Singlet zuurstof ontstaat door de input van energie, waardoor de elektronen herschikt worden en de spinrestrictie verdwijnt [33]. 1O_2 kan proteïnen, DNA en lipiden direct oxideren.

Wanneer één enkel elektron wordt toegevoegd aan O_2 , ontstaat het superoxide radicaal ($O_2^{\cdot-}$). Het superoxide radicaal heeft een korte halfwaardetijd van 2 tot 4 μs [34].

Wanneer er nog één extra elektron wordt afgeleverd aan $O_2^{\cdot-}$ ontstaat O_2^{2-} , het niet-radical peroxide ion. Dit wordt snel omgezet in waterstofperoxide (H_2O_2) [33]. H_2O_2 heeft een langere halfwaardetijd van ongeveer 1 ms, waardoor het kan migreren naar nabijgelegen cellulaire compartimenten en zelfs naar naburige cellen. Het transport van H_2O_2 over membranen gebeurt door specifieke aquaporines genaamd peroxiporines [34].

Door toevoeging van twee elektronen aan O_2^{2-} , wordt de zuurstof-zuurstof-verbinding geëlimineerd en ontstaan twee oxide ionen (O^{2-}) die op hun beurt snel worden omgezet in H_2O [33].

Reactieve zuurstofvormen

Een veelgebruikte term voor deze partieel gereduceerde vormen van zuurstof (e.c. $O_2^{\cdot-}$) en niet-radical derivaten van zuurstof (e.c. H_2O_2) is reactieve zuurstofvormen (ROS) [33].

1.2.2 Productie van reactieve zuurstofvormen

ROS worden geproduceerd in alle cellulaire compartimenten en tijdens verschillende biologische processen. De concentratie ROS wordt strikt onder controle gehouden, maar verschillende biotische en abiotische factoren zijn in staat deze balans te verstoren [34].

Chloroplasten zijn een belangrijke bron van ROS. Fotosynthetische elektronentransferketens produceren $O_2^{\bullet-}$ door het lekken van elektronen van Fe-centra van fotosysteem 1 of tijdens de Mehlerreactie. Hoewel een overmatige productie van ROS gevaarlijk kan zijn, voorkomt het vermogen van O_2 om elektronen te accepteren in dit geval overreductie van de elektronentransportketen en vermindert het de kans op productie van 1O_2 [34].

Mitochondriale respiratie leidt tot de vorming van $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 . De belangrijkste bronnen van ROS-productie in mitochondria zijn NADH-dehydrogenase, het ubiquinoneradicaal en complex III. Mitochondriale ROS zijn belangrijke regulatoren van een aantal belangrijke processen zoals stressadaptatie en apoptose [35].

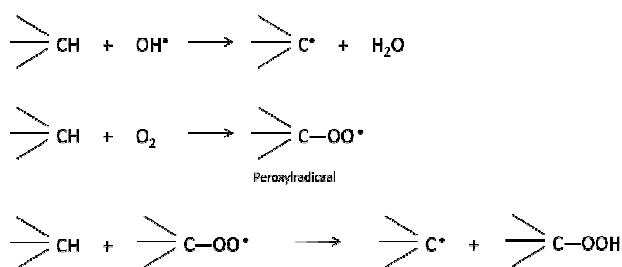
ROS ontstaan tevens in peroxisomen en glyoxisomen tijdens respectievelijk fotorespiratie en vetzuuroxidatie [36].

Het NADPH-oxidase en celwand-geassocieerde peroxidasen zijn de belangrijkste apoplastische $O_2^{\bullet-}$ - en H_2O_2 -producerende enzymen [34]. Het wordt aangenomen dat deze enzymsystemen een belangrijke rol hebben in ROS-productie en signaaltransductie tijdens abiotische stress zoals bijvoorbeeld tijdens blootstelling aan Cd [26].

1.2.3 Schade door vrije radicalen en andere reactieve zuurstofvormen

Twee vrije radicalen kunnen reageren en een covalente verbinding vormen. Stikstofoxide (NO^{\bullet}) en $O_2^{\bullet-}$ reageren bijvoorbeeld snel en vormen daarbij peroxylnitriet ($ONOO^{\bullet}$) dat bij een fysiologische pH protoneert tot vorming van salpeterzuur ($ONOOH$), een sterk oxiderend agens [33]. Salpeterzuur kan door homolytische fissie worden omgezet in stikstofdioxide (NO_2^{\bullet}) en het uiterst reactieve hydroxylradicaal (OH^{\bullet}). Peroxynitriet kan door reactie met CO_2 ook leiden tot radicaalvorming.

De meeste biologische moleculen kennen echter geen radicalaire structuur. Wanneer een vrij radicaal reageert met een niet-radicaal ontstaat een nieuw radicaal en dit kan de start betekenen van een kettingreactie. Er bestaan verschillende soorten van dergelijke reacties [37]. ⁽¹⁾ Zo kan een radicaal reageren met een ander molecuul, waarbij het adduct een ongepaard elektron heeft. Het hydroxylradicaal reageert bijvoorbeeld met de basen in DNA, wat mutaties en massale celschade tot gevolg kan hebben. ⁽²⁾ Daarnaast kan een radicaal zelf een reducerend of oxiderend agens zijn. ⁽³⁾ Ook kunnen reactieve radicalen waterstofatomen wegvangen van C-H-verbindingen van bijvoorbeeld koolwaterstofketens van polyonverzadigde vetzuren (PUFA) in biologische membranen. Dit proces wordt lipidenperoxidatie genoemd (figuur 2). Aangezien H^{\bullet} slechts één elektron heeft, blijft een ongepaard elektron achter. Deze radicalen met koolstofcenter reageren efficiënt met O_2 waarbij peroxyradicalen worden gevormd, die voldoende reactief zijn om in een kettingreactie membraanproteïnen te oxideren en PUFA-zijketens aan te vallen. Een nieuw C-radicaal en een lipidehydroperoxide worden gevormd. Eén enkel reactief radicaal is dus in staat om meerdere peroxideradicalen te vormen d.m.v. een kettingreactie. Deze kettingreactie kan op verschillende plaatsen in de koolstofketen starten wat kan leiden tot vorming van verschillende eindproducten. Op grote schaal zal lipidenperoxidatie leiden tot een verminderde viscositeit van celmembranen, schade aan membraanproteïnen en inactivatie van receptoren, enzymen en ionkanalen [33].



Figuur 2: Lipidenperoxidatie

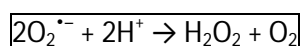
De destructieve kenmerken van $\text{O}_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 komen nog meer tot uiting wanneer deze ROS interageren in de aanwezigheid van metaalionen tot vorming van OH^\bullet . Deze reactie wordt de Fenton-reactie of Haber-Weiss-reactie [33] genoemd. Een hydroxylradicaal kan reageren met en schade berokkenen aan zowat alles waar het mee in contact komt. Net omdat OH^\bullet zo reactief is, beschikken cellen niet over enzymatische mechanismen om het te verwijderen, maar zijn ze afhankelijk van mechanismen die de vorming ervan voorkomen.

1.2.4 Detoxificatie van reactieve zuurstofvormen

Een nauwgezette controle van het gehalte aan ROS is van groot belang om ROS-toxiciteit tegen te gaan en om signaalgeving door ROS (zie hoofdstuk 1.2.5) niet te verstoren. Planten beschikken over complexe enzymatische en niet-enzymatische antioxidatieve systemen die samen met ROS-producerende enzymen ROS-homeostase handhaven in verschillende cellulaire compartimenten en de concentratie van ROS aanpassen aan de vraag op een bepaald moment [34]. In *Arabidopsis* zou een dynamisch en redundant netwerk van minstens 152 genen hierbij betrokken zijn [38].

Antioxidatieve enzymen

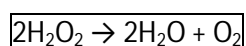
Superoxide dismutase (SOD) enzymen zijn de enige enzymen in planten die $\text{O}_2^{\bullet-}$ kunnen wegvangen. Ze katalyseren de dismutatie van $\text{O}_2^{\bullet-}$, waarbij één $\text{O}_2^{\bullet-}$ wordt gereduceerd tot vorming van H_2O_2 en het ander $\text{O}_2^{\bullet-}$ wordt geoxideerd tot vorming van zuurstof (figuur 3) [39].



Figuur 3: Reactie gekatalyseerd door SOD

Er bestaan verschillende SOD's op basis van het metaal op de actieve plaats [39]. Planten en dieren beschikken over MnSOD in de mitochondriale matrix en CuZnSOD in de mitochondriale intermembranaire ruimte en in de rest van de cel. Planten hebben daarnaast ook FeSOD in de chloroplast [33].

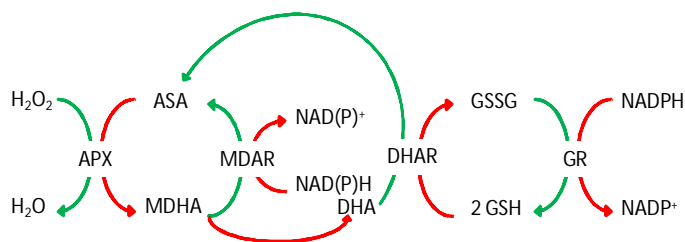
Het H_2O_2 dat voortkomt uit deze reactie moet worden verwijderd door andere mechanismen zoals bijvoorbeeld het enzym catalase (CAT). Catalase zet H_2O_2 om in water en zuurstof [33] (figuur 4).



Figuur 4: Reactie gekatalyseerd door CAT

Het meeste CAT in planten en dieren is aanwezig in peroxisomen. Hier wordt H_2O_2 , geproduceerd door oxidase, onschadelijk gemaakt [33]. CAT detoxificeert H_2O_2 zonder reducerend vermogen en is daarom een energie-efficiënte manier om H_2O_2 te verwijderen. Deze enzymen zijn vrijwel enkel actief bij relatief hoge concentraties H_2O_2 [34].

Grote hoeveelheden H_2O_2 worden, buiten het bereik van CAT, geproduceerd in de chloroplast en mitochondria. Voor het neutraliseren van deze ROS bestaat er nog andere groep enzymen: de peroxidasen, die in tegenstelling tot CAT in staat zijn lagere concentraties H_2O_2 te detoxificeren. Deze enzymen verwijderen H_2O_2 door het te gebruiken om een cosubstraat te oxideren [33]. Veel peroxidasen van planten zijn niet specifiek en gebruiken meerdere cosubstraten zoals bijvoorbeeld het geval is voor 'horseradishperoxidase'. Glutathionperoxidase koppelt de reductie van H_2O_2 tot H_2O aan de oxidatie van glutathion (GSH). Ascorbaatperoxidase (APX), aanwezig in de chloroplast, het mitochondrium en het cytosol, gebruikt vitamine C (ascorbaat - ASA) als cosubstraat. APX is een belangrijke component van de ASA-GSH-cyclus [40] (figuur 5). De uitkomst van deze cyclus is dat H_2O_2 gereduceerd wordt door het reducerend vermogen dat netto afkomstig is van NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate). In een eerste stap wordt H_2O_2 gereduceerd door APX met behulp van ASA als elektrondonor. Het MDHA (monodehydroascorbaat) dat hier uit ontstaat is een radicaal en wordt enzymatisch omgezet in ASA via het enzym monodehydroascorbaatreductase (MDAR) en NAD(P)H. Wanneer MDHA niet onmiddellijk wordt gereduceerd kan het spontaan dismuteren tot vorming van ASA en dehydroascorbaat (DHA). DHA wordt gereduceerd gebruikmakende van dehydroascorbaatreductase (DHAR) en GSH als elektrondonor dat wordt omgezet in glutathiondisulfide (GSSG). Uiteindelijk wordt GSSG opnieuw gereduceerd met elektronen afkomstig van NADPH in een reactie gekatalyseerd door glutathionreductase (GR).



Figuur 5: De ASA-GSH-cyclus. Groene pijlen stellen reducties voor en rode pijlen oxidaties.

Een nog andere groep enzymen die H_2O_2 kunnen verwijderen, zijn de peroxiredoxines. H_2O_2 oxideert een thiolgroep van het peroxiredoxine tot vorming van een cys-SH-groep, dat op verschillende manieren opnieuw gereduceerd kan worden [33,34].

Antioxidatieve metabolieten

Naast antioxidantieve enzymen bestaan er ook antioxidantieve metabolieten die preferentieel geoxideerd worden door ROS, opdat op die manier essentiële biomoleculen onbeschadigd blijven [33,34]. Voorbeelden hiervan zijn ASA en GSH die de meeste ROS zoals $O_2^{\cdot-}$, $ONOOH$, OH^{\cdot} en RO_2^{\cdot} kunnen wegvangen. Een nog andere groep zijn de tocoferolen die kunnen reageren met peroxyradicalen en op die manier membranen beschermen tegen lipidenperoxidatie.

1.2.5 Signaalgeving door ROS

Wijzigingen in het gehalte aan ROS in de tijd en ruimte worden geïnterpreteerd als signalen voor groei, ontwikkeling, tolerantie voor abiotische stressfactoren, een gepaste respons op pathogenen en apoptose [34]. De specificiteit van deze biologische respons hangt af van verschillende factoren zoals de chemische identiteit van de ROS, de intensiteit van het signaal, de plaats van productie, het ontwikkelingsstadium van de plant, de voorgeschiedenis van de plantencel en de interactie met andere signaalmoleculen zoals stikstofoxide en plantenhormonen [34].

1.3 Ascorbaatperoxidase 1

Arabidopsis thaliana kent verschillende isozymen van APX [38]. De chloroplast bevat er minstens 3 verschillende: een thylakoïd-gebonden APX (tAPX - At1g77490), APX4 (At4g09010) en een APX dat tot expressie komt in het stroma van de chloroplast en in mitochondria (sAPX - At4g08390). Zowel, APX1 (At1g07890) als APX2 (At3g09640) komen tot expressie in het cytosol. Het isozym APX3 (At4g35000) is gebonden op de buitenste laag van het peroxisoom en ook APX5 (At4g35970) komt vermoedelijk tot expressie in het peroxisoom. Verder komt APX6 (At4g32320) vermoedelijk tot expressie in het cytosol, de chloroplast en het mitochondrium. Tot slot is er nog APX7 (At1g33660) dat vermoedelijk ook tot expressie komt in het mitochondrium.

Experimenten met planten met een geïnactiveerde expressie van ascorbaatperoxidase 1 (knock-out-*apx1* – KO-*apx1*) hebben aangetoond dat APX1 een sleutelrol heeft in de bescherming van planten tegen H₂O₂. Pnueli *et al.* (2003) beschreven dat onder stressvrije condities KO-*apx1* van *A. thaliana* worden gekenmerkt door een accumulatie van H₂O₂, een vertraagde groei en ontwikkeling en een gewijzigde respons van de huidmondjes [41]. Verder beschreven ze dat deze KO tijdens lichtstress gekenmerkt wordt door een verhoogde inductie van 'heat shock proteins' (HSP). Koussevitzky *et al.* (2008) toonden aan dat KO-*apx1* van *A. thaliana* gevoeliger zijn voor hittestress en droogtestress in vergelijking met het wildtype in tegenstelling tot planten met een geïnactiveerde expressie van andere APX's zoals knock-outs voor tAPX en voor sAPX [42]. Rizhsky *et al.* (2002) beschreven dat *Nicotiana tabacum* met een verminderende expressie van APX1 (knock-down-*apx1* – KD-*apx1*) hiervoor compenseert door een geïnduceerde expressie van cytosolisch CuZnSOD, CAT en GR [43]. Pnueli *et al.* vonden een dergelijke inductie niet terug bij KO-*apx1* van *A. thaliana* onder stressvrije condities, maar bewezen wel dat ondermeer CAT2 en de transcripten van twee peroxidasen (prxr10 en ATP3a) verhoogd tot expressie komen tijdens lichtstress [41]. Davletova *et al.* (2005) toonden aan dat bij KO-*apx1* van *A. thaliana* oxidatie van chloroplastische proteïnen plaatsvindt tijdens (lichte tot matige) lichtstress, wat aangeeft dat dit cytosolisch enzym betrokken is bij de bescherming van de chloroplast tegen H₂O₂ [44].

Smeets *et al.* (2008) beschreven dat de aanmaak van H₂O₂ de belangrijkste oorzaak van oxidatieve stress is in de blaadjes van *A. thaliana* tijdens blootstelling aan realistische concentraties Cd (gebaseerd op metingen in de Noorderkempen (België)) gedurende 24u en dat een verhoogde genexpressie van APX1 een mogelijk antioxidatief verdedigingsmechanisme is tijdens deze stressconditie [45].

1.4 Onderzoeksvragen en objectieven

In dit project wordt onderzocht op welke manier blootstelling aan realistische Cd-concentraties het pro- en antioxidatief systeem en de redoxstatus van *A. thaliana* kan beïnvloeden. Daarnaast wordt onderzocht op welke manier deze parameters worden beïnvloed bij *A. thaliana* met geïnactiveerd ascorbaatperoxidase 1 en welk effect het verlies van dit enzym heeft op de cadmium-gevoeligheid. Op die manier wordt getracht te achterhalen wat het belang is van dit enzym tijdens Cd-geïnduceerde oxidatieve stress.

Het pro- en antioxidatief systeem en de redoxstatus worden bestudeerd door analyses van genen, enzymen en metabolieten betrokken bij de oxidatieve stressrespons in blaadjes van *A. thaliana*. Zo wordt de genexpressie van een selectie pro- en antioxidatieve genen gemeten. De genen van deze selectie hebben een rol in de ASA-GSH-cyclus en/of zijn betrokken bij de detoxificatie van H₂O₂ of zijn

gevoelig aan Cd-geïnduceerde oxidatieve stress. Daarnaast worden enzymactiviteiten van een reeks belangrijke antioxidatieve enzymen geanalyseerd. Tot slot wordt de concentratie van belangrijke metabolieten, die bepalend zijn voor de cellulaire redoxstatus, gemeten. Queval en Noctor (2007) beschreven een methode voor de analyse van deze redoxkoppels [46], die aangepast en toegepast zal worden tijdens dit project.

De Cd-gevoeligheid wordt bestudeerd tijdens een groeiexperiment waarbij de wortelgroei en de biomassa van de rozetjes worden bestudeerd.

Oxidatieve stress is een universeel mechanisme dat optreedt bij alle organismen in alle domeinen van het leven. Met dit project trachten we nieuwe inzichten te verschaffen in dit belangrijk mechanisme, wat van groot belang is voor de biologische en biomedische wetenschappen.

Dit project kan op termijn bijdragen tot verschillende concrete toepassingen. Een eerste mogelijkheid zijn strategieën om metaaltolerante planten te ontwikkelen, die toegepast kunnen worden om bodems gecontamineerd met zware metalen te saneren. Een tweede mogelijke toepassing is het ontwikkelen van fruit of groenten die een hoger gehalte aan essentiële metalen, zoals bijvoorbeeld zink, bevatten. Een nog andere toepassing is het bestuderen van de kwaliteit van planten a.d.h.v. de redoxstatus of de antioxidatieve capaciteit wat van belang kan zijn in het kader van voedselkwaliteit en revegetatie van gecontamineerde bodems.

2 Materiaal en methoden

In dit hoofdstuk worden de verschillende deelexperimenten afzonderlijk besproken.

2.1 Plantenmateriaal

In dit experiment wordt *A. thaliana* gebruikt als modelorganisme. De KO-*apx1* werd ontwikkeld via een T-DNA-insert in het tweede exon en werd beschreven door Pnueli *et al.* (2003) [41]. De KO-*apx1* en het wildtype (WT) zijn een gemengd ecotype en werden ontwikkeld door kruising van het ecotype Wassilewskija (WS) met het ecotype Columbia (Col) door Van Breusegem *et al.* (Vlaams Instituut voor Biotechnologie/Universiteit Gent - Departement Plant Systems Biology).

Wanneer in het vervolg van deze scriptie wordt gesproken over 'de KO', wordt bedoeld de knock-out-*apx1*.

2.2 Groeiexperiment op verticale agarplaten

De zaadjes van *A. thaliana* werden gesteriliseerd volgens een aangepast protocol van Balcells *et al.* [47], waarna ze werden gedroogd in een laminaire flowkast ($\pm 3u$). Het groeiexperiment is gebaseerd op de procedure beschreven door Zhang *et al.* [48], waarbij het groeimedium is gebaseerd op Gamborg's B5 medium met een 50-voudige verdunning van de macronutriënten en een 2-voudige verdunning van de micronutriënten. Dit medium bestaat uit 0,02 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0,02 mM $MgSO_4$, 0,02 mM $CaCl_2$, 0,02 mM NaH_2PO_4 , 0,49 mM KNO_3 , 24,3 μM H_3BO_3 , 29,6 μM $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0,05 μM $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 3,48 μM $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,52 μM $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0,05 μM $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 2,26 μM KI 0,05 mM $FeCl_3$ en 0,5 g MES. Het medium werd op pH 5,7 – 5,8 gebracht met KOH en er werd 0,5% sucrose en 1% agar (N°4, Plant Tissue Culture, Sigma Aldrich, VS/MO) toegevoegd. Het medium werd kort geautoclaveerd (121°C, 5 min) en daarna uitverdeeld in verticale platen (120x120 mm) (40 ml per plaat) en één dag bij 4°C bewaard. De steriele en gedroogde zaadjes werden m.b.v. een steriele tandenstoker bovenop de voedingsbodem (kiemingsplaten) geplaatst (± 1 cm van de bovenrand). Op elke plaat werden 25 zaadjes geplaatst. Deze platen werden afgesloten met parafilm en gedurende 3 dagen, in het donker, bij 4°C bewaard. Dit zorgt voor een meer homogene kieming. Vervolgens werden de voedingsbodems in de kweekkamer geplaatst. De platen werden schuin gestapeld, in een hoek van 80°, om te voorkomen dat de wortels in het medium groeien. De groeiomstandigheden in de kweekkamer zijn gecontroleerd: 22/18°C $\pm 1^\circ C$, 12/12 uur licht/donker, 100 μE lichtintensiteit (53% rood licht, 43% blauw licht, 25% ver-rood licht) en een relatieve luchtvochtigheid van 65%. Na één week werden WT en KO met een exact fenotype overgebracht op behandelingsplaten met dezelfde samenstelling als de kiemingsplaten met als uitzondering dat geen sucrose werd toegevoegd aan dit medium maar wel $CdSO_4$ (0, 5, 10, 15, 20, 25 of 30 μM $CdSO_4$). Het $CdSO_4$ werd na autoclaveren aan het medium toegevoegd, om degradatie door hoge temperaturen tegen te gaan, maar werd wel eerst gesteriliseerd door filtratie. Op elke behandelingsplaat werden 8 plantjes gebracht. Er werd uitgegaan van 20 biologische herhalingen. De groei van de primaire wortel werd dagelijks gemonitord gedurende één week. De wortelgroei werd geanalyseerd m.b.v. het programma OPTIMAS® (AES, Australië). De biomassa werd gemeten met een analytische balans.

2.3 Groei in hydrocultuur

Voor de analyse van de genexpressie, enzymactiviteiten en redoxkoppels in blaadjes van *A. thaliana* werden de plantjes gekweekt in hydrocultuur zoals beschreven door Smeets *et al.* [48]. De zaadjes werden op de zelfde manier gesteriliseerd als beschreven in hoofdstuk 2.2, met als verschil dat de

zaadjes na sterilisatie niet werden gedroogd. Het groeimedium is een aangepast Hoagland medium [49] en de groeiomstandigheden zijn identiek als beschreven in hoofdstuk 2.2.

De genexpressie en enzymactiviteiten werden geanalyseerd in een kinetisch experiment waarbij de planten gedurende 2u, 24u en 72u werden blootgesteld aan CdSO₄ (0, 5 en 10 µM CdSO₄). Deze concentraties zijn gebaseerd op concentraties gemeten in het poriënwater in een met Cd vervuild gebied in de Noorderkempen (België) [49]. Er werd een testexperiment uitgevoerd om het optimale tijdstip van blootstellen te bepalen, waarbij rekening werd gehouden met de mogelijkheid de planten te kunnen bestuderen in eenzelfde ontwikkelingsstadium. De metabolietconcentratie werd enkel gemeten na een behandeling met CdSO₄ gedurende 24u. Voor de verschillende analyses werden telkens volledige rozetjes geoogst, overgebracht in eppendorf®-buisjes (epje) (Eppendorf, Duitsland) en onmiddellijk gekoeld met vloeibare stikstof.

2.4 Analyse van genexpressie van pro- en antioxidatieve genen

Elk staal bevatte 50 tot 100 mg bladmateriaal. Op dit staal werd een RNA-extractie uitgevoerd gebruikmakende van de RNAqueous®-kit (Applied Biosystems, VS/CA). Onmiddellijk na extractie werd de concentratie RNA en de zuiverheid van het staal bepaald met een Nanodrop™ (Thermo Fisher, VS/MA). De concentratie RNA is gebaseerd op de absorptie bij 260 nm en de zuiverheid van het staal is gebaseerd op de verhouding van de absorptie bij 260 nm en 280 nm. Na deze stap werd het RNA onmiddellijk gekoeld met vloeibare stikstof en bewaard bij -70°C. In een volgende stap werd resterend DNA verwijderd m.b.v. de Turbo-DNA-free™ kit (Applied Biosystems, VS/CA). Om variatie binnen de stalen tegen te gaan werd voor elk experiment dezelfde hoeveelheid RNA gebruikt nl. 1 µg. Vervolgens werd het RNA omgezet in cDNA met de High-Capacity cDNA Reverse Transcription-kit (Applied Biosystems, VS/CA). Het geproduceerde cDNA werd 10 maal verdund in Tris-EDTA buffer en bewaard bij -20°C. Voor de eigenlijke real-time PCR reactie werd gebruik gemaakt van SYBR® Green technologie en het 7500 Fast Real-Time PCR systeem (beide: Applied Biosystems, VS/CA). Het totale reactievolume was 10 µl en bestond uit 2 µl cDNA en 300 nM van elke primer (forward en reverse). Er werd een selectie van 30 genen gemaakt waarvan de genexpressie werd gemeten (tabel 1). Primers werden ontwikkeld met behulp van Primer Express™ 2.0 (versie 2.0, 1995-2001, Applied Biosystems, VS/CA). Normalisatie van de genexpressie gebeurde volgens de 2^{-ΔΔCt}-methode van Livak *et al.* gebruikmakende van drie referentiegenen [50]. Deze referentiegenen zijn *AT5G15710*, *AT2G28390* en *AT5G08290* en werden geselecteerd omwille van hun hoge expressiestabiliteit in *A. thaliana* na behandeling met Cd zoals beschreven door Remans *et al.* [51]. Voor dit experiment werd uitgegaan van 4 biologische herhalingen.

Tabel 1: Overzicht van de bestudeerde genen inclusief het locus en de 'forward'- en 'reverse'-primer gebruikt tijdens real time PCR.

Gen	Locus	Forward primer	Reverse primer
APX1	At1g07890	TGCCACAAGGATAGGTCTGG	CCTTCTCTCTCCGCTCAA
APX2	At3g09640	TTGCTGTTGAGATCACTGGAGGA	TGAGGCAGACGACCTTCAGG
APX3	At4g35000	TTGAGCATCATAGGTTCCAGCA	CCGTGAGCTCCGTTCTCTCAT
APX4	At4g09010	CTCGAAGTTGATTTGCTGTCTAAG	CCGTGAAACCGTATCTCAGACTG
APX5	At4g35970	TGCAGTGGAGGTTACTGGCG	TGGATTTGGAAGTTCTCCATCGT
APX6	At4g32320	CGGCCAACAAATCCAGTAGT	CGAGGCACTCAGGGTTTCTG
APX7	At1g33660	CCTTTTGTAGCATCAGGGAGACG	TCATTTCCACCCTTGAAGAGAGG
CAT1	At1g20630	AAGTTTAGTCTTCCGCTCGGT	ACCATGAGGCCGAGAAATCA
CAT2	At4g35090	AAGTGCTTCATCGGGAAGGA	CTTCAACAAAACGCTTCACGA
CAT3	At1g20620	AACTCTCCATGACCGTTGGA	TCCGTTCCCTGTGCGAAATTG
CSD1	At1g08830	TCCATGCAGACCCTGATGAC	CCTGGAGACCAATGATGCC
CSD2	At2g28190	GAGCCTTTGTGGTTCACGAG	CACACCACATGCCAATCTCC
DHAR1	At4g32320	CCAGATTCACCTCTTTCGTC	TTACATCTCTGTTCGCGCC
DHAR2	At1g33660	ATCAGATGGTCTTGTAGGGAAGC	GTGCTCCTGATGTTCTCGGC
DHAR3	At4g08390	AACTCTTCCCGCGGATAA	CTGAATTTGCCTCTGTTGGCTC
FSD1	At4g25100	CTCCCAATGCTGTGAATCCC	TGGTCTTCGGTCTCGAAGTC
GR1	At3g24170	CTCAAGTGTGGAGCAACCAAAG	ATGCGTCTGGTCACACTGC
GR2	At3g54660	GCCAGATGGATGGAACAGAT	TAGGGTTGGAGAATGTTGGCG
LOX1	At1g55020	TTGGCTAAGGCTTTTGTCCG	GTGGCAATCACAACGGTTC
LOX2	At3g45140	TTTGCTCGCCAGACACTTG	GGGATCACCATAAACGGCC
MDAR1	At1g07890	TGCACCAACCCCAACTATCAC	CACAGCTCAGCCAAATGGAGAG
MDAR2	At1g07890	CCCAATTCAGCAGCAACAT	TCCATATGAGCGTCTGCACT
MDAR3	At4g35000	AAATGATTGCGAGTTCACCAGG	TACGTGATCATTGGAGGTGGTGT
MDAR4	At4g09010	GGTACGCAGCTCTCGAATTCA	AGGCCTCTCATACGGTGCAA
MDAR5	At4g35970	TAGTAGAAAGCGGATCGCCTGA	GCGCTTGGCAGTTTAGCCTT
MSD1	At3g10920	ATGTTTGGGAGCAGCCTAC	AACCTCGCTTGCATATTTCCA
RBOHC	At5g51060	TCACCAGAGACTGGCACAATAAA	GATGCTCGACCTGAATGCTC
RBOHD	At5g47910	AACTCTCCGCTGATTCCAACG	TGGTCAGCGAAGTCTTTAGATTCTT
sAPX	At4g08390	GGACACCAGAGTGGCTGAAGTT	GCATCAGTGGGTAGGACAAGGAG
tAPX	At1g77490	ATTCTCTTGGAAAGCGTCGCAT	CTCGTGCTCGTCCCATGAT

2.4.1 Clusteranalyse

Er werd een clusteranalyse uitgevoerd met de data van de analyse van de genexpressie om eventuele coregulatie tijdens Cd-stress te identificeren. Dit werd gedaan met GenEx Software (versie 4.3.1, MultiD Analyses AB, Zweden). De analyse is gebaseerd op het Ward-algoritme.

2.5 Analyse van activiteiten van antioxidatieve enzymen

Deze analyse is gebaseerd op de procedure beschreven door Smeets *et al.* [45]. De verschillende enzymactiviteiten werden gemeten met hetzelfde extract van blaadjes van *A. thaliana*. Deze stalen met een massa van ongeveer 100 mg (80 – 120 mg) werden fijngemalen met mortier en stamper samen met 2 ml extractiebuffer en een mespunt zand en polyvinylpyrrolidone (PVP). De extractiebuffer bevatte 0,1 M Tris HCl, 1 mM EDTA en 1 mM DTT en de pH werd op pH 7,8 gebracht. Polyvinylpyrrolidone zal deactivatie van proteïnen door fenolen tegengaan door te binden met fenolen. Het zand vergemakkelijkt het homogeniseren. Het extract werd gefilterd met een nylon gaas en vervolgens 10 minuten gecentrifugeerd (4°C, maximale snelheid). De enzymactiviteiten werden spectrofotometrisch bepaald in het supernatans bij 25°C. Hiervoor werd gebruik gemaakt van een eenvoudige UV/VIS-spectrofotometer (UV-1602, Shimadzu, Japan). Er werd voor deze analyse gebruik gemaakt van 4 of 5 biologische herhalingen.

Catalase

Catalase zet H_2O_2 om in water en de activiteit van CAT werd bepaald bij 240 nm. Het reactiemengsel bestond uit 730 μl 0,1 mM kaliumfosfaatbuffer (pH 7), 170 μl 5 mM H_2O_2 en 100 μl extract.

Glutathionreductase

Glutathionreductase reduceert GSSG tot vorming van GSH. De capaciteit van GR werd gemeten bij 340 nm. Het reactiemengsel bestond uit 815 μl 0,1 M Tris met 1 mM EDTA (pH 8), 17,5 μl 81,6 mM GSSG in water, 17,5 μl 6,7 mM NADPH in water en 150 μl extract.

Superoxidedismutase

Superoxidedismutase katalyseert de dismutatie van $\text{O}_2^{\cdot-}$ waarbij één $\text{O}_2^{\cdot-}$ wordt gereduceerd tot vorming van waterstofperoxide en het ander wordt geoxideerd tot vorming van zuurstof. Cytochroom C kan net als SOD $\text{O}_2^{\cdot-}$ oxideren tot O_2 . De analyse van de SOD-activiteit is gebaseerd op de inhibitie van cytochroom C bij 550 nm en werd berekend a.d.h.v. een blanco zonder toegevoegd staal. Het reactiemengsel bestond uit 630 μl 50 mM kaliumfosfaatbuffer (pH 7,8), 100 μl 1mM EDTA, 100 μl 0,5 mM xanthine, 100 μl 0,1mM cytochroom C, 50 μl extract en 20 μl xanthineoxidase (XOD).

2.6 Analyse van redoxkoppels met een centrale rol in het antioxidatief systeem

Voor de analyse van NAD, NADP, GSH en ASA in de blaadjes van *A. thaliana* werd een methode, beschreven door Queval en Noctor [46], aangepast. Voor geoxideerde en gereduceerde vormen van GSH en ASA en voor NAD^+ en NADP^+ werd een zure extractie (0,2 N HCl) uitgevoerd. Voor de analyse van NADH en NADPH werd een alkalische extractie (0,2 M NaOH) uitgevoerd.

Elk staal had een massa van ongeveer 100 mg. Homogenisatie gebeurde met een schudapparaat en stalen bolletjes (1 minuut; maximale snelheid), waarbij de houders vooraf gekoeld werden met vloeibare stikstof. Het extractiemedium (0,2 N HCl of 0,2 N NaOH) werd toegevoegd in een concentratie van 10 μl per mg staal en het mengsel werd geschud met een vortex tot het volledig was ontdooid. Hierna werd het staal 10 minuten gecentrifugeerd (4°C, maximale snelheid).

Voor de analyse van ASA en GSH werd 500 μl van het zure extract overgebracht in een nieuw epje waaraan 50 μl NaH_2PO_4 (pH 5,6) werd toegevoegd. De pH werd op pH 5-6 gebracht met 0,2 M NaOH. Op voorhand werd met teststalen en pH-strips getest welk volume 0,2 M NaOH moest worden toegevoegd om het staal op pH te krijgen. Voor de analyse van $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ werd 200 μl van het zure extract overgebracht in een nieuw epje. Dit werd gedurende 1 minuut in kokend water gebracht en vervolgens onmiddellijk gekoeld. Daarna werd 20 μl 0,2 M NaH_2PO_4 (pH 5,6) toegevoegd en werd de pH op pH 5-6 gebracht met 0,2 M NaOH. Voor de analyse van NADH en NADPH werd 200 μl van het alkalische extract overgebracht in een nieuw epje. Dit extract werd 1 minuut gekookt waarna het onmiddellijk werd gekoeld. Hierna werd 20 μl 0,2 M NaH_2PO_4 (pH 5,6) toegevoegd aan het extract en werd de pH met behulp van 0,2 N HCl op pH 7-8 gebracht.

De absorptie werd spectrofotometrisch gemeten m.b.v. een platereader (FLUOstar Omega, BMG LABTECH, Duitsland) en Greiner 96 well microplates (F-bottom) (Greiner Bio-One, Oostenrijk). Er werd uitgegaan van 3 technische en 3 of 4 biologische herhalingen. De kwantificatie is gebaseerd op de vergelijking met relevante standaarden die in tweevoud werden gemeten (twee technische herhalingen). Bij de analyse van elk staal werd de absorptie gemeten in een welletje met alle

componenten, maar zonder toegevoegd staal. Deze controlestep dient om absorptie door andere componenten uit te sluiten. De ASA-meting is een eindpuntmeting terwijl de andere metingen kinetische metingen zijn.

Voor al de oplossingen in dit protocol werd Milli-Q®-water (Millipore Corporation, VS-MA) gebruikt. De enzymen gebruikt in dit protocol werken optimaal bij een temperatuur van 25°C, waardoor het belangrijk is de mastermix op kamertemperatuur te brengen.

Ascorbaat

De ASA-meting is gebaseerd op de omzetting van gereduceerd ASA door ascorbaatoxidase (AO) in de niet-absorberende geoxideerde vorm (DHA). Gereduceerd ASA kent een absorptiemaximum bij 265 nm. Totaal ASA werd gemeten na voorbehandeling met dithiothreitol (DTT) wat DHA omzet in ASA.

Ascorbaatoxidase (A0157, Sigma Aldrich, VS-MO) werd opgelost in 0,2 M NaH₂PO₄ (pH 5,6) in een concentratie van 40U.ml⁻¹. De standaardcurve voor de analyse van ASA was gebaseerd op volgende concentraties: 20000, 10000, 5000, 2500, 1250, 625 en 312,5 pmol ASA (A7631, Sigma Aldrich, VS-MO). De standaardcurve voor DHA was gebaseerd op volgende concentraties: 2000, 1500, 100, 750, 500, 250 en 125 pmol DHA (A0157, Sigma Aldrich, VS-MO). Beide standaarden werden opgelost in 0,2 M NaH₂PO₄ (pH 5,6).

Eerst werd een mastermix bereid bestaande uit 4/7^e 0,2 M NaH₂PO₄ (pH 5,6) en 3/7^e Milli-Q®-water. Voor de analyse van ASA werd 20 µl staal, standaard of blanco in een welletje gebracht samen met 155 µl mastermix. Daarna werd de plaat geschud met een plaatschudder (30 sec, 1000 rpm) waarna de absorptie werd gemeten bij 265 nm. Vervolgens werd 10 µl AO (40 U/ml) samen met 20 µl mastermix toegevoegd en werd er opnieuw geschud. 5 minuten na toevoeging van het enzym werd opnieuw de absorptie bij 265 nm gemeten. Voor de meting van totaal ASA werd 100 µl staal, standaard en blanco gemengd met 0,14 ml 0,12 M NaH₂PO₄ (pH 7,5) en 10 µl 25 mM DTT. Na een incubatieperiode van een halfuur bij kamertemperatuur werd de absorptie, zoals voor ASA, gemeten. De concentratie DHA werd bekomen door het verschil tussen de concentratie ASA en totaal ASA te berekenen.

Glutathion

Deze analyse berust op de GR-afhankelijke reductie van 5,5'-dithiobis(2-nitro-benzoic acid) (DTNB) tot vorming van 2-nitro-5-thiobenzoate (NTB) in de aanwezigheid van gereduceerd GSH. Voor de meting van GSSG werd staal eerst voorbehandeld met 2-vinylpyridine (VPD) dat een complex vormt met GSH.

Glutathionreductase (G3664, Sigma Aldrich, VS-MO) is opgelost in (NH₄)₂SO₄. Dit werd 10 minuten gecentrifugeerd (4°C, maximale snelheid) en de pellet werd opgelost in 0,2 M Na₂PO₄ (pH 7,5) en 10 mM EDTA in een concentratie van 20 U/ml. De standaardcurve voor GSH was gebaseerd op de concentraties: 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 en 15,625 pmol GSH (G4251, Sigma Aldrich, VS-MO) en de standaardcurve voor GSSG bestond uit volgende concentraties: 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 en 3,125 pmol GSSG (G4376, Sigma Aldrich, VS-MO).

Voor de analyse van totaal GSH (gereduceerd GSH + GSSG) werd 10 µl staal of standaard in een welletje gebracht samen met 100 µl 0,2 M NaH₂PO₄ (pH 7,5) met 10 mM EDTA, 60 µl Milli-Q®- water, 10 µl 10 mM NADPH, 10 µl 12 mM DNTB (D8130, Sigma Aldrich, VS-MO) in DMSO en 10 µl GR (20

U/ml). De absorptie bij 412 nm werd onmiddellijk gemeten na automatisch schudden in het toestel (10 sec). Voor de analyse van GSSG werd VPD toegevoegd aan 200 μ l stalen, blanco's en standaarden. Na een incubatieperiode van een half uur bij kamertemperatuur werd het mengsel 1 minuut gecentrifugeerd (maximale snelheid), wat VPD doet neerslaan. Er werd 20 μ l van dit product toegevoegd aan elk welletje. De analyse werd verder uitgevoerd zoals beschreven voor totaal GSH. De concentratie GSH werd berekend door het verschil tussen de concentratie totaal GSH en de concentratie GSSG te nemen.

NAD en NADP

Deze methode berust op de phenazinemethosulfaat (PMS)-gekatalyseerde reductie van dichlorophenolindophenol (DCPIP) in de aanwezigheid van ethanol en alcoholdehydrogenase (ADH) (voor NAD^+ en NADH) of glucose-6-fosfaat (G6P) en glucose-6-fosfaat-dehydrogenase (G6PDH) (voor NADP^+ en NADPH). Er werd onderscheid gemaakt tussen de gereduceerde en geoxideerde vorm door preferentiële destructie in zuur of base.

Alcoholdehydrogenase (A3263, Sigma Aldrich, VS-MO) werd opgelost in 0,1 M HEPES (pH 8,8) en 2 mM EDTA tot 2500 U/ml. G6PDH (G7877, Sigma Aldrich, VS-MO) is opgelost in $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Het mengsel werd 10 minuten gecentrifugeerd (4°C, maximale snelheid) waarna de pellet werd opgelost in 0,1 M HEPES (pH 7,4) en 2 mM EDTA tot 200 U/ml. De standaardcurve voor NAD^+/NADH was gebaseerd op 40; 30; 20; 15; 10; 5 en 2,5 pmol NADH (N4505, Sigma Aldrich, VS-MO). De standaardcurve voor $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ was gebaseerd op 60; 45; 30; 22,5; 15; 7,5, 3,75 pmol NADPH (N5130, Sigma Aldrich, VS-MO).

Voor de analyse van NAD^+ en NADH werd 20 μ l staal of standaard in een welletje gebracht samen met 0,1 ml 0,1 M HEPES (pH 8,8) en 2 mM EDTA, 20 μ l 1,2 mM DCPIP (33125, Sigma Aldrich, VS-MO), 10 μ l 20 mM PMS (P9625, Sigma Aldrich, VS-MO), 10 μ l Milli-Q®- water en 10 μ l ADH (2500 U. ml^{-1}). Daarna werd 30 μ l ethanol/water (1/1) toegevoegd en werd de absorptie gemeten bij 600 nm na automatisch schudden in het toestel (10 sec).

Voor de analyse van NADP^+ en NADPH werd 30 μ l staal of standaard in een welletje gebracht samen met 0,1 ml 0,1 M HEPES (pH 7,4) en 2 mM EDTA, 20 μ l 1,2 mM DCPIP, 10 μ l 20 mM PMS, 10 μ l 10 mM G6P (G7250, Sigma Aldrich, VS-MO), 30 μ l Milli-Q®- water en 10 μ l G₆PDH (200 U. ml^{-1}). Na automatisch schudden in het toestel (10 sec) werd de absorptie bij 600 nm gemeten.

2.6.1 Opmerkingen bij de recent beschreven methode voor analyse van redoxkoppels

Queval en Noctor (2007) beschreven een methode voor de UV/VIS-spectrofotometrische analyse van vier belangrijke redoxkoppels in een plantencel [46]. Deze methode werd succesvol aangepast en toegepast tijdens dit project, hoewel er nog ruimte is voor verbetering.

Zo was het niet mogelijk om NADH te kwantificeren in het bestudeerde plantenmateriaal, vermoedelijk omwille van het feit dat NADH onder de detectielimiet zat. Queval en Noctor (2007) beschreven dat NADH slechts in een concentratie van 2,8 nmol/g aanwezig was in *A. thaliana* (15-31 dagen oud). Dit is veel lager dan de waarden van de andere componenten. Dit probleem zou verholpen kunnen worden door minder extractiemedium te gebruiken in verhouding tot de massa staal (5 μ l/mg i.p.v. 10 μ l/mg). Verder beschreven Queval en Noctor dat DHA slechts 19% uitmaakt van het totale ASA, terwijl uit dit experiment blijkt dat DHA 71% uitmaakt van het totaal gemeten

ASA (onbehandeld WT). Queval en Noctor beschreven ook dat DHA de meest problematische component was om te meten daar er soms grote verschillen zaten op individuele metingen. Dit was echter geen probleem tijdens dit experiment. De analyse van DHA, NAD^+ , NADP^+ en NADPH leverde geen significante verschillen op, maar met uitzondering van NAD^+ waren er wel telkens sterke niet-significante verschillen. Voor deze analyses werden slechts 3 biologische herhalingen gebruikt. Meer herhalingen zouden mogelijk meer significante verschillen hebben opgeleverd. Het feit dat PC ook gemeten wordt via deze methode als totaal GSH is een probleem wanneer Cd-stress wordt bestudeerd. Cadmium is een potente activator van de biosynthese van PC, wat kan leiden tot een vertekend beeld van de redoxstatus van GSH. Dit kan verholpen worden door deze analyse te combineren met de analyse van PC. Tot slot, de homogenisatie gebeurde door het staal te schudden tegen hoge snelheden samen met stalen bolletjes. Het toevoegen van 0,2 N HCl maakt dat de stalen bolletjes oxideren. Omdat dit mogelijk een negatief effect kan hebben op het staal, wordt aanbevolen om de extractie te doen met mortier en stamper. Eventueel kan zand gebruikt worden om het fijnmalen te bevorderen.

2.7 Statistische analyse

De data werd statistisch geanalyseerd met de statistische software SAS 9.2 (SAS Institute Inc., USA-NC). Eerst werd getest met behulp van een Shapiro-Wilk-test of de data al dan niet normaal verdeeld was. Ook werd a.d.h.v. een plot van de residuen gecontroleerd of de variantie gelijk was in de dataset (homoscedasticiteit). Indien de data niet voldeed aan deze voorwaarden werd een transformatie toegepast gebaseerd op één van volgende wiskundige functies: logaritme, vierkantswortel, reciproke of exponentiële functie. De data werd uiteindelijk geanalyseerd met een twee-weg ANOVA (analysis of variance) met PROC GLM (general linear model). 'Multiple comparison' was gebaseerd op de Tukey-methode.

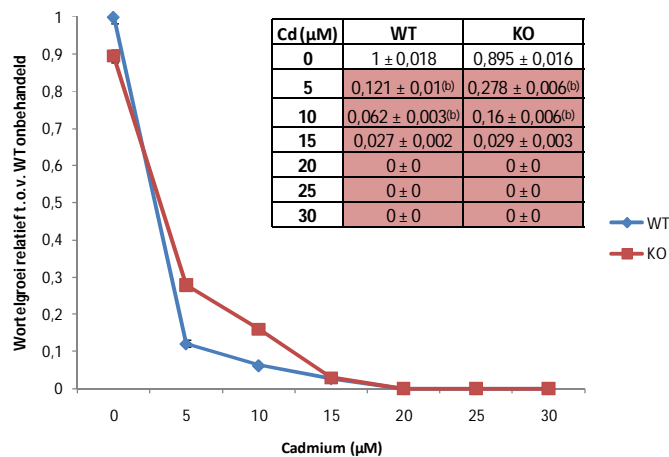
Indien het toepassen van een transformatie niet volstond om te voldoen aan de voorwaarden, werd gebruik gemaakt van een niet-parametrische Kruskal-Wallis-test met behulp van Microsoft Excel (Microsoft Corporation, VS-WA).

3 Resultaten

In dit hoofdstuk worden de resultaten van de verschillende deexperimenten besproken.

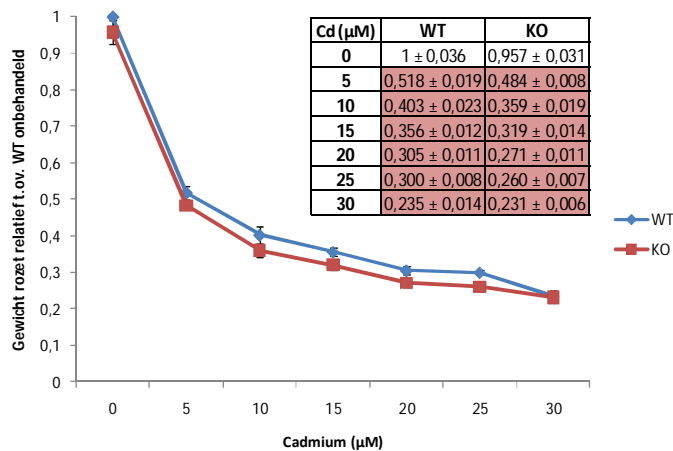
3.1 Groeiexperiment op verticale agarplaten

Na één week zonder Cd-behandeling was de wortelgroei van de KO 10% lager in vergelijking met de wortelgroei van het WT (niet-significant) (figuur 6). Bij blootstelling aan de verschillende Cd-concentraties werd, voor beide genotypes, een significant lagere wortelgroei gemeten. Bij 5 en 10 μM Cd werd een significant hogere wortelgroei waargenomen voor de KO in vergelijking met het WT. Vanaf 15 μM werd zo goed als geen wortelgroei meer waargenomen.



Figuur 6: De relatieve wortelgroei van 2 weken oude *A. thaliana* WT en KO bij blootstelling aan Cd (μM). Elk punt stelt het gemiddelde voor van 20 biologische herhalingen \pm standaardfout. Een significant genotype-effect wordt weergegeven door een letter achter de waarden in de tabel (SN: ^(b) $p < 0,05$). Een afname in wortelgroei door blootstelling aan Cd (Cd-effect) wordt weergegeven door een markering (SN: $p < 0,01$).

Bij blootstelling aan de verschillende Cd-concentraties werd, voor beide genotypes, een significant lagere biomassa van het rozet gemeten (figuur 7). Er werden geen significante genotype-effecten waargenomen.



Figuur 7: Het relatief gewicht van het rozet van 2 weken oude *A. thaliana* WT en KO bij blootstelling aan Cd (μM). Elk punt stelt het gemiddelde voor van 20 biologische herhalingen \pm standaardfout. Een afname in wortelgroei door blootstelling aan Cd (Cd-effect) wordt weergegeven door een markering (SN: $p < 0,01$).

3.2 Testexperiment groei in hydrocultuur

Uit een testexperiment bleek dat plantjes best behandeld worden op dag 18 (data niet toegevoegd). De plantjes bevinden zich op die manier gedurende minstens 72u in hetzelfde ontwikkelingsstadium.

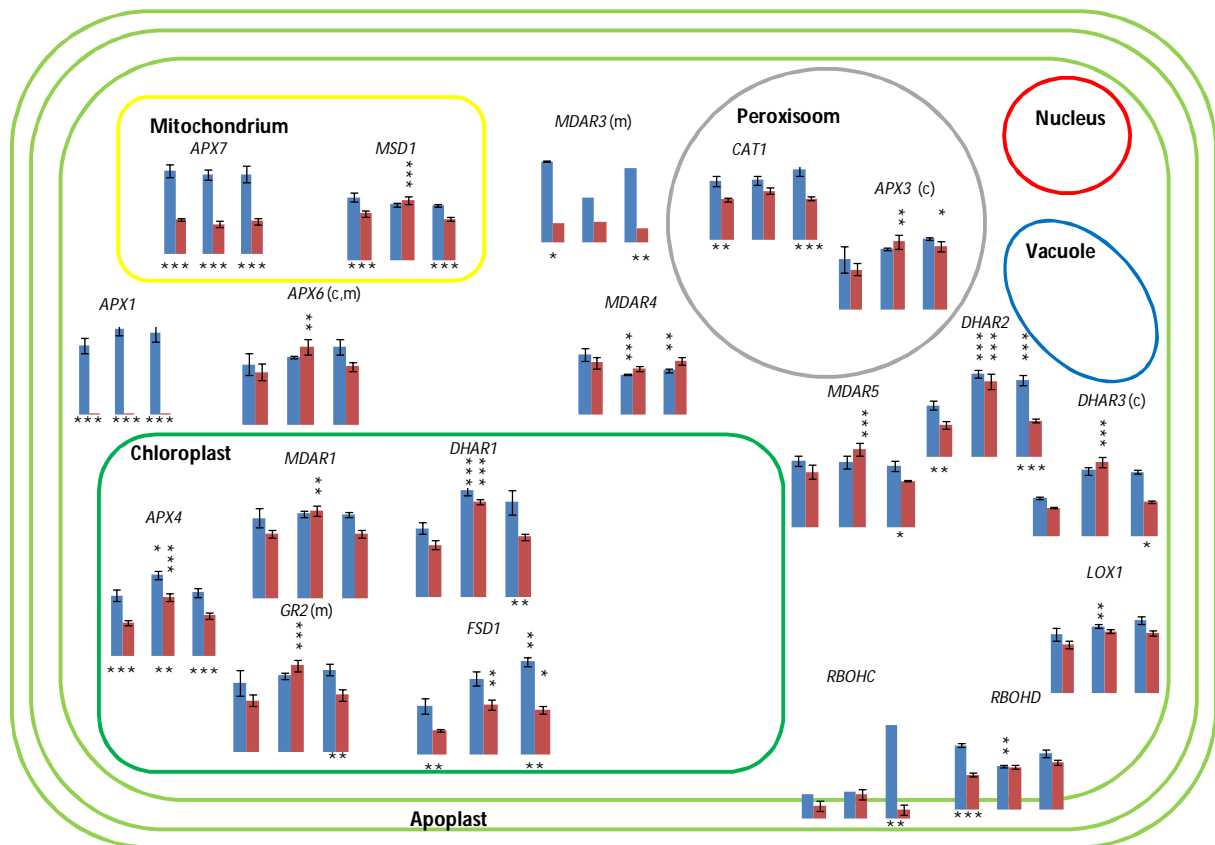
3.3 Analyse van genexpressie van pro- en antioxidatieve genen

In dit hoofdstuk worden de resultaten van de analyse van de genexpressie besproken. Het resultaat na elke blootstellingstijd komt afzonderlijk aan bod.

Genotype- en cadmiumeffecten na 2u

Na 2u werden duidelijke verschillen waargenomen in de genexpressie van beide genotypes (figuur 8 en tabellen 2 en 3). Onder controleomstandigheden werd de genexpressie van *MDAR3*, *DHAR2*, *MSD1*, *APX7*, *CAT1*, *RBOHD*, *APX4* en *FSD1* significant verlaagd bij de KO t.o.v. het WT. Bij een blootstelling aan 5 μM Cd werd de expressie van *APX7* en *APX4* verlaagd bij de KO t.o.v. het WT. Bij een blootstelling aan 10 μM Cd werden *MDAR3*, *DHAR3*, *MDAR5*, *DHAR2*, *MSD1*, *APX7*, *CAT1*, *RBOHC*, *DHAR1*, *APX4*, *FSD1* en *GR2* gereduceerd in expressie bij de KO in vergelijking met het WT.

De KO en het WT werden op een verschillende manier beïnvloed door een Cd-behandeling van 2u (figuur 8 en tabellen 2 en 3). De genexpressie van *DHAR2*, *APX4* en *DHAR1* werd verhoogd bij blootstelling aan 5 μM Cd gedurende 2u en dit voor zowel het WT als de KO. De expressie van *LOX1* werd bij deze behandeling geïnduceerd bij het WT en *DHAR3*, *APX3*, *MDAR1*, *MDAR5*, *GR2*, *FSD1* en *MSD1* werden geïnduceerd bij de KO. De expressie van *MDAR4* en *RBOHD* werd verlaagd bij het WT bij blootstelling aan 5 μM Cd terwijl het transcriptieniveau van *APX6* werd gereduceerd bij de KO. Bij een blootstelling aan 10 μM Cd werd de genexpressie van *FSD1* geïnduceerd bij het WT en de KO. Het transcriptieniveau van *DHAR2* werd bij deze behandeling geïnduceerd bij het WT en *APX3* werd geïnduceerd bij de KO. De expressie van *MDAR4* werd bij blootstelling aan 10 μM Cd enkel verlaagd bij het WT.



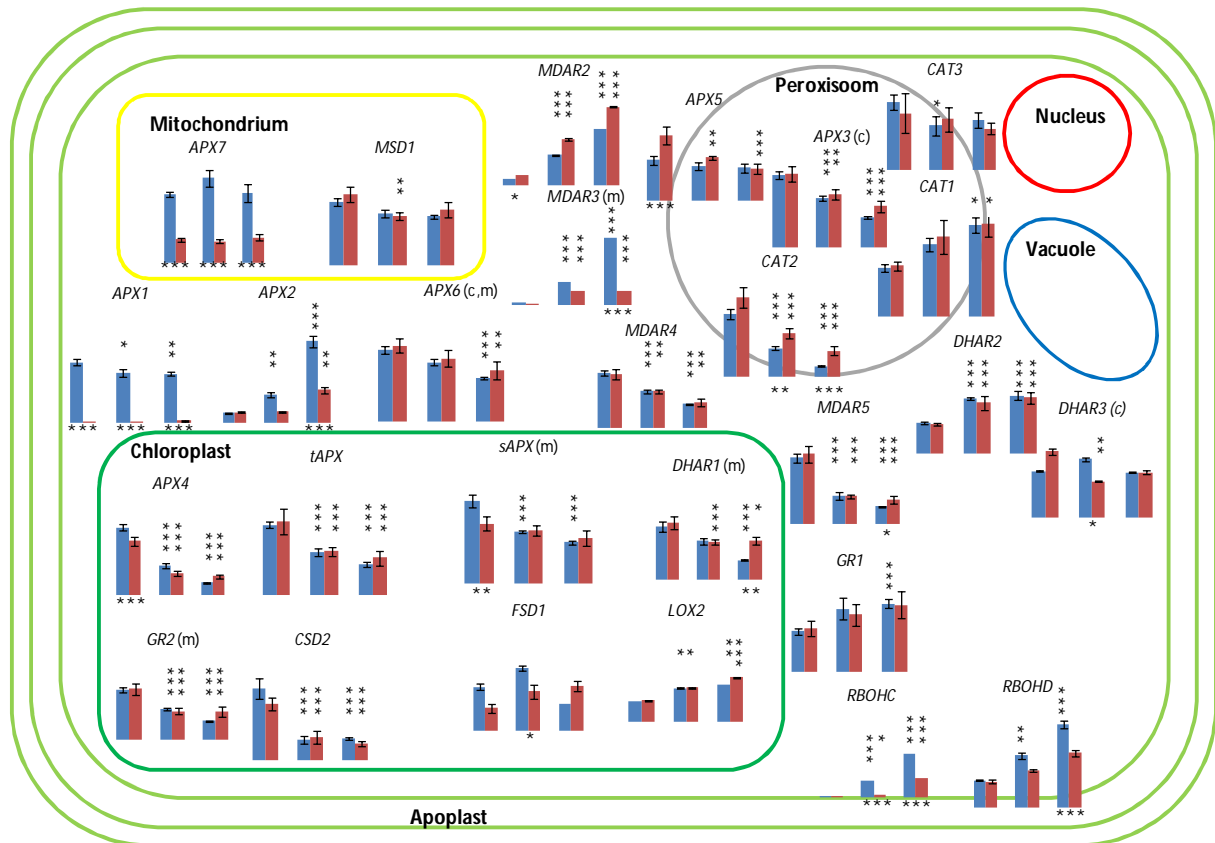
Figuur 8: Genotype- en Cd-effecten in de genexpressie in blaadjes van 18 dagen oude *A. thaliana* WT en KO, 2u na de behandeling met Cd. Elk gen wordt in dit schema van een plantencel weergegeven volgens zijn subcellulaire lokalisatie (gebaseerd op Mittler *et al.* [38]). Bepaalde genen komen in verschillende organellen tot expressie wat wordt weergegeven door de letter tussen haakjes (c: chloroplast, m: mitochondrium). De blauwe kolommen staan voor het WT en de rode voor de KO. Elke eerste twee kolommen staan voor het resultaat bij 0 μM Cd, de volgende twee voor het resultaat bij 5 μM Cd en de laatste twee voor het resultaat bij 10 μM Cd. Elke kolom stelt het gemiddelde voor van 4 biologische herhalingen (relatief t.o.v. onbehandeld WT op tijdstip 0) \pm standaardfout. Sterretjes onder twee kolommen stellen een genotype-effect voor (SN: * : $p < 0,1$; ** : $p < 0,05$; * : $p < 0,01$). Sterretjes boven een kolom staan voor een Cd-effect (t.o.v. onbehandeld WT of KO) (SN: * : $p < 0,1$; * : $p < 0,05$; * : $p < 0,01$).**

Genotype- en cadmiumeffecten na 24u

Na 24u werden een aantal verschillen waargenomen in de genexpressie van beide genotypes (figuur 9 en tabellen 2 en 3). De genexpressie van *APX7*, *APX4* en *sAPX* werd verlaagd na 24u zonder blootstelling aan Cd bij de KO in vergelijking met het WT terwijl de expressie van *MDAR2* en *APX5* werd geïnduceerd bij de KO t.o.v. het WT. Bij een blootstelling aan 5 μM Cd werden de genen *DHAR3*, *APX7*, *RBOHC* en *FSD1* verhoogd tot expressie gebracht bij de KO t.o.v. het WT terwijl de expressie van *CAT2* werd verhoogd bij de KO t.o.v. het WT. Bij blootstelling aan 10 μM Cd werd de genexpressie van *MDAR3*, *APX2*, *APX7*, *RBOHC*, *RBOHD* en *DHAR1* verlaagd bij de KO in vergelijking met het WT terwijl de expressie van *MDAR5*, *CAT2* en *DHAR1* werd verhoogd bij de KO t.o.v. het WT.

Na een Cd-behandeling gedurende 1 dag waren er gelijkenissen en verschillen in de Cd-respons van beide genotypes (figuur 9 en tabellen 2 en 3). De genexpressie van *MDAR2*, *MDAR3*, *DHAR2*, *LOX2* en *RBOHC* werd verhoogd bij blootstelling aan 5 μM Cd en dit bij zowel het WT als de KO. De expressie van *APX2* en *RBOHD* werd bij deze behandeling enkel geïnduceerd bij het WT. De genexpressie van *APX3*, *APX4*, *tAPX*, *MDAR4*, *MDAR5*, *DHAR1*, *DHAR3*, *GR2*, *CAT2* en *CSD2* werd verlaagd bij blootstelling aan 5 μM Cd bij zowel het WT als de KO. Het transcriptieniveau van *APX1* en *sAPX* werd bij deze behandeling enkel verlaagd bij het WT terwijl *DHAR1*, *DHAR3* en *MSD1* enkel verlaagd tot

expressie werden gebracht bij de KO. De genexpressie van *APX2*, *MDAR2*, *MDAR3*, *DHAR2*, *CAT1*, *LOX2*, *RBOHC* en *RBOHD* werd verhoogd bij blootstelling aan 10 μM Cd en dit bij zowel de KO als het WT. *GR1* werd bij deze blootstelling enkel geïnduceerd bij het WT. De genexpressie van *APX3*, *APX4*, *APX6*, *tAPX*, *MDAR4*, *MDAR5*, *DHAR1*, *GR2*, *CAT2* en *CSD2* werd verlaagd bij blootstelling aan 10 μM Cd en dit bij zowel het WT als de KO. Het transcriptieniveau van *APX1* en *sAPX* werd bij deze behandeling enkel verlaagd bij het WT terwijl *APX5* enkel verlaagd tot expressie werd gebracht bij de KO.

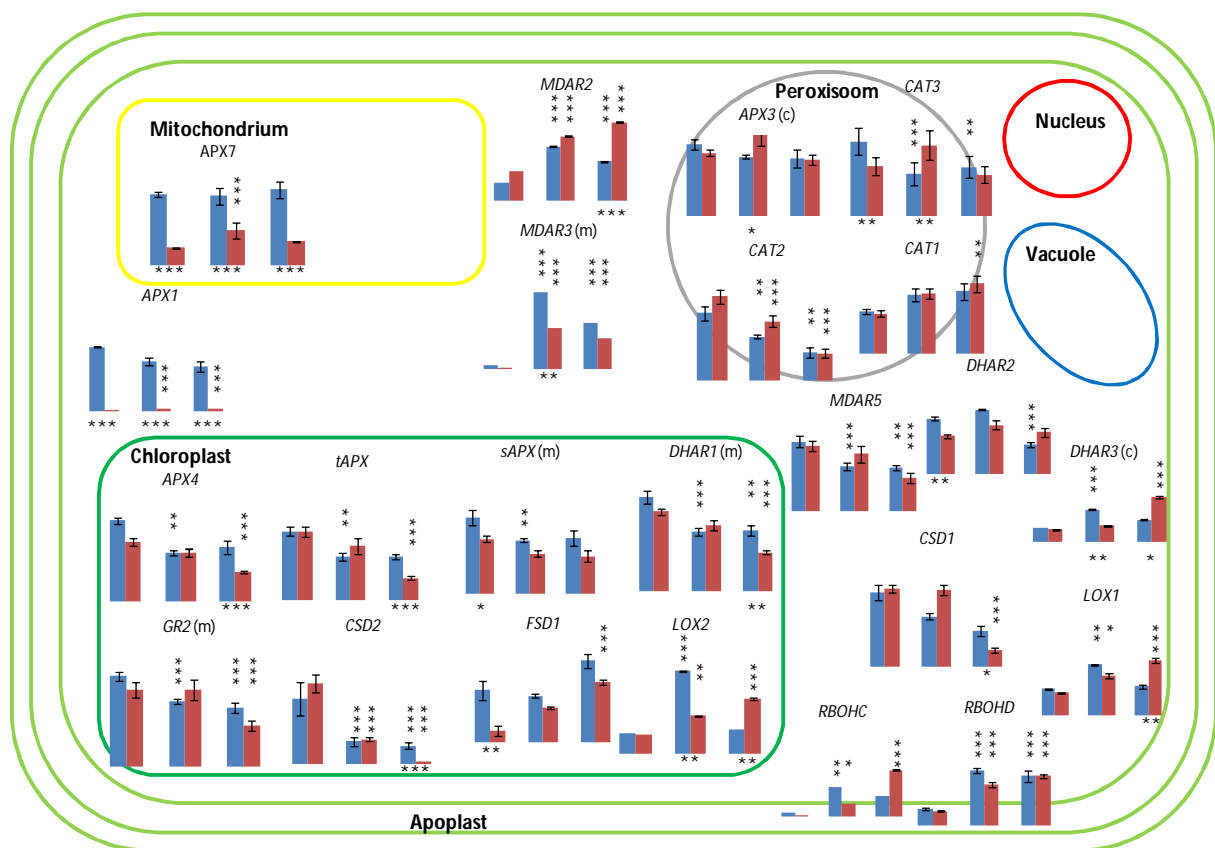


Figuur 9: Genotype- en Cd-effecten in de genexpressie in blaadjes van 19 dagen oude *A. thaliana* WT en KO, 24u na de behandeling met Cd. Elk gen wordt in dit schema van een plantencel weergegeven volgens zijn subcellulaire lokalisatie (gebaseerd op Mittler *et al.* [38]). Bepaalde genen komen in verschillende organellen tot expressie wat wordt weergegeven door de letter tussen haakjes (c: chloroplast, m: mitochondrium). De blauwe kolommen staan voor het WT en de rode voor de KO. Elke eerste twee kolommen staan voor het resultaat bij 0 μM Cd, de volgende twee voor het resultaat bij 5 μM Cd en de laatste twee voor het resultaat bij 10 μM Cd. Elke kolom stelt het gemiddelde voor van 4 biologische herhalingen (relatief t.o.v. onbehandeld WT op tijdstip 0) \pm standaardfout. Sterretjes onder twee kolommen stellen een genotype-effect voor (SN: * : $p < 0,1$; ** : $p < 0,05$; *** : $p < 0,01$). Sterretjes boven een kolom staan voor een Cd-effect (t.o.v. onbehandeld WT of KO) (SN: * : $p < 0,1$; * : $p < 0,05$; * : $p < 0,01$).

Genotype- en cadmiumeffecten na 72u

Na 3 dagen werden duidelijke verschillen waargenomen in de genexpressie van beide genotypes (figuur 10 en tabellen 2 en 3). De genexpressie van *DHAR2*, *APX7*, *CAT3*, *sAPX* en *FSD1* werd verlaagd bij de KO na 72u zonder blootstelling aan Cd. De genexpressie van *MDAR3*, *DHAR3*, *APX7* en *LOX2* werd verlaagd na blootstelling aan 5 μM Cd bij de KO t.o.v. het WT terwijl de genexpressie van *APX3* en *CAT3* werd verhoogd bij de KO t.o.v. het WT. Bij een blootstelling aan 10 μM Cd werd de genexpressie van *APX7*, *APX4*, *DHAR1*, *tAPX* en *CSD2* verlaagd bij de KO in vergelijking met het WT terwijl de expressie van *DHAR3*, *MDAR2*, *LOX1* en *LOX2* werd geïnduceerd in vergelijking met het WT.

Na een Cd-behandeling gedurende 3 dagen waren er gelijkenissen en verschillen in de Cd-respons van beide genotypes (figuur 10 en tabellen 2 en 3). De genexpressie van *MDAR2*, *MDAR3*, *DHAR2*, *LOX1*, *LOX2*, *RBOHC* en *RBOHD* werd verhoogd bij blootstelling aan 5 μM Cd en dit bij zowel het WT als de KO. *DHAR3* werd bij deze behandeling enkel geïnduceerd bij het WT terwijl *APX7* werd geïnduceerd bij de KO. De genexpressie van *CAT2* en *CSD2* werd verlaagd bij blootstelling aan 5 μM Cd voor zowel het WT als de KO. Het transcriptieniveau van *MDAR5*, *DHAR1*, *CAT3*, *APX4*, *tAPX*, *sAPX* en *GR2* werd gereduceerd bij deze behandeling bij het WT terwijl het transcriptieniveau van *APX1* enkel bij de KO werd verlaagd. De genexpressie van *MDAR2*, *MDAR3* en *RBOHD* werd verhoogd bij blootstelling aan 10 μM Cd bij zowel het WT als de KO. Het transcriptieniveau van *CAT3* werd bij deze behandeling geïnduceerd bij het WT terwijl *DHAR3*, *CAT1*, *FSD1*, *LOX1*, *LOX2* en *RBOHC* werden geïnduceerd bij de KO. De genexpressie van *MDAR5*, *DHAR1*, *GR2*, *CAT2* en *CSD2* werd verlaagd bij blootstelling aan 10 μM Cd bij het WT en de KO. De expressie van *DHAR2* en *CAT3* werd verlaagd bij het WT terwijl het transcriptieniveau van *APX1*, *APX4*, *tAPX* en *CSD1* werd verlaagd bij de KO.



Figuur 10: Genotype- en Cd-effecten in de genexpressie in blaadjes van 21 dagen oude *A. thaliana* WT en KO, 72u na de behandeling met Cd. Elk gen wordt in dit schema van een plantencel weergegeven volgens zijn subcellulaire lokalisatie (gebaseerd op Mittler *et al.* [38]). Bepaalde genen komen in verschillende organellen tot expressie wat wordt weergegeven door de letter tussen haakjes (c: chloroplast, m: mitochondrium). De blauwe kolommen staan voor het WT en de rode voor de KO. Elke eerste twee kolommen staan voor het resultaat bij 0 μM Cd, de volgende twee voor het resultaat bij 5 μM Cd en de laatste twee voor het resultaat bij 10 μM Cd. Elke kolom stelt het gemiddelde voor van 4 biologische herhalingen (relatief t.o.v. onbehandeld WT op tijdstip 0) \pm standaardfout. Sterretjes onder twee kolommen stellen een genotype-effect voor (SN: * : p < 0,1; ** : p < 0,05; *** : p < 0,01). Sterretjes boven een kolom staan voor een Cd-effect (t.o.v. onbehandeld WT of KO) (SN: * : p < 0,1; ** : p < 0,05; *** : p < 0,01).

Tabel 2: Genotype- en Cd-effecten in de genexpressie in blaadjes van 18 tot 21 dagen oude *A. thaliana* WT na de behandeling met Cd (0, 5 of 10 μM Cd) gedurende verschillende tijden (2u, 24u en 72u). Elke waarde stelt het gemiddelde voor van 4 biologische herhalingen (relatief t.o.v. onbehandeld WT op tijdstip 0 (niet toegevoegd)) \pm standaardfout. De letters tussen haakjes stellen genotype-effecten voor (SN: ^(a): $p < 0,1$; ^(b): $p < 0,05$; ^(c): $p < 0,01$). Een afname in genexpressie door blootstelling aan Cd (Cd-effect t.o.v. WT onbehandeld na zelfde blootstellingstijd) wordt weergegeven

door volgende kleurmarkering: SN: $p < 0,1$; $p < 0,05$; $p < 0,01$. Een toename in genexpressie door blootstelling aan Cd (Cd-effect t.o.v. WT onbehandeld na dezelfde blootstellingstijd) wordt weergegeven door volgende kleurmarkering:

SN: $p < 0,1$; $p < 0,05$; $p < 0,01$.

	2u			24 u			72u		
	0 μM Cd	5 μM Cd	10 μM Cd	0 μM Cd	5 μM Cd	10 μM Cd	0 μM Cd	5 μM Cd	10 μM Cd
APX1	1,112 \pm 0,118 ^(c)	1,380 \pm 0,097 ^(c)	1,326 \pm 0,142 ^(c)	1,220 \pm 0,065 ^(c)	1,012 \pm 0,075 ^(c)	0,991 \pm 0,043 ^(c)	1,26 \pm 0,018 ^(c)	0,981 \pm 0,075 ^(c)	0,873 \pm 0,104 ^(c)
APX2	0,295 \pm 0,024	0,314 \pm 0,011	0,348 \pm 0,017	0,532 \pm 0,045	1,543 \pm 0,149	4,551 \pm 0,311 ^(c)	0,611 \pm 0,022	0,79 \pm 0,149	0,337 \pm 0,026
APX3	0,893 \pm 0,23	1,071 \pm 0,014	1,259 \pm 0,028	1,322 \pm 0,066	0,890 \pm 0,038	0,542 \pm 0,031	1,441 \pm 0,1	1,176 \pm 0,038 ^(a)	1,156 \pm 0,18
APX4	1,073 \pm 0,102 ^(c)	1,419 \pm 0,062 ^(b)	1,119 \pm 0,075 ^(c)	0,930 \pm 0,049 ^(c)	0,412 \pm 0,035	0,168 \pm 0,012	1,016 \pm 0,038	0,612 \pm 0,035	0,680 \pm 0,077 ^(c)
APX5	0,965 \pm 0,081	0,867 \pm 0,063	0,986 \pm 0,08	0,823 \pm 0,095 ^(c)	0,703 \pm 0,087	0,668 \pm 0,089	0,740 \pm 0,076	0,677 \pm 0,087	0,741 \pm 0,155
APX6	0,831 \pm 0,015	0,929 \pm 0,015	1,074 \pm 0,101	0,914 \pm 0,048	0,757 \pm 0,037	0,553 \pm 0,016	1,282 \pm 0,113	1,062 \pm 0,037	0,979 \pm 0,085
APX7	1,155 \pm 0,094 ^(c)	1,11 \pm 0,074 ^(c)	1,109 \pm 0,114 ^(c)	1,116 \pm 0,049 ^(c)	1,386 \pm 0,134 ^(c)	1,139 \pm 0,143 ^(c)	1,125 \pm 0,034 ^(c)	1,097 \pm 0,134 ^(c)	1,204 \pm 0,137 ^(c)
tAPX	0,808 \pm 0,244	0,817 \pm 0,061	0,950 \pm 0,066	0,970 \pm 0,04	0,598 \pm 0,053	0,434 \pm 0,033	0,955 \pm 0,069	0,617 \pm 0,053	0,605 \pm 0,032 ^(c)
sAPX	1,209 \pm 0,399	1,036 \pm 0,1	1 \pm 0,037	1,167 \pm 0,088 ^(b)	0,735 \pm 0,023	0,582 \pm 0,024	1,025 \pm 0,101 ^(a)	0,711 \pm 0,023	0,738 \pm 0,107
MDAR1	1,175 \pm 0,145	1,232 \pm 0,052	1,225 \pm 0,032	1,1 \pm 0,038	0,9 \pm 0,031	0,875 \pm 0,047	1,276 \pm 0,049	1,191 \pm 0,031	1,125 \pm 0,162
MDAR2	1,615 \pm 0,069	1,035 \pm 0,009	1,173 \pm 0,022	1,051 \pm 0,014 ^(a)	4,955 \pm 0,035	9,134 \pm 0,057	0,963 \pm 0,009	2,886 \pm 0,035	2,1 \pm 0,027 ^(c)
MDAR3	1,383 \pm 0,008 ^(a)	0,763 \pm 0,002	1,257 \pm 0,004 ^(b)	4,232 \pm 0,025	48,64 \pm 0,068	138,361 \pm 0,252 ^(c)	2,911 \pm 0,022	78,361 \pm 0,068 ^(b)	46,446 \pm 0,172
MDAR4	1,215 \pm 0,133	0,819 \pm 0,017	0,901 \pm 0,028	1,17 \pm 0,059	0,776 \pm 0,046	0,507 \pm 0,017	1,058 \pm 0,071	1,139 \pm 0,046	0,929 \pm 0,093
MDAR5	0,951 \pm 0,07	0,932 \pm 0,085	0,874 \pm 0,068 ^(a)	0,949 \pm 0,057	0,406 \pm 0,051	0,255 \pm 0,012 ^(a)	0,906 \pm 0,073	0,582 \pm 0,051	0,575 \pm 0,032
DHAR1	0,892 \pm 0,083	1,389 \pm 0,066	1,225 \pm 0,163 ^(b)	0,889 \pm 0,081	0,642 \pm 0,052	0,325 \pm 0,013 ^(b)	1,293 \pm 0,09	0,818 \pm 0,052	0,842 \pm 0,072 ^(b)
DHAR2	0,802 \pm 0,069 ^(b)	1,292 \pm 0,063	1,191 \pm 0,082 ^(c)	0,743 \pm 0,032	1,341 \pm 0,021	1,418 \pm 0,112	1,133 \pm 0,038 ^(b)	1,321 \pm 0,021	0,608 \pm 0,048
DHAR3	1,623 \pm 0,058	2,808 \pm 0,092	2,697 \pm 0,11 ^(a)	1,17 \pm 0,015	1,479 \pm 0,056 ^(a)	1,133 \pm 0,017	1,46 \pm 0,057	3,333 \pm 0,056 ^(b)	2,297 \pm 0,074 ^(a)
GR1	0,625 \pm 0,084	0,578 \pm 0,095	0,618 \pm 0,059	0,754 \pm 0,052	1,174 \pm 0,203	1,266 \pm 0,082	0,854 \pm 0,077	0,941 \pm 0,203	0,686 \pm 0,335
GR2	0,804 \pm 0,151	0,893 \pm 0,04	0,963 \pm 0,064 ^(b)	0,858 \pm 0,037	0,532 \pm 0,031	0,326 \pm 0,019	1,123 \pm 0,055	0,814 \pm 0,031	0,731 \pm 0,066
CAT1	2,011 \pm 0,174 ^(b)	2,058 \pm 0,148	2,419 \pm 0,194 ^(c)	1,235 \pm 0,097	1,821 \pm 0,16	2,309 \pm 0,19	1,039 \pm 0,06	1,439 \pm 0,16	1,521 \pm 0,194
CAT2	0,319 \pm 0,116	0,304 \pm 0,013	0,39 \pm 0,05	0,866 \pm 0,066	0,396 \pm 0,023 ^(b)	0,147 \pm 0,008 ^(c)	0,943 \pm 0,097	0,614 \pm 0,023	0,392 \pm 0,067
CAT3	1,026 \pm 0,469	0,644 \pm 0,059	0,752 \pm 0,103	1,253 \pm 0,143	0,813 \pm 0,175	0,921 \pm 0,147	1,094 \pm 0,200 ^(b)	0,619 \pm 0,175 ^(b)	0,721 \pm 0,165
CSD1	1,471 \pm 0,102	1,433 \pm 0,057	1,339 \pm 0,144	1,343 \pm 0,084	0,898 \pm 0,065	1,586 \pm 0,151	1,370 \pm 0,139	0,93 \pm 0,065	0,66 \pm 0,09 ^(a)
CSD2	1,562 \pm 0,323	0,99 \pm 0,127	1,135 \pm 0,186	1,798 \pm 0,266	0,518 \pm 0,094	0,553 \pm 0,033	1,212 \pm 0,306	0,409 \pm 0,094	0,335 \pm 0,058 ^(c)
FSD1	0,648 \pm 0,106 ^(b)	1,022 \pm 0,094	1,253 \pm 0,064 ^(b)	0,976 \pm 0,079	1,395 \pm 0,045 ^(a)	0,607 \pm 0,003	1,367 \pm 0,254 ^(b)	1,217 \pm 0,045	2,126 \pm 0,182
MSD1	1,286 \pm 0,081 ^(c)	1,141 \pm 0,034	1,118 \pm 0,036 ^(c)	0,827 \pm 0,046	0,676 \pm 0,047	0,636 \pm 0,027	0,94 \pm 0,013	0,902 \pm 0,047	0,835 \pm 0,06
LOX1	0,757 \pm 0,077	0,858 \pm 0,023	0,934 \pm 0,054	1,105 \pm 0,02	1,193 \pm 0,016	1,457 \pm 0,11	1,22 \pm 0,029	2,308 \pm 0,016	1,312 \pm 0,096 ^(b)
LOX2	1,985 \pm 0,061	1,823 \pm 0,019	1,852 \pm 0,04	1,354 \pm 0,02	2,188 \pm 0,018	2,388 \pm 0,022	1,724 \pm 0,039	7,043 \pm 0,018 ^(b)	2,023 \pm 0,011 ^(b)
RBOHC	1,137 \pm 0,001	1,257 \pm 0,002	4,316 \pm 0,003 ^(b)	21,983 \pm 0,062	215,45 \pm 0,107 ^(c)	543,667 \pm 0,166 ^(c)	1,021 \pm 0,001	7,979 \pm 0,107	5,478 \pm 0,002
RBOHD	0,59 \pm 0,018 ^(c)	0,4 \pm 0,008	0,514 \pm 0,035	0,75 \pm 0,027	1,431 \pm 0,091	2,288 \pm 0,116 ^(c)	0,661 \pm 0,039	2,152 \pm 0,091	1,946 \pm 0,232

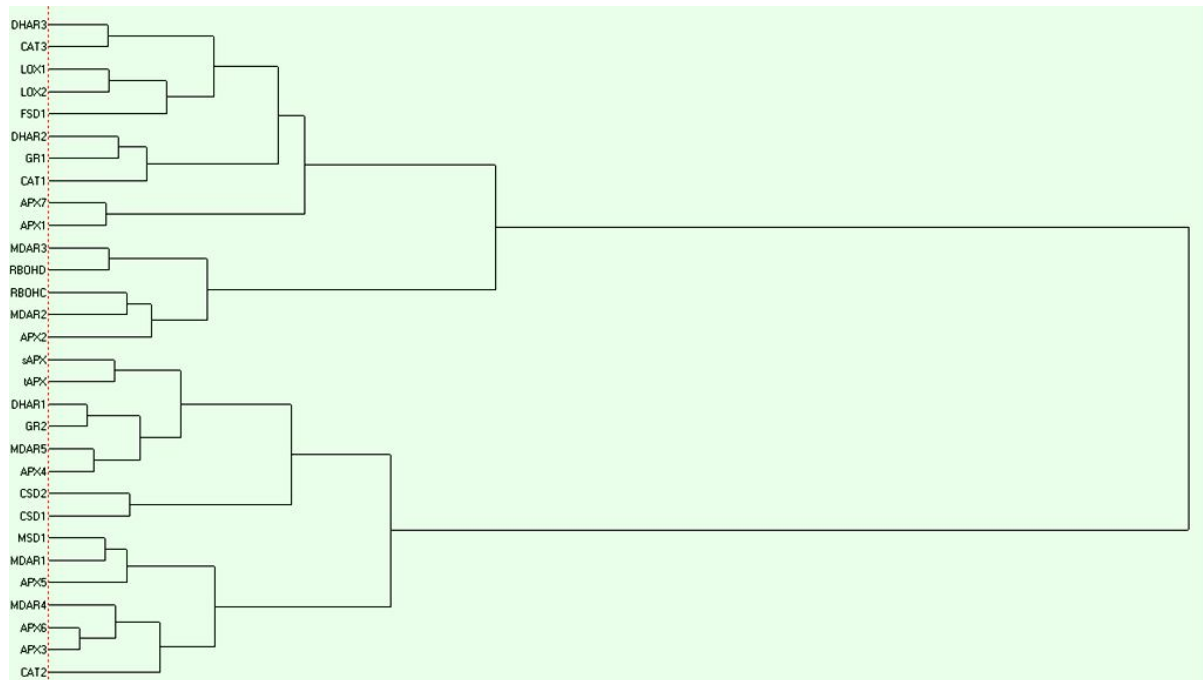
Tabel 3: Genotype- en Cd-effecten in de genexpressie in blaadjes van 18 tot 21 dagen oude *A. thaliana* KO na de behandeling met Cd (0, 5 of 10 µM Cd) gedurende verschillende tijden (2u, 24u en 72u). Elke waarde stelt het gemiddelde voor van 4 biologische herhalingen (relatief t.o.v. onbehandeld WT op tijdstip 0 (niet toegevoegd)) ± standaardfout. De letters tussen haakjes stellen genotype-effecten voor (SN: ^(a): p < 0,1; ^(b): p < 0,05; ^(c): p < 0,01). Een afname in genexpressie door blootstelling aan Cd (Cd-effect t.o.v. KO onbehandeld na zelfde blootstellingstijd) wordt weergegeven

door volgende kleurmarkering: SN: p < 0,1 ; p < 0,05 ; p < 0,01. Een toename in genexpressie door blootstelling aan Cd (Cd-effect t.o.v. KO onbehandeld na dezelfde blootstellingstijd) wordt weergegeven door volgende kleurmarkering: SN: p < 0,1 ; p < 0,05 ; p < 0,01.

	2u			24 u			72u		
	0 µM Cd	5 µM Cd	10 µM Cd	0 µM Cd	5 µM Cd	10 µM Cd	0 µM Cd	5 µM Cd	10 µM Cd
APX1	0,012 ± 0,001 ^(c)	0,009 ± 0,001 ^(c)	0,009 ± 0,001 ^(c)	0,014 ± 0,001 ^(c)	0,019 ± 0,003 ^(c)	0,053 ± 0,009 ^(c)	0,008 ± 0,001 ^(c)	0,041 ± 0,006 ^(c)	0,043 ± 0,005 ^(c)
APX2	0,28 ± 0,034	0,454 ± 0,014	0,242 ± 0,01	0,578 ± 0,022	0,607 ± 0,033	1,826 ± 0,16 ^(c)	0,681 ± 0,031	0,443 ± 0,01	0,402 ± 0,029
APX3	0,715 ± 0,11	1,203 ± 0,13	1,11 ± 0,09	1,333 ± 0,14	0,967 ± 0,089	0,75 ± 0,11	1,261 ± 0,069	1,7 ± 0,296 ^(a)	1,126 ± 0,106
APX4	0,592 ± 0,044 ^(c)	1,039 ± 0,075 ^(b)	0,717 ± 0,05 ^(c)	0,742 ± 0,063 ^(c)	0,296 ± 0,029	0,257 ± 0,024	0,745 ± 0,043	0,617 ± 0,047	0,372 ± 0,021 ^(c)
APX5	0,833 ± 0,117	0,987 ± 0,225	0,927 ± 0,068	1,323 ± 0,183 ^(c)	0,876 ± 0,032	0,658 ± 0,099	0,99 ± 0,081	1,033 ± 0,28	0,811 ± 0,078
APX6	0,728 ± 0,111	1,072 ± 0,11	0,801 ± 0,065	0,972 ± 0,084	0,803 ± 0,105	0,654 ± 0,114	1,125 ± 0,073	1,398 ± 0,184	0,879 ± 0,076
APX7	0,484 ± 0,02 ^(c)	0,419 ± 0,049 ^(c)	0,462 ± 0,045 ^(c)	0,380 ± 0,037 ^(c)	0,353 ± 0,028 ^(c)	0,413 ± 0,053 ^(c)	0,279 ± 0,009 ^(c)	0,550 ± 0,118 ^(c)	0,387 ± 0,011 ^(c)
tAPX	0,609 ± 0,103	0,851 ± 0,119	0,857 ± 0,116	1,023 ± 0,18	0,601 ± 0,07	0,512 ± 0,093	0,945 ± 0,07	0,745 ± 0,107	0,308 ± 0,026 ^(c)
sAPX	0,887 ± 0,137	0,940 ± 0,118	0,757 ± 0,069	0,848 ± 0,096 ^(b)	0,744 ± 0,067	0,641 ± 0,109	0,729 ± 0,048 ^(a)	0,536 ± 0,047	0,505 ± 0,074
MDAR1	0,941 ± 0,063	1,279 ± 0,07	0,938 ± 0,062	1,147 ± 0,097	1,064 ± 0,12	0,939 ± 0,115	1,164 ± 0,031	1,51 ± 0,181	1,133 ± 0,11
MDAR2	1,190 ± 0,02	2,225 ± 0,028	1,368 ± 0,004	1,776 ± 0,026 ^(a)	7,428 ± 0,189	12,702 ± 0,161	1,601 ± 0,005	3,453 ± 0,027	4,184 ± 0,041 ^(c)
MDAR3	0,33 ± 0,001 ^(a)	0,353 ± 0,001	0,252 ± 0,001 ^(b)	0,749 ± 0,002	28,244 ± 0,059	28,594 ± 0,05 ^(c)	1,021 ± 0,01	41,227 ± 0,067 ^(b)	31,174 ± 0,039
MDAR4	1,065 ± 0,118	0,937 ± 0,057	1,094 ± 0,082	1,137 ± 0,114	0,779 ± 0,033	0,542 ± 0,091	0,929 ± 0,066	1,223 ± 0,147	0,856 ± 0,105
MDAR5	0,793 ± 0,095	1,111 ± 0,099	0,663 ± 0,012 ^(a)	1,004 ± 0,115	0,401 ± 0,026	0,348 ± 0,059 ^(a)	0,854 ± 0,063	0,75 ± 0,109	0,439 ± 0,063
DHAR1	0,676 ± 0,058	1,228 ± 0,035	0,777 ± 0,049 ^(b)	0,950 ± 0,109	0,631 ± 0,038	0,650 ± 0,067 ^(b)	1,099 ± 0,042	0,907 ± 0,063	0,54 ± 0,028 ^(b)
DHAR2	0,493 ± 0,056 ^(b)	1,181 ± 0,113	0,558 ± 0,03 ^(c)	0,724 ± 0,034	1,244 ± 0,165	1,365 ± 0,143	0,776 ± 0,036 ^(b)	1,007 ± 0,087	0,851 ± 0,084
DHAR3	1,204 ± 0,033	3,119 ± 0,201	1,471 ± 0,058 ^(a)	1,672 ± 0,079	0,915 ± 0,027 ^(a)	1,147 ± 0,043	1,293 ± 0,03	1,711 ± 0,074 ^(b)	4,606 ± 0,167 ^(a)
GR1	0,453 ± 0,052	0,551 ± 0,043	0,493 ± 0,057	0,805 ± 0,142	1,067 ± 0,207	1,243 ± 0,247	0,787 ± 0,088	0,844 ± 0,132	0,601 ± 0,109
GR2	0,605 ± 0,062	1,014 ± 0,072	0,672 ± 0,068 ^(b)	0,871 ± 0,101	0,498 ± 0,048	0,493 ± 0,083	0,951 ± 0,094	0,949 ± 0,129	0,511 ± 0,066
CAT1	1,394 ± 0,076 ^(b)	1,689 ± 0,114	1,418 ± 0,062 ^(c)	1,298 ± 0,114	2,005 ± 0,416	2,347 ± 0,346	0,974 ± 0,08	1,478 ± 0,135	1,721 ± 0,205
CAT2	0,390 ± 0,078	0,451 ± 0,076	0,496 ± 0,058	1,102 ± 0,137	0,609 ± 0,07 ^(b)	0,359 ± 0,063 ^(c)	1,178 ± 0,102	0,834 ± 0,076	0,379 ± 0,065
CAT3	1,053 ± 0,296	0,816 ± 0,12	0,835 ± 0,246	1,044 ± 0,359	0,930 ± 0,225	0,760 ± 0,098	0,738 ± 0,132 ^(b)	1,038 ± 0,219 ^(b)	0,609 ± 0,12
CSD1	1,075 ± 0,058	1,534 ± 0,099	0,8 ± 0,017	1,443 ± 0,087	1,778 ± 0,431	1,460 ± 0,133	1,451 ± 0,07	1,412 ± 0,097	0,312 ± 0,039 ^(a)
CSD2	0,888 ± 0,113	1,095 ± 0,183	0,807 ± 0,076	1,408 ± 0,167	0,569 ± 0,166	0,423 ± 0,063	1,488 ± 0,175	0,451 ± 0,036	0,039 ± 0,007 ^(c)
FSD1	0,322 ± 0,023 ^(b)	0,662 ± 0,071	0,595 ± 0,052 ^(b)	0,5 ± 0,098	0,870 ± 0,157 ^(a)	0,998 ± 0,123	0,316 ± 0,142 ^(b)	0,916 ± 0,041	1,583 ± 0,071
MSD1	0,953 ± 0,067 ^(c)	1,226 ± 0,074	0,84 ± 0,038 ^(c)	0,928 ± 0,097	0,634 ± 0,052	0,726 ± 0,095	0,838 ± 0,005	0,859 ± 0,103	0,78 ± 0,07
LOX1	0,619 ± 0,048	0,795 ± 0,019	0,772 ± 0,034	1,155 ± 0,102	1,09 ± 0,034	1,192 ± 0,055	1,038 ± 0,031	1,823 ± 0,116	2,501 ± 0,131 ^(b)
LOX2	1,426 ± 0,025	2,718 ± 0,113	1,244 ± 0,025	1,391 ± 0,025	2,235 ± 0,042	2,868 ± 0,037	1,625 ± 0,011	3,236 ± 0,058 ^(b)	4,674 ± 0,08 ^(b)
RBOHC	0,593 ± 0,001	1,128 ± 0,001	0,399 ± 0,001 ^(b)	1,030 ± 0,001	42,201 ± 0,037 ^(c)	245,800 ± 0,105 ^(c)	0,482 ± 0,001	3,424 ± 0,003	12,563 ± 0,007
RBOHD	0,321 ± 0,019 ^(c)	0,388 ± 0,018	0,435 ± 0,02	0,715 ± 0,045	1,033 ± 0,038	1,502 ± 0,096 ^(c)	0,588 ± 0,025	1,605 ± 0,088	1,951 ± 0,066

3.4 Clusteranalyse

Een clusteranalyse werd uitgevoerd met alle data van de genexpressiemetingen (figuur 11). Deze levert twee hoofdclusters op die beide bestaan uit twee primaire subclusters. De eerste subcluster van de eerste hoofdcluster bestaat uit de genen *DHAR3*, *CAT3*, *LOX1*, *LOX2*, *FSD1*, *DHAR2*, *GR1*, *CAT1*, *APX7* en *APX1*. De tweede subcluster van diezelfde hoofdcluster bestaat uit *MDAR3*, *RBOHD*, *RBOHC*, *MDAR2* en *APX2*. De eerste subcluster van de tweede hoofdcluster bestaat uit *sAPX*, *tAPX*, *DHAR1*, *GR2*, *MDAR5*, *APX4*, *CSD2* en *CSD1*. De tweede subcluster van de tweede hoofdcluster bestaat uit de genen *MSD1*, *MDAR1*, *APX5*, *MDAR4*, *APX6*, *APX3* en *CAT2*.



Figuur 11: Hiërarchische clustering van de data van de analyse van de genexpressie in blaadjes van 18 tot 21 dagen oude *A. thaliana* WT en KO, behandeld met 0, 5 of 10 μM Cd gedurende 2u, 24u of 72u. De data wordt uitgedrukt relatief t.o.v. het onbehandelde WT op tijdstip 0. De groepering is gebaseerd op het Ward-algoritme.

3.5 Analyse van activiteiten van antioxidatieve enzymen

In dit hoofdstuk worden de resultaten van de analyse van de enzymactiviteiten besproken. In het algemeen kan gesteld worden dat de activiteit van SOD ongewijzigd bleef onafhankelijk van tijd, Cd-concentratie en genotype (tabel 4).

Na 2 uur werden geen significante genotype- en Cd-effecten waargenomen (tabel 4).

Na een blootstelling van 24u aan verschillende Cd-concentraties werden zowel genotype-gerelateerde verschillen waargenomen alsook effecten van de Cd-behandeling (tabel 4). De enzymactiviteit van CAT werd significant verhoogd (66%) bij de KO in vergelijking met het WT na 24 uur onder stressvrije condities. Bij blootstelling aan 5 μM Cd werd de activiteit van CAT geïnduceerd bij het WT (44%) en niet bij de KO. Bij blootstelling aan 10 μM Cd werd de CAT-activiteit zowel bij het WT (51%) als bij de KO (29%) geïnduceerd t.o.v. 0 μM Cd en was de CAT-activiteit significant hoger bij de KO in vergelijking met het WT (42%).

De activiteit van GR werd significant geïnduceerd bij de KO bij blootstelling aan 5 en 10 μM Cd (27 en 28% respectievelijk). Een vergelijkbare trend was zichtbaar bij het WT (tabel 4).

Na 72u onder controle-omstandigheden was er geen genotype-effect waar te nemen. Deze werden wel gezien in de Cd-blootgestelde plantjes (tabel 4). De activiteit van CAT werd significant geïnduceerd bij de KO na 72u bij 5 en 10 μM Cd t.o.v. 0 μM Cd (66% en 73% respectievelijk). Een minder sterke trend was zichtbaar bij het WT. Bij 10 μM Cd was de CAT-activiteit significant verhoogd bij de KO in vergelijking met het WT (35%).

De GR-activiteit werd verhoogd bij het WT bij 5 en 10 μM Cd t.o.v. 0 μM Cd (23% en 34% respectievelijk) (tabel 4). Bij de KO werd de activiteit van GR geïnduceerd bij 10 μM Cd t.o.v. 0 μM Cd (28%).

Tabel 4: Genotype- en Cd-effecten in de activiteit van CAT, GR en SOD (mU/gFW) in blaadjes van 18 tot 21 dagen oude *A. thaliana* WT en KO na een behandeling met Cd (0, 5 of 10 μM Cd) gedurende verschillende tijden (2u, 24u en 72u). Elke waarde stelt het gemiddelde voor van minstens 4 biologische herhalingen \pm standaardfout. De letters tussen haakjes stellen genotype-effecten voor (SN: ^(a): $p < 0,1$; ^(b): $p < 0,05$; ^(c): $p < 0,01$). Een toename in enzymactiviteit door blootstelling aan Cd (Cd-effect t.o.v. WT of KO onbehandeld na dezelfde blootstellingstijd) wordt weergegeven door volgende kleurmarkering: SN: $p < 0,1$; $p < 0,05$; $p < 0,01$.

CAT(mU/gFW)	2u		24u		72u	
	WT	KO	WT	KO	WT	KO
Cd (μM)	WT	KO	WT	KO	WT	KO
0	185,898 \pm 12,513	222,316 \pm 27,077	144,071 \pm 14,166 ^(c)	239,343 \pm 14,151 ^(c)	187,181 \pm 10,423	179,795 \pm 5,783
5	192,398 \pm 25,312	199,229 \pm 10,89	207,434 \pm 5,849	251,541 \pm 5,011	244,898 \pm 16,226	299,382 \pm 10,89
10	198,515 \pm 10,031	214,930 \pm 17,861	217,139 \pm 15,772 ^(c)	308,227 \pm 16,366 ^(c)	229,961 \pm 27,115 ^(b)	310,642 \pm 21,591 ^(b)
GR (mU/gFW)	2u		24u		72u	
	WT	KO	WT	KO	WT	KO
Cd (μM)	WT	KO	WT	KO	WT	KO
0	1729,423 \pm 85,684	1499,173 \pm 166,319	1798,663 \pm 84,39	1470,749 \pm 84,499	1697,791 \pm 74,759	1501,955 \pm 130,169
5	1754,619 \pm 114,653	1360,158 \pm 190,384	2132,933 \pm 54,522	1861,555 \pm 119,716	2094,592 \pm 84,25	1828,746 \pm 66,172
10	1888,851 \pm 76,816	1552,045 \pm 147,565	1999,945 \pm 133,811	1885,042 \pm 87,72	2267,031 \pm 81,986	1928,112 \pm 105,413
SOD (mU/gFW)	2u		24u		72u	
	WT	KO	WT	KO	WT	KO
Cd (μM)	WT	KO	WT	KO	WT	KO
0	474521,352 \pm 24027,876	444665,668 \pm 38037,011	472564,272 \pm 31145,635	444849,008 \pm 44599,641	438319,778 \pm 28108,153	376213,216 \pm 28197,515
5	462663,055 \pm 33923,184	430545,478 \pm 38820,568	451383,019 \pm 38150,903	409314,765 \pm 37324,756	374229,034 \pm 30445,177	373695,096 \pm 27251,527
10	488186,573 \pm 31617,078	448376,218 \pm 29399,44	465932,841 \pm 22657,347	515112,451 \pm 28507,254	440764,348 \pm 27934,438	412864,198 \pm 30706,226

3.6 Analyse redoxkoppels met een centrale rol in het antioxidatief systeem

Hoewel geen genotype-effecten werden waargenomen na 24u onder controle-omstandigheden, werden deze wel zichtbaar na behandeling met Cd (tabel 5). De concentratie ASA werd significant geïnduceerd bij het WT bij blootstelling aan 5 μM Cd t.o.v. 0 μM Cd (40%). Bij 10 μM Cd werd deze trend ook waargenomen, maar het verschil was niet significant. De analyse van DHA toonde geen significante, maar toch sterke verschillen. Zo lijkt de concentratie DHA te stijgen bij het WT bij stijgende concentraties Cd, terwijl het omgekeerde lijkt te gebeuren bij de KO.

De analyse van GSH leverde geen significante, maar toch grote verschillen op (tabel 5). De concentratie GSH lijkt te stijgen bij het WT bij stijgende concentraties Cd, terwijl het omgekeerde lijkt te gebeuren bij de KO. De GSSG-concentratie werd zeer sterk gereduceerd bij het WT en de KO bij blootstelling aan 5 en 10 μM Cd (\pm 70%). De totale concentratie GSH werd significant verlaagd bij de KO bij blootstelling aan 5 en 10 μM Cd (24% en 36% respectievelijk). Bij 10 μM Cd werd de totaal GSH-concentratie significant verlaagd bij de KO t.o.v. het WT (22%). De redoxstatus van GSH (GSSG/GSH-ratio) werd significant verlaagd bij het WT en de KO bij blootstelling aan 5 en 10 μM Cd.

De concentratie NAD⁺ lijkt over het algemeen lager te liggen bij de KO in vergelijking met het WT (tabel 5).

Het resultaat van de NADPH-meting toont een trend waarbij de concentratie stijgt met de concentratie Cd en dit voor zowel het WT als de KO (tabel 5). De concentratie NADP⁺ werd niet-significant verhoogd bij de KO t.o.v. het WT bij 10 μM Cd. De concentratie totaal NADP werd niet-significant verhoogd bij het WT bij blootstelling aan Cd. De redoxstatus werd niet-significant verlaagd bij WT en KO bij stijgende concentraties Cd.

Tabel 5: Genotype- en Cd-effecten in de concentratie en redoxstatus van redoxkoppels (ASA, GSH, NAD en NADP) in blaadjes van 18 tot 21 dagen oude *A. thaliana* WT en KO 24u na de behandeling met Cd (0, 5 of 10 μM Cd). Elke waarde stelt het gemiddelde voor van 3 of 4 biologische herhalingen \pm standaardfout. De letters tussen haakjes stellen genotype-effecten voor (SN: ^(c): $p < 0,01$). Een daling in concentratie of in de redoxstatus door blootstelling aan Cd (Cd-effect t.o.v.

WT of KO onbehandeld) wordt weergegeven door volgende kleurmarkering: SN: $p < 0,01$. Een toename in concentratie of in de redoxstatus door blootstelling aan Cd (Cd-effect t.o.v. WT onbehandeld) wordt weergegeven door volgende kleurmarkering: SN: $p < 0,01$.

Ascorbaat ($\mu\text{mol/g}$)		ASC		DHA		Totaal ascorbaat		DHA/ASC	
Cd (μM)	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO	
0	1,952 \pm 0,108	2,166 \pm 0,113	4,77 \pm 0,653	6,901 \pm 1,147	6,67 \pm 0,563	9,177 \pm 1,107	2,57 \pm 0,47	3,053 \pm 0,552	
5	2,728 \pm 0,240	2,285 \pm 0,128	5,108 \pm 0,896	5,004 \pm 1,143	7,99 \pm 0,87	7,216 \pm 0,994	1,816 \pm 0,417	2,357 \pm 0,706	
10	2,404 \pm 0,065	2,010 \pm 0,089	6,626 \pm 0,864	4,871 \pm 0,894	9,066 \pm 0,788	6,848 \pm 0,882	2,743 \pm 0,44	2,494 \pm 0,524	
Glutathion ($\mu\text{M/g}$)		GSH		GSSG		Totaal glutathion		GSSG/GSH	
Cd (μM)	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO	
0	933,54 \pm 154,41	1207,759 \pm 245,115	361,432 \pm 24,573	349,348 \pm 32,752	1656,403 \pm 127,85	1906,455 \pm 276,794	0,876 \pm 0,214	0,685 \pm 0,199	
5	1169,174 \pm 130,906	1236,558 \pm 168,095	114,206 \pm 11,279	103,852 \pm 9,048	1397,586 \pm 111,646	1444,263 \pm 182,248	0,21 \pm 0,043	0,173 \pm 0,017	
10	1315,878 \pm 129,637	1047,999 \pm 162,773	118,734 \pm 6,46	85,727 \pm 2,657	1553,346 \pm 127,645 ^(c)	1219,454 \pm 162,916 ^(c)	0,187 \pm 0,026	0,179 \pm 0,035	
NAD (nmol/g)				NAD ⁺					
Cd (μM)	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO	
0			21,544 \pm 3,286	19,132 \pm 1,921					
5			21,127 \pm 3,411	19,995 \pm 3,727					
10			21,384 \pm 2,513	18,344 \pm 3,775					
NADP (nmol/g)		NADPH		NADP ⁺		Totaal NADP		NADP ⁺ /NADPH	
Cd (μM)	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO	
0	3,832 \pm 0,458	4,193 \pm 0,822	9,87 \pm 0,915	9,986 \pm 1,672	13,866 \pm 1,102	14,179 \pm 2,454	2,706 \pm 0,73	2,438 \pm 0,196	
5	5,639 \pm 1,585	4,301 \pm 0,942	10,957 \pm 1,52	9,3 \pm 1,203	16,595 \pm 2,708	13,601 \pm 2,011	2,176 \pm 0,432	2,276 \pm 0,289	
10	6,04 \pm 1,081	5,338 \pm 1,053	10,725 \pm 0,976	7,953 \pm 0,958	16,765 \pm 2,029	13,291 \pm 1,942	1,842 \pm 0,187	1,567 \pm 0,213	

4 Discussie

In het eerste deel van de discussie wordt besproken wat het effect is van Cd-geïnduceerde oxidatieve stress op *A. thaliana* WT. In het tweede deel wordt besproken wat de rol is van ascorbaatperoxidase 1 tijdens deze stressconditie. In het derde deel wordt het resultaat van de clusteranalyse geïnterpreteerd en in het vierde en laatste deel van de discussie wordt kort aangehaald welk toekomstig onderzoek kan bijdragen aan dit geleverd onderzoek.

4.1 Effect van cadmium-geïnduceerde oxidatieve stress op wildtype *Arabidopsis thaliana*

De gemeten effecten van realistische concentraties Cd op het pro- en antioxidatief systeem en de redoxstatus van blaadjes van *A. thaliana* WT worden kritisch geëvalueerd in dit hoofdstuk. De effecten na verschillende blootstellingstijden komen afzonderlijk aan bod.

Omdat er geen verschillen werden teruggevonden in de **activiteit van SOD** en omdat de standaardfout klein was, kan geconcludeerd worden dat de activiteit van totaal SOD niet wordt beïnvloed door blootstelling aan realistische concentraties Cd (5 en 10 μM) gedurende 2u, 24u en 72u (tabel 4). Dit is een bevestiging van de resultaten van Smeets *et al.* (2008, 2009) die een onveranderde SOD-activiteit beschreven in *A. thaliana*-rozetjes na behandeling met 5, 10 en 20 μM CdSO₄ gedurende 24u [45,52]. Het is echter belangrijk om na te gaan of de activiteit van de verschillende isovormen beïnvloed wordt door Cd. Dit werd onderzocht en wordt vervolgens besproken.

De oxidatieve stresssignatuur na 2u

De oxidatieve stressparameters werden subtiel beïnvloed door een korte Cd-blootstelling van 2u (figuur 8 en tabel 2). Bij blootstelling aan 5 μM Cd werd **LOX1** geïnduceerd, wat een verhoogde lipidenperoxidatie tot gevolg kan hebben. Een mogelijk mechanisme om de ROS-balans in evenwicht te houden bij blootstelling aan 5 μM Cd, is een verminderde productie van ROS door een verminderde expressie van **RBOHD**. Ook de ASA-GSH-cyclus heeft mogelijk een rol in dit stadium omdat **DHAR2**, **APX4** en **DHAR1** werden geïnduceerd. Het gen **MDAR4** lijkt echter niet betrokken bij de verdediging omdat het transcriptieniveau van dit gen werd gereduceerd. Bij blootstelling aan 10 μM Cd vertoonde **DHAR2** nog steeds een geïnduceerde expressie. Oxidatieve stress door O₂⁻ lijkt hier belangrijk te zijn omdat de expressie van **FSD1** werd verhoogd. Dit laatste kan het gevolg zijn van de niet verlaagde expressie van **RBOHD** of de niet geïnduceerde expressie van **APX4** en **DHAR1** bij 10 μM Cd, wat wel het geval was bij 5 μM Cd.

Het feit dat geen significante verschillen in enzymactiviteit werden gedetecteerd na 2 uur doet vermoeden dat de verschillen in genexpressie onvoldoende groot zijn om te leiden tot significante verschillen in enzymactiviteit (tabel 4). Een andere verklaring kan zijn dat effecten op het eiwitniveau zich nog niet konden manifesteren na deze korte behandeling.

De oxidatieve stresssignatuur na 24u

De oxidatieve stressparameters werden veel sterker beïnvloed tijdens een blootstelling aan Cd van 24u (figuur 9 en tabel 2). Bij blootstelling aan 5 μM Cd gedurende 24 uur werden de pro-oxidatieve genen **RBOHC**, **RBOHD** en **LOX2** geïnduceerd wat kan leiden tot extra vorming van ROS. Specifieke genen met een rol in de ASA-GSH-cyclus in het cytosol (en mitochondrium) zoals **APX2**, **MDAR2**,

DHAR2 en **MDAR3** lijken betrokken bij de verdediging tijdens deze stressconditie omdat hun expressie werd geïnduceerd, in tegenstelling tot andere genen zoals **APX1**, **MDAR4** en **MDAR5** waarvan de expressie werd verlaagd. Vooral **MDAR3** werd zeer sterk geïnduceerd. Gezien de verlaagde expressie van **CAT2** en **CAT3**, die beide betrokken zijn bij de detoxificatie van H_2O_2 , lijkt de plant goed in staat te zijn om ROS-homeostase te handhaven ondanks de aanwezigheid van cadmium-geïnduceerde oxidatieve stress. De verlaagde expressie van **CSD2**, dat betrokken is bij de omzetting van $O_2^{\cdot-}$ in H_2O_2 , geeft aan dat oxidatieve stress door $O_2^{\cdot-}$ vermoedelijk minder belangrijk is in dit stadium. De ASA-GSH-cyclus in de chloroplast lijkt niet betrokken te zijn bij de antioxidatieve verdediging omdat de expressie van **APX3**, **APX4**, **tAPX**, **sAPX** en **GR2** werd gereduceerd en **APX6**, **DHAR3** en **DHAR1** niet werden geïnduceerd. Het belang van de ASA-GSH-cyclus in het mitochondrium tijdens deze stressconditie is onduidelijk.

Ook bij blootstelling aan 10 μM Cd gedurende 24 uur werden **RBOHC**, **RBOHD** en **LOX2** geïnduceerd. Vooral **RBOHC** werd zeer sterk geïnduceerd (2473%) (figuur 9 en tabel 2). Specifieke genen met een rol in de ASA-GSH-cyclus in het cytosol (en mitochondrium) zoals **APX2**, **MDAR2**, **MDAR3**, **DHAR2** en **GR1** lijken betrokken te zijn bij de verdediging omdat hun expressie werd geïnduceerd. Opnieuw werd **MDAR3** zeer sterk geïnduceerd (3269%). Andere genen met een rol in de ASA-GSH-cyclus in het cytosol zoals **APX1**, **APX6**, **MDAR4** en **MDAR5** hebben een verlaagde expressie. Ondanks de nog steeds sterk verlaagde expressie van **CAT2** werd **CAT1** geïnduceerd wat mogelijk wijst op een rol voor dit gen in de verdediging tegen H_2O_2 . Net zoals bij 5 μM Cd werd **CSD2** ook hier gereduceerd, wat opnieuw wijst op een mindere rol voor $O_2^{\cdot-}$ tijdens oxidatieve stress. De ASA-GSH-cyclus in de chloroplast lijkt niet te zijn betrokken bij de antioxidatieve verdediging omdat de expressie van **APX6**, **APX3**, **APX4**, **tAPX**, **sAPX** en **GR2** werd gereduceerd en de expressie van **DHAR3** en **DHAR1** niet werd geïnduceerd. Het belang van de ASA-GSH-cyclus in het mitochondrium tijdens deze stressconditie is onduidelijk.

Smeets *et al.* (2008) analyseerden de genexpressie van **CSD2**, **FSD1**, **MSD1**, **CAT1**, **APX1**, **DHAR2**, **GR1** en **LOX1** in blaadjes van *A. thaliana* (3 weken oud, ecotype Col) na blootstelling aan 0, 5 en 10 μM $CdSO_4$ gedurende 24u [44]. De resultaten van hun experiment komen overeen met de genexpressie van het WT in dit experiment behalve voor **APX1**. Smeets *et al.* toonden aan dat **APX1** geïnduceerd werd bij blootstelling aan 5 en 10 μM $CdSO_4$ (46% en 202% respectievelijk) [45] terwijl dit experiment een lichte reductie aantoonde bij behandeling met 5 en 10 μM $CdSO_4$ (17% en 19% respectievelijk) (tabel 2). Het feit dat in dit experiment gebruik werd gemaakt van een gemengd ecotype WS/Col is mogelijk een verklaring voor het verschil in genexpressie. De verschillen kunnen echter ook verklaard worden door verschillen in groeicondities. Smeets *et al.* groeiden hun planten onder wit licht terwijl in dit experiment gebruik werd gemaakt van licht bestaande uit specifieke golflengten wat dichter aanleunt bij natuurlijk zonlicht (zie hoofdstuk 2.2). Blootstelling aan wit licht kan een lichte vorm van lichtstress betekenen die in combinatie met Cd-stress kan leiden tot een inductie van **APX1**. Pnueli *et al.* (2003) beschreven dat de genexpressie van **APX1** werd geïnduceerd bij blootstelling aan matige lichtstress [41]. Dat net **APX1** werd beïnvloed is niet vreemd omwille van zijn centrale sleutelrol in de antioxidatieve verdediging [45]. Een nog andere verklaring kan zijn dat *A. thaliana* in beide experimenten in een verschillend ontwikkelingsstadium werd bestudeerd en dat **APX1** een verschillende rol heeft in verschillende ontwikkelingsstadia. Het experiment van Smeets *et al.* leidde tot de algemene bevinding dat na Cd-geïnduceerde oxidatieve stress gedurende 24u de vorming van $O_2^{\cdot-}$ de hoofdoorzaak is van oxidatieve stress in de wortels en dat de productie van H_2O_2 een zeer belangrijke oorzaak is van oxidatieve stress in de blaadjes. Het resultaat van dit experiment lijkt het

tweede deel van deze bevinding te steunen omwille van de sterk geïnduceerde expressie van verschillende genen van de ASA-GSH-cyclus en de verlaagde expressie van SOD-genen in de blaadjes van *A. thaliana*.

Pnueli *et al.* (2003) beschreven dat APX1, in tegenstelling tot andere isovormen van APX, zeer sterk reageert op biotische en abiotische stress [41]. Deze gegevens tonen echter aan dat **APX2** zeer sterk werd geïnduceerd bij blootstelling aan 5 μM Cd (190%) en 10 μM Cd (760%) gedurende 24u (tabel 2).

Een verhoging van de **enzymactiviteit van CAT** kan een belangrijk verdedigingsmechanisme zijn tijdens Cd-geïnduceerde oxidatieve stress (tabel 4). Het is moeilijk om dit resultaat te verklaren a.d.h.v. het transcriptiepatroon van de CAT-genen omdat *CAT2* en *CAT3* significant werden verlaagd bij 5 μM Cd gedurende 24u. *CAT1* daarentegen vertoonde wel een sterke trend in de omgekeerde richting (47 en 87% respectievelijk). Het is mogelijk dat posttranscriptionele of posttranslationale regulatie hier een belangrijke rol speelt [53].

De **GR-activiteit** lijkt te worden geïnduceerd door blootstelling aan 5 en 10 μM Cd (tabel 4). Dit resultaat is wel niet significant, maar wordt bevestigd door het transcriptiepatroon van *GR1* dat niet-significant geïnduceerd werd bij 5 μM Cd en significant geïnduceerd werd bij 10 μM Cd. Het gen *GR2* daarentegen werd significant gereduceerd tijdens beide behandelingen.

Smeets *et al.* (2008) beschreven, aan de hand van een vergelijkbaar experiment, een onveranderde CAT- en GR-activiteit in de blaadjes van *A. thaliana* na blootstelling aan Cd (5 en 10 μM) gedurende 24u [45].

De redoxstatus van de vier bestudeerde metaboliëten wordt uitgedrukt als de verhouding tussen de geoxideerde en gereduceerde vorm. De verhoogde **ASA-concentratie** bij 5 μM Cd heeft als effect dat de **redoxstatus van ASA** (DHA/ASA) (niet-significant) werd verlaagd (tabel 5). Dit resultaat zou gekoppeld kunnen worden aan de verhoogde totale genexpressie van MDAR en DHAR die instaan voor de regeneratie van ASA. Een belangrijke bijdrage hierin wordt mogelijk geleverd door *MDAR2* en *MDAR3* omdat de expressie van deze genen zeer sterk werd geïnduceerd. Een verklaring voor het feit dat de ASA-concentratie niet langer verhoogd was bij 10 μM Cd, ondanks dat *MDAR2* en *MDAR3* nog sterker werden geïnduceerd, kan zijn dat nog andere genen (*MDAR4*, *MDAR5* en *DHAR1*) sterk verlaagd tot expressie werden gebracht. Ook kan de sterk geïnduceerde expressie van APX2 (760%) een verklaring zijn voor de daling in ASA-concentratie bij 10 μM Cd.

Het feit dat de **redoxstatus van GSH** (GSSG/GSH) sterk verlaagd was bij Cd-blootstelling bij zowel het WT als de KO zou betekenen dat inactivatie en aggregatie van proteïnen wordt tegengegaan door een voldoende grote hoeveelheid gereduceerd GSH [54] (tabel 5). Die daling in de GSSG/GSH-ratio kan grotendeels verklaard worden door de daling in **GSSG-concentratie**. Een daling in GSSG-concentratie kan gekoppeld worden aan de stijging in GR-activiteit (niet-significante trend), want GR is verantwoordelijk voor de reductie van GSSG. Dit resultaat kan bevestigd worden gebruikmakende van het resultaat van de genexpressie van *GR1*. De verlaagde GSSG/GSH-ratio gekoppeld aan de verlaagde GSSG-concentratie kan ook verklaard worden door het binden van Cd met GSH en GSH-afgeleide derivaten zoals PC. Een hoge intracellulaire Cd-concentratie kan op die manier leiden tot depletie van totaal GSH [40]. Dit kan tot gevolg hebben dat GSH onbeschikbaar wordt voor deelname aan de ASA-GSH-cyclus, wat zich in dit experiment kan uiten als een daling in de GSSG-concentratie omdat, met de methode van Queval en Noctor (2007), geen onderscheid gemaakt kan worden tussen GSH, PC en GSH-Cd-complexen [46].

De oxidatieve stresssignatuur na 72u

Bij blootstelling aan 5 μM Cd gedurende 72u werden **LOX1**, **RBOHC**, **RBOHD** en **LOX2** geïnduceerd wat kan leiden tot vorming van extra ROS (figuur 10 en tabel 2). Specifieke genen met een rol in de ASA-GSH-cyclus in het cytosol (en mitochondrium en/of chloroplast) zoals **MDAR2**, **MDAR3** en **DHAR3** lijken betrokken bij de verdediging omdat hun expressie werd geïnduceerd. Vooral **MDAR3**, maar ook **MDAR2**, werden zeer sterk geïnduceerd. Omdat geen van de zeven APX-genen werd geïnduceerd, zijn vermoedelijk andere substraten hier betrokken bij de oxidatie van ASA [31]. Het gen **MDAR5** vertoonde een verlaagde expressie. Gezien de verlaagde expressie van **CAT2** en **CAT3** lijkt het WT goed in staat om ROS-homeostase te handhaven. Net zoals na 24u bij 5 en 10 μM Cd is de expressie van **CSD2** gereduceerd, wat vermoedelijk aangeeft dat $\text{O}_2^{\cdot-}$ een minder belangrijke oorzaak van oxidatieve stress is. De ASA-GSH-cyclus in de chloroplast lijkt niet betrokken te zijn bij de verdediging omdat de expressie van **APX4**, **tAPX**, **sAPX**, **DHAR1** en **GR2** werden gereduceerd. **DHAR3** werd echter wel geïnduceerd. Het belang van de ASA-GSH-cyclus in het mitochondrium tijdens deze stressconditie is onduidelijk.

Bij blootstelling aan 10 μM Cd gedurende 72u werd van al de gemeten pro-oxidatieve genen enkel **RBOHD** geïnduceerd (figuur 10 en tabel 2). Het niet induceren van andere pro-oxidatieve genen, wat wel het geval was bij een kortere blootstelling (24u) en/of blootstelling aan een lagere concentratie Cd (5 μM), kan een verdedigingsmechanisme zijn om ROS-homeostase te handhaven. Ook is het mogelijk dat deze toxische behandeling signaalgeving door RBOH-genen onmogelijk maakt, terwijl dit bij minder toxische condities wel mogelijk was. Specifieke genen met een rol in de ASA-GSH-cyclus in het cytosol (en mitochondrium) zoals **MDAR2** en **MDAR3** lijken betrokken bij de verdediging omdat hun expressie sterk werd geïnduceerd. Andere genen zoals **MDAR5** en **DHAR2** hadden een verlaagde expressie. Gezien de verlaagde expressie van **CAT2** en **CAT3** lijkt het WT goed in staat om ROS-homeostase te handhaven. Net zoals na 24u bij 5 en 10 μM Cd en na 72u bij 5 μM Cd was de expressie van **CSD2** gereduceerd, wat aangeeft dat stress door $\text{O}_2^{\cdot-}$ ook hier minder belangrijk is. De ASA-GSH-cyclus in de chloroplast lijkt niet betrokken bij de verdediging omdat het transcriptieniveau van **DHAR1** en **GR2** werd gereduceerd en **DHAR3**, **APX4**, **tAPX** en **sAPX** niet werden geïnduceerd.

De **CAT-activiteit** werd niet-significant geïnduceerd na 72u bij 5 en 10 μM Cd (tabel 4). Deze trend kan verklaard worden door het genexpressieprofiel van **CAT1**, maar niet door het profiel van **CAT2** en **CAT3**.

De **GR-activiteit** werd significant geïnduceerd door blootstelling aan 5 en 10 μM Cd (tabel 4). Dit resultaat kan echter niet bevestigd worden door het transcriptiepatroon van **GR1** of **GR2**. De expressie van **GR1** werd niet beïnvloed en **GR2** werd significant verlaagd tot expressie gebracht. Het is mogelijk dat posttranscriptionele of posttranslationele regulatie hier een belangrijke rol speelt [53].

4.2 De rol van ascorbaatperoxidase 1 tijdens cadmium-geïnduceerde oxidatieve stress

In het tweede deel van deze discussie wordt onderzocht wat het belang is van ascorbaatperoxidase 1 voor de groei, het pro- en antioxidatief systeem en de redoxstatus van *A. thaliana*, tijdens oxidatieve stress, door blootstelling aan realistische Cd-concentraties.

Het genexpressie-experiment is een bevestiging van de mutatie omdat **APX1** vrijwel niet tot expressie werd gebracht bij de KO (figuren 8, 9 en 10 en tabellen 2 en 3).

4.2.1 Wortelgroei en biomassa bovengrondse delen

Pnueli *et al.* (2003) beschreven dat de KO-*apx1* van *A. thaliana* een vertraagde groei en ontwikkeling hebben in vergelijking met het WT [41]. Dit experiment toont aan dat 2 weken oude KO een licht verminderde wortelgroei hadden in vergelijking met het WT (10%, niet-significant) (figuur 6), maar dat het gewicht van de rozetjes niet verschillend was voor de KO en het WT (figuur 7).

De wortelgroei van de KO was minder gevoelig aan lage concentraties Cd (5 en 10 μM) in vergelijking met het WT (figuur 6). Dit zou een bevestiging kunnen zijn van het model ontwikkeld door Pnueli *et al.* (2003) [41]. Dat model beschrijft dat H_2O_2 wanneer het terechtkomt in het cytosol (deels) wordt gedetoxificeerd door APX en dat het niet gedetoxificeerde H_2O_2 leidt tot de inductie van 'heat shock proteïns' (HSP). Wanneer APX1 wordt uitgeschakeld kan minder H_2O_2 worden verwijderd wat zal leiden tot een sterkere inductie van HSP's, die kan bijdragen aan een snellere en meer efficiënte verdediging tijdens stresscondities. Zo beschreven Neumann *et al.* (1994) dat tomaatcellen, na te zijn blootgesteld aan hoge temperaturen, Cd-tolerantie ontwikkelen, vermoedelijk als gevolg van een eerdere inductie van stressproteïnen zoals de HSP's [55]. Een andere verklaring voor deze lagere Cd-gevoeligheid is dat antioxidatieve mechanismen worden geïnduceerd als gevolg van het verlies van APX1 en dat deze compensatiemechanismen bijdragen aan een betere verdediging tegen toekomstige stresscondities. Dit wordt verder onderzocht in het volgende hoofdstuk.

4.2.2 De oxidatieve stresssignatuur

In dit hoofdstuk worden de gemeten effecten op het pro- en antioxidatief systeem en de redoxstatus van blaadjes van de KO-*apx1* van *A. thaliana* vergeleken met die van het *A. thaliana* WT. Op die manier wordt getracht een beter beeld te krijgen van de rol van ascorbaatperoxidase 1 tijdens Cd-geïnduceerde oxidatieve stress. De effecten na verschillende blootstellingstijden komen afzonderlijk aan bod.

Omdat er geen verschillen werden teruggevonden in **SOD-activiteit** en omdat de standaardfout klein was, kan geconcludeerd worden dat de activiteit van totaal SOD niet wordt beïnvloed bij de KO in vergelijking met het WT tijdens de bestudeerde condities (tabel 4).

APX7 komt bij de verschillende condities (0, 5 en 10 μM Cd – 2u, 24u en 72u), sterk verlaagd tot expressie in de KO (een gemiddeld 64% lagere expressie t.o.v. het WT) (figuren 8, 9 en 10 en tabellen 2 en 3). Mittler *et al.* (2004) beschreven dat APX7 tot expressie komt in het mitochondrium [38]. Narendra *et al.* (2005) beschreven dat er geen EST's (expressed sequence tags) geassocieerd zijn met APX7 wat aangeeft dat dit gen mogelijk een pseudogen is [56]. Het resultaat van dit onderzoek doet vermoeden dat de expressie van APX1 en APX7 aan elkaar gelinkt is en dat de verlaagde expressie van APX7 direct of indirect veroorzaakt werd door het uitschakelen van APX1. Het zou bijvoorbeeld kunnen dat een sequentie binnen APX1 een enhancer is voor APX7. Het uitschakelen van APX1 zou dan tot gevolg hebben dat APX7 minder efficiënt tot expressie komt en een verklaring zijn voor de 'knockdown' van APX7.

De oxidatieve stresssignatuur na 2u

De KO lijkt, wanneer er geen externe stress wordt toegediend, een aantal mechanismen aan te schakelen om te compenseren voor het verlies van APX1 (figuur 8 en tabellen 2 en 3). Het verminderen van ROS-productie kan een belangrijk mechanisme zijn aangezien de expressie van **RBOHD** sterk werd verlaagd bij de KO t.o.v. het WT. Het feit dat **MSD1** en **FSD1** minder tot expressie

werden gebracht bij de KO geeft aan dat de KO minder te kampen heeft bij stress door $O_2^{\cdot-}$ en is mogelijk een gevolg van de verlaagde expressie van *RBOHD*. Drie genen betrokken bij de ASA-GSH-cyclus kwamen verlaagd tot expressie bij de KO t.o.v. het WT, nl. ***MDAR3***, ***DHAR2*** en ***APX4***. De verminderde expressie van de eerste twee zou een gevolg kunnen zijn van de verminderde omzetting van ASA in MDHA door het verlies van APX1. Een verminderde hoeveelheid substraat voor MDAR en DHAR houdt in dat het energetisch gezien niet zinvol is om deze genen maximaal tot expressie te brengen. Tot slot werd ook het transcriptieniveau van ***CAT1*** gereduceerd. Een verhoogde expressie van dit H_2O_2 -detoxificerend gen zou een mechanisme kunnen zijn waarbij de KO compenseert voor het verlies van APX1. Een verlaagde expressie van dit gen lijkt aan te geven dat de KO, onder stressvrije condities, toch goed in staat is ROS te detoxificeren. Mogelijk is een verminderde productie van ROS, door een verminderde expressie van *RBOHD* een signaal voor de cel om minder *CAT1* tot expressie te brengen. Dit is een bevestiging van de bevinding van Davletova *et al.* (2005) dat *RBOHD* mogelijk betrokken is in de signaaltransductieketen van ondermeer *CAT1* als positieve amplificatiefactor [44].

Bij blootstelling aan 5 μM Cd lijkt een verlaagde expressie van ***RBOHD*** niet langer een compensatiemechanisme van de KO te zijn omdat de expressie niet werd beïnvloed t.o.v. 0 μM Cd of t.o.v. het WT (figuur 8 en tabellen 2 en 3). Dit geeft aan dat andere mechanismen aangesproken moeten worden om het ROS-gehalte tijdens Cd-stress onder controle te houden. Eén mogelijkheid is een verhoogde expressie van ***APX6*** en ***APX3***. Deze genen werden geïnduceerd bij de KO door blootstelling aan 5 μM Cd t.o.v. 0 μM Cd wat niet het geval was bij het WT. Dat *APX3* mogelijk een belangrijke rol heeft in de verdediging tegen Cd-geïnduceerde oxidatieve stress bij verlies van APX1 kan een aanvulling zijn op de publicatie van Narendra *et al.* (2006) die beschreven dat *APX3* mogelijk geen belangrijk antioxidantief enzym is voor *Arabidopsis* [57]. Gezien de centrale rol van APX in de ASA-GSH-cyclus is het niet vreemd dat ook andere genen met een rol in deze cyclus werden beïnvloed door het verlies van APX1. De genen ***MDAR1***, ***MDAR5***, ***DHAR3*** en ***GR2*** werden geïnduceerd bij blootstelling aan 5 μM Cd t.o.v. 0 μM Cd bij de KO terwijl dat niet het geval was bij het WT. Het gen ***MDAR4*** werd verlaagd tot expressie gebracht bij het WT terwijl dat niet het geval was bij de KO. Een verhoogde activiteit van de ASA-GSH-cyclus bij de KO wordt bevestigd door een licht verhoogde expressie van ***MSD1*** en ***FSD1*** omdat SOD H_2O_2 , het substraat voor de cyclus, produceert.

Een mogelijk belangrijk mechanisme van de KO om de productie van ROS te controleren bij blootstelling aan 10 μM Cd, is een sterk verlaagde expressie van ***RBOHC*** (figuur 8 en tabellen 2 en 3). De verlaagde expressie van ***FSD1*** en ***MSD1*** geeft aan dat de KO minder te kampen heeft bij stress door $O_2^{\cdot-}$ en is mogelijk een gevolg van de verlaagde expressie van *RBOHC*. Hoewel de expressie van ***APX3*** bij 10 μM Cd nog steeds (maar minder sterk) was geïnduceerd t.o.v. 0 μM Cd, was ***APX6***, bij deze concentratie Cd, niet langer geïnduceerd bij de KO t.o.v. 0 μM Cd. Dat APX en de ASA-GSH-cyclus minder belangrijk zijn bij deze specifieke behandeling, wordt bevestigd doordat het transcriptieniveau van ***APX4***, ***MDAR5***, ***DHAR1***, ***DHAR2***, ***DHAR3*** en ***GR2*** significant werd gereduceerd bij de KO t.o.v. het WT. De verlaagde expressie van *FSD1* en *MSD1* lijkt deze bevinding te steunen. Net zoals onder de stressvrije conditie werd de expressie van ***CAT1*** gereduceerd bij de KO, wat opnieuw zou kunnen betekenen dat de KO goed in staat is het gehalte ROS te handhaven en dat een verminderde ROS-productie een signaal is voor de cel om *CAT1* verminderd tot expressie te brengen.

Het feit dat geen significante genotypeverschillen in **enzymactiviteit** werden gedetecteerd na 2 uur is een aanwijzing dat de verschillen in genexpressie onvoldoende groot zijn om te leiden tot significante verschillen in enzymactiviteit of dat effecten op het eiwitniveau zich nog niet konden manifesteren na deze korte tijdspanne (tabel 4).

De oxidatieve stresssignatuur na 24u

In tegenstelling tot bij 2 uur onder stressvrije condities, zijn bij 24 uur bij 0 μM Cd **MDAR2** en **APX5** geïnduceerd bij de KO t.o.v. het WT (figuur 9 en tabellen 2 en 3). Terwijl 18 dagen oude KO's (na 2u), onder stressvrije condities, voornamelijk lijken te compenseren voor het verlies van APX1 door minder ROS te produceren, lijkt bij 19 dagen oude KO's (na 24u) de ASA-GSH-cyclus hiervoor belangrijk te zijn. Daar tegenover staat dat de expressie van **APX4** zoals na 2u bij 0 μM Cd gereduceerd werd bij de KO t.o.v. het WT. Het gen **sAPX**, dat ook tot expressie komt in de chloroplast, kende tevens een gereduceerde expressie na 24 uur onder stressvrije condities.

Mogelijke mechanismen van de KO om ROS-homeostase te handhaven tijdens blootstelling aan 5 μM Cd zijn een verminderde productie van ROS door een verlaagde genexpressie van **RBOHC** en **RBOHD** (figuur 9 en tabellen 2 en 3). Vooral **RBOHC** werd opnieuw zeer sterk verlaagd tot expressie gebracht. De expressie van **MSD1** en **FSD1** was licht afgenomen wat opnieuw wijst op een mindere rol voor $\text{O}_2^{\cdot-}$ tijdens oxidatieve stress. Een licht verhoogde expressie van **CAT2** en **CAT3** lijkt tijdens deze conditie een rol te spelen bij de compensatie voor het verlies van APX1. De ASA-GSH-cyclus lijkt minder belangrijk in deze context, in tegenstelling tot dezelfde behandeling gedurende 2 uur. Geen genen van deze cyclus werden geïnduceerd bij de KO t.o.v. het WT, het transcriptieniveau van **APX5**, **DHAR1** en **DHAR3** werd verlaagd bij de KO bij blootstelling aan 5 μM Cd t.o.v. 0 μM Cd en **APX2** werd geïnduceerd bij het WT t.o.v. 0 μM Cd, wat niet het geval was bij de KO. Een argument voor een rol van de ASA-GSH-cyclus in de compensatie voor het verlies van APX1, is het feit dat het transcriptieniveau van **sAPX** werd gereduceerd bij het WT, maar niet bij de KO, t.o.v. 0 μM Cd.

Een mogelijk belangrijk mechanisme van de KO om ROS-homeostase te handhaven tijdens blootstelling aan 10 μM Cd is een sterk verminderde expressie van **RBOHC** en een mindere expressie van **RBOHD** (figuur 9 en tabellen 2 en 3). Verder werd **CAT2** ook bij blootstelling aan 10 μM Cd geïnduceerd t.o.v. het WT wat aangeeft dat het ook tijdens deze conditie betrokken kan zijn bij de compensatie voor het verlies van APX1. Hoewel de expressie van **APX2** en **MDAR3** werd verlaagd bij de KO t.o.v. het WT, werden **DHAR1** en **MDAR5** geïnduceerd t.o.v. het WT wat zou kunnen wijzen op een specifieke rol voor deze genen. Net zoals bij 5 μM Cd werd **sAPX** verlaagd tot expressie gebracht bij het WT, maar niet bij de KO.

Een mogelijk compensatiemechanisme na 24u onder stressvrije condities is een geïnduceerde **CAT-activiteit** (tabel 4). Dit resultaat bevestigt het resultaat van Asai *et al.* (2004) die beschreven dat 2 weken oude KO-*apx1* van *A. thaliana* een 30% hogere CAT-activiteit hebben in vergelijking met het wildtype [58]. De analyse van de genexpressie levert geen overduidelijke bevestiging van deze stijging in enzymactiviteit, hoewel het transcriptieniveau van **CAT1** en **CAT2** niet-significant werd verhoogd. Mogelijk speelt posttranscriptionele en posttranslationale regulatie hier een belangrijke rol [53]. Catalase lijkt, net zoals bij het WT, ook bij de KO een rol te spelen in de verdediging tegen Cd-geïnduceerde oxidatieve stress omdat de activiteit werd verhoogd bij 10 μM Cd t.o.v. 0 μM Cd. Dit resultaat kan bevestigd worden door het expressiepatroon van **CAT1**. Bij blootstelling aan 10 μM Cd lijkt een verhoogde CAT-activiteit een belangrijk compensatiemechanisme voor het verlies van

APX1. Mogelijk hebben de sterk geïnduceerde expressie van *CAT2* bij de KO t.o.v. het WT en de geïnduceerde expressie van *CAT1* bij 10 μM t.o.v. 0 μM een belangrijk aandeel in deze verhoogde enzymactiviteit.

Een geïnduceerde **GR-activiteit** kan voor de KO een belangrijk mechanisme zijn om ROS voortgebracht door Cd-geïnduceerde oxidatieve stress te detoxificeren omdat de activiteit van GR significant was gestegen bij de KO bij blootstelling aan 5 en 10 μM Cd (tabel 4). Eenzelfde trend was wel zichtbaar bij het WT. Dit kan bevestigd worden door het transcriptiepatroon van *GR1* dat niet-significant geïnduceerd werd bij 5 μM Cd en significant geïnduceerd werd bij 10 μM Cd. De expressie van *GR2* daarentegen werd wel significant gereduceerd.

De KO kende, in tegenstelling tot het WT, geen stijging in de **ASA-concentratie** bij blootstelling aan 5 μM Cd (tabel 5). Dit verschil kan moeilijk verklaard worden a.d.h.v. het expressiepatroon dat grotendeels gelijkaardig was voor het WT en de KO. Het enige relevante verschil is een verlaagde expressie van *DHAR3*.

De **concentratie van totaal GSH** was significant verlaagd bij de KO bij blootstelling aan 5 en 10 μM Cd en was significant lager bij 10 μM Cd in vergelijking met het WT (tabel 5). Dit resultaat zou betekenen dat de KO minder GSH synthetiseert bij stijgende concentraties Cd en dus minder wordt beschermd via de ASA-GSH-cyclus en Cd-scavenging via GSH en PC [40]. De GSH-synthese kan geïnduceerd worden door een oxidatieve stimulus [59] en mogelijk wordt de synthese van GSH in mindere mate gestimuleerd bij de KO door een lager gehalte aan ROS. Dit verlaagd gehalte ROS kan een gevolg zijn van het induceren of activeren van alternatieve mechanismen als gevolg van het verlies van APX1. Een belangrijk mechanisme in deze context is mogelijk het verhogen van de CAT-activiteit omdat May *et al.* (1993) beschreven dat een oxidatieve stimulus als gevolg van de inhibitie van CAT geassocieerd is met een verhoogde synthese van GSH [60].

De oxidatieve stresssignatuur na 72u

Het gen *FSD1* werd sterk verlaagd tot expressie gebracht bij de KO t.o.v. het WT na 72u zonder externe stress door Cd (figuur 10 en tabellen 2 en 3). Dit geeft aan dat de KO minder te kampen heeft met oxidatieve stress door $\text{O}_2^{\cdot-}$. Er lijkt geen bijzondere rol weggelegd voor de ASA-GSH-cyclus als compensatiemechanisme. De genexpressie van *DHAR2* en *sAPX* werden zelf gereduceerd bij de KO t.o.v. het WT. De KO lijkt goed om te kunnen met het verlies van APX1 omdat de expressie van *CAT3* verlaagd werd t.o.v. het WT.

Bij blootstelling aan 5 μM Cd werd de expressie van *APX1* meer dan 5 maal verhoogd bij de KO t.o.v. 0 μM Cd (figuur 10 en tabellen 2 en 3). Een verklaring hiervoor kan zijn dat, ondanks APX1 werd uitgeschakeld, een deel van het transcript nog kan worden afgeschreven onder invloed van een nog steeds actieve promotor. Dit onvolledige transcript kan dan geamplificeerd worden tijdens de real-time PCR reactie. Een mogelijk belangrijk mechanisme van de KO om homeostase te handhaven tijdens Cd-stress door een behandeling met 5 μM Cd, is een verhoogde expressie van *CAT3*, dat werd geïnduceerd bij de KO t.o.v. het WT en verlaagd tot expressie werd gebracht bij het WT bij 5 μM Cd t.o.v. 0 μM Cd. Een mogelijk ander compensatiemechanisme is een verminderde vorming van ROS door een verminderde expressie van het pro-oxidatief gen *LOX2*. Bij deze conditie lijkt de ASA-GSH-cyclus in de chloroplast en het mitochondrium van belang te zijn voor de KO. De genen *APX4*, *tAPX*, *sAPX*, *DHAR1* en *GR2* werden allemaal verlaagd tot expressie gebracht bij het WT bij 5 μM Cd t.o.v. 0 μM Cd en dat in tegenstelling tot bij de KO. Het gen *APX7* werd geïnduceerd bij de KO bij 5 μM Cd t.o.v. 0 μM Cd. De rol van de ASA-GSH-cyclus in het cytosol is onduidelijk. Het transcriptieniveau van

MDAR3 en **DHAR3** werd verlaagd bij de KO t.o.v. het WT, maar het transcriptieniveau van **MDAR5** werd verlaagd bij het WT en niet bij de KO bij 5 μM Cd t.o.v. 0 μM Cd.

Bij blootstelling aan 10 μM Cd werd de expressie van **APX1** tevens meer dan 5 maal verhoogd bij de KO t.o.v. 0 μM Cd (figuur 10 en tabellen 2 en 3). Bij blootstelling aan 10 μM Cd gedurende 72u lijkt ROS-homeostase bij de KO in het gedrang te komen omdat de genexpressie van de ROS-producerende genen **LOX1** en **LOX2** werd geïnduceerd bij de KO t.o.v. het WT en t.o.v. 0 μM Cd en omdat **RBOHC** werd geïnduceerd bij de KO t.o.v. 0 μM Cd. De expressie van **FSD1** werd sterk geïnduceerd bij de KO bij 10 μM Cd t.o.v. 0 μM Cd, terwijl **CSD1** en **CSD2** verlaagd tot expressie werden gebracht, wat de impact van oxidatieve stress door $\text{O}_2^{\cdot-}$ onduidelijk maakt. De ASA-GSH-cyclus in het cytosol speelt mogelijk een rol omdat **MDAR2** en **DHAR3** werden geïnduceerd t.o.v. het WT en de expressie van **DHAR2** werd gereduceerd bij het WT en niet bij de KO. In de chloroplast en het mitochondrium lijkt de cyclus een mindere rol te spelen voor de KO omdat de expressie van **APX4**, **tAPX** en **DHAR1** werden gereduceerd bij de KO t.o.v. het WT.

Hoewel de **CAT-activiteit** verlaagd was bij het WT in vergelijking met de KO na 24u bij 0 μM Cd, hadden WT en KO na 72 uur een vergelijkbare CAT-activiteit (tabel 4). Dit resultaat kan bevestigd worden door de genexpressie van **CAT2** en **CAT3**. **CAT3** werd geïnduceerd bij de KO t.o.v. het WT en **CAT2** kende een trend in de omgekeerde richting, waardoor de individuele effecten mogelijk werden geneutraliseerd. Bij blootstelling aan 5 μM Cd lijkt een verhoogde CAT-activiteit belangrijk te zijn voor de KO, omdat de activiteit significant werd verhoogd t.o.v. 0 μM Cd. Bij het WT werd een minder sterke trend in dezelfde richting waargenomen. Bij blootstelling aan 10 μM Cd lijkt een verhoogde CAT-activiteit, zoals na 24u, een belangrijk compensatiemechanisme voor het verlies van APX1 te zijn, omdat de activiteit van CAT significant was verhoogd t.o.v. het WT. Dit resultaat kan moeilijk worden bevestigd door het resultaat van de analyse van de genexpressie omdat de expressie van **CAT1-3** niet verschillend was voor de KO en het WT.

4.3 Coregulatie van genen tijdens cadmiumstress

Een eerste interessante cluster bestaat uit **MDAR3** en **RBOHD** (figuur 11). De clusteranalyse voorspelt een sterke coregulatie tussen beide genen, wat zou betekenen dat een verhoogde ROS-productie onder gecontroleerde omstandigheden gebeurt. De cel is als het ware voorbereid tegen extra ROS en kan de balans tussen pro-oxidanten en antioxidanten snel opnieuw in evenwicht brengen via de ASA-GSH-cyclus. MDAR kan dit evenwicht uiteraard niet alleen herstellen, maar heeft andere enzymen nodig. Zo verspelt de clusteranalyse een iets minder sterke coregulatie met **APX2**. Een tweede en derde subcluster bestaan respectievelijk uit **DHAR1** en **GR2** en **MDAR5** en **APX4**. Beide clusters maken op zich onderdeel uit van een overkoepelende cluster. Deze vier genen hebben een rol in de ASA-GSH-cyclus en hun expressie wordt mogelijk gecoreguleerd tijdens Cd-geïnduceerde stress. De expressie van **APX3** en **APX6** wordt volgens de clusteranalyse ook gecoreguleerd. Uit de analyse van de genexpressie blijkt bijvoorbeeld dat beide mogelijk samen belangrijk zijn als compensatiemechanisme voor het verlies van APX1 tijdens een korte blootstelling van 2u aan 5 μM Cd. Een vijfde en laatste interessante cluster bestaat uit **LOX1** en **LOX2**. Coregulatie van beide lipoxygenasegenen verklaart een link tussen het cytosol en de chloroplast en geeft aan dat in beide organellen via een zelfde mechanisme ROS worden geproduceerd tijdens externe stress door Cd.

4.4 Verder onderzoek

Dit project heeft een aantal concrete vragen opgeleverd. Zo werd in hoofdstuk 4.2.1 beschreven dat de verminderde gevoeligheid van de KO voor Cd het resultaat kan zijn van een sterkere inductie van HSP's, zoals voorgesteld door Pnueli *et al.* (2003) [45]. Analyses van de HSP's kunnen meer duidelijkheid hierin verschaffen. In hoofdstuk 4.2.2 werd beschreven dat de KO, wanneer blootgesteld aan Cd, minder GSH zal synthetiseren in vergelijking met het WT als gevolg van een minder intense oxidatieve stimulus. Meer bewijs voor dit mechanisme kan komen van een analyse van de genen betrokken bij de biosynthese van glutathion. Omdat een verhoogde CAT-activiteit werd aangehaald als mogelijke oorzaak van de verminderde oxidatieve stimulus, kan verder onderzoek met *A. thaliana*, met geïnactiveerd catalase, bijdragen aan deze kennis.

Omdat dit project aanwijzingen geeft voor allerlei compensatiemechanismen in de blaadjes van *A. thaliana*, is het zinvol dit project uit te breiden naar de wortel. Omwille van diezelfde reden is het zinvol om deze kennis aan te vullen met andere analyses van het antioxidatief systeem (analyse lipidenperoxidatie en andere antioxidatieve eiwitten (e.c. peroxiredoxines) en metabolieten (e.c. tocoferolen)). Ook zou het zinvol zijn om de mate van oxidatieve stress te onderzoeken a.d.h.v. bijvoorbeeld een H₂O₂-meting. Tot slot, vermoedelijk dragen deze compensatiemechanismen bij aan een veranderde oxidatieve signaalgeving wat onderzocht kan worden binnen verschillende studievelden (e.g. transcriptomics, proteomics, metabolomics) en wat kan bijdragen aan een beter inzicht in dit complex principe.

5 Conclusie

Cadmium is een wijdverspreid en niet-essentieel zwaar metaal dat via een indirect mechanisme kan leiden tot oxidatieve stress. In dit project werd onderzocht op welke manier blootstelling aan realistische Cd-concentraties het pro- en antioxidatief systeem en de redoxstatus van blaadjes van *A. thaliana* kan beïnvloeden na verschillende blootstellingstijden. Daarnaast werd onderzocht op welke manier deze parameters worden beïnvloed bij *A. thaliana* met geïnactiveerd ascorbaatperoxidase 1 en welk effect het verlies van dit antioxidatief enzym heeft op de Cd-gevoeligheid. Op die manier werd getracht een beter inzicht te bekomen in de rol van APX1 tijdens Cd-geïnduceerde oxidatieve stress.

De analyse van het effect van Cd op het WT toont sterke verschillen na verschillende Cd-concentraties en blootstellingstijden. Het antioxidatief systeem werd slechts subtiel beïnvloed door een korte Cd-blootstelling van 2u. Het verminderen van ROS-productie door een verlaagde expressie van *RBOHD* en het induceren van de ASA-GSH-cyclus lijken betrokken bij de antioxidatieve verdediging. Oxidatieve stress door $O_2^{\cdot-}$ lijkt een rol te spelen in dit stadium.

Bij een langere Cd-blootstelling van 24u werd het systeem sterker onder druk geplaatst door een inductie van verschillende pro-oxidatieve genen. Oxidatieve stress door $O_2^{\cdot-}$ speelt vermoedelijk een mindere rol in dit stadium. De ASA-GSH-cyclus in het cytosol lijkt belangrijk te zijn in de antioxidatieve verdediging. Vooral de specifieke genen *APX2*, *MDAR2* en *MDAR3* lijken zeer belangrijk. De sterk geïnduceerde expressie van de MDAR-genen ligt mogelijk aan de grondslag van de verhoogde concentratie gereduceerd ASA. Een verhoogde CAT-activiteit lijkt een ander belangrijk mechanisme in de verdediging tijdens deze stressconditie. Het gen *CAT1* ligt mogelijk aan de grondslag van deze inductie. Bij blootstelling aan Cd gedurende 24u werd de redoxstatus van GSH sterk verlaagd. Dit kan grotendeels verklaard worden door een sterke daling in de GSSG-concentratie. Dit laatste kan bevestigd worden door een verhoogde activiteit van GR en een geïnduceerde expressie van *GR1*, maar kan (deels) ook een gevolg zijn van Cd-scavenging door GSH en PC.

Bij 5 μ M Cd gedurende 72u werd het systeem sterk onder druk geplaatst door een inductie van alle gemeten pro-oxidatieve genen. Deze respons was veel minder sterk bij 10 μ M Cd en kan een verdedigingsmechanisme voorstellen om het gehalte ROS onder controle te houden. Het kan ook betekenen dat oxidatieve signaalgeving door RBOHC minder belangrijk is in dit stadium. Tijdens beide condities lijkt oxidatieve stress door $O_2^{\cdot-}$ een mindere rol te spelen. De ASA-GSH-cyclus in het cytosol en/of het mitochondrium, en meer specifiek de genen *MDAR2* en *MDAR3*, lijken zeer belangrijk tijdens de antioxidatieve verdediging. Het verhogen van de activiteit van GR lijkt hier ook een belangrijke rol te spelen. Tot slot lijkt een verhoogde CAT-activiteit ook een rol te spelen. Het gen *CAT1* ligt mogelijk aan de grondslag van deze inductie.

Dit eerste deelexperiment toont aan dat het antioxidatief systeem een dynamisch en redundant systeem is dat van verschillende mechanismen gebruik kan maken om ROS-homeostase te handhaven zoals het verminderen van de productie van ROS, een verhoogde activiteit van de ASA-GSH-cyclus in het cytosol en/of mitochondrium en stimulatie van CAT. Afhankelijk van de blootstellingstijd en de concentratie Cd kunnen andere mechanismen worden aangesproken.

De vergelijking tussen het WT en de KO levert sterke verschillen op tussen beide genotypes. Zo toont een analyse van de wortelgroei aan dat de KO minder gevoelig is aan realistische concentraties Cd. Dit zou een gevolg kunnen zijn van een sterkere inductie van HSP's bij de KO. Een andere verklaring is

dat mechanismen die compenseren voor het verlies van APX1, maken dat de KO meer resistent is tegen Cd-geïnduceerde oxidatieve stress.

De onbehandelde KO na 2u lijkt vooral te compenseren voor het verlies van APX1 door de productie van ROS te verminderen door *RBOHD* verlaagd tot expressie te brengen. Oxidatieve stress door $O_2^{\cdot-}$ lijkt minder op te treden bij de KO dan bij het WT. Bij een behandeling met 5 μ M Cd gedurende 2u lijkt de ASA-GSH-cyclus, van verschillende organellen, erg belangrijk te zijn in de antioxidatieve verdediging. Bij een behandeling met 10 μ M Cd gedurende 2u lijkt de KO te compenseren voor het verlies van APX1 door de productie van ROS te beperken door de expressie van *RBOHC* te verminderen. Bij deze conditie lijkt oxidatieve stress door $O_2^{\cdot-}$ opnieuw van minder belang te zijn voor de KO. Het verlaagde transcriptieniveau van pro-oxidatieve genen bij 0 en 10 μ M Cd was mogelijk een signaal voor de cel om *CAT1* verlaagd tot expressie te brengen.

De onbehandelde KO na 24u lijkt vooral te compenseren voor het verlies van APX1 door specifieke genen van de ASA-GSH-cyclus zoals *MDAR2* en *APX5* te induceren en door de CAT-activiteit te verhogen. Bij een blootstelling aan Cd gedurende 24u lijkt het verlagen van de ROS-productie door een verlaagde expressie van *RBOHC* en *RBOHD* belangrijk te zijn. Bij 10 μ M Cd gedurende 24u lijkt een verhoogde CAT-activiteit een rol te spelen, waarbij de genen *CAT1* en *CAT2* mogelijk een belangrijk aandeel hebben in deze verhoogde enzymactiviteit. De verlaagde concentratie totaal GSH bij de KO bij 10 μ M Cd kan het gevolg zijn van een minder sterke oxidatieve stimulatie van de GSH-synthese door een meer efficiënte antioxidatieve verdediging als gevolg van de inductie van compensatiemechanismen. De verhoogde CAT-activiteit heeft hier mogelijk een belangrijk aandeel in.

Het lijkt er op dat de onbehandelde KO na drie dagen veel minder te maken heeft met oxidatieve stress door $O_2^{\cdot-}$. Mogelijke compensatiemechanismen bij 5 μ M Cd gedurende 72u zijn een verhoogde detoxificatie van H_2O_2 door een verhoogde expressie van *CAT3*, minder ROS-productie door een verlaagde expressie van *LOX2* en mogelijk een verhoogde activiteit van de ASA-GSH-cyclus in het mitochondrium en de chloroplast. Bij 10 μ M Cd gedurende 72u werd het antioxidatief systeem van de KO ernstig onder druk geplaatst omdat verschillende pro-oxidatieve genen verhoogd tot expressie werden gebracht. Toch lijkt oxidatieve stress door $O_2^{\cdot-}$ een mindere rol te spelen bij de KO in vergelijking met het wildtype. Mogelijke compensatiemechanismen tijdens deze conditie zijn een verhoogde activiteit van de ASA-GSH-cyclus in het cytosol en een verhoogde concentratie totaal CAT.

Het tweede deelexperiment toont aan dat het antioxidatief systeem, tijdens en zonder Cd-stress, op verschillende niveaus moet compenseren voor het verlies van APX1. Dit geeft aan dat dit cytosolisch enzym een brede taak te vervullen heeft en ook een rol speelt in de antioxidatieve verdediging binnen andere celorganellen zoals de chloroplast, het mitochondrium en het peroxisoom. De efficiënte inductie van compensatiemechanismen ligt mogelijk aan de grondslag van een verminderde Cd-gevoeligheid, een verminderde productie van $O_2^{\cdot-}$ en een verlaagde GSH-synthese.

Referenties

1. World Health Organization. Chapter 6.3 Cadmium. Air Quality Guidelines – second edition. Copenhagen, Denmark: World Health Organization, Regional Office for Europe; 2000. p. 136-138.
2. Järup L. Hazards of heavy metal contamination. *Br Med Bull* 2003; 68: 167-182.
3. Järup L, Åkesson A. Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2009; 238: 201-208.
4. Nawrot T, Plusquin M, Hogervorst J, Roels H A, Celis H, Thijs L, Vangronsveld J, Van Hecke E, Staessen J A. Environmental exposure to cadmium and risk of cancer: a prospective population-based study. *The Lancet Oncology* 2006; 7: 119-126.
5. Olsson IM, Bensryd I, Lundh T, Ottosson H, Skerfving S, Oskarsson A. Cadmium in blood and urine—impact of sex, age, dietary intake, iron status, and former smoking—association of renal effects. *Environmental Health Perspectives* 2002; 110: 1185–1190.
6. Järup L, Persson B, Elinder CG. Decreased glomerular filtration rate in cadmium exposed solderers. *Occupational and Environmental Medicine* 1995; 52: 818-822.
7. Hellström L, Elinder CG, Dahlberg B, Lundberg M, Järup L, Persson B, Axelsson O. Cadmium exposure and end-stage renal disease. *American Journal of Kidney Diseases* 2001; 38: 1001-1008.
8. Wang H, Zhu G, Shi Y, Weng S, Jin T, Kong Q, Nordberg G F. Influence of environmental cadmium exposure on forearm bone density. *Journal of Bone and Mineral Research* 2003; 8: 553-560.
9. Jin T, Nordberg G, Ye T, Bo M, Wang H, Zhu G, Kong Q, Bernard A. Osteoporosis and renal dysfunction in a general population exposed to Cadmium in China. *Environmental Research* 2004; 96: 353-359.
10. Åkesson A, Bjellerup P, Lundh T, Lidfeldt J, Nerbrand C, Samsioe G, Skerfving S, Vahter M. Cadmium-induced effects on bone in a population-based study of women. *Environmental Health Perspectives* 2008; 114: 830-834.
11. Schutte R, Nawrot T S, Richart T, Thijs L, Vanderschueren D, Kuznetsova T, Van Hecke E, Roels H A, Staessen J A. Bone resorption and environmental exposure to cadmium in women: a population study. *Environmental Health Perspectives* 2008; 116: 777-783.
12. International Agency for Research on Cancer. Cadmium and cadmium compounds. Lyon: International Agency for Research on Cancer 1993: 119–220.
13. Verougstraete V, Lison D, Hotz P. Cadmium, lung and prostate cancer: a systematic review of recent epidemiological data. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 2003; 6: 227-55.
14. Menke A, Muntner P, Silbergeld EK, Platz E A, Guallar E. Cadmium levels in urine and mortality among US adults. *Environmental Health Perspectives* 2008; 117: 190-196.
15. Nawrot TS, Van Hecke E, Thijs L, Richart T, Kuznetsova T, Jin Y, Vangronsveld J, Roels HA, Staessen JA. Cadmium-related mortality and long-term secular trends in the cadmium body burden of an environmentally exposed population. *Environmental Health Perspectives* 2008; 116: 1620-1628.
16. Clemens S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 2006; 88: 1707-1719.
17. Wagner GJ. Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Advances in Agronomy* 1993; 51: 173-212.
18. Connolly EL, Fett JP, Guerinot ML. Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. *Plant Cell* 2002; 14: 1347-1357.
19. Grotz N, Fox T, Connolly E, Park W, Guerinot ML, Eide D. Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95 1998. 7220-7224.
20. Perfus-Barbeoch L, Leonhardt N, Vavasseur A, Forestier C. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *Plant Journal* 2002; 32: 539-548.
21. Larsson E, Asp H, Bornman J. Influence of prior Cd(2+) exposure on the uptake of Cd(2+) and other elements in the phytochelatin-deficient mutant, *cad1-3*, of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 2002; 53: 447-453.
22. Ortiz DF, Ruscitti T, McCue KF, Ow DW. Transport of metalbinding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270: 4721-4728.
23. Salt DE, Wagner GJ. Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots. Evidence for a Cd²⁺/H⁺ antiport activity. *Journal of Biological Chemistry*. 1993; 268: 12297-12302.
24. Hirschi K, Korenkov V, Wilganowski N. Expression of *Arabidopsis* CAX2 in tobacco. Altered metal accumulation and increased manganese tolerance. *Plant Physiology* 2000; 124: 125-133.
25. Thomine S, Wang R, Ward J, Crawford N, Schroeder J. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000; 97: 4991-4996.
26. Cuypers A, Smeets K, Opdenakker K, Keunen E, Ruytinx J, Remans T, Horemans N, Vanhoudt N, Van Sanden S, Semane B, Van Belleghem F, Guisez Y, Colpaert J, Vangronsveld J. The cellular redox state as a modulator in Cd and Cu responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings. Unpublished 2009.
27. Gong JM, Lee DA, Schroeder JI. Long-distance root-to-shoot transport of phytochelatin and cadmium in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003. 100; 10118-10123.
28. Chen A, Komives EA, Schroeder JI. An improved grafting technique for mature *Arabidopsis* plants demonstrates long-distance shoot-to-root transport of phytochelatin in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 2006; 141: 108-120.
29. Axelsen K, Palmgren M. Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 2001; 126: 696-706.
30. Verret F, Gravot A, Auroy P, Leonhardt N, David P, Nussaume L, Vavasseur A, Richaud P. Overexpression of AtHMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance. *FEBS Letters* 2004; 576: 306-312.
31. Stohs S J, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine* 1995; 18: 321-336.
32. Cuypers A, Plusquin M, Remans T, Jozefczak M, Keunen E, Gielen H, Opdenakker K, Nair AR, Munters E, Artois TJ, Nawrot T, Vangronsveld J, Smeets K. Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals* 2010; Epub ahead of print.

33. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 2006; 141: 312-322.
34. Gechev TS, Van Breusegem F, Stone JM, Denev I, Laloi C. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays* 2006; 28: 1091-1101.
35. Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 2001; 52: 561-591.
36. del Rio LA, Sandalio LM, Corpas FJ, Barroso JB. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology* 2006; 141:330-335.
37. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Ed 4. Clarendon Press, Oxford 2006.
38. Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 2004; 9: 1360-1385.
39. Fridovich I. Superoxide radical and SODs. *Annual Review of Biochemistry* 1995; 64: 97-112.
40. Meyer AJ. The integration of glutathione homeostasis and redox signaling. *Journal of Plant Physiology* 2008; 165: 1390-1403.
41. Pnueli L, Liang H, Rozenberg M, Mittler R. Growth suppression, altered stomatal responses, and augmented induction of heat shock proteins in cytosolic ascorbate peroxidase (Apx1)-deficient *Arabidopsis* plants. *The Plant Journal* 2003; 34: 187-203.
42. Koussevitzky S, Suzuki N, Huntington S, Armijo L, Sha W, Cortes D, Shulaev V, Mittler R. Ascorbate Peroxidase 1 Plays a Key Role in the Response of *Arabidopsis thaliana* to Stress Combination. *The Journal of Biological Chemistry* 2008; 49: 34197-34203.
43. Rizhsky L, Hallak-Herr E, Van Breusegem F, Rachmilevitch S, Barr JE, Rodermel S, Inze D, Mittler R. Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. *The Plant Journal* 2002; 32: 329-342.
44. Davletova S, Rizhsky L, Liang H, Shengqiang Z, Oliver DJ, Couto J, Shulaev V, Schlauch K, Mittler R. Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 2005; 17: 268-281.
45. Smeets K, Ruytinx J, Semane B, Van Belleghem F, Remans T, Van Sanden S, Vangronsveld J, Cuypers A. Cadmium-induced transcriptional and enzymatic alterations related to oxidative stress. *Environmental and Experimental Botany* 2008; 63: 1-8.
46. Queval G, Noctor G. A plate reader method for the measurement of NAD, NADP, glutathione, and ascorbate in tissue extracts: Application to redox profiling during *Arabidopsis* rosette development. *Analytical Biochemistry* 2007; 363: 58-69.
47. Balcells L. A method for sterilising *Arabidopsis* seeds. In *Arabidopsis: The complete guide*. Flanders D, Dean C, editors. 1992. Version 1.4.
48. Zhang H, Forde BG. An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* 1998; 279: 407-409.
49. Smeets K, Ruytinx J, Van Belleghem F, Semane B, Lin D, Vangronsveld J, Cuypers A. Critical evaluation and statistical validation of a hydroponic culture system for *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* 2008; 46: 212-218.
50. 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.
51. Remans T, Smeets K, Opdenakker K, Mathijssen D, Vangronsveld J, Cuypers A. Normalisation of realtime RT-PCR gene expression measurements in *Arabidopsis thaliana* exposed to increased metal concentrations. *Planta* 2008; 227: 1343-1349.
52. Smeets K, Opdenakker K, Remans T, Van Sanden S, Van Belleghem F, Semane B, Horemans N, Guisez Y, Vangronsveld J, Cuypers A. Oxidative stress-related responses at transcriptional and enzymatic levels after exposure to Cd or Cu in a multipollution context. *Journal of Plant Physiology* 2009; 166: 1982-1992.
53. Mazzucotelli E., Mastrangelo A.M., Crosatti C., Guerra D., Stanca A.M., Cattivelli L. Abiotic stress response in plants: When post-transcriptional and post-translational regulations control transcription. *Plant Science* 2008; 174: 420-431.
54. Foyer C.H. Noctor G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment* 2005; 28: 1056-1071.
55. Neumann D., Lichtenberger O., Gunther D., Tschiersch K., Nover L. Heat-shock proteins induce heavy-metal tolerance in higher plants. *Planta* 1994; 194: 360-367.
56. Narendra S. The subcellular localization and function of APX3 in *Arabidopsis*. PhD thesis, Texas Tech University 2005.
57. Narendra S., Venkataramani S., Shen G., Wang J., Pasapula V., Lin Y., Korniyev D., Holaday A. S., Zhang H. The *Arabidopsis* ascorbate peroxidase 3 is a peroxisomal membrane-bound antioxidant enzyme and is dispensable for *Arabidopsis* growth and development. *Journal of Experimental Botany* 2006; 57: 3033-3042.
58. Asai N, Matsuyama T, Tamaoki M, Nakajima N, Kuba A, Aono M, Kato T, Tabata S, Shirano Y, Shibata D, Hayashi H, Mullineau PM, Saji H. Compensation for lack of a cytosolic ascorbate peroxidase in an *Arabidopsis* mutant by activation of multiple antioxidative systems. *Plant Science* 2004; 166: 1547-1554.
59. Noctor G, Arisi AM, Jouanin L, Kunert KJ, Rennenberg H, Foyer C. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *Journal of Experimental Botany* 1998; 49: 623-647.
60. May MJ, Leaver CJ. Oxidative stimulation of glutathione synthesis in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant Physiology* 1993; 103: 621-627.

Auteursrechtelijke overeenkomst

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

Cadmium-geïnduceerde oxidatieve stress: de rol van ascorbaatperoxidase 1

Richting: **master in de biomedische wetenschappen-milieu en gezondheid**

Jaar: **2010**

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

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

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

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

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

Voor akkoord,

Geybels, Milan

Datum: **14/06/2010**