



# ***Metaalspecifieke regulaties in de promotoractiviteit van de lipoxygenase genen in Arabidopsis thaliana***

## **An Bielen**

promotor :  
Prof. dr. Ann CUYPERS

co-promotor :  
dr. Tony REMANS

# Inhoudsopgave

<b>Voorwoord</b>	<b>1</b>
<b>Lijst met afkortingen</b>	<b>2</b>
<b>Samenvatting</b>	<b>3</b>
<b>1 Inleiding</b>	<b>4</b>
1.1 Effecten van zware metalen op de mens	4
1.2 Effecten van verhoogde concentraties zware metalen in planten	5
1.3 Oxidatieve stress	7
1.4 Lipidenperoxidatie en – lipoxygenase	8
1.5 Opzet en doel van het project	10
<b>2 Materiaal en methoden</b>	<b>12</b>
2.1 Meten van de promotoractiviteit in de transgene LOX-GUS lijnen	12
2.1.1 Plantmateriaal	12
2.1.2 Plantcultuur op agarplaten	12
2.1.3 Range-finding experiment	13
2.1.4 Blootstelling en opvolging wortelgroei	13
2.1.5 Kwantificatie van GUS activiteit	13
2.1.6 Verificatie-experiment	15
2.1.7 Histochemische kleuring	15
2.1.8 Statistische analyse	16
2.2 Kloneringen	16
2.2.1 LOX promotor amplificatie	16
2.2.2 Klonering van de promotorfragmenten in de gateway entry vector pENTR1A	17
2.2.3 Transfer van de promotorfragmenten naar de expressievector	18

<b>3</b>	<b>Resultaten</b>	<b>20</b>
3.1	De gevoeligheid voor zware metalen van <i>Arabidopsis thaliana</i>	20
3.1.1	Resultaten van het range-finding experiment	20
3.1.2	Wortelgroei van de transgene <i>Arabidopsis</i> planten na blootstelling	21
3.1.3	Promotoractiviteit	22
3.1.4	GUS activiteit van het verificatie-experiment	30
3.1.5	Histochemische kleuring	31
3.2	Klonering	33
3.2.1	Amplificatie-reactie	33
3.2.2	Restrictie pENTR1A vector	34
3.2.3	Klonering van de promotorfragmenten in de gateway entry vector pENTR1A	35
3.2.4	LR reactie	36
<b>4</b>	<b>Discussie</b>	<b>38</b>
4.1	Lipoxygenase promotoractiviteiten bij blootstelling aan cadmium, koper of zink	38
4.2	Klonering	41
4.3	Toekomstperspectieven	42
<b>5</b>	<b>Conclusie</b>	<b>43</b>
<b>6</b>	<b>Referenties</b>	<b>45</b>
	<b>Bijlage</b>	<b>48</b>

## Voorwoord

Na een half jaar stage ben ik aan het einde gekomen van mijn thesis en kijk ik terug op een geweldige en leerzame ervaring. Hiervoor wil ik in de eerste plaats mijn promotor Prof. Dr. Ann Cuypers en copromotor Dr. Tony Remans bedanken. Zij hebben me de kans gegeven om de seniorstage in het Centrum voor Milieukunde tot een goed einde te brengen. Ik wil hun bedanken voor het aanleren en het onder de knie krijgen van verschillende technieken en de tijd die ze vrijgemaakt hebben voor mij. In het bijzonder wil ik Tony bedanken voor het helpen van het schrijven van deze thesis. Zonder enige aarzeling was hij bereid om mijn thesis na te lezen en te beoordelen. Hij stond altijd even enthousiast klaar voor een handje te helpen in het labo en bij het analyseren van de data.

Verder wil ik iedereen van het labo bedanken voor de aangename sfeer die ze creëerden, ook voor de begeleiding en de flexibele samenwerking. Mijn klasgenoten waren een grote steun tijdens deze periode. Ook bedankt voor de toffe babbels en het samen eten tijdens de middag.

Mijn ouders verdienen ook een dankwoord. Zij hebben het volgen van deze studie mogelijk gemaakt en in moeilijke tijden stonden ze altijd klaar om een riem onder het hart te steken. Mijn broertje bedank ik voor de gezellige pauzemomenten tijdens het studeren thuis. Ook een dankjewel aan mijn familie voor de mentale ondersteuning en de getoonde interesses. En dan als laatste, maar zeker niet het minst belangrijke, wil ik mijn vriendinnen en vrienden van Zonhoven en Diepenbeek bedanken voor de steun en toeverlaat, de nodige ontspanning en feestjes, kortom voor een fijne studententijd!

## Lijst met afkortingen

BSA	Bovine serum albumine
C	Koolstof
Cd	Cadmium
CO <sub>2</sub>	Koolstofdioxide
CSD	Koper/zink superoxide-dismutase
Cu	Koper
DNA	Deoxyribonucleïne zuur
dH <sub>2</sub> O	Gedestilleerd water
E. coli	Escherichia coli
Fe	Ijzer
GUS	Glucuronidase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Waterstofperoxide
LOX	Lipoxygenase
LUC	Luciferase
Mn	Mangaan
mRNA	Messenger ribonucleïnezuur
MT	Metallothioneïnen
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide fosfaat
NaOH	Natriumhydroxide
Na-P buffer	Natriumfosfaat-buffer
O <sub>2</sub>	Zuurstofmolecule
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Superoxide anion
OH <sup>•</sup>	Hydroxylradicaal
PUFA's	Meervoudige onverzadigde vetzuren (poly unsaturated fatty acids)
ROS	Reactieve zuurstofvormen
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Sulfaat anion
SOD	Superoxide-dismutase
X-gluc	5-bromo-4chloro-3indolyl-β-D-glucoronide
Zn	Zink

## Samenvatting

Als gevolg van geavanceerde industriële activiteit en landbouwtechnieken werden sinds de 19<sup>de</sup> eeuw zware metalen verspreid in de biosfeer. Dit leidde tot een ernstige metaalverontreiniging in bepaalde gebieden in België, ondermeer de Maasvallei bij Luik, Noord-Limburg en de Antwerpse Kempen. Zware metalen in de bodem kunnen accumuleren in de gewassen, wat nadelige gevolgen heeft voor de kwaliteit van de voeder- of voedselgewassen en de gezondheid van de gebruikers in de voedselketen. Een te veel aan zware metalen in planten kan op cellulair niveau oxidatieve stress induceren, wat veroorzaakt is door een inhibitie van de antioxidatieve verdediging of een gestegen productie van reactieve zuurstofvormen (ROS). ROS zijn schadelijk voor verschillende biologische componenten, waaronder lipiden. Lipidenperoxidatie is een proces dat enzymatisch veroorzaakt wordt door lipoxygenasen (LOXen). LOXen katalyseren de oxidatie van meervoudige onverzadigde vetzuren (PUFA's) die op hun beurt betrokken zijn bij fysiologische processen, waaronder celsignalisatie, en geïnduceerd worden tijdens stresscondities. Bovendien zorgen LOXen voor de productie van verschillende structurele oxylipines. Het is mogelijk dat diverse oxylipines een verzameling van signalisatiemoleculen representeren die deelnemen aan de plasticiteit van de reacties in planten op abiotische of biotische stress.

In deze studie werden metaalspecifieke regulaties in de promotoractiviteiten van de lipoxygenase genen bestudeerd. *Arabidopsis thaliana* plantjes werden 0u, 6u, 24u, 30u en 96u/120u blootgesteld aan de zware metalen cadmium (Cd), koper (Cu) en zink (Zn), die elk verschillende eigenschappen bevatten. De promotoractiviteiten werden bestudeerd door middel van  $\beta$ -glucuronidase (GUS) constructen, waardoor de GUS activiteit gemeten werd via MUG assays.

Uit de resultaten werden geen metaalspecifieke regulaties in de promotoractiviteit van de *LOX* genen waargenomen. De verschillen van de promotoractiviteiten bij de 6 LOX-GUS constructen waren niet robuust genoeg en er was geen blijvende inductie van de promotoractiviteit waar te nemen. Aangezien men in de toekomst wil kijken naar de invloed van oxylipines in de ontwikkeling van de wortels, werd tijdens deze studie de promotor van LOX1, LOX3 en LOX5 gekloneerd in een expressievector met het luciferase (*LUC*) reporter gen. Hierin werkt de histochemische kleuring niet-destructief in op de plant, waardoor in de tijd meerdere kleuringen op dezelfde plant kunnen worden uitgevoerd. Bovendien is het LUC proteïne minder stabiel en vertoont het sterkere veranderingen na wijziging van de promotoractiviteit. Hierdoor worden veranderingen in promotoractiviteit beter gedetecteerd.

## **1 Inleiding**

De verspreiding van zware metalen in de biosfeer is uitgegroeid tot een belangrijk proces in de geochemische cyclus van deze metalen. Zware metalen, zoals cadmium, koper en zink, zijn in hoge mate in de omgeving verspreid geworden door industriële en agrarische activiteit, waardoor ze belangrijke milieuverontreinigde stoffen zijn [1]. De gecontamineerde gebieden in België zijn ondermeer de Maasvallei bij Luik, Noord-Limburg en de Antwerpse Kempen. Deze gebieden hebben een ernstige Cd/Zn-verontreiniging ten gevolge van vroegere activiteit van Zn-smelters. Zelfs grotere gebieden zijn matig verontreinigd met zware metalen als gevolg van verspreiding van de contaminatie bijvoorbeeld door winderosie. Eind vorige eeuw werden deze fabrieken verplicht om over te schakelen op milieuvriendelijkere productieprocessen, waardoor de uitstoot van zware metalen daalde. In veel regio's is de historische verontreiniging echter nog steeds een probleem. Ook blijft in ontwikkelingslanden de vervuiling voortgaan [2,3,4]. Door het overschrijden van de natuurlijke emissies kunnen zware metalen ernstige problemen veroorzaken voor alle organismen. Zware metalen in de bodem kunnen accumuleren in de gewassen die erop geproduceerd worden, wat nadelige gevolgen heeft voor de kwaliteit van de voeder- of voedselgewassen en de gezondheid van de gebruikers in de voedselketen. Naast inhalatie via vervuilde lucht is de opname van zware metalen via de voedselketen de belangrijkste route van blootstelling in de menselijke populatie. Van hieruit stapelen de metalen zich op in het lichaam en kunnen zo hun schadelijke effecten uitvoeren via verstoring van verschillende fysiologische processen. Dit kan leiden tot ernstige gezondheidsproblemen, die afhankelijk zijn van onder andere de eigenschappen van het zwaar metaal, de dosis, de voeding, de leeftijd en de levenswijze [1].

### **1.1 Effecten van zware metalen op de mens**

Cadmium, koper en zink behoren tot de groep van zware metalen en hebben nadelige invloeden op fysiologische en biologische processen. Cadmium (Cd) wordt voornamelijk gebruikt in oplaadbare batterijen en voor de productie van speciale legeringen (samensmelten van verschillende metalen). Bovendien is Cd aanwezig in sigarettenrook en in uitlaatgassen. Cd is vooral toxisch voor de nieren, met name de proximale tubulaire cellen, de belangrijkste plaats voor accumulatie. Bovendien leidt Cd tot demineralisatie van het bot en kan overmatige blootstelling aan Cd de longfunctie aantasten en het risico op longkanker doen stijgen [5]. Koper en zink zijn, in tegenstelling tot Cd, essentiële micronutriënten die nodig zijn voor groei en ontwikkeling van organismen. Koper (Cu) kan een geoxideerde en een gereduceerde vorm aannemen, wat bijdraagt tot zijn rol als katalytische cofactor voor metalloenzymen betrokken bij verschillende biochemische processen. Een tekort aan Cu kan onder andere resulteren in aangetaste energieproductie, een abnormaal glucose en cholesterol



metabolisme, een verhoogde oxidatieve schade en een gewijzigde structuur en functie van circulerend bloed en immuuncellen [6,7]. Hoewel Cu van essentieel belang is, kan het ook toxisch zijn indien het overmatig aanwezig is. Gecontamineerd voedsel of drinkwater en koperbevattende voedingssupplementen zijn de hoofdbronnen van blootstelling aan Cu. Blootstelling aan zeer hoge hoeveelheden Cu kan leiden tot darmklachten en leveraandoeningen. Zink (Zn) heeft een functie in de genexpressie, groei en het immuunsysteem. Bij mensen blootgesteld aan hoge hoeveelheden Zn, via inhalatie van dampen en metaalstof, worden effecten op de longen waargenomen. Opname van hoge hoeveelheden zinkverbindingen, via medicijnen/supplementen of via gecontamineerd water, veroorzaakt maag- en darmklachten; en blootstelling op lange termijn leidt tot bloedarmoede, onderdrukking van het immuunsysteem en schade aan de alvleesklier. In de wetenschappelijke literatuur zijn er geen aanwijzingen dat hoge hoeveelheden Cu en Zn in de bodem leiden tot rechtstreekse gezondheidsschade voor de mens. Milieuverontreiniging met Cu en Zn zijn voornamelijk nadelig voor planten [6,8].

## **1.2 Effecten van verhoogde concentraties zware metalen in planten**

Accumulatie van zware metalen in planten verstoort fysiologische processen die noodzakelijk zijn voor het normaal functioneren. De reactie van de plant is een complex netwerk van parallelle en/of opeenvolgende gebeurtenissen waartoe snelle fysiologische en trage morfologische processen behoren. Op morfologisch vlak leidt metaalstress tot een zichtbaar gereduceerde plantengroei [9,10,11]. Dit is gedeeltelijk te wijten aan de onderdrukking van celverlenging, vooral in de stengel, als gevolg van een onomkeerbare inhibitie uitgeoefend door Cd op de protonpomp die verantwoordelijk is voor dit proces [12].

Op fysiologisch niveau vindt er een gereduceerde productie van fotosynthetische pigmenten plaats, en wordt fotosynthese geïnhibeerd op verschillende niveaus: CO<sub>2</sub>-fixatie, inhibitie van het openen van de stomata, chlorofylsynthese, elektrontransport en verminderde activiteit van de enzymen van de Calvin cyclus [13]. Bovendien ontstaan er symptomen zoals chlorose en necrose [9,10]. Verder, zowel bij mens als plant, zorgen zware metalen in biomoleculen voor blokkering van bepaalde essentiële groepen en het vervangen van essentiële metaalionen. Bijvoorbeeld, enzymen die een cysteïne aminozuur bevatten waaraan het zwavelatoom nodig is voor zijn functie, worden geïnhibeerd omdat toxische metalen een hoge affiniteit hebben voor zwavel en zich vastbinden aan het essentiële cysteïne. Een ander voorbeeld is dat zware metalen essentiële kationische cofactoren zoals ijzer, mangaan en magnesium vervangen in proteïnen, wat leidt tot het verlies van de functie.

Cadmium verstoort een aantal fysiologische processen: zoals fotosynthese, transpiratie en stomatale sluiting [9]. Cadmium zorgt bijvoorbeeld voor de inhibitie van Fe(III)-reductase in de wortel, wat leidt tot Fe(II)-deficiëntie, een ernstig gevolg voor de fotosynthese. Het is algemeen aanvaard dat laagpotentiële elektrondonors, zoals Fe(II), de belangrijkste brandstoffen zijn voor de primaire productie van fotosynthese. Omdat Fe(II) een tussentijds redoxpotentiaal heeft, in vergelijking met andere elektrondonors gebruikt in de fotosynthese, wordt er gesuggereerd dat Fe(II)-fototrofie een overgangsvorm vertegenwoordigt van fotosynthetisch metabolisme. Ook wordt de fotosynthese aangetast door verstoringen in chloroplastmetabolisme door het inhiberen van de chlorofylbiosynthese en de activiteit van de enzymen betrokken in CO<sub>2</sub>-fixatie [9,12]. Verder reduceert Cd de absorptie van nitraat en zijn transport van de wortels naar de stengel door inhibitie van de activiteit van het enzym nitraatreductase in de stengel [9,12]. Metaal toxiciteit kan de plasmamembraanactiviteit beïnvloeden door het induceren van lipidenperoxidatie. Hierdoor kan de permeabiliteit van het plasmamembraan worden aangetast, waardoor een reductie in waterinhoud veroorzaakt wordt [9,10]. Daarenboven wijzigt Cd de opname van mineralen zoals calcium, kalium, ijzer en fosfaat door de biobeschikbaarheid van deze nutriënten te beïnvloeden, doordat Cd-ionen in competitie gaan voor dezelfde transmembranaire carriers als deze nutriënten [9,14]. Ten slotte wordt bij blootstelling aan Cd chlorose veroorzaakt, het ontstaat door ijzerdeficiëntie, fosfaatdeficiëntie of door een verminderde mangaantransport.

In regulatieproteïnen is Cu een structureel element en neemt daarom deel aan verschillende processen zoals fotosynthetische elektrontransport, mitochondriale respiratie, oxidatieve stressresponsen, celwandmetabolisme en hormoonsignalisatie [10]. Hierdoor is in de blaadjes onder Cu-stress een lager gehalte aan chlorofyl en wijzigingen aan de chloroplaststructuur terug te vinden. Bovendien wordt er verondersteld dat Cu interfereert met de biosynthese van het fotosynthetische systeem. Verder doen lipidenperoxidaties het gehalte aan lipiden dalen en brengen ze veranderingen aan in vetzuurcompositie van thylakoïde membranen [10,15].

Zn speelt een belangrijke rol in diverse metabolische processen van planten; het activeert enzymen en is onder andere betrokken bij de proteïnesynthese en het metabolisme van koolhydraten, nucleïnezuren en lipiden. Net als andere zware metalen veroorzaakt Zn veranderingen in vitale groeiprocessen zoals fotosynthese. Bovendien verstoort het de chlorofylbiosynthese en membraanintegriteit [11].

Om zichzelf te beschermen tegen zware metalen, beschikt een plantencel over een aantal verdedigingsmechanismen: (1) immobilisatie van het zware metaal aan de celwand; (2)

Metaalsekwestratie in minder gevoelige subcellulaire compartimenten, zoals de celwand en de vacuole; (3) secretie; (4) synthese van stress proteïnen; (4) een mechanisme waarbij het metaal-ion het cytosol van de cel intreedt, waar het onmiddellijk gecomplexeed en geïnactiveerd wordt. Dit proces is gemedieerd door fytochelatines, een benaming voor klasse III metallothioneïnen (MT). Het zijn metaalbindende peptiden gevonden in vele eukaryotische organismen. MTs zijn cys-rijke metaalchelator proteïnen die een belangrijke rol spelen in metaalhomeostase. Hoewel deze mechanismen nog niet volledig bekend zijn, wijzen recente onderzoeken naar een rol voor metaalchelatoren zoals MTs in  $\text{Cu}^{2+}$ -complexatie. [11,12,14,15].

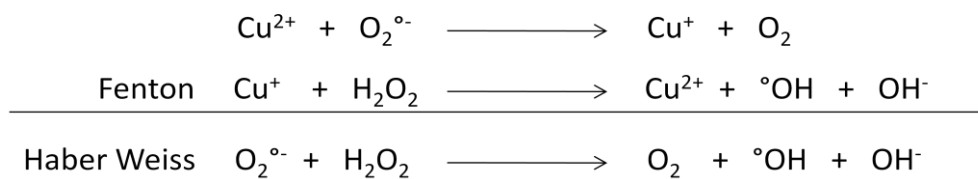
### **1.3 Oxidatieve stress**

Zoals een aantal andere biotische en abiotische stresscondities veroorzaken ook zware metalen oxidatieve stress in planten [13,16,17]. Bij oxidatieve stress is er een verstoring van de cellulaire redoxstatus. Tijdens dit proces worden reactieve zuurstofvormen (ROS) gevormd die het evenwicht naar de pro-oxidatieve zijde verstoren, maar plantcellen bevatten een goed uitgerust antioxidatief verdedigingssysteem om het redoxevenwicht te behouden. De productie van ROS is een gevolg van de opname van energie of een elektron door een zuurstofmolecule dat converteert naar een superoxide ( $\text{O}_2^\ominus$ ), een waterstofperoxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) of een hydroxylradicaal ( $\text{OH}^\ominus$ ). Organellen met een sterk oxiderend metabolische activiteit of met een intense snelheid van elektronenstroom, zoals chloroplasten en mitochondriën, zijn een belangrijke bron van ROS productie in plantcellen. De belangrijkste enzymatische bron is het NADPH oxidase in het plasmamembraan. Dit enzym katalyseert de reductie van  $\text{O}_2$  naar  $\text{O}_2^\ominus$  via een transmembranair elektronentransport [18]. ROS zijn schadelijk voor verschillende biologische componenten, namelijk lipiden, eiwitten en DNA. Lipidenperoxidatie leidt tot schade aan de celmembraan. Door oxidatie van proteïnen kunnen proteïnen hun structuur en functie verliezen, en oxidatie van DNA kan leiden tot mutaties [19]. Hoewel verhoogde niveaus van ROS cellulaire schade kunnen veroorzaken, zijn gecontroleerde niveaus van ROS vereist voor modulerende signalisatienetwerken die fysiologische processen en stressresponsen controleren [20].

Voordat er schade optreedt zal de cel proberen om de activiteit van het antioxidatief systeem te verhogen. Dit systeem bestaat uit zowel enzymatische als niet-enzymatische componenten die via specifieke reacties ROS zullen proberen te verwijderen. De superoxide dismutasen, de catalasen en de peroxidasen behoren alle drie tot de enzymatische antioxidanten. De superoxide dismutase enzymen (SOD) verwijderen  $\text{O}_2^\ominus$  met vorming van  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{O}_2$ . Er zijn drie soorten SOD's; MnSOD, CuZnSOD (CSD) en FeSOD. MnSOD bevindt zich in de mitochondriën, CSD-1 bevindt zich in de mitochondriale intermembranaire ruimte en in het cytosol van de cel, FeSOD en CSD-2 zitten in de

chloroplast, en CSD-3 in de peroxisomen [19,21,22]. Catalasen zetten  $H_2O_2$  om in  $H_2O$  en  $O_2$ . De catalasen zijn vooral aanwezig in de peroxisomen en in mindere mate in de mitochondriën en de chloroplasten. Peroxidasen verwijderen  $H_2O_2$  door een cosubstraat te oxideren, zoals glutathion of ascorbaat (vitamine C). De niet-enzymatische antioxidanten, ook wel antioxidatieve metabolieten genoemd, zijn componenten die geoxideerd worden door ROS zodat ROS geen andere moleculen kunnen beschadigen. Voorbeelden van deze antioxidanten zijn vitamine C, vitamine E, carotenoïden (pro-vitamine A) en glutathion [19,22].

Het is gekend dat transitie-metalen zoals Cu de vorming van hydroxylradicalen katalyseren via de niet-enzymatische chemische reactie tussen  $O_2^{\circ-}$  en  $H_2O_2$  (Haber-Weiss reactie) (zie figuur 1) [10]. In tegenstelling tot Cu, kan Cd niet rechtstreeks ROS produceren via Fenton en/of Haber Weiss reacties, maar kunnen Cd-ionen de activiteit van verschillende pro- en antioxidatieve enzymen beïnvloeden. In blaadjes, verhoogt Cd de lipoxygenase en NADPH oxidase activiteit [20] en vermindert het de activiteit van de volgende antioxidatieve enzymen: superoxide dismutase, catalase, ascorbaat peroxidase, glutathion reductase en dehydroascorbaat reductase [14].

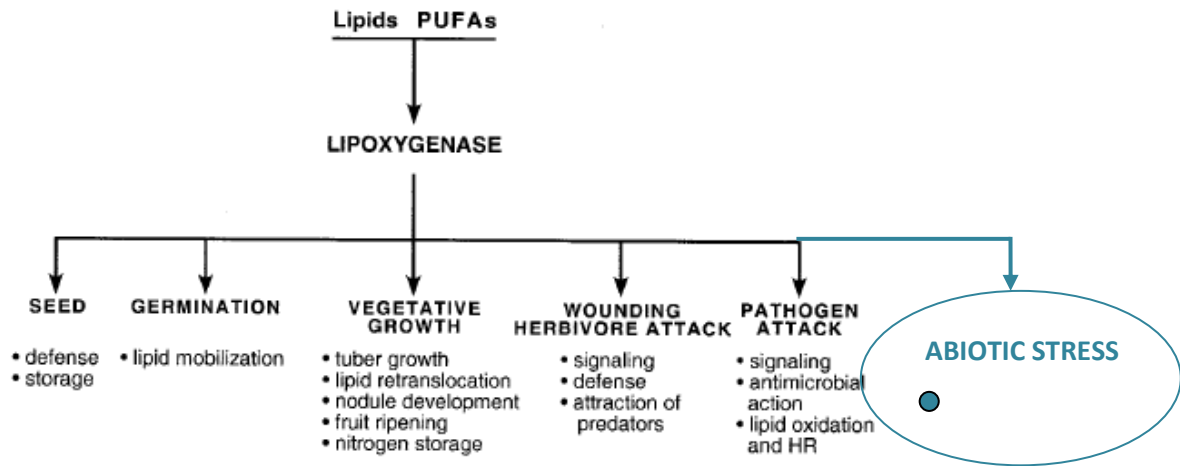


**Figuur 1:** De Haber Weiss reactie, bestaande uit de oxidatie van  $O_2^{\circ-}$  en de Fentonreactie.

#### **1.4 Lipidenperoxidatie en - lipoxygenase**

Lipidenperoxidatie is een veel voorkomende metabolische reactie in alle biologische systemen. Het komt voor in ontwikkelingsprocessen en als reactie op abiotische en biotische stressfactoren (zie figuur 2). De vorming van geoxideerde (hydroperoxy) meervoudige onverzadigde vetzuren (poly unsaturated fatty acids, PUFA's) is één van de belangrijkste reacties in de modificatie van lipiden [23]. PUFA's beïnvloeden vele cellulaire en fysiologische processen in zowel planten als dieren. PUFA's en hun metabolieten hebben een verscheidenheid aan fysiologische functies, waaronder energievoorziening, membraanstructuur, celsignalisatie en regulatie van genexpressie. Bovendien zijn PUFA's essentiële componenten die vloeibaarheid, flexibiliteit en selectieve permeabiliteit geven aan cellulaire membranen. Membraanfosfolipiden zijn bijzonder gevoelig voor oxidatie, niet alleen vanwege hun hoge concentratie aan PUFA's, maar ook omwille van hun associatie in de

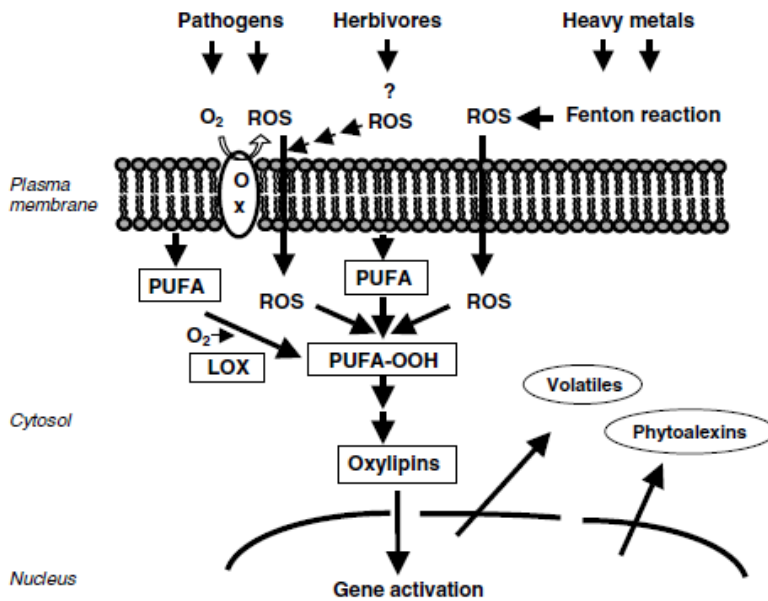
celmembraan met niet-enzymatische en enzymatische systemen die geschikt zijn voor het genereren van pro-oxidatieve vrije radicalen. Het is algemeen aanvaard dat de gevoeligheid toeneemt als een machtsfunctie van het aantal dubbele bindingen per vetzuurmolecule [24].



**Figuur 2:** Lipoxygenasen hebben actieve functies in verschillende processen tijdens het leven van een plant [27]. Wij onderzoeken hun betrokkenheid in zware metaalstress.

Er zijn twee grote uitkomsten van lipidenperoxidatie: structurele schade aan membranen en generatie van secundaire producten [24]. Producten afgeleid van lipidenperoxidatieprocessen worden collectief oxylipines genoemd. De initiële vorming van hydroperoxides kan ofwel gebeuren door middel van chemische oxidatie of door de werking van enzymen [23,25] (zie figuur 3).

Membraanschade vloeit voort uit de generatie van gefragmenteerde vetzuurketens, lipide-lipide crosslinks, lipide-eiwit crosslinks en endocyclisatie die op hun beurt fytoprostanen produceren. Wanneer deze processen combineren, produceren ze veranderingen in de biofysische eigenschappen van membranen die diepgaande gevolgen hebben voor de activiteit van membraangebonden eiwitten. Fytoprostanen zijn prostaglandine/jasmonaat-achtige producten van niet-enzymatische lipidenperoxidatie die niet alleen voorkomen bij gezonde planten, maar ook verhogen in reactie op oxidatieve stress. Fytoprostanen worden gevormd uit een biochemisch mechanisme van  $\alpha$ -linoleenzuur gekatalyseerd door een vrij radicaal, waaronder B1-fytoprostanen chemisch stabiele eindproducten zijn van de lipidenperoxidatie [26].



**Figuur 3:** Een model voor biotische en zware metaal behandeling, waarbij de biosynthese van secundaire metabolieten betrokken zijn [28].

Enzymatische lipidenperoxidatie wordt voornamelijk gekatalyseerd door lipoxygenase enzymen (LOXen). In het afgelopen decennium is er een opmerkelijke toename van het inzicht in de betrokkenheid van de LOX reacties en hun fysiologische betekenis [23,25]. De diversiteit van LOXen stellen de plant in staat om nieuwe functionaliteiten te introduceren in deze belangrijke biomoleculen [23,25,28]. Lipoxygenasen bestaan uit een familie van enzymen die vrije en veresterde meervoudig onverzadigde vetzuren oxideren naar de overeenkomstige hydroperoxy derivaten. De belangrijkste substraten voor LOXen zijn linolzuur (C18:2) en linoleenzuur (C18:3) die gekatalyseerd worden naar 9- of 13-hydroxyperoxides [28]. LOX is belangrijk en heeft een aantal specifieke functies in de ontwikkeling van de plant [27]. LOXen zijn betrokken bij de vegetatieve groei, zijn aanwezig in rijpe en kiemende zaden, en worden gebruikt als een vegetatief opslageiwit. Verschillende lipoxygenasen produceren oxylipines met een andere functionaliteit in verschillende signaaltransductiewegen. Bijvoorbeeld jasmonaten en hun biosynthetische C18 precursoren, octadecanoïden, waren de eerste oxylipines met een toegewezen functie in signaaltransductie [25]. Verschillende octadecanoïden verschillen duidelijk in hun capaciteiten om de reactie van planten te beïnvloeden [25].

### **1.5 Opzet en doel van het project**

LOXen hebben een rol in de fysiologische processen van de ontwikkeling van de plant, zoals bijvoorbeeld groei en vruchtbaarheid. Voor het evalueren van de functionele rol van oxylipines tijdens de ontwikkeling van de zijwortels, werd in een voorgaande studie [29] de activiteit van promotors van de zes *LOX* genen in *Arabidopsis thaliana* bestudeerd door middel van  $\beta$ -

glucuronidase (GUS) constructen (zie verder). Deze analyse onthulde de expressie van LOX1, LOX2, LOX3 en LOX4 in de bladeren van transgene zaailingen en LOX1, LOX3 en LOX5 in de wortels, terwijl er geen LOX6 promotoractiviteit werd waargenomen. Het patroon van de promotoractiviteit is in overeenstemming met een rol van LOX1, LOX3 en LOX5 in het ontwikkelingsproces van de vorming van zijwortels. Gebaseerd op hun vermeende aminozuursequenties, worden LOX1 en LOX5 voorgesteld als 9-LOXen, terwijl LOX3 waarschijnlijk een 13-LOX isovorm is. Deze resultaten suggereren een rol van beide 9-LOX-en 13-LOX-gegenereerde oxylipines in de ontwikkeling van laterale wortels [29].

Verder heeft een voorgaande studie [20] metaalspecifieke en algemene reacties van de expressie van de lipoxygenase genen bepaald in de bladeren en wortels van 25 dagen oude *Arabidopsis thaliana* kiemplanten, die werden blootgesteld voor 24 uur aan 5  $\mu\text{M}$   $\text{CdSO}_4$  of 2  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ . De metaalspecifieke patronen van *LOX* genexpressie zouden metaalspecifieke veranderingen in oxylipine signalisatie tot gevolg kunnen hebben, waardoor een verandering optreedt in de downstream responsen zoals bijvoorbeeld in de wortelgroei of de antioxidatieve signalisatie. Planten geïncubeerd met verschillende metalen, vertonen inderdaad verschillende morfologische reacties in de wortels [T.Remans, niet gepubliceerd].

Vermits er in de veranderingen van het steady-state mRNA niveau van de *LOX* genen metaalspecifieke patronen konden gevonden worden [20], zal er in deze studie bepaald worden of ook in de promotoractiviteiten van de *LOX* genen deze metaalspecifieke patronen kunnen worden teruggevonden. In de toekomst zal deze kennis dan gebruikt worden voor het bepalen van metaalspecifieke transcriptiefactoren. Om metaalspecifieke regulaties te ontdekken wordt een vergelijking gemaakt tussen drie metalen: Cd, Cu en Zn. De drie metalen hebben verschillende biologische eigenschappen. Koper en zink zijn beide essentiële metalen, terwijl cadmium dat niet is. Verder is koper redoxactief, terwijl cadmium en zink dat niet zijn.

In dit project worden zes transgene LOX-GUS lijnen gebruikt waarin de promotors gekoppeld werden aan een *GUS* reporter gen [29]. In het eerste experiment wordt een analyse van de promotoractiviteit gedaan wanneer planten blootgesteld worden aan cadmium, koper en zink voor 0u, 6u, 24u, 30u en 96u/120u. In het tweede deel van het onderzoek worden de promotors van LOX1, LOX3 en LOX5 gekloneerd in een expressievector met het luciferase reporter gen voor verdere studie van de ontwikkeling van de wortels.

## 2 Materiaal en methoden

### 2.1 Meten van de promotoractiviteit in de transgene LOX-GUS lijnen

#### **2.1.1 Plantmateriaal**

In dit project werd gewerkt met de plant *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis* is een populair modelorganisme in plantenbiologie en -genetica. Het genoom van *Arabidopsis* is één van de kleinste plantgenomen en het was de eerste plant waarvan de genoomsequentie volledig bepaald werd. De kleine grootte maakt deze plant geschikt voor in vitro cultuur in dit onderzoek. *A. thaliana* wildtype planten van het ecotype Columbia werden verkregen van Lehle zaadjes (Round Rock, TX, USA). Zes transgene lijnen bevattende de transcriptionele fusies tussen de zes LOX-promotorsequenties en het *GUS* reporter gen werden verkregen van Carmen Castresana [29].

#### **2.1.2 Plantcultuur op agarplaten**

*Arabidopsis thaliana* planten werden gekweekt op verticale agarplaten. Groeimeidium werd bereid aan de hand van stockoplossingen van macronutriënten, micronutriënten en ijzer (zie bijlage 1). Dit groeimeidium is gebaseerd op Gamborg's B5 medium [30], met een 50-maal verdunning en een aangepaste Cu-concentratie. Na bereiding van het groeimeidium werd het geautoclaveerd en bewaard op 60°C. Agarplaten werden onder steriele omstandigheden gemaakt door 40 ml groeimeidium in een 12x12cm steriele polystyreenplaat (Greiner, 688102) te gieten en ze na stollen 15 min geopend aan de luchtstroom in een laminaire flowkast te laten drogen.

De *Arabidopsis* zaadjes werden onder een laminaire flowkast gesteriliseerd in een 90 mm filterpapiertje (Whatman, 1542090) dat in een kegelvorm gevouwen werd. Het filtertje met zaadjes werd dicht geplooid en gefixeerd met een paperclip. Vervolgens werd het filtertje 1 minuut in een maatbeker met 0.1% NaOCl-oplossing (1 ml 10-13% javel + 90 ml dH<sub>2</sub>O + 1 druppel Tween) gelegd, daarna vier keer gespoeld met steriel dH<sub>2</sub>O en verder werd het vier keer gedurende vijf minuten in 150 ml steriel dH<sub>2</sub>O gelegd. Als laatste werd het filtertje op een Petri schaalteje opengevouwen en de zaadjes uitgespreid zodat de zaadjes konden drogen (onder de laminaire flowkast).

De agarplaten werden onder steriele omstandigheden gezaaid met 20 zaadjes per plaat met behulp van een steriele tandenstoker. De gezaaide platen werden gedurende drie dagen bewaard in het donker bij 4°C (imbibitie). Vervolgens werden de gezaaide platen verticaal in een klimaatkast geplaatst met een fotosynthetische fotonfluxdichtheid van 160-200 µmol per m<sup>2</sup> per seconde gedurende 12u/24u; 22°C/18°C dag/nachttemperatuur en een constante luchtvochtigheid van 65%.



### **2.1.3 Range-finding experiment**

Op 24 platen werden elk 20 Col-0 plantjes gezaaid. Na één week werd een homogene set van plantjes overgezet op agarplaten zonder sucrose aan 7 plantjes per plaat. Na één week groei werden ze blootgesteld aan verschillende concentraties Cd, Cu en Zn. Dit gebeurde door de wortels te overleggen met in vloeibaar medium gedrenkt filterpapier (10x10,5 cm). Het vloeibaar medium had dezelfde aangepaste B5/50 samenstelling als het vaste medium, zonder sucrose en agar. Deze methode van blootstelling werd in alle volgende experimenten toegepast. Telkens zeven platen per behandeling werden blootgesteld aan 20, 25, 30, 40, 50, 75 en 100  $\mu\text{M}$   $\text{CdSO}_4$ ; 20, 25, 30, 40, 50, 75 en 100  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ ; en 200, 250, 300, 400, 500, 750 en 1000  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ . De overige 3 platen werden als controle gebruikt. De lengte van de primaire wortel werd aangeduid vooraleer men de planten blootstelde, alsook na 96u blootstelling. De verticale agarplaten werden ingescand en de primaire wortelgroei na blootstelling werd bepaald met behulp van de Optimas beeldanalyse software (Optimas corporation, versie 6.1). Hierna werd gekeken welke concentraties zorgden voor 50% wortelgroei-inhibitie.

### **2.1.4 Blootstelling en opvolging wortelgroei**

Per LOX-GUS construct werden 80 platen gezaaid met elk 20 transgene *Arabidopsis* plantjes. Na een week groeien in de klimaatkast werd een homogene set van plantjes overgezet op agarplaten zonder sucrose aan vijf plantjes per plaat. Zeven dagen na het overzetten werden de plantjes afhankelijk van het experiment blootgesteld aan 15 of 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdSO}_4$ , 10 of 50  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  en 250, 400 of 500  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , of vloeibaar medium zonder toevoegende metalen. Bovendien werden de planten voor verschillende tijdstippen blootgesteld, namelijk 0u, 6u, 24u, 30u en 96u/120u. Er waren vier herhalingen per conditie per tijdstip. Na 0u, 6u, 24u, 30u en 96u/120u werden de planten geoogst in genummerde 2 ml buisjes met stalen bolletjes erin en werden ze onmiddellijk in vloeibare stikstof gedaan. De stalen werden op  $-70^\circ\text{C}$  bewaard en werden gebruikt voor het meten van de GUS activiteit. Ook werd de wortelgroei na 96u of 120u blootstelling bepaald zoals in het range-finding experiment beschreven.

### **2.1.5 Kwantificatie van GUS activiteit**

Metingen van GUS activiteit volgens Jefferson et al. (1987) [31] werden aangepast en geoptimaliseerd voor toepassing op de metaalbehandelde LOX-GUS lijnen (zie bijlage 2). Voor het meten van de promotoractiviteit werd proteïne geëxtraheerd van 80 blad- of wortelstalen. Eerst werden de stalen vermalen met de Retsch Mixer Mill, 2 min met amplitude 70. De stalen en de schudadaptors werden vooraf gekoeld door het vooraf in de vloeibare stikstof te leggen. Hierna werd 350  $\mu\text{l}$  extractiebuffer toegevoegd (10 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 50 mM Na-P buffer (pH 7), 0.1% sodium lauryl

sarcosine, 0.025% Triton X-100 en 0.07%  $\beta$ -mercaptoethanol) en de stalen steeds op ijs bewaard. Na 5 min centrifugeren op 13000 rpm en 4°C bracht men het supernatans over in een nieuw epje. Hiervan werd de proteïneconcentratie gemeten in een doorschijnende 96-well plaat. In de eerste twee kolommen werd een bovine serum albumine (BSA) standaardreeks, gemaakt in extractiebuffer, gepipetteerd (zie tabel 4 en 5). In kolom 1 werden de lage BSA concentraties, van 0  $\mu\text{g/ml}$  tot 250  $\mu\text{g/ml}$ , gepipetteerd en in kolom 2 de hoge BSA concentraties, van 200  $\mu\text{g/ml}$  tot 2000  $\mu\text{g/ml}$ . In de overige 80 welletjes pipetteerde men 10  $\mu\text{l}$  van het proteïne-extract van elk staal. Voor het kwantificeren van de proteïnen gebruikte men de kleurreagens Biorad protein assay (BioRad, 500-0006), welke compatibel is met de extractiebuffer. De proteïneconcentraties werden gemeten op een absorptiegolflengte van 595 nm (Fluostar Omega, BMG Labtech). Vervolgens werd één concentratie gekozen waarnaar alle stalen verdund werden met extractiebuffer.

**Tabel 4: Lage BSA standaardreeks**

$\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$ BSA	EB
250	500 $\mu\text{l}$	500 $\mu\text{l}$
200	400 $\mu\text{l}$	600 $\mu\text{l}$
150	300 $\mu\text{l}$	700 $\mu\text{l}$
100	200 $\mu\text{l}$	800 $\mu\text{l}$
50	100 $\mu\text{l}$	900 $\mu\text{l}$
25	50 $\mu\text{l}$	950 $\mu\text{l}$
0	0 $\mu\text{l}$	1000 $\mu\text{l}$

**Tabel 5: Hoge BSA standaardreeks**

$\mu\text{g/ml}$	10 mg/ml BSA	EB
2000	200 $\mu\text{l}$	800 $\mu\text{l}$
1500	150 $\mu\text{l}$	850 $\mu\text{l}$
1000	100 $\mu\text{l}$	900 $\mu\text{l}$
800	80 $\mu\text{l}$	920 $\mu\text{l}$
600	60 $\mu\text{l}$	940 $\mu\text{l}$
400	40 $\mu\text{l}$	960 $\mu\text{l}$
200	20 $\mu\text{l}$	980 $\mu\text{l}$
0	0 $\mu\text{l}$	1000 $\mu\text{l}$

Voor de MUG assay werd gebruik gemaakt van vier zwarte microplaten. In kolom 1 en 2 werd een verdunningsreeks van MU, gemaakt in extractiebuffer, gepipetteerd; 200, 150, 100, 50, 25, 10, 5 en 0  $\mu\text{M}$ . In de rest van de welletjes werd proteïne-extract in 4-voud (4 replicates) toegediend (voorbeeld staal 1 in welletjes A3, B3, C3 en D3; staal 2 in welletjes E4, F4, G4 en H4) (zie bijlage 2). Vervolgens werd in elke kolom assaybuffer toegevoegd, wat bestaat uit 4 mM MUG, 20% methanol en extractiebuffer. Na het toevoegen van de assaybuffer, werd onmiddellijk stopbuffer toegediend aan de microplaat in kolom 1 en 2. Vervolgens werd er stopbuffer toegediend aan het 1<sup>ste</sup> replicate na 0 min, aan het 2<sup>de</sup> replicate na 15 min, aan het 3<sup>de</sup> replicate na 30 min en aan het 4<sup>de</sup> replicate na 45 min voor de bladstalen en voor de wortelstalen respectievelijk na 0, 30, 60 en 90 min. Naast het kinetisch aspect zorgt deze alkalische buffer er ook voor dat MU een hogere fluorescentie heeft. Ten slotte werden de platen gelezen (Fluostar Omega) bij een excitatie van 355 nm en een emissie van 460 nm. Na het bereken van de standaardcurve werden de fluorescentiewaarden weergegeven in nmol MU. Hierna berekende men in Excel de slope van de 4 replicates van elk staal en corrigeerde men voor de proteïne inhoud om de activiteit uit te drukken in nmol MU/min/mg proteïne.

### **2.1.6 Verificatie-experiment**

Uit het voorgaande experiment, waarbij de 6 LOX-GUS constructen werden opgekweekt en de GUS activiteit werd gemeten, werden vier interessante punten geselecteerd waarbij metaalspecifieke stijgingen te zien waren tussen de behandelingen binnen een bepaald tijdstip. De vier interessante punten werden respectievelijk waargenomen bij LOX4-GUS blaadjes na 6u, LOX3-GUS blaadjes na 24u, LOX5-GUS blaadjes na 96u en bij LOX4-GUS wortels na 96u. Om deze punten te verifiëren werden 16 platen met LOX3-GUS plantjes gezaaid, 16 platen met LOX5-GUS plantjes en 32 platen met LOX4-GUS plantjes. Na een week groeien in de klimaatkast werd een homogene set van plantjes overgezet op agarplaten zonder sucrose aan vijf plantjes per plaat. Zeven dagen na het overzetten werden de plantjes blootgesteld aan 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdSO}_4$ , 50  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  en 500  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , of aan een controlebehandeling. Zestien platen van de LOX4-GUS planten werden 6u blootgesteld, terwijl de overige 16 platen 96u werden blootgesteld. Bovendien werden de LOX3-GUS planten 24u en de LOX5-GUS planten 96u blootgesteld. Ook hier waren vier herhalingen per conditie per tijdstip. Na 6u werden de blaadjes van de LOX4-GUS planten geoogst, na 24u de blaadjes van de LOX3-GUS planten en na 96u de blaadjes van de LOX5-GUS planten en de wortels van de LOX4-GUS planten. Ook deze stalen werden op  $-70^\circ\text{C}$  bewaard. De primaire wortelgroei van de 96u planten werd bepaald zoals in het range-finding experiment beschreven en de analyse voor GUS activiteit was identiek aan de hierboven beschreven methode.

### **2.1.7 Histochemische kleuring**

Een X-gluc oplossing (5-bromo-4chloro-3indolyl- $\beta$ -D-glucoronide) diende voor het zichtbaar maken van de GUS activiteit door het blauwkleuren van de blaadjes/wortels waar GUS tot expressie komt. In een maatcilinder van 100 ml werd 40 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  gebracht. Hierbij werd 1 g ascorbine zuur, 0.1 g CHAPS en 0.1 g X-gluc opgelost in 2 ml DMSO aan toegevoegd. Vervolgens werd een hoeveelheid  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  en een andere hoeveelheid  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  toegediend voor een finale concentratie van 100 mM Na-P buffer. De pH-waarde werd op 7.0 gebracht door druppelsgewijs NaOH toe te voegen. Hierna werd het aangelengd tot 100 ml en bewaard in buisjes van 50 ml op  $-20^\circ\text{C}$ .

Wanneer de planten geoogst werden, liet men één plantje per plaat staan voor het uitvoeren van de X-gluc kleuring. De blaadjes en wortels werden in een plaat met welletjes gelegd waaraan 500  $\mu\text{l}$  X-gluc oplossing (voorverwarmd op  $37^\circ\text{C}$ ) werd toegevoegd. Na overnachting op  $37^\circ\text{C}$  werd de X-gluc oplossing eruit gepipetteerd en werd er 500  $\mu\text{l}$  70% ethanol aan toegevoegd zodat, na een incubatietijd van een halve dag, de kleuring duidelijker werd.

### 2.1.8 Statistische analyse

Om statistische verschillen aan te tonen tussen de verschillende behandelingen binnen één tijdstip werd eerst bepaald of de data normaal verdeeld waren en een gelijke variantie vertoonden (homoscedasticiteit). De normaliteit van de data werd getest met behulp van vier testen: Shapiro-Wilk test, Kolmogorov-Smirnov test, Cramer-von Mises test en Anderson-Darling test. De homoscedasticiteit werd gecontroleerd aan de hand van een plot van residuen ten opzichte van het groepsgemiddelde. Vervolgens werden de data geanalyseerd met de éénweg-ANOVA test met behulp van SAS 9.1. Deze toets werd gebruikt omdat het verschillen aangeeft tussen verschillende behandelingen binnen één tijdstip. Een Tukey-Kramer post-test werd gebruikt om de significante verschillen tussen de behandelingen te bepalen.

## 2.2 Kloneringen

### 2.2.1 LOX-promotor amplificatie

In het tweede deel van dit onderzoek werden de promotors van LOX1, LOX3 en LOX5 gekloneerd. De primers (zie tabel 6) voor deze promotors werden zo gekozen dat ze kunnen amplificeren tot een lengte van 1500 bp. Bovendien werd in de sequentie van de forward primer, de sequentie van restrictie-enzym BamH I (GGATCC) verwerkt en in de reverse primer de sequentie voor het restrictie-enzym Xho I (CTCGAG). De primers hadden een smelttemperatuur van ongeveer 60°C. De specificiteit van de primers werd getest via BLAST.

**Tabel 6:** De sequentie en smelttemperatuur van de forward en reverse primers voor LOX1, LOX3 en LOX5

Primer	Sequentie	Smelttemperatuur
LOX1-Forward	aaattgga <u>tcct</u> actaatgcaaaaaatttcgagac	57.6°C
LOX1-Reverse	tctcc <u>ctcgag</u> ctttttgggtga	59.7°C
LOX3-Forward	tatg <u>cgga</u> tccaagagattgtggttc	58.5°C
LOX3-Reverse	gctaact <u>cgag</u> cacgataatctaataaattacaattttg	57.6°C
LOX5-Forward	aagtagga <u>tcct</u> caactattgatgtgcaatc	57.6°C
LOX5-Reverse	gtgtg <u>ctcgag</u> ggcgatatattgcag	60.7°C

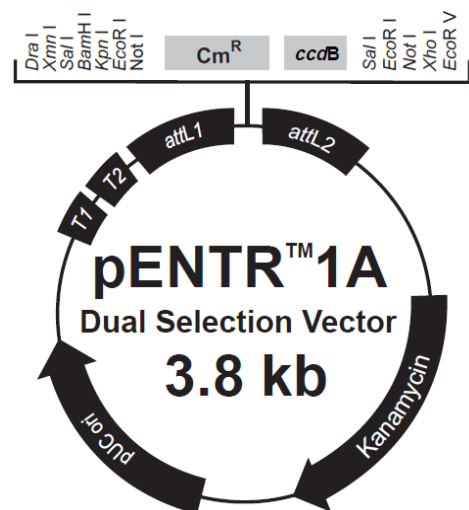
De promotorfragmenten werden geamplificeerd in drie verschillende reactiemixen bevattende: 2.5 U High Fidelity PCR enzyme mix (Fermentas), 1x bijhorende PCR buffer (bevattende 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>), 1 µM van de forward en 1 µM van de reverse primer, 200 nM van elk dNTP, en 3 µl van een verdunde oplossing genomisch DNA (~100 pg). Amplificatie startte met een initiële denaturatiestap van 2 min op 94°C; dan 30 cycli van 20 s denaturatie op 94°C, 30 s annealing op 58°C en 90 s elongatie op 72°C;

gevolgd door een finale elongatiestap van 10 min op 72°C, waarna de stalen op 4°C werden gehouden.

Na de PCR reactie werd een gelelektroforese uitgevoerd (zie bijlage 3) met behulp van 1x TAE buffer en een 1% agarosegel. Voor de DNA kleuring werd gelred (Biotium) gebruikt. Vijf µl DNA ladder (1 kb DNA ladder, Fermentas) werd aangebracht op de gel. Bij de stalen werd eerst 5 µl loading buffer toegevoegd vooraleer men ± 40 µl van elk staal aanbracht op de gel. Vervolgens liet men de gel lopen gedurende 60 min op 80 Volt. Geamplificeerde promotorfragmenten werden uit de gel gesneden voor opzuivering.

### 2.2.2 Klonering van de promotorfragmenten in de gateway entry vector pENTR1A

De kloneringvector pENTR1A (zie figuur 4) werd geknipt met BamH I en Xho I. Hiervoor werd in een PCR-buisje 32 µl RNase-vrij water toegevoegd, vervolgens 4 µl 10x fastdigest buffer (Fermentas), 2 µg (2 µl) pENTR1A vector en ten slotte 1 µl Xho I (fastdigest) en 1 µl BamH I (fastdigest). Deze mix werd 30 min op 37°C gehouden. Hierna werd de vector gedefosforyleerd met 1 µl Fast alkaline fosfatase (Fermentas). Na gelelektroforese werd een bandje met grootte 2.3 kb uit de gel gesneden.



Figuur 4: pENTR1A vector

Voor opzuivering van de promotorfragmenten uit agarosegel werd gebruik gemaakt van het NucleoSpin®Extract II gel-extraction protocol (Machery-Nagel) en werden de DNA fragmenten geëluëerd in 20 µl elutiebuffer. Deze opgezuiverde promotorfragmenten werden eveneens geknipt met BamH I en Xho I (fastdigest, Fermentas) in 7 µl RNase-vrij water, 3 µl 10x fastdigest buffer (Fermentas), 18 µl DNA promotorfragment, en 1 µl BamH I (fastdigest) en 1 µl Xho I (fastdigest). Vervolgens werd het 30 min op 37°C gehouden. Na digestie werden de promotorfragmenten opgezuiverd via het NucleoSpin®Extract II PCR clean-up protocol en geëluëerd in 20 µl elutiebuffer. Ze werden vervolgens geligeerd in de BamH I/Xho I geknipte pENTR1A vector: hiervoor werd 2 µl van het pENTR1A vector gebruikt waaraan 5 µl RNase-vrij water, 4 µl 10x ligatiebuffer, 8 µl promotorfragment en 1 µl Rapid DNA ligase (Fermentas) werd toegevoegd. Een negatieve ligatiecontrole bevatte 8 µl RNase-vrij water in plaats van een promotorfragment. Deze oplossing

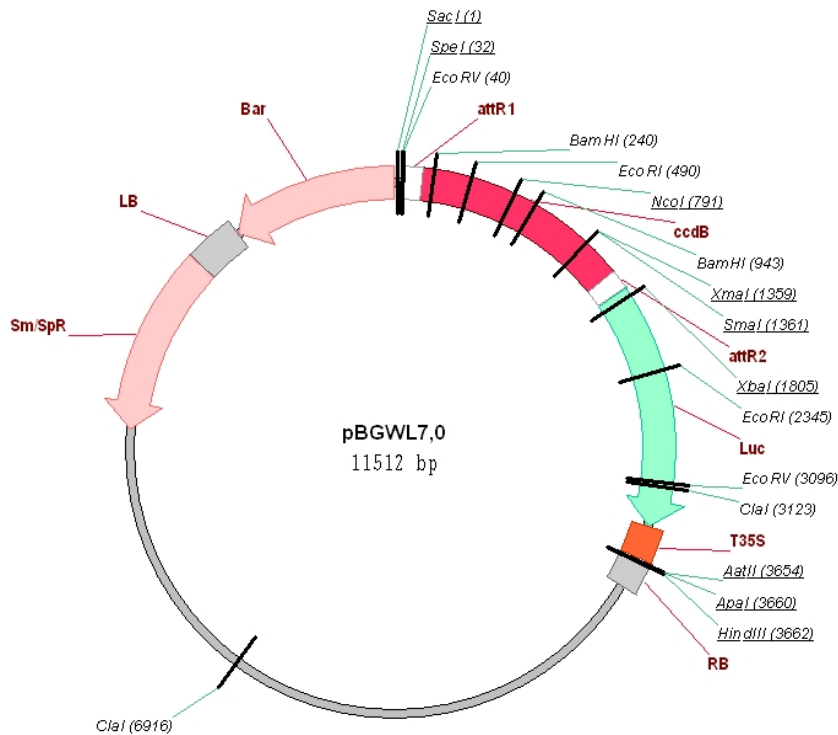
werd gevortexed, gecentrifugeerd en geïncubeerd gedurende 10 min op kamertemperatuur (zie bijlage 4).

Vervolgens werden *E. coli* DH5 $\alpha$  cellen (TOP10, invitrogen) getransformeerd met 5  $\mu$ l ligatiemix. Na incubatie van 20 min op ijs ondergingen de cellen een heat-shock voor 30 s in een 42°C waterbad. Hierna werden de cellen 2 min op ijs gezet. Als laatste werd er 250  $\mu$ l S.O.C. medium toegevoegd aan de cellen en werden de cellen geschud (stalen diagonaal in een rekje zetten) in een waterbad gedurende 45 min aan 150 rpm op 37°C.

De cellen werden uitgestreken op LB agar (10 g/l tryptone, 5 g/l yeast extract, 10 g/l NaCl, pH 7.0 en 15 g/l agar) met 100  $\mu$ g/ml kanamycine en overnacht geïncubeerd op 37°C. Kolonies werden geïnoculeerd in 5 ml vloeibaar LB medium met 100  $\mu$ g/ml kanamycine en overnacht geschud op 37°C. Plasmide werd geïsoleerd met de NucleoSpin®Plasmid kit (Machery-Nagel) en geëluëerd met 50  $\mu$ l elutiebuffer. De concentratie van het plasmide DNA werd gemeten met de nanodrop (Thermo Scientific). De pENTR1A-LOX vectoren werden geknipt met BamH I/Xho I om de aanwezigheid van het 1.5 kb promotorfragment te verifiëren. Hiervoor startte men met 10  $\mu$ l RNase-vrij water, waarbij 3  $\mu$ l 10x fastdigest buffer, 15  $\mu$ l plasmide DNA (~500 ng), en 1  $\mu$ l BamH I (fastdigest) en 1  $\mu$ l Xho I (fastdigest) werd toegevoegd. Verder werd het 30 min op 37°C geïncubeerd, waarna men een gelelektroforese uitvoerde.

### ***2.2.3 Transfer van de promotorfragmenten naar de expressievector***

*E. coli* bevattende de expressievector pBGWL7.0 (zie figuur 5) werd overnacht op 37°C opgegroeid in 5 ml vloeibaar LB medium met 50  $\mu$ g/ml streptomycine en het plasmide werd geïsoleerd met de NucleoSpin®Plasmid kit (Machery-Nagel). Voor recombinatie tussen de pENTR1A-LOX entry vector en pBGWL7.0 expressievector werd 4  $\mu$ l van het plasmide van de entry clone (pENTR1A-LOX) samengevoegd met 4  $\mu$ l destination vector (pBGWL7.0-LUC), waarbij 2  $\mu$ l LR clonase enzyme mix II (invitrogen, figuur 6 in bijlage 5) toegevoegd werd. Na een incubatie gedurende 1 uur op 25°C werd 1  $\mu$ l proteïne K toegevoegd om de reactie te stoppen en 10 min geïncubeerd op 37°C.



**Figuur 5:** pBGWL7.0 vector bevattende het referentiegen LUC.

JM107 E. coli cellen (Fermentas) werden getransformeerd met deze recombinatiemix. Daarvoor werden eerst de JM107 E. coli cellen (Fermentas) overnacht op 37°C in cultuur gebracht in 5 ml vloeibaar LB medium. Deze cultuur werd gebruikt in het bacterial transformation protocol (Fermentas): aan twee 2ml buisjes werd 1.5 ml c-medium toegevoegd en 10 min geïncubeerd op 37°C. Aan het c-medium werd 150 µl JM107 cellen toegevoegd en gedurende 20 min al schuddend in een waterbad op 37°C geïncubeerd. Na 1 min centrifugeren werd het supernatans verwijderd en de pellet opgelost in 300 µl T-oplossing en geïncubeerd gedurende 5 min op ijs. Na 1 min centrifugeren werd het supernatans opnieuw verwijderd en de pellet opgelost in 120 µl T-oplossing en 5 min geïncubeerd op ijs. Er werd 50 µl van deze cellen toegevoegd aan 4 µl DNA van pBGWL7.0-LOX3 en aan 4 µl DNA van pBGWL7.0-LOX5. Deze oplossingen werden goed gevortexed, waarna een incubatie volgde van 5 min op ijs. Er werd 50 µl van deze oplossingen uitgestreken op LB agar met 50 µg/ml streptomycine. Deze platen werden overnacht op 37°C gezet.

Kolonies werden geïnoculeerd in 5 ml vloeibaar LB medium met 50µg/ml streptomycine. Hierna werd een plasmide prep uitgevoerd met de NucleoSpin® Plasmid kit (Machery-Nagel). De DNA concentratie werd gemeten via de nanodrop, en de aanwezigheid van het 1.5 kb promotorfragment bevestigd door digestie met restrictie-enzymen BamH I en Xho I en een gelelektroforese.

## 3 Resultaten

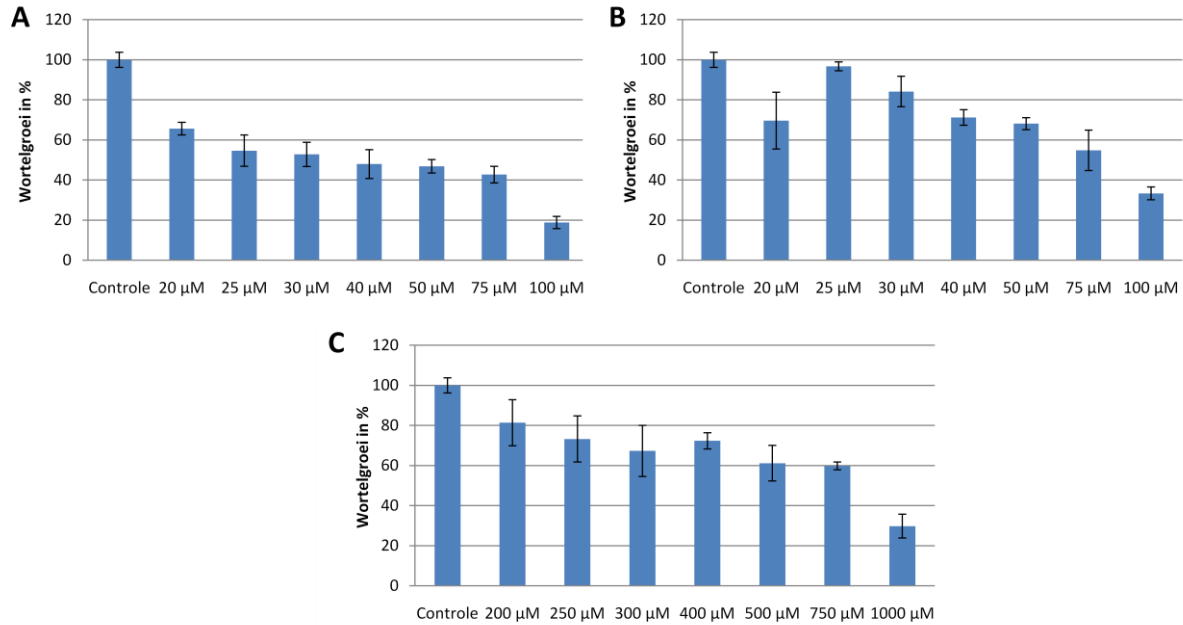
### 3.1 De gevoeligheid voor zware metalen van *Arabidopsis thaliana*

Voor het uitvoeren van het eerste deel van dit onderzoek, werd elke transgene LOX-GUS lijn apart bestudeerd. Na één week groei werd een homogene set van plantjes overgezet op agarplaten zonder sucrose aan vijf plantjes per plaat. Sucrose werd uit het medium gelaten zodat de plantjes zelf aan fotosynthese moeten doen om C te fixeren. De planten werden verdeeld in vier groepen, waarvan drie blootgesteld werden aan respectievelijk CdSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub> en ZnSO<sub>4</sub> en waarbij de laatste groep als controlegroep diende. Verder werd elke groep voor 0u, 6u, 24u, 30u en 96u/120u blootgesteld aan het metaal. De planten werden blootgesteld aan de metalen door de wortels te overdekken met in metaaloplossing gedrenkt filterpapier, aangezien de plantjes te groot waren om over te zetten.

#### **3.1.1 Resultaten van het range-finding experiment**

Uit voorgaande ervaring in de onderzoeksgroep werd verwacht dat ongeveer 50% wortelgroei-inhibitie veroorzaakt zou worden door 15 µM CdSO<sub>4</sub>, 10 µM CuSO<sub>4</sub> of 250 µM ZnSO<sub>4</sub>. Omdat de eerste experimenten echter niet de verwachte 50% wortelgroei-inhibitie vertoonden, werd er een range-finding experiment uitgevoerd. *Arabidopsis* Col-0 plantjes werden 96u blootgesteld aan verschillende concentraties van Cd, Cu en Zn. In figuur 7 is de reeks concentraties van de zware metalen weergegeven en is de primaire wortelgroei na blootstelling uitgedrukt in procent van de controle. De gekozen concentraties voor verdere experimenten waren 50 µM Cd (figuur 7A), 50 µM Cu (figuur 7B) en 400 µM Zn (figuur 7C). Voor 50% wortelgroei-inhibitie werden, uit ervaring, concentraties gekozen waarbij de wortelgroei-inhibitie ligt tussen de 25% en 75%. Alle opgezette kweken verschillen van elkaar en er mag zeker geen wortelgroei-inhibitie van meer dan 75% optreden aangezien de behandeling dan te toxisch wordt.

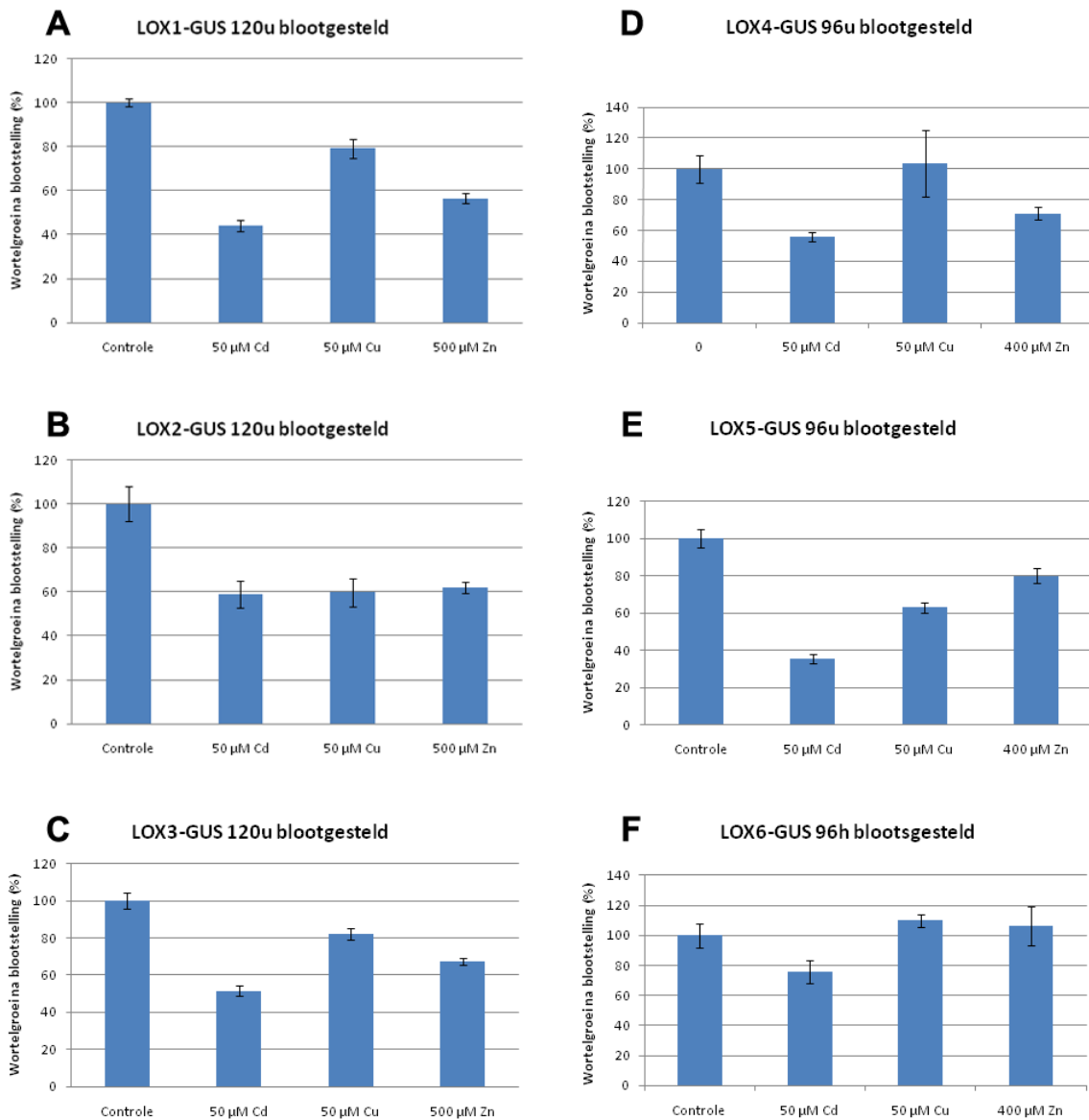




**Figuur 7:** Primaire wortelgroei na 96u blootstelling aan verschillende concentraties van Cd (A), Cu (B) en Zn (C). De wortelgroei is in procent weergegeven, waarbij controle 100% is.

### 3.1.2 Wortelgroei van de transgene *Arabidopsis* planten na blootstelling

Transgene *Arabidopsis* planten, LOX4-GUS, LOX5-GUS en LOX6-GUS, werden blootgesteld aan 50 µM CdSO<sub>4</sub>, 50 µM CuSO<sub>4</sub>, 400 µM ZnSO<sub>4</sub> of aan een controlebehandeling. De primaire wortelgroei werd bijgehouden om te controleren of er inderdaad ongeveer 50 % wortelgroei-inhibitie optrad na 96u blootstelling (zie figuur 8, D, E en F). Ook hier werd de primaire wortelgroei na blootstelling uitgedrukt in procent van de controle. Na 96u blootstelling aan 400 µM Zn was de wortelgroei van deze LOX-GUS constructen maar met 20% afgenomen. Daarom werden in het volgende experiment de LOX1-GUS, LOX2-GUS en LOX3-GUS constructen blootgesteld aan 500 µM Zn. Bovendien werden ze 120u blootgesteld in plaats van 96u, dit maakt principieel geen groot verschil omdat beide langdurige blootstellingen zijn. Deze LOX-GUS constructen vertoonden dit keer wel ongeveer een 50% wortelgroei-inhibitie bij blootstelling aan Zn (zie figuur 8, A, B en C).



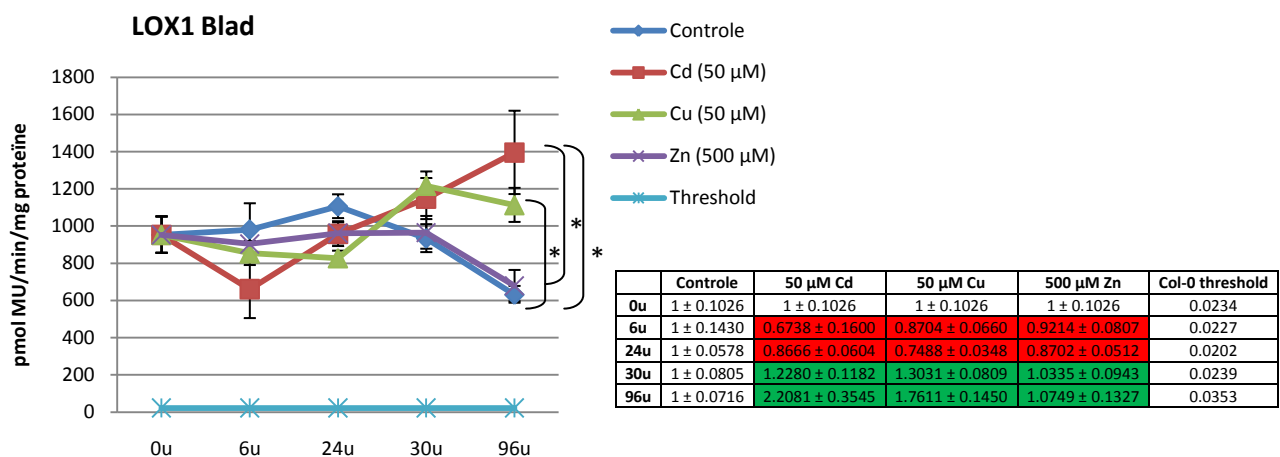
**Figuur 8:** Primaire wortelgroei na 96u/120u blootstelling aan 50 μM Cd, 50 μM Cu en 400/500 μM Zn. Grafieken D, E en F vertonen ongeveer een 50% wortelgroei-inhibitie na blootstelling aan 50 μM Cd en 50 μM Cu, maar bij blootstelling aan 400 μM Zn een wortelgroei-inhibitie van 20%. Grafieken A, B en C vertonen ongeveer een 50% wortelgroei-inhibitie na blootstelling aan 50 μM Cd en 500 μM Zn. Bij blootstelling aan 50 μM Cu treedt ongeveer een 50% wortelgroei-inhibitie op bij LOX2-GUS en een veel mindere wortelgroei-inhibitie bij LOX1-GUS en LOX3-GUS.

### 3.1.3 Promotoractiviteit

Om de activiteit van de promotors te observeren maakten men gebruik van de transgene LOX-GUS lijnen waarin de promotors gekoppeld werden aan een *GUS* reporter gen. Een reporter gen is een gen waarbij de expressie gemakkelijk detecteerbaar is. Voor het meten van *GUS* activiteit, werden proteïne-extracties genomen van de planten. Na het berekenen van de proteïneconcentraties werd één concentratie gekozen waarnaar alle stalen verdund werden, waardoor het resultaat achteraf homogener werd. Deze extracten werden geïncubeerd met het substraat *MUG*, waardoor

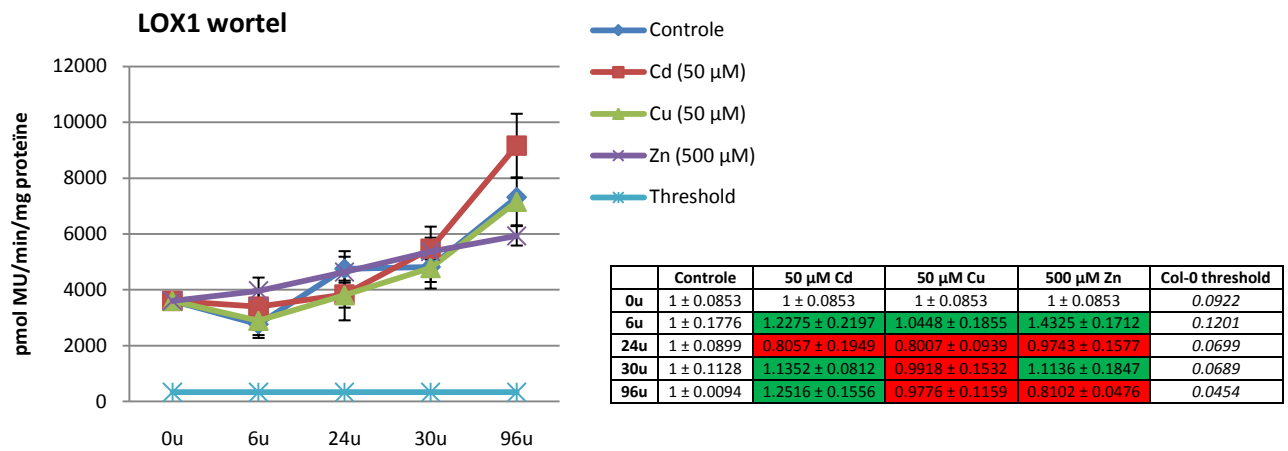
fluorescente producten werden gevormd. Het substraat MUG werd door het GUS enzym opgesplitst in MU en glucuronide, waarbij de stoichiometrische verhouding 1:1 was. Vermits het hier gaat om een enzymatische reactie, werd de toename van de omzetting gevolgd in functie van de tijd. Hoe meer GUS aanwezig was, hoe sneller en meer MU gevormd werd, waardoor er meer fluorescentie optrad, wat uiteindelijk een gevolg was van een verhoogde promotoractiviteit. GUS werd tot expressie gebracht in de plant maar is een E. coli enzym, daarom dat het optimaal werkte bij 37°C. Niet-specifieke fluorescentie en afbraak van het substraat MUG werd bepaald door de “GUS activiteit” van een aantal Col-0 stalen te meten. De bekomen gemiddelde achtergrondwaarde werd vermeerderd met 2x de standaarddeviatie op deze metingen om de threshold te bepalen waarboven significante GUS activiteit gemeten kan worden.

De GUS activiteit van de blaadjes en wortels van het LOX1-GUS construct is weergegeven in figuur 9 en 10. Bij de blaadjes waren na 96u blootstelling significante verschillen gevonden ( $P < 0.05$ ). De GUS activiteit was na blootstelling aan Cd significant hoger dan de activiteit van de controle plantjes ( $P = 0.0034$ ). Bovendien was de promotoractiviteit bij blootstelling aan Cd significant hoger dan bij blootstelling aan Zn ( $P = 0.0054$ ). Tevens werd een significant verschil gevonden ( $P = 0.0391$ ) tussen de GUS activiteit bij blootstelling aan Cu en controle.



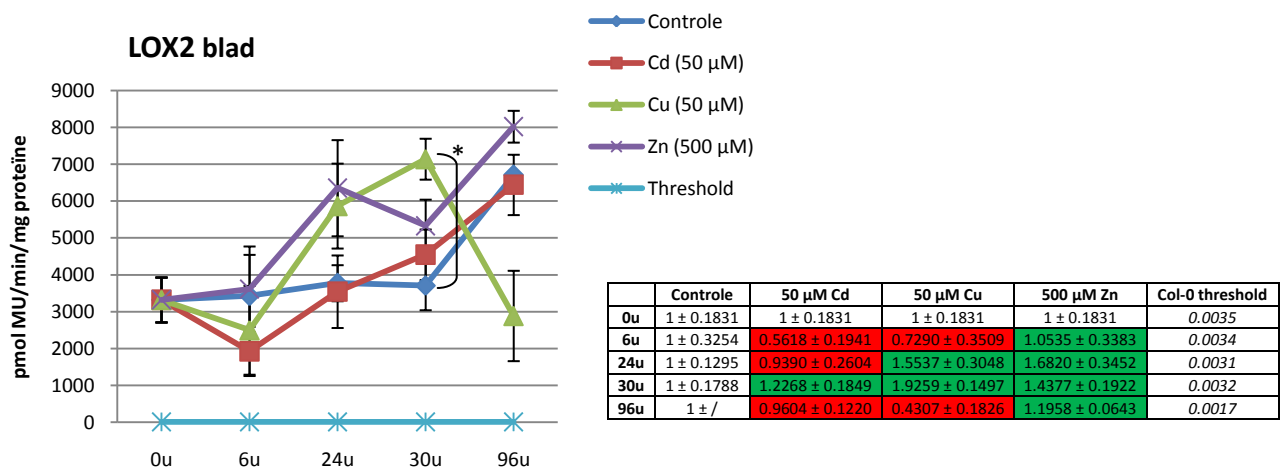
**Figuur 9:** Promotoractiviteit bij de blaadjes van LOX1-GUS *Arabidopsis* planten. (\*) betekent dat er significante verschillen zijn waargenomen ( $P < 0.05$ ). Inhibitie (rood) of stimulatie (groen) van relatieve promotoractiviteit is weergegeven in de tabel. De threshold staat in *cursief*, alle andere waardes die ook in *cursief* staan tonen aan dat deze waardes beneden de threshold liggen.

De promotoractiviteit van de wortels vertoonde geen significante verschillen ( $P < 0.05$ ) tussen de verschillende behandelingen binnen een bepaald tijdstip (zie figuur 10).



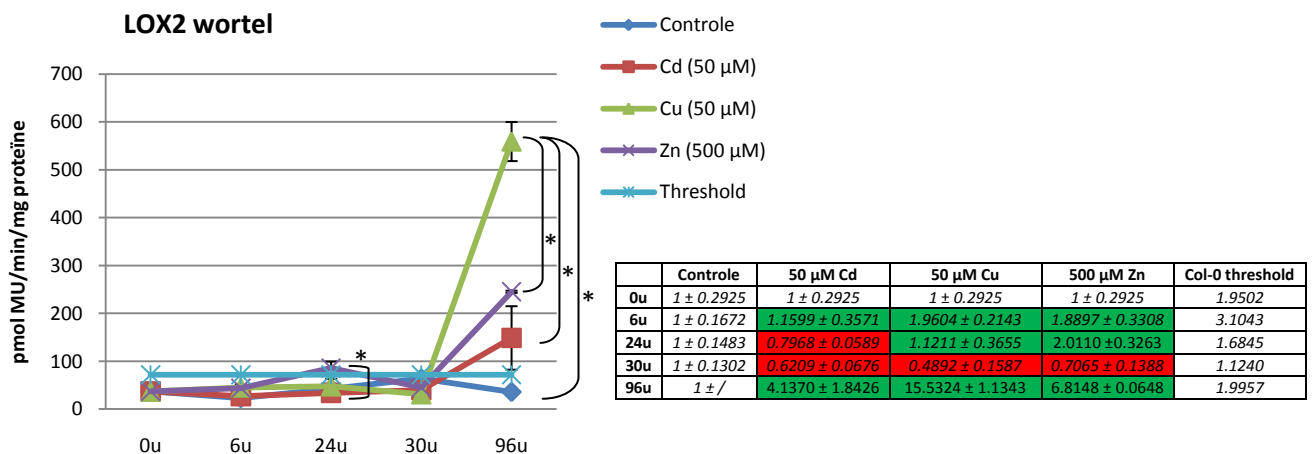
**Figuur 10:** Promotoractiviteit van LOX1-GUS *Arabidopsis* planten bij de wortels. (\*) betekent dat er significante verschillen zijn waargenomen ( $P < 0.05$ ). Inhibitie (rood) of stimulatie (groen) van relatieve promotoractiviteit is weergegeven in de tabel. De threshold staat in *cursief*, alle andere waarden die ook in *cursief* staan tonen aan dat deze waarden beneden de threshold liggen.

Na 30u was er een significant verschil ( $P < 0.05$ ) gevonden tussen de promotoractiviteit van de blaadjes van LOX2-GUS constructen. De GUS activiteit bij blootstelling aan Cu was significant hoger dan de controle ( $P = 0.0127$ ) (zie figuur 11).



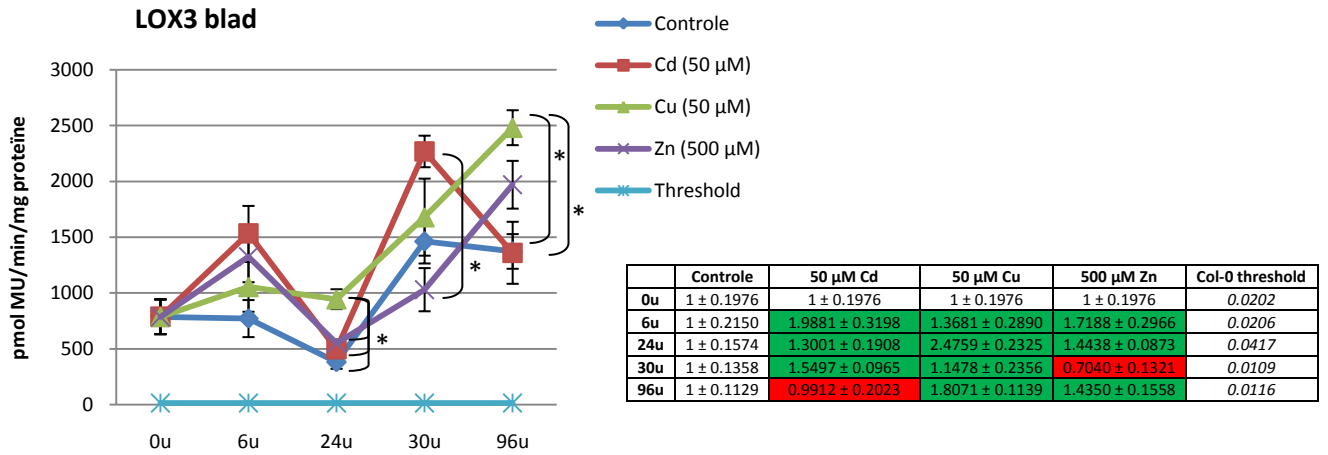
**Figuur 11:** Promotoractiviteit van de blaadjes van LOX2-GUS constructen. (\*) betekent dat er significante verschillen zijn waargenomen ( $P < 0.05$ ). Inhibitie (rood) of stimulatie (groen) van relatieve promotoractiviteit is weergegeven in de tabel. De threshold staat in *cursief*, alle andere waarden die ook in *cursief* staan tonen aan dat deze waarden beneden de threshold liggen.

Ook de wortels van LOX2-GUS planten vertoonden significante verschillen ( $P < 0.05$ ) (zie figuur 12). De promotoractiviteit bij 96u blootstelling aan Cu was significant hoger dan de activiteit van GUS waargenomen bij 96u blootstelling aan controle ( $P = 0.0203$ ), aan Cd ( $P = 0.0227$ ) en aan Zn ( $P = 0.0472$ ). Verder werd een significant verschil gevonden ( $P = 0.0306$ ) tussen de GUS activiteit na 24u blootstelling, waarbij de activiteit na Cd-blootstelling significant lager was dan de activiteit gevonden bij blootstelling aan Zn.

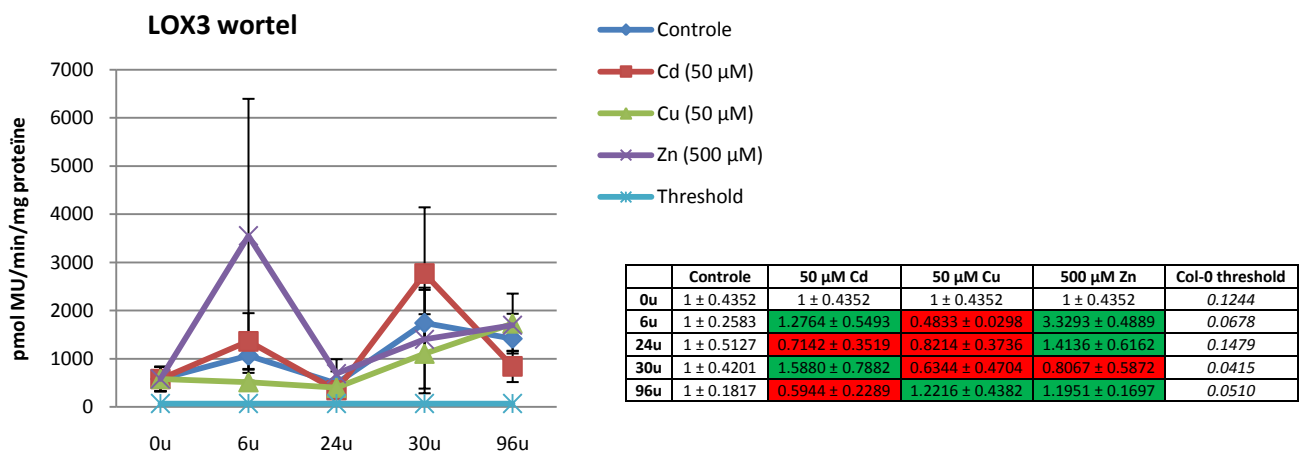


**Figuur 12:** In de grafiek is de GUS activiteit van de wortels van LOX2-GUS constructen weergegeven. (\*) betekent dat er significante verschillen zijn waargenomen ( $P < 0.05$ ). Inhibitie (rood) of stimulatie (groen) van relatieve promotoractiviteit is weergegeven in de tabel. De threshold staat in *cursief*, alle andere waardes die ook in *cursief* staan tonen aan dat deze waardes beneden de threshold liggen.

Bij de LOX3-GUS transgene planten vertoonden de blaadjes op 3 tijdstippen significante verschillen ( $P < 0.05$ ) (zie figuur 13). Na 24u blootstelling was de promotoractiviteit bij Cu significant hoger dan de controle ( $P = 0.0003$ ), Cd ( $P = 0.0023$ ) en Zn ( $P = 0.0062$ ). Ook werd er een significant verschil gevonden na 30u blootstelling tussen Cd en Zn ( $P = 0.0124$ ). Ten slotte werd een significant verschil van de promotoractiviteit waargenomen na 96u tussen Cu en controle ( $P = 0.0227$ ) en tussen Cu en Cd ( $P = 0.0213$ ). In de wortels van de LOX3-GUS planten werden geen significante verschillen ( $P < 0.05$ ) aangetoond (zie figuur 14).

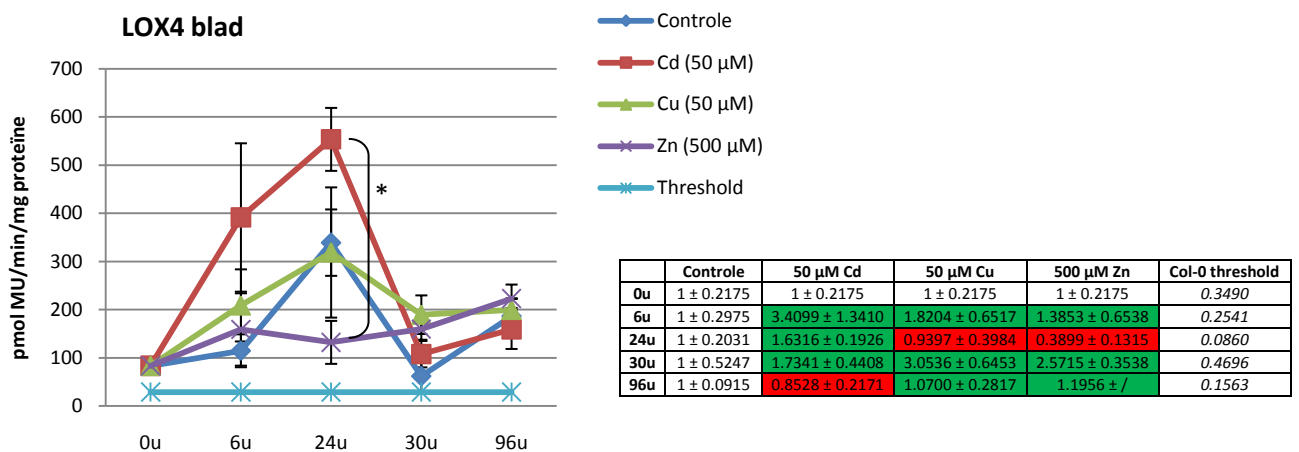


**Figuur 13:** In de grafiek is de promotoractiviteit van de blaadjes van LOX3-GUS planten weergegeven. (\*) betekent dat er significante verschillen zijn waargenomen ( $P < 0.05$ ). Inhibitie (rood) of stimulatie (groen) van relatieve promotoractiviteit is weergegeven in de tabel. De threshold staat in *cursief*, alle andere waardes die ook in *cursief* staan tonen aan dat deze waardes beneden de threshold liggen.

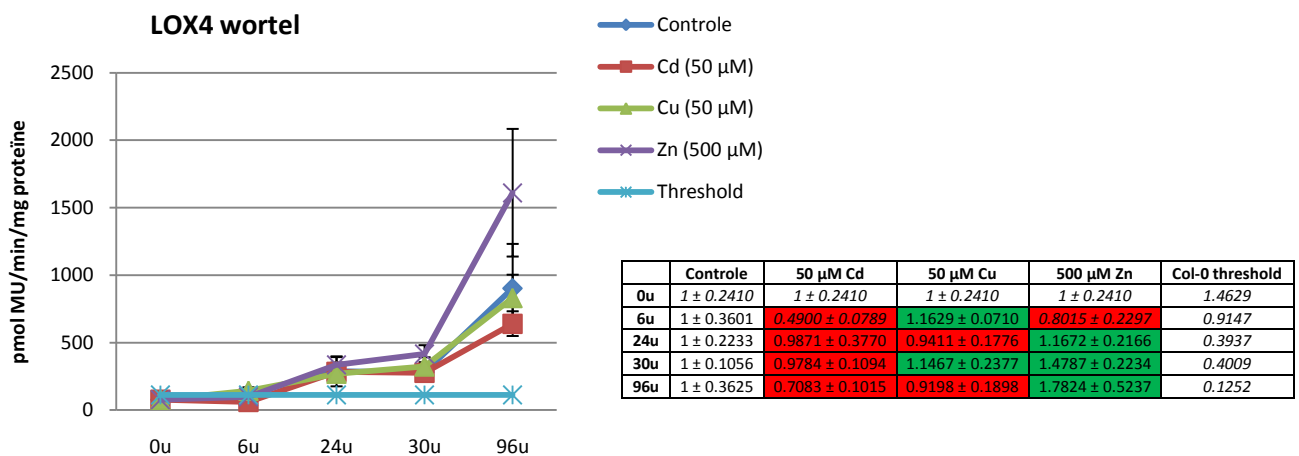


**Figuur 14:** In de grafiek is de promotoractiviteit van de wortels van LOX3-GUS planten weergegeven. Inhibitie (rood) of stimulatie (groen) van relatieve promotoractiviteit is weergegeven in de tabel. De threshold staat in *cursief*, alle andere waardes die ook in *cursief* staan tonen aan dat deze waardes beneden de threshold liggen.

In de blaadjes van de LOX4-GUS constructen werd enkel een significant verschil ( $P < 0.05$ ) gevonden na 24u (zie figuur 15), waarbij de promotoractiviteit na Cd-blootstelling significant hoger was dan na blootstelling aan Zn ( $P = 0.0093$ ). In tegenstelling tot de blaadjes, waren er bij de wortels geen significante verschillen ( $P < 0.05$ ) terug te vinden (zie figuur 16).

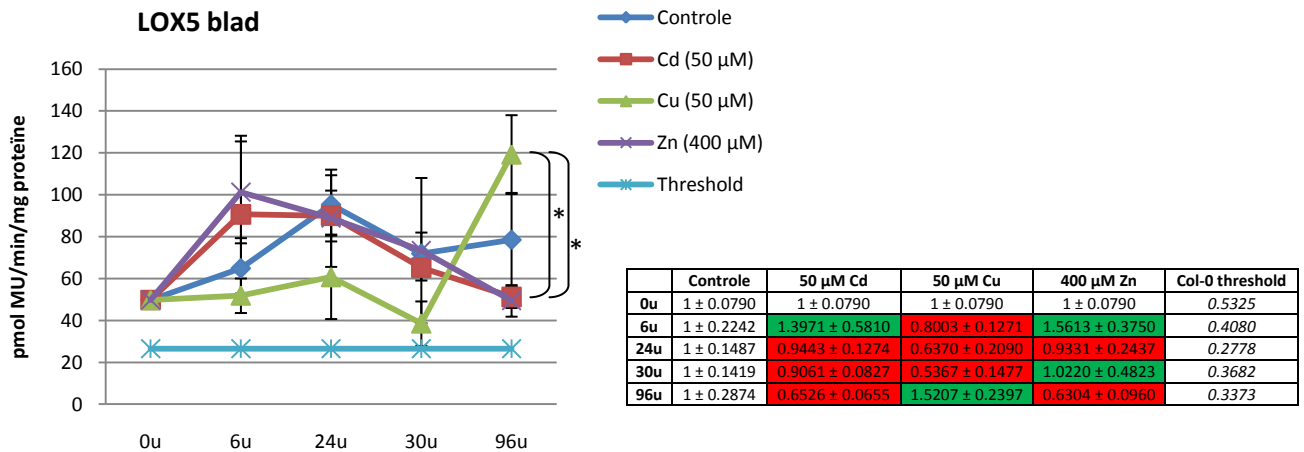


**Figuur 15:** De GUS activiteit van LOX4-GUS *Arabidopsis* planten van de wortels is weergegeven in een grafiek. (\*) betekent dat er significante verschillen zijn waargenomen ( $P < 0.05$ ). Inhibitie (rood) of stimulatie (groen) van relatieve promotoractiviteit is weergegeven in de tabel. De threshold staat in *cursief*, alle andere waarden die ook in *cursief* staan tonen aan dat deze waarden beneden de threshold liggen.

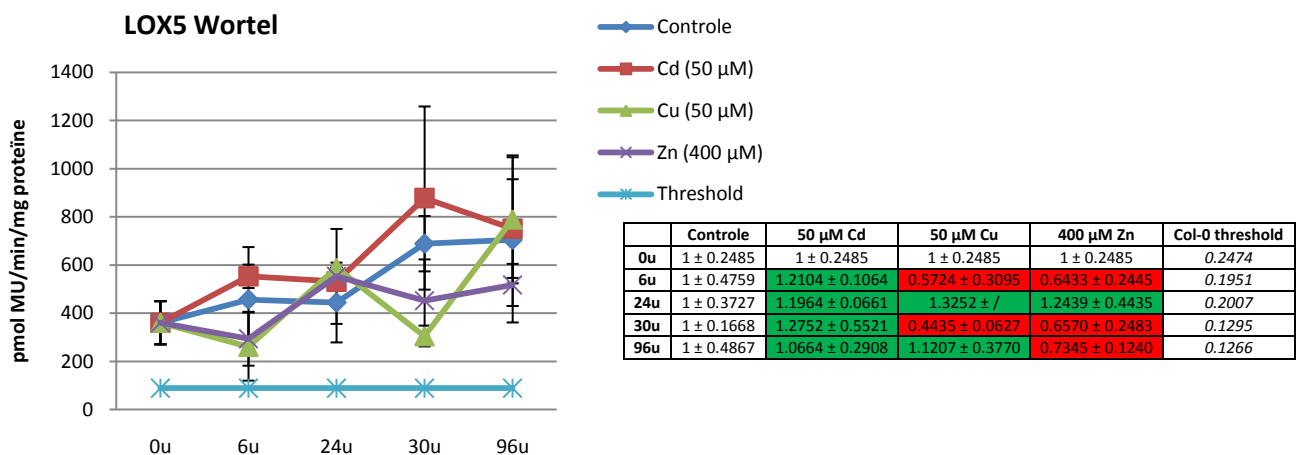


**Figuur 16:** De GUS activiteit van LOX4-GUS *Arabidopsis* planten van de wortels is weergegeven in een grafiek. Inhibitie (rood) of stimulatie (groen) van relatieve promotoractiviteit is weergegeven in de tabel. De threshold staat in *cursief*, alle andere waarden die ook in *cursief* staan tonen aan dat deze waarden beneden de threshold liggen.

Bij de LOX5-GUS planten waren enkel in de blaadjes significante verschillen ( $p < 0.05$ ) terug te vinden (zie figuur 17). De GUS activiteit bij 96u blootstelling aan Cd en Zn was significant lager dan de promotoractiviteit bij 96u blootstelling aan Cu (respectievelijk  $P = 0.0376$  en  $P = 0.0327$ ).



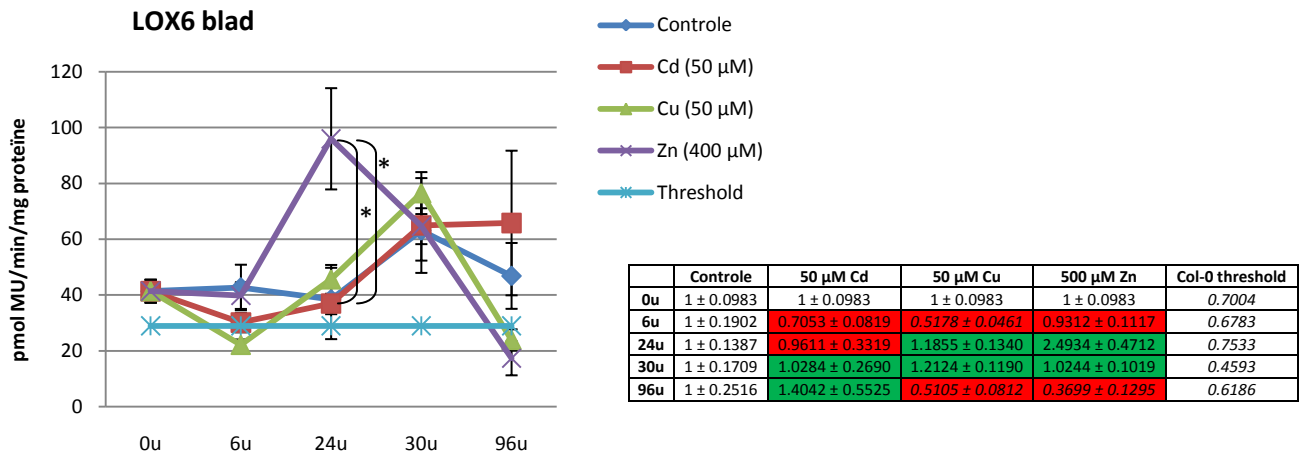
**Figuur 17:** De promotoractiviteit van LOX5-GUS planten van de blaadjes is weergegeven in een grafiek. (\*) betekent dat er significante verschillen zijn waargenomen ( $P < 0.05$ ). Inhibitie (rood) of stimulatie (groen) van relatieve promotoractiviteit is weergegeven in de tabel. De threshold staat in *cursief*, alle andere waardes die ook in *cursief* staan tonen aan dat deze waardes beneden de threshold liggen.



**Figuur 18:** De promotoractiviteit van LOX5-GUS planten van de wortels is weergegeven in een grafiek. Inhibitie (rood) of stimulatie (groen) van relatieve promotoractiviteit is weergegeven in de tabel. De threshold staat in *cursief*, alle andere waardes die ook in *cursief* staan tonen aan dat deze waardes beneden de threshold liggen.

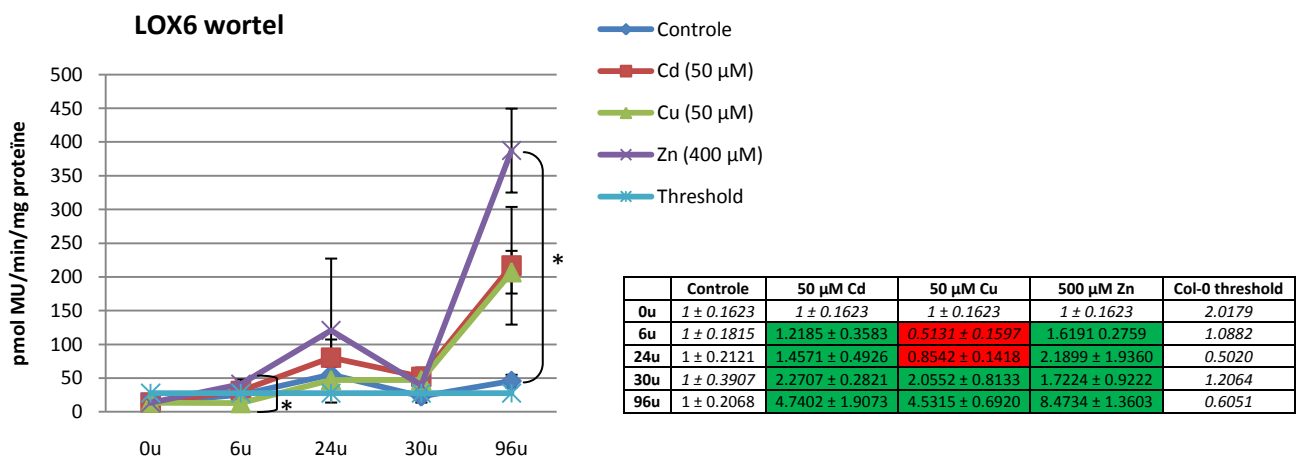
Er werden significante verschillen ( $P < 0.05$ ) waargenomen na 24u blootstelling in de blaadjes van LOX6-GUS transgene planten (zie figuur 19). De GUS activiteit bij Zn-stress was significant hoger dan de activiteit waargenomen in de controle ( $P = 0.0341$ ) of bij blootstelling aan Cd ( $P = 0.0301$ ).





**Figuur 19:** In een grafiek is de promotoractiviteit van de blaadjes van LOX6-GUS constructen weergegeven. (\*) betekent dat er significante verschillen zijn waargenomen ( $P < 0.05$ ). Inhibitie (rood) of stimulatie (groen) van relatieve promotoractiviteit is weergegeven in de tabel. De threshold staat in *cursief*, alle andere waarden die ook in *cursief* staan tonen aan dat deze waarden beneden de threshold liggen.

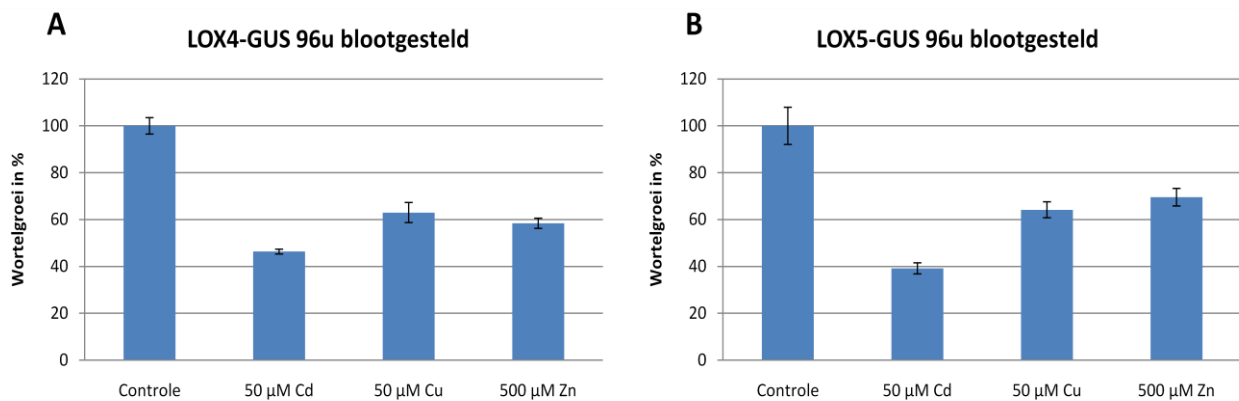
Ten slotte werden ook in de wortels van LOX6-GUS constructen significante verschillen ( $P < 0.05$ ) aangetoond (zie figuur 20). Er was een significant verschil tussen de promotoractiviteit bij 6u blootstelling aan Cu en de activiteit bij 6u blootstelling aan Zn ( $P = 0.0183$ ). Verder werd een significant verschil gevonden ( $P = 0.0110$ ) tussen de GUS activiteit van de controle en bij 96u blootstelling aan Zn.



**Figuur 20:** In een grafiek is de promotoractiviteit van de wortels van LOX6-GUS constructen weergegeven. (\*) betekent dat er significante verschillen zijn waargenomen ( $P < 0.05$ ). Inhibitie (rood) of stimulatie (groen) van relatieve promotoractiviteit is weergegeven in de tabel. De threshold staat in *cursief*, alle andere waarden die ook in *cursief* staan tonen aan dat deze waarden beneden de threshold liggen.

### 3.1.4 GUS activiteit van het verificatie-experiment

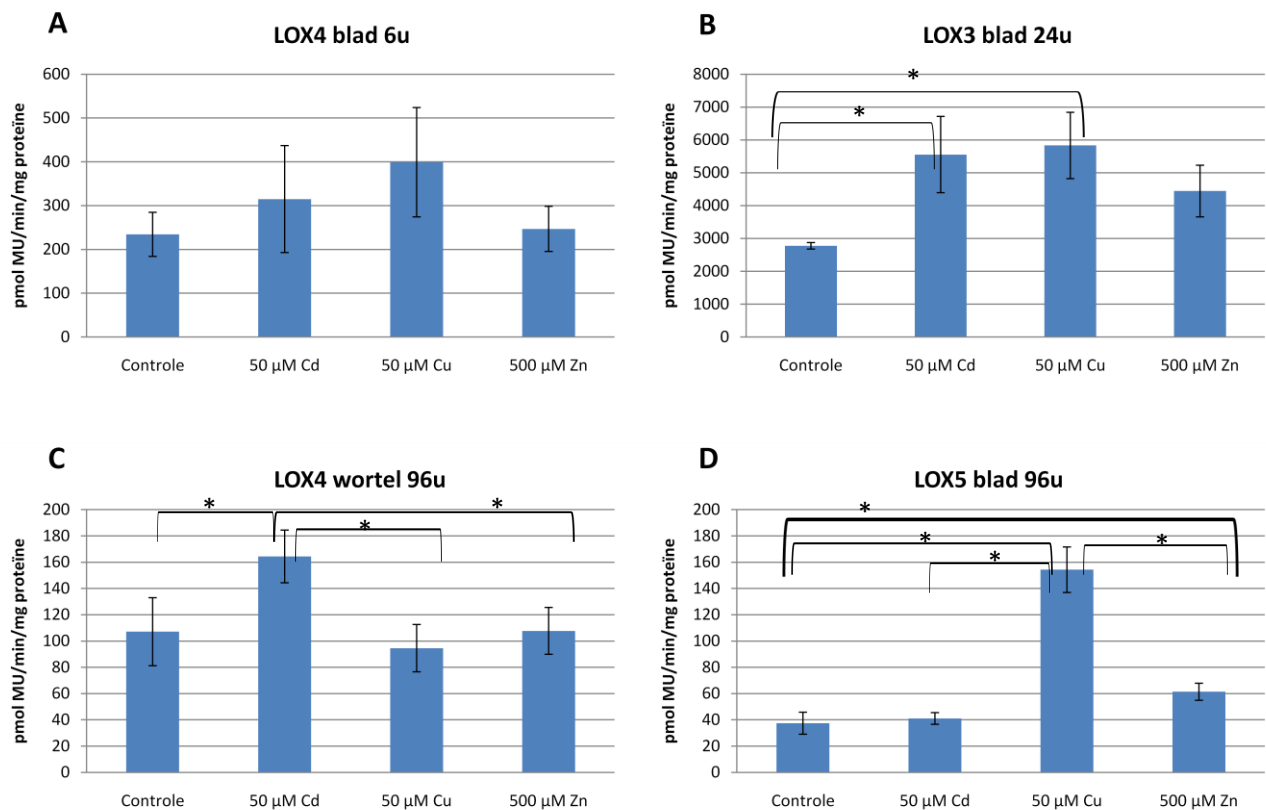
Uit voorgaande resultaten werden vier interessante punten gevonden waarbij metaalspecifieke stijgingen te zien waren tussen de behandelingen binnen een bepaald tijdstip. Bij blootstelling aan Cd trad er na 6u een inductie van de promotoractiviteit op bij de blaadjes van LOX4-GUS. Een inductie veroorzaakt door Cu-blootstelling was waar te nemen bij de blaadjes van LOX3-GUS na 24u en bij de blaadjes van LOX5-GUS na 96u. Tot slot was er een inductie van de GUS activiteit na blootstelling aan Zn bij de wortels van LOX4-GUS na 96u. Deze punten werden herhaald in het verificatie-experiment. De plantjes werden blootgesteld aan 50  $\mu\text{M}$  CdSO<sub>4</sub>, 50  $\mu\text{M}$  CuSO<sub>4</sub>, 500  $\mu\text{M}$  ZnSO<sub>4</sub> en aan een controlebehandeling. De primaire wortelgroei na 96u blootstelling werd bijgehouden van de LOX4-GUS en LOX5-GUS planten en vertoonden een wortelgroei-inhibitie van ongeveer 50% (zie figuur 21).



**Figuur 21:** Wortelgroei na 96u blootstelling aan 50  $\mu\text{M}$  Cd, 50  $\mu\text{M}$  Cu en 500  $\mu\text{M}$  Zn. Bij LOX4-GUS (A) en LOX5-GUS (B) is er een wortelgroei-inhibitie van ongeveer 50% vastgesteld na 96u blootstelling.

De promotoractiviteit waargenomen bij het verificatie-experiment is weergegeven in figuur 22. Bij de blaadjes van LOX4-GUS planten werden na 6u blootstelling geen significante verschillen ( $P < 0.05$ ) gevonden, wat tevens het voorgaande experiment bevestigde (zie figuur 22, A). De promotoractiviteit van de blaadjes van LOX3-GUS planten werd bevestigd waarbij de controle significant lager was dan de activiteit waargenomen na blootstelling aan Cd ( $P = 0.1592$ ) en Cu ( $P = 0.1104$ ) (zie figuur 22, B). In het voorgaande experiment was de inductie bij Cu-stress ook significant hoger dan bij Cd- en Zn-stress. In tegenstelling tot de resultaten van het vorige experiment werden er significante verschillen ( $P < 0.05$ ) gevonden bij de wortels van LOX4-GUS planten na 96u blootstelling (zie figuur 22, C). De GUS activiteit na Cd-blootstelling was significant hoger dan de promotoractiviteit bij blootstelling aan controle ( $P = 0.2577$ ), Cu ( $P = 0.1782$ ) en Zn ( $P = 0.2657$ ). Ten slotte werd bevestigd dat de promotoractiviteit van de LOX5-GUS blaadjes bij Cu-stress significant hoger was dan bij blootstelling aan Cd ( $P < 0.0001$ ) en Zn ( $P = 0.0002$ ). Bovendien was er een inductie

van promotoractiviteit na blootstelling aan Cu ten opzichte van de controle ( $P < 0.0001$ ) en werd een significant verschil gevonden tussen de GUS activiteit van controle en Zn ( $P = 0.4018$ ) (zie figuur 22, D).



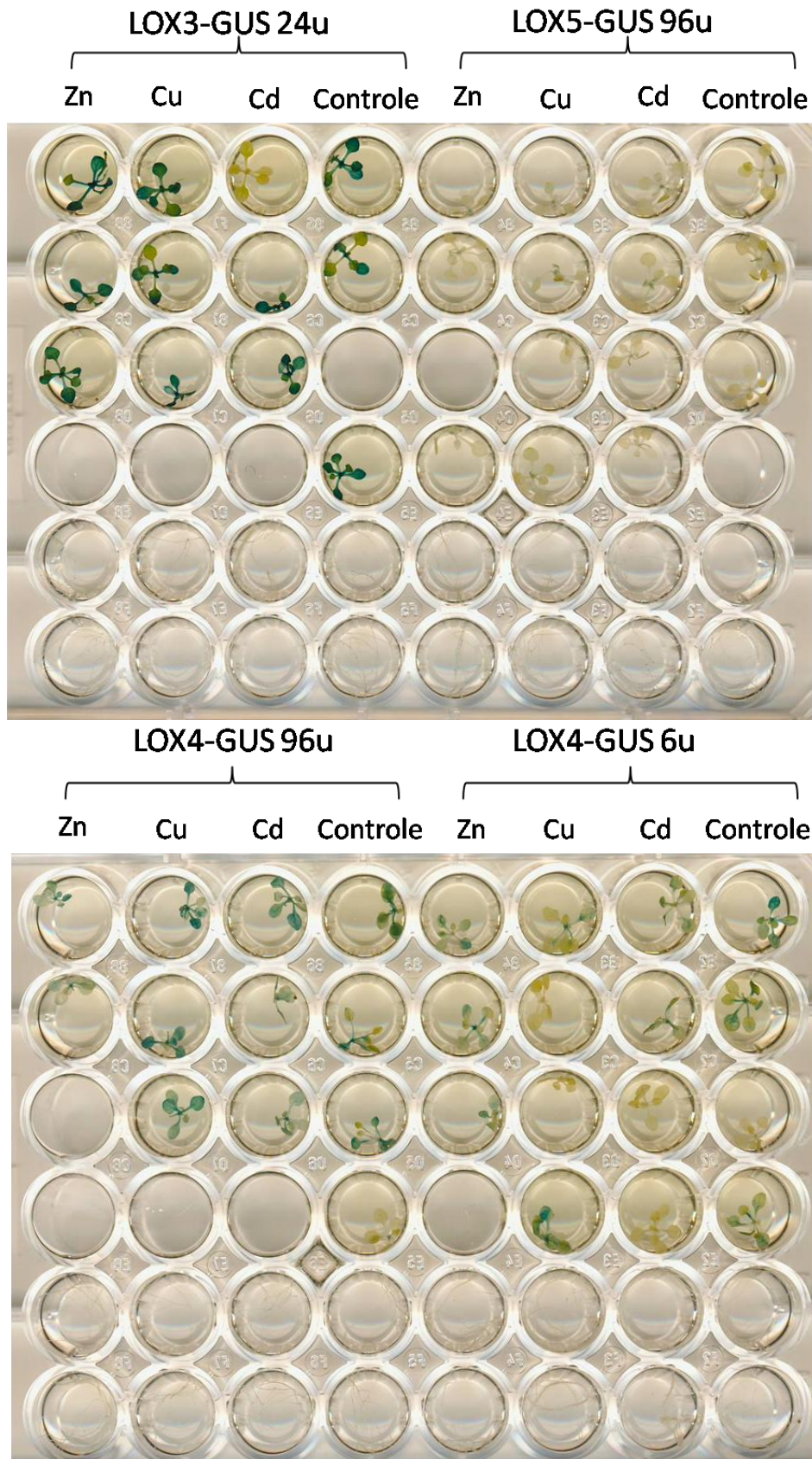
**Figuur 22:** Promotoractiviteit van (A) LOX4-GUS blaadjes na 6u blootstelling, (B) LOX3-GUS blaadjes na 24u blootstelling, (C) LOX4-GUS wortels na 96u blootstelling en (D) LOX5-GUS blaadjes na 96u blootstelling. (\*) betekent dat er significante verschillen zijn waargenomen ( $P < 0.05$ ).

### 3.1.5 Histochemische kleuring

De promotoractiviteit werd niet enkel geanalyseerd via fluormetrische assays, maar werd ook gevisualiseerd gebruik makend van een histochemische kleuring. X-gluc is een substraat voor GUS, en wordt gesplitst in het kleurloze glucuronic acid en de intens blauwe neerslag van het chlorobromindigo. Via deze kleuring werd de GUS expressie in de plant zichtbaar gemaakt. De blaadjes en wortels van de LOX-GUS planten werden in de X-gluc oplossing gebracht en geïncubeerd voor 1 nacht op 37°C.

In alle plantjes was er geen blauwkleuring terug te vinden in de wortels. Bij de blaadjes was de expressie van GUS duidelijk zichtbaar (zie figuren 23 en 24). In de blaadjes van LOX4-GUS planten werd na 6u blootstelling een blauwkleuring waargenomen bij Zn en controle, bij Cd en Cu was de kleuring iets minder. Bij de LOX3-GUS planten was de blauwkleuring in de blaadjes duidelijk zichtbaar

na 24u blootstelling aan Cd, Cu en Zn, alsook in de controle. Er werd geen kleuring vastgesteld bij de LOX5-GUS planten na 96u blootstelling. In de blaadjes van LOX4-GUS planten was er bij Cu en Cd een blauwkleuring waar te nemen na 96u blootstelling, terwijl bij Zn deze minder zichtbaar was. Bovendien werd bij de controle een blauwkleuring vastgesteld die minder was dan Cd en Cu, maar beter zichtbaar was dan bij Zn.



**Figuur 23:**  
GUS expressie bij transgene Arabidopsis plantjes LOX3-GUS, na 24u blootstelling, en LOX5-GUS, na 96u blootstelling.

**Figuur 24:**  
GUS expressie bij transgene Arabidopsis plantjes LOX4-GUS na 6u blootstelling en na 96u blootstelling.

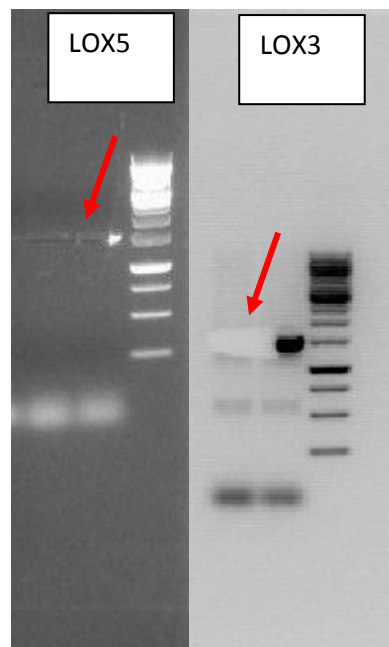
## **3.2 Klonering**

In dit deel van het onderzoek werden de promotors van LOX1, LOX3 en LOX5 gekloneerd in een expressievector met het luciferase reporter gen.

### ***3.2.1 Amplificatie-reactie***

Men startte met het ontwerpen van de primers waarin sequenties van de restrictie-enzymen BamH I en Xho I verwerkt werden. Na het amplificeren van de primers voerde men een gelelektroforese uit aangezien men enkel de PCR fragmenten met een grootte van 1.5 kb nodig heeft. Gelelektroforese is een scheidingstechniek die moleculen onder invloed van een elektrisch veld laat bewegen in een gel. Negatief geladen moleculen, zoals het DNA, bewegen naar beneden waar de positieve pool zich bevindt. De bandjes van 1.5 kb werden uit de gel gesneden om later te gebruiken voor DNA extractie.

De promotorfragmenten van LOX1, LOX3 en LOX5 werden aangebracht op de gel alsook een 1 kb DNA ladder (zie figuur 25). De amplificatie van de LOX5-promotor en de LOX3-promotor is gelukt, aangezien er bij beide een bandje van 1.5 kb werd weergegeven (pijltje). Op de foto is er maar een stukje van het bandje te zien vermits ze werden uitgesneden voor DNA extractie. De amplificatie van de LOX1-promotorsequentie was niet gelukt. Er werd verder gegaan met het kloneringsexperiment, enkel met LOX3 en LOX5.

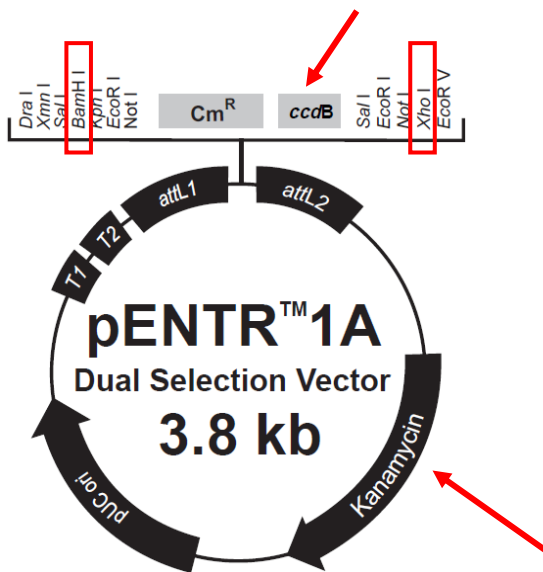


**Figuur 25:** Resultaat van gelelektroforese van de geamplificeerde promotorfragmenten LOX3 en LOX5. Het pijltje geeft aan dat er een stukje van het bandje van 1.5 kb te zien is. Dit bandje werd grotendeels uitgesneden voor later te gebruiken voor DNA extractie.



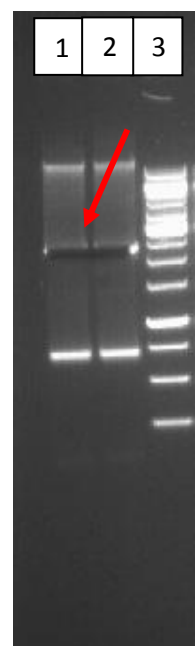
### 3.2.2 Restrictie pENTR1A vector

Na opzuivering van de promotorfragmenten uit agarosegel werden ze geknipt met BamH I en Xho I. De restrictie-enzym fragmenten werden gekloneerd in een entry vector, namelijk pENTR1A, om de pENTR1A-LOX entry clones te creëren. pENTR1A bevat het *ccdB* gen (wat codeert voor een toxische proteïne) geflankeerd door twee recombinatiesites attL1 en attL2 (zie figuur 26). Het *ccdB* gen werd verwijderd uit het construct door de pENTR1A vector te knippen met BamH I en Xho I in de restrictiesites. Hierdoor ontstond een stuk met grootte 1.5 kb (het stukje tussen de restrictie-enzymen waar het *ccdB* gen in zit) en één met grootte 2.3 kb (totaal, 3.8 kb – 1.5 kb).



Figuur 26: pENTR1A vector

Voor het opnemen van de promotorfragmenten in de pENTR1A vector werd het stukje vector met grootte 2.3 kb geïsoleerd via gelelektroforese (zie figuur 27). In kolom 1 en 2 werd de geknipte pENTR1A vector toegevoegd en in kolom 3 een 1kb DNA ladder. Het bandje met grootte 2.3 kb werd uit de gel gesneden waaruit later DNA geëxtraheerd werd.

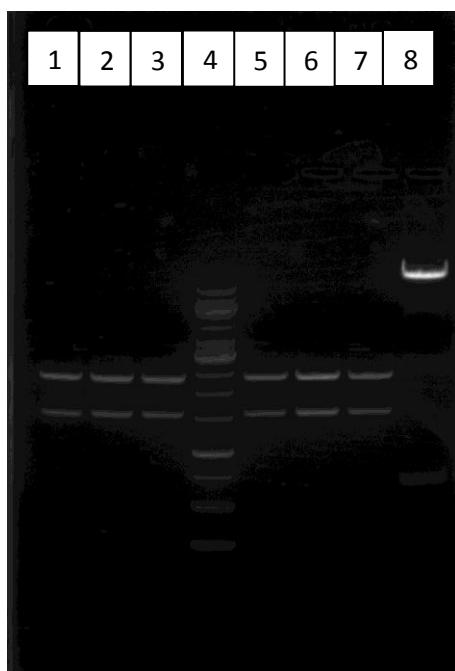


Figuur 27: Gelelektroforese van de geknipte pENTR1A vector. In kolom 3 is de ladder weergegeven en in kolom 1 en 2 de pENTR1A vector. Het pijltje geeft aan dat er een stukje van het bandje van 2.3 kb te zien is. Dit bandje werd grotendeels uitgesneden voor later te gebruiken voor DNA extractie.

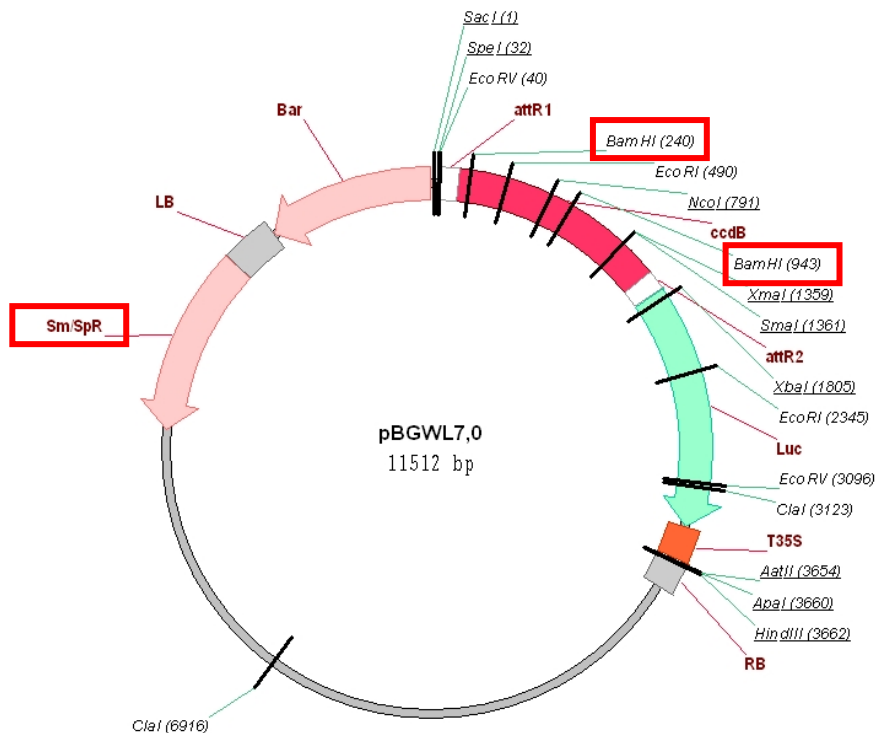
### 3.2.3 Klonering van de promotorfragmenten in de gateway entry vector pENTR1A

De ligatiereactie zorgde voor de opname van de promotorfragmenten in de geknipte pENTR1A vector. *E. coli* DH5 $\alpha$  cellen werden getransformeerd met deze ligatiemix. De cellen werden uitgestreken op LB agar met 100  $\mu$ g/ml kanamycine. Er groeien enkel kolonies op deze platen als de ligatie tussen pENTR1A vector (resistent tegen kanamycine) en het promotorfragment gelukt was, alsook de transformatie. Na een nacht in de broeikast op 37°C werden bij beide, LOX3 en LOX5, kolonies vastgesteld.

Na het inoculeren van de kolonies werd het plasmide DNA uit de *E. coli* geïsoleerd. De pENTR1A-LOX vectoren werden geknipt met BamH I/Xho I om de aanwezigheid van het 1.5 kb promotorfragment te verifiëren. Ook de intactheid van de pBGWL7.0 vector werd nagegaan door te knippen met BamH I/Xho I. Men voerde een gelelektroforese (zie figuur 28) uit waarbij in kolom 1, 2 en 3 pENTR1A-LOX3 werd aangebracht, in kolom 4 de 1 kb DNA ladder, in kolom 5, 6 en 7 pENTR1A-LOX5 en in kolom 8 de pBGWL7.0-LUC vector. De pENTR1A vector en zijn opgenomen promotorfragmenten werd geknipt met beide restrictie-enzymen in de daarvoor bestemde restrictiesites en toonden bandjes van 1.5 kb (promotorfragmenten) en 2.3 kb (pENTR1A vector). Bij de pBGWL7.0-LUC vector werd een bandje van  $\pm$  11 kb en één van 700 bp vastgesteld. Deze vector werd enkel geknipt met BamH I op 240 bp en op 943 bp (zie figuur 29). Dus de vectoren pENTR1A-LOX3, pENTR1A-LOX5 en pBGWL7.0 waren nog intact en er werd verder gegaan met het experiment.



**Figuur 28:** Gelelektroforese van de geknipte pENTR1A vector en zijn opgenomen promotorfragmenten en van de geknipte pBGWL7.0-LUC vector. In kolom 4 is de ladder weergegeven, in kolom 1, 2 en 3 de pENTR1A vector met LOX3-promotorfragment, in kolom 5, 6 en 7 de pENTR1A vector met LOX5-promotorfragment en in kolom 8 de pBGWL7.0-LUC vector.



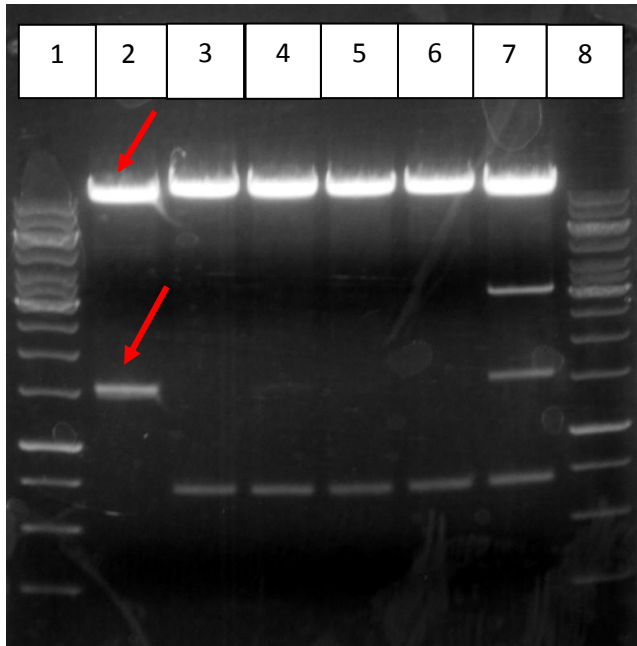
**Figuur 29:** pBGWL7.0-LUC vector

### 3.2.4 LR reactie

De entry clone bevat de attL1 en attL2 sites en kunnen gerecombineerd worden met de attR1 en attR2 sites van een destination vector, namelijk pBGWL 7.0, in de LR reactie om een expressievector te creëren (zie figuur 6 in bijlage 5). Bij de recombinatie werd het letale *ccdB* gen in de destination vector uitgewisseld met het promotorfragment in de donor vector. JM107 *E. coli* cellen werden getransformeerd met deze recombinatiemix. Deze cellen werden uitgestreken op LB agar met 50 µg/ml streptomycine vermits de pBGWL7.0 vector het streptomycineresistentiegen bevat (zie figuur 29). Na een incubatie van een nacht op 37°C werden kolonies op de LB platen vastgesteld.

Ter controle werden de kolonies geïnoculeerd, werd een plasmide prep uitgevoerd, volgde een digestie met BamH I en Xho I en werd een gelelektroforese uitgevoerd. In kolom 1 en 8 werd 1 kb DNA ladder aangebracht op de gel, in kolom 2, 3 en 4 pBGWL7.0-LOX3 en in kolom 5, 6 en 7 pBGWL7.0-LOX5. De pBGWL7.0 vector en zijn promotorfragmenten zouden bandjes met een grootte van 11 kb (vector) en 1.5 kb (promotorfragment) moeten weergeven. Enkel de recombinatie tussen pBGWL7.0-LUC vector en het LOX3 promotorfragment uit kolonie A is gelukt (zie figuur 30, pijltje).





**Figuur 30:** Gelelektroforese van pBGWL7.0 vector gerecombineerde promotorfragmenten. In kolom 1 en 8 wordt de 1 kb DNA ladder weergegeven, in kolom 2, 3 en 4 pBGWL7.0-LUC vector met het LOX3 promotorfragment en in kolom 5, 6 en 7 pBGWL7.0-LUC vector met het LOX5 promotorfragment. De twee pijltjes duiden respectievelijk de bandjes van 11 kb en 1.5 kb aan.

## 4 Discussie

Metaalvervuiling heeft negatieve gevolgen voor alle organismen. Er treden gezondheidsproblemen op bij mensen en dieren, en de productie en kwaliteit van voeder- of voedselgewassen neemt af. Als reactie op metaalvervuiling kunnen planten zowel morfologische responsen (zoals groei-inhibitie) als fysiologische responsen (zoals inhibitie van fotosynthese en respiratie) vertonen [9,10,13]. Blootstelling aan zware metalen veroorzaakt ook oxidatieve stress en lipidenperoxidatie. Lipidenperoxidatie is een proces waarbij de oxidatie van PUFA's gekatalyseerd wordt door onder andere lipoxygenase enzymen om hydroperoxides te produceren. Lipidenperoxidatie beïnvloedt verschillende cellulaire en fysiologische processen, waaronder celsignalisatie, membraanstructuur en regulatie van genexpressie [24] en worden vaak geïnduceerd tijdens stresscondities [23,24]. In een voorgaande studie werd bijvoorbeeld bij metaalstress een verhoogde activiteit van LOXen gevonden [32]. De gewijzigde activiteit van LOXen kunnen leiden tot de generatie van vele verschillende structurele oxylipines. Het is mogelijk dat de diverse structurele oxylipines een verzameling van signalisatiemoleculen representeren die deelnemen aan de plasticiteit van de reacties in planten [25]. Dus de verschillende leden van de lipoxygenase genfamilie hebben het potentieel om een specifieke rol te spelen in de reactie van de plant op verschillende stressfactoren [27]. Dit onderzoek concentreert zich op het bepalen van metaalspecifieke promotoractiviteiten bij de *LOX* genen. Hiervoor werden *Arabidopsis thaliana* plantjes 0u, 6u, 24u, 30u en 96u/120u blootgesteld aan de zware metalen Cd, Cu en Zn. De promotoractiviteiten werden bestudeerd door middel van  $\beta$ -glucuronidase (GUS) constructen, waarbij de GUS activiteit gemeten werd via MUG assays. De bekomen kinetische grafieken van promotoractiviteiten zouden het startpunt zijn voor studies van metaalspecifieke signaaltransductiewegen.

### **4.1 Lipoxygenase promotoractiviteiten bij blootstelling aan cadmium, koper of zink**

Lipoxygenase activiteit kan dus belangrijk zijn in de inductie van oxidatieve stress en signalisatie na blootstelling aan zware metalen. Het doel van de studie was om metaalspecifieke regulaties te ontdekken in de promotoractiviteiten van de *LOX* genen. Waarom promotoractiviteit? Omdat de expressie van de genen bepaald wordt door de activiteit van de promotor, welk de eerste stap is in het expressieproces, en omdat de promotor de plaats is waar transcriptiefactoren binden. De transgene planten werden blootgesteld aan drie metalen met elk verschillende eigenschappen. Koper [20] is een redoxactief en essentieel metaal die de ROS productie direct kan uitlokken via Fenton en Haber-Weiss reacties. Cadmium [20] is een niet-redoxactief niet-essentieel metaal, die ROS kan induceren via indirecte mechanismen zoals inhibitie van het antioxidatief systeem of de activatie van enzymen die ROS en enzymatische lipidenperoxidatie produceren. Als laatste het

metaal zink, hetgeen een essentieel niet-redoxactief metaal is. Vooraleer men startte met het meten van de promotoractiviteit van de planten werd eerst gekeken of de blootstellingconcentraties van de metalen Cd, Cu en Zn een wortelgroei-inhibitie van ongeveer 50% veroorzaakten. Uit voorgaande ervaring in de onderzoeksgroep werd 50% wortelgroei-inhibitie verwacht bij 15  $\mu\text{M}$   $\text{CdSO}_4$ , 10  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  en 250  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ . Omdat de eerste experimenten niet de verwachte 50% wortelgroei-inhibitie vertoonden, werd een range-finding experiment uitgevoerd. De gekozen concentraties voor verdere experimenten waren 50  $\mu\text{M}$  Cd, 50  $\mu\text{M}$  Cu en 400/500  $\mu\text{M}$  Zn. In alle verdere experimenten vertoonden de transgene LOX-GUS planten een wortelgroei-inhibitie van ongeveer 50%. Deze concentraties zijn, zelfs voor een langdurige tijd, subleetaal voor de *Arabidopsis thaliana* planten. Ze induceren fysiologische en moleculaire veranderingen die gerelateerd zijn aan oxidatieve stress.

De promotoractiviteit is gekoppeld aan de activiteit van GUS wegens de transcriptionele fusie promotor-reportergen. In deze studie waren zes transgene lijnen van LOX genen (1-6) beschikbaar die de promotor-GUS fusies dragen [29].

Uit de resultaten van de MUG assays werden verschillende metaalspecifieke stijgingen en dalingen gevonden alsook significante verschillen ( $P < 0.05$ ) tussen de behandelingen binnen een bepaald tijdstip. Uit deze resultaten werden vier interessante punten geselecteerd waarbij een metaalspecifieke inductie werd vastgesteld. Bij blootstelling aan Cd trad er na 6u een inductie van de promotoractiviteit op bij de blaadjes van LOX4-GUS. Een significante stijging veroorzaakt door Cu-blootstelling was waar te nemen bij de blaadjes van LOX3-GUS na 24u en bij de blaadjes van LOX5-GUS na 96u. Tot slot was er een inductie van de GUS activiteit na blootstelling aan Zn bij de wortels van LOX4-GUS na 96u. Deze punten werden herhaald in het verificatie-experiment, waarvoor de plantjes opnieuw blootgesteld werden aan 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdSO}_4$ , 50  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ , 500  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$  en aan een controlebehandeling. Tussen de promotoractiviteiten van de blaadjes van de LOX4-GUS planten werden geen significante verschillen gevonden na 6u blootstelling, wat tevens een bevestiging is van het resultaat uit het voorgaande experiment. Het resultaat van de promotoractiviteit van de blaadjes van LOX3-GUS planten na 24u blootstelling werd gedeeltelijk bevestigd. De promotoractiviteit bij Cu-stress was enkel significant hoger dan de controle, maar niet dan de activiteit bij Cd- en Zn-stress zoals vastgesteld in het voorgaande experiment. In tegenstelling tot de resultaten van het vorige experiment, werden in het verificatie-experiment significante verschillen gevonden tussen de GUS activiteit van de wortels van LOX4-GUS planten na 96u blootstelling. De wortels van LOX4-GUS planten zijn hier Cd responsief. Als laatste werd bevestigd dat de promotoractiviteit bij Cu-stress significant hoger was dan bij Cd- en Zn-stress in de blaadjes van de LOX5-GUS planten. Ook was in het

verificatie-experiment de activiteit van GUS bij Cu- en Zn-stress significant hoger dan de activiteit waargenomen bij de controle.

In het algemeen was, onder controle condities, de promotoractiviteit van de LOXen in de wortels van de transgene *Arabidopsis* planten het hoogst voor LOX1, terwijl LOX2 en LOX6 in de wortels de laagste promotoractiviteit toonde. Het gen met de hoogste promotoractiviteit in de blaadjes is LOX2. Een voorgaande studie [20] bestudeerde de genexpressie van de *LOX* genen in wildtype *Arabidopsis* planten en kwamen ongeveer tot hetzelfde resultaat voor de controle condities. LOX1 en LOX6 vertoonden de hoogste expressie in de wortels, terwijl LOX2 het laagst was. Ook was de expressie het hoogst in de blaadjes voor LOX2. Velloso et al. [29] onthulde de expressie van LOX1, LOX2, LOX3 en LOX4 in de bladeren van transgene zaailingen onder controle condities. Ook maakten ze bekend dat de expressie van LOX1, LOX3 en LOX5 in de wortels werd teruggevonden. Terwijl de promotoractiviteit van LOX6 helemaal niet werd waargenomen in de planten. In deze studie stelde men gelijkaardige resultaten vast. De promotoractiviteit van LOX5 en LOX6 werden bijna niet gedetecteerd in de blaadjes onder controle condities en de activiteit van GUS in de wortels was hoog voor LOX1, LOX3, (LOX4) en LOX5. Voor LOX6 werd bijna geen promotoractiviteit waargenomen in zowel de wortels als de blaadjes onder controle condities.

In een voorgaande studie [20] was enkel de expressie in de wortels van LOX1 en LOX6 significant gestegen bij blootstelling aan Cd. Maar blootstelling aan Cu leidde ook tot een metaalspecifieke stijging in de wortels waargenomen voor LOX3 en LOX4, terwijl er een daling was voor LOX5. In dit onderzoek zijn de enige significante responsieve *LOX* genen in de wortels LOX2 en LOX6. LOX2 vertoonde een hogere promotoractiviteit na 96u blootstelling aan Cu. Op de andere tijdstippen bleef de promotoractiviteit na Cu-stress stabiel (werd ook vast gesteld door Remans et al. [20]). Na 24u was de GUS activiteit bij Zn-stress wel significant hoger dan Cd-blootstelling. Voor LOX6 was de promotoractiviteit na 6u Zn-stress hoger dan bij Cd-stress. Ook was de activiteit van GUS na 96u Zn-stress hoger dan de controle. Dus na 96u blootstelling is LOX2 responsief voor Cu en LOX6 voor Zn.

Remans et al. [20] stelden vast dat het enige significante responsieve lipoxygenase gen in de blaadjes LOX2 was. Deze vertoonde een hogere expressie in planten blootgesteld aan Cu na 24u. In tegenstelling tot Remans et al. [20] werden in deze studie meerdere significante verschillen gevonden in de blaadjes. De promotoractiviteit van de blaadjes na 96u blootstelling was Cu responsief voor LOX1, LOX3 en LOX5. Ook na 24u en 30u blootstelling waren er Cu responsieve reacties voor respectievelijk LOX3 en LOX2. In tegenstelling tot de wortels, vertoonden de blaadjes

ook Cd responsieve reacties voor LOX1, LOX3 en LOX4 respectievelijk na 96u, 30u en 24u. Als laatste is LOX6 Zn responsief na 24u blootstelling.

De activiteit is verschillend voor blaadjes en wortels. Dit heeft verschillende redenen [20]. De stress intensiteit is op de verschillende tijdstippen verschillend. Terwijl de wortels direct worden blootgesteld aan het metaal, de reactie van de blaadjes hangt af van de translocatie van het metaal naar de blaadjes of signalisatie van de blaadjes naar de wortels. De perceptie van de signalisatie in de blaadjes verschilt van de wortels te wijten aan verschillende signalisatie wegen die geïnduceerd worden.

Vermits enkel in LOX3-GUS planten en in LOX5-GUS planten een significant verschil binnen een bepaald tijdstip werd bevestigd, kan men niet spreken over metaalspecifieke signalisatie. De verschillen tussen de promotoractiviteiten bij blootstelling aan de drie metalen zijn niet robuust genoeg. Bovendien is er bij geen enkele LOX-GUS construct een blijvende stijging of daling van de promotoractiviteit over de vijf tijdstippen waar te nemen. Dus de lipoxygenase promotors zijn uiteindelijk geen goede kandidaten voor het bepalen van metaalspecifieke regulaties. Er zou wel naar andere promotors kunnen gekeken worden voor het bestuderen van metaalspecificiteit. Het belangrijkste doel is dan om de DNA-sequentie te bepalen die verantwoordelijk is voor de metaalspecificiteit van de promotor. Dit wordt bereikt door het maken van deletieconstructen. De transcriptionele activiteit van een promotor wordt geregeld door transcriptiefactoren die binden aan specifieke DNA-sequenties van de promotorregio. Deze transcriptiebinding is ook gekend als het cis-acting element. Om te weten welke DNA-sequentie van belang is, worden deleties in de promotor gemaakt. Om informatie te verkrijgen over de functionaliteit van de verwijderde cis-acting elementen, wordt de volledige promotorsequentie vergeleken met de deletievarianten in verschillende stress-situaties veroorzaakt door metalen. Als gevolg daarvan worden DNA-fragmenten verantwoordelijk voor metaalspecifieke regulaties geselecteerd. De LOX-promotors kunnen echter wel gebruikt worden voor andere doeleinden. Zo wil men in de toekomst de signalisatie van oxylipines, afkomstig van lipoxygenase activiteit, bestuderen in de ontwikkeling van de wortels. De promotors van LOX1, LOX3 en LOX5 worden hiervoor gekloneerd, aangezien deze LOXen in de wortels tot expressie komen.

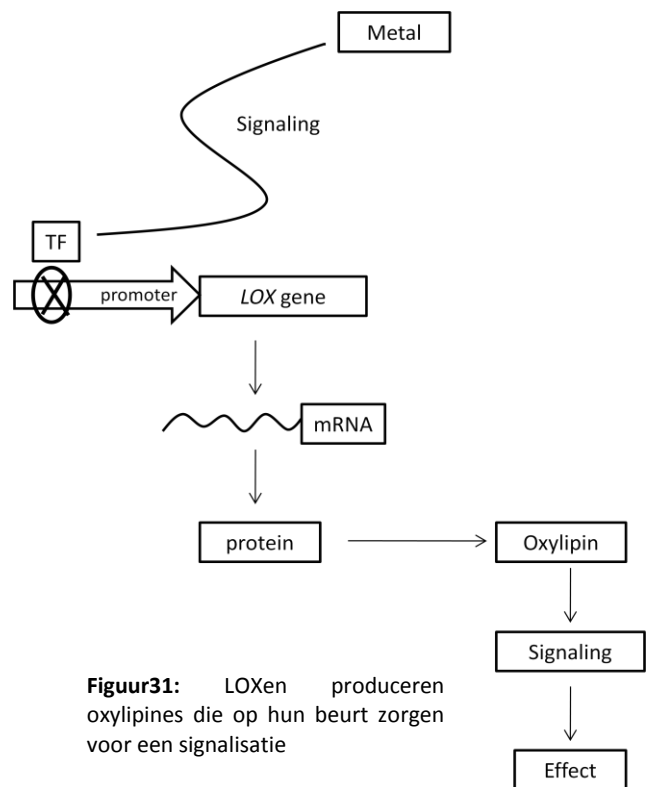
## **4.2 Klonering**

De promotors van LOX1, LOX3 en LOX5 werden gekloneerd in een expressievector met het *LUC* reporter gen. Eerst werden de promotorfragmenten gekloneerd in een entry vector pENTR1A, om pENTR1A-LOX entry clones te produceren. De pENTR1A vector bevat de attL1 en attL2 sites,

waarmee ze kunnen recombineren met de attR1 en attR2 sites van een destination vector, namelijk pBGWL7.0, in de LR reactie om een expressievector te produceren. Tijdens de recombinatie werd het letale *ccdB* gen in de destination vector uitgewisseld met het promotorfragment in de donor vector. De klonering van de LOX3-promotor was gelukt. Hierdoor worden LOX3-LUC constructen ontwikkeld in plaats van LOX3-GUS constructen, waarmee men in deze studie werkte. In de toekomst wil men de signalisatie van oxylipines in de ontwikkeling van de wortels bestuderen. Hiervoor wordt ook een kinetisch experiment op de planten uitgevoerd. Waarom verkiest men dan LOX-LUC constructen boven de LOX-GUS varianten? Een blauwkleuring uitvoeren op LOX-GUS planten werkt destructief in op de plant. Wanneer een spray van het luciferase substraat gespoten wordt op LOX-LUC planten, worden de planten niet vernietigd, waardoor in de tijd meerdere kleuringen op dezelfde plant kunnen gebeuren. Wanneer het *LUC* reporter gen gebruikt wordt, is het proteïne minder stabiel, waardoor het sterkere veranderingen toont na wijziging van de promotoractiviteit. Hierdoor worden veranderingen in promotoractiviteit beter gedetecteerd.

#### **4.3 Toekomstperspectieven**

Naast lipidenperoxidatie zijn LOXen verantwoordelijk voor de productie van oxylipines. Verschillende LOX-isovormen kunnen verschillende oxylipine precursoren creëren, waaronder jasmonaten, wat resulteert in de creatie van verschillende onderliggende signalisatiemechanismen. Kacperska et al. [33] suggereert een potentiële rol voor jasmonaat als belangrijke inter- en intracellulair signaalcomponent bij verdedigingsreacties zoals metaalstress. Bovendien linken Mithöfer et al. [34] ROS en lipidenperoxidatieprocessen en suggereren ze dat de interplay tussen deze processen in verschillende stresscondities een stress-specifieke mix van signalisatiemoleculen creëert die leiden tot stress-specifieke responsen. Op figuur 31 wordt de signalisatie waargenomen bij metaalstress weergegeven. Een metaal veroorzaakt een signaaltransductieweg, wanneer een plant hieraan blootgesteld wordt. Vervolgens wordt een transcriptiefactor geactiveerd en bindt het aan een DNA sequentie in de promotorregio. Als gevolg hiervan zal de expressie van het *LOX* gen veranderen. Dit leidt tot veranderde relatieve hoeveelheid van LOX proteïnen, en op zijn beurt tot verschillende



**Figuur31:** LOXen produceren oxylipines die op hun beurt zorgen voor een signalisatie

oxylipines, wat verschillende downstream effecten kan hebben. Daarom is het interessant om de verzameling van oxylipines te bepalen die geproduceerd worden in wildtype *Arabidopsis thaliana* en mutanten onder zware metaalstress.

## 5 Conclusie

Als reactie van metaalstress veroorzaken *Arabidopsis thaliana* planten oxidatieve stress [9,10,11]. Koper kan als essentieel, redoxactief metaal rechtstreeks ROS induceren en oxidatieve stress veroorzaken. Cadmium daarentegen is een niet-essentieel niet-redoxactief metaal dat oxidatieve stress via indirecte manieren kan induceren. Zink is een essentieel niet-redoxactief metaal dat ook via indirecte mechanismen de redoxbalans verstoort. Oxidatieve stress veroorzaakt schade via oxidatie van verschillende biomoleculen, waaronder de plasmamembranen. Lipidenperoxidatie is een proces dat enzymatisch veroorzaakt wordt door lipoxygenasen [23,25]. Het doel van de studie was om metaalspecifieke regulaties te ontdekken in de promotoractiviteiten van de lipoxygenase genen na blootstelling aan Cd, Cu en Zn. De promotoractiviteiten werden bestudeerd door middel van  $\beta$ -glucuronidase (GUS) constructen [29].

Uit het verificatie-experiment werden maar twee significante verschillen bevestigd. Na 24u blootstelling werd bevestigd dat de promotoractiviteit van de blaadjes van LOX3-GUS planten bij Cu-stress significant hoger was dan de controle. Verder werd in de blaadjes van de LOX5-GUS planten bevestigd dat na 96u blootstelling de promotoractiviteit bij Cu-stress significant hoger was dan bij Cd- en Zn-stress. Vermits niet genoeg resultaten bevestigd werden, kan men niet spreken over metaalspecifieke signalisatie. Bovendien zijn de verschillen tussen de promotoractiviteiten niet robuust genoeg en is er geen blijvende inductie van de promotoractiviteit te zien bij de 6 LOX-GUS constructen na metaalstress.

Lipoxygenasen zorgen voor de productie van verschillende structurele oxylipines. Het is mogelijk dat diverse oxylipines een verzameling van signalisatiemoleculen representeren die deelnemen aan de plasticiteit van de reacties in planten op abiotische of biotische stress [25]. Daarom is het interessant voor het bestuderen van deze signalisatiemoleculen, via lipoxygenase activiteit, in wildtype *Arabidopsis thaliana* en mutanten onder zware metaalstress.

Aangezien men in de toekomst wil kijken naar de invloed van oxylipines in de ontwikkeling van de wortels, werd tijdens deze studie de promotor van LOX1, LOX3 en LOX5 gekloneerd in een expressievector met het *LUC* reporter gen. Hier werd dus gekozen voor het maken van LOX-LUC

constructen in plaats van LOX-GUS varianten, waarmee men in de studie werkte. Wanneer de LOX-LUC planten gekleurd worden, werkt de kleuring niet-destructief in op de plant. Hierdoor kunnen in de tijd meerdere kleuringen op dezelfde plant worden uitgevoerd om een dynamisch beeld te creëren. Bovendien is het LUC proteïne minder stabiel, waardoor het sterkere veranderingen toont na wijziging van de promotoractiviteit. Hierdoor worden veranderingen in promotoractiviteit beter gedetecteerd.



## 6 Referenties

1. Islam E, Yang XE, He ZL, Mahmood Q. Assessing potential dietary toxicity of heavy metals in selected vegetables and food crops. *Journal of Zhejiang Univ Sci B* 2007;8(1):1-13.
2. Lauwerys R, Amery A, Bernard A, Bruaux P, Buchet JP, Claeys F, et al. Health effects of environmental exposure to cadmium: objectives, design and organization of the Cadmibel study: a cross-sectional morbidity study carried out in Belgium from 1985 to 1989. *Environmental health perspectives* 1990; 87: 283-289.
3. Sanita di Toppi L, Gabbriellini R. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, 1999. 41(26): p. 105-130.
4. Nawrot T, Van Hecke E, Thijs L, Richart T, Kuznetsova T, Vangronsveld J et al. 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.
5. Bernard A. Cadmium & its adverse effects on human health. *Indian J Med Res* 2008;128:557-564.
6. Mariët Ticheler. Gezondheidsklachten gevolg van bodemvervuiling met koper en zink. *Meldpunt gezondheid en milieu* 2007;1-2.
7. Cockell KA, Bertinato J en L'Abbé MR. Regulatory frameworks for copper considering chronic exposures of the population. *Am J Clin Nutr* 2008;88:863S-6S.
8. Onosaka S, Tetsuchikawahara N en Min KS. Paradigm shift in zinc: Metal pathology. *Tohoku J Exp Med* 2002;196:1-7.
9. Benavides MP, Gallego SM and Tomaro ML. Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 2005;17(1):21-34.
10. Yruela I. Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 2005;17(1):145-156.
11. Stoyanova Z and Doncheva S. The effect of zinc supply and succinate treatment on plant growth and mineral uptake in pea plant. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 2002;14:111-116.
12. Perfus-Barbeoch L, Leonhardt N, Vavasseur A and Forestier C. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *The Plant Journal* 2002;32:539–548.
13. Lagriffoul A, Mocquot B, Mench M and Vangronsveld J. Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.). *Plant and Soil* 1998;200:241–250.

14. Sanita di Toppi L, Gabbriellini R. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 1999;41(26):105-130.
15. Guo WJ, Meetam M, Goldsbrough PB. Examining the specific contributions of individual *Arabidopsis* metallothioneins to copper distribution and metal tolerance. *Plant Physiology* 2008;146(4):1697-1706.
16. Fargasova A. Phytotoxic effects of Cd, Zn, Pb, Cu and Fe on *Sinapis alba* L. seedlings and their accumulation in roots and shoots. *Biologia plantarum* 2001;44:471-473.
17. Smeets K, Opdenakker K, Remans T, Van Sanden S, Van Belleghem F, Semane B, Horemans N, Guisez Y, Vangronsveld J en 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.
18. Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Science* 2004;9(10):490-498.
19. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 2006;141:312-322.
20. Remans T, Opdenakker K, Smeets K, Mathijsen Dennis, Vangronsveld J en Cuypers Ann. Metal-specific and NADPH oxidase dependent changes in lipoxygenase and NADPH oxidase gene expression in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium or excess copper. *Functional Plant Biology* 2010;in press.
21. Yamasaki H, Pilon M en Shikanai T. How do plants respond to copper deficiency? *Plant Signal Behav* 2008;3(4):231-232.
22. Arora A, Sairim RK, Srivastava GC. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science* 2002;82:1227-1238.
23. Andreou A and Feussner I. Lipoxygenases – Structure and reaction mechanism. *Phytochemistry* (2009), doi:10.1016/j.phytochem.2009.05.008.
24. Catalá A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2006;1482-1495.
25. Liavonchanka A and Feussner I. Lipoxygenases: Occurrence, functions and catalysis. *Journal of Plant Physiology* 2006;163:348-357.
26. Loeffler C, Berger S, Guy A, Durand T, Bringmann G, Dreyer M, et.al. B1-Phytosteranes trigger plant defense and detoxification responses. *Plant Physiol* 2005;137(1):328–340.
27. Porta H and Rocha-Sosa M. Plant Lipoxygenases: Physiological and molecular features. *Plant Physiology* 2002;130:15-21.

28. Mithöfer A, Schulze B and Boland W. Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS Letters* 2004;566:1-5.
29. Vellosillo T, Martinez M, Lopez LA, Vicente J, Cascon T, Dolan L et.al. Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in *Arabidopsis* regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *The Plant Cell* 2007;19:831–846.
30. Gamborg O; Miller R and Ojima K. Nutrient requirement suspensions cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 1968;50:151-158.
31. Jefferson RA. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter* 1987;5:387-405.
32. Skórzynska-Polit E en Krupa Z. The activity of lipoxygenase in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh – a preliminary study. *Cellular and molecular biology letters* 2003;8(2):279-284.
33. Kacperska A. Sensor types in signal transduction pathways in plant cells responding to abiotic stressors: do they depend on stress intensity? *Physiologia Plantarum*, 2004. 122: p. 159-168.
34. Mithöfer A, Schulze B en Boland W. Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS Letters* 2004;566:1-5.

## Bijlage

### Bijlage 1

Het groeimedium werd bereid aan de hand van stockoplossingen van macronutriënten, micronutriënten en ijzer (zie tabel 1, 2 en 3). Bij 850 ml milliQ water werden 80 ml macronutriënten, 4 ml micronutriënten, 4 ml ijzer en 2 g MES gevoegd. De pH werd op 5,7-5,8 gebracht met KOH. Daarna werd het volume aangelengd met milliQ water tot 1000 ml. Hierna nam men vier flessen van één liter en deed men in elke fles 250 ml groeimedium en 750 ml milliQ water. Als laatste werd er 5 g/l sucrose en 10 g/l agar toegevoegd.

Stockoplossingen:

**Tabel 1: Macronutriënten**

<b>50x Macronutriënten</b>	<b>mg/l</b>	<b>Finale concentratie in mM B5/50</b>
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	134	0.02
$\text{MgSO}_4$	122.09	0.02
$\text{CaCl}_2$	113.24	0.02
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	169.5	0.02
$\text{KNO}_3$	2500	0.49

**Tabel 2: Micronutriënten**

<b>100x Micronutriënten</b>	<b>mg/l</b>	<b>Finale concentratie in <math>\mu\text{M}</math> B5/50</b>
$\text{H}_3\text{BO}_3$	60	0.970
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	200	1.183
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	100 ml 1mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (vloeistof)	0.100
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	40	0.139
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2 ml 10.3 mM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (vloeistof)	0.021
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2 ml 1.03 mM $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (vloeistof)	0.002
KI	2 ml 45 mM KI (vloeistof)	0.090

**Tabel 3: Ijzer**

<b>1000x Ijzer</b>	<b>mg/100 ml</b>	<b>Finale concentratie in mM B5/50</b>
$\text{FeNO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	80.8	0.002

## Bijlage 2

### Voorbereiding

#### GUS proteïne-extractiebuffer (EB)

500 ml extractiebuffer:

Maatcilinder (500ml) vullen tot 350 ml.

Toevoegen:

- 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA (E010) → 1.8612 g/500 ml

$$\begin{array}{ccc} 1\text{M} = 372.24 \text{ g/l} & \xrightarrow{\text{: } 100} & 10 \text{ mM} = 3.7224 \text{ g/l} \\ & & \downarrow \text{: } 2 \\ & & 1.8612 \text{ g/500 ml} \end{array}$$

- 50 mM Na-Fosfaat buffer op pH 7.00

Nieuwe maatcilinder (1l):

- 0.2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (N023) → 31.202 g/l  
 $1\text{M} = 156.01 \text{ g/l} \xrightarrow{\text{: } 5} 0.2\text{M} = 31.202 \text{ g/l}$
- 0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (N039) → 35.598 g/l  
 $1\text{M} 177.99 \text{ g/l} \xrightarrow{\text{: } 5} 0.2\text{M} = 35.598 \text{ g/l}$

→ pH 7: 39.0 ml NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 61.0 ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
Voeg toe aan de maatcilinder van 500 ml.

- Check pH 7.0 en corrigeer met KOH of HCl.
- Leng aan tot 500 ml
- 0.1% sodium lauryl sarcosine (L004) → 0.5 g/500 ml

$$0.1 \text{ g/100 ml} \xrightarrow{\text{x } 5} 0.5 \text{ g/500 ml}$$

- 0.025% Triton X-100 (T021) → 125 µl/500 ml

Opletten: Triton X-100 is een visceuze vloeistof. Nauwkeurig pipetteren met een afgeknipte 1000 µl tip en de buitenkant schoonvegen.

$$25 \text{ µl/100ml} \xrightarrow{\text{x } 5} 125 \text{ µl/500 ml}$$

- 0.07% B-mercaptoethanol → achteraf pas toevoegen

⇒ 7 µl β-mercaptoethanol / 10 ml extractiebuffer = EB

Extractiebuffer (500 ml) zonder β-mercaptoethanol wordt bewaard in de frigo voor max 4 weken.

### MUG-Assaybuffer voor 80 stalen

30 ml:

- 18 ml extractiebuffer (+ 21  $\mu$ l  $\beta$ -mercaptoethanol)
- 20% methanol  $\rightarrow$  6ml  
 $20/100 \times 30 = 6$
- 6 ml MUG 20 mM (\*)  

20 mM	$\xrightarrow{5x}$	4 mM FINAL
6 ml	$\xrightarrow{\quad}$	30 ml

(\*) 20 mM MUG:

SIGMA 250 mg

MW = 352.29 g/mol

Mol/g =  $1/352.29 \times 250/1000$  (per 250 mg) = 0.00070964 mol/250mg

$\rightarrow \times 1000$  (mmol) = 0.70964 mmol per 250mg

20mM = 20 mmol/l = 20 mmol/1000ml

= 1 mmol per 50 ml

$\rightarrow \times 0.70964$

= 0.70964 mmol per 35.482ml

= 4ml DMSO + 31.482ml EB

$\rightarrow$  23 buisjes 20mM MUG van 1.5ml bewaren we in de diepvriezer

De assaybuffer wordt niet bewaard en bij elke meting wordt er opnieuw 30 ml gemaakt.

### BSA

BSA in labo afgewogen: 100 mg/10 ml EB

Verdelen in 10 buisjes van 1 ml (10 mg/ml BSA stocks) en invriezen op  $-20^{\circ}\text{C}$  (1 stockje is genoeg voor 1 keer twee BSA verdunningsreeksen hieronder)

De verdunningsreeks wordt gemaakt in epjes van 1.5 ml:

*De lage BSA concentraties:*

BSA 250, 200, 150, 100, 50, 25 en 0  $\mu\text{g/ml}$ .

Starten met 10 mg/ml. Deze verdunnen tot 500  $\mu\text{g/ml}$ : 80  $\mu\text{l}$  van 2000  $\mu\text{g/ml}$  BSA + 1520  $\mu\text{l}$  EB

$\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$ BSA	EB
250	500 $\mu\text{l}$	500 $\mu\text{l}$
200	400 $\mu\text{l}$	600 $\mu\text{l}$
150	300 $\mu\text{l}$	700 $\mu\text{l}$
100	200 $\mu\text{l}$	800 $\mu\text{l}$
50	100 $\mu\text{l}$	900 $\mu\text{l}$
25	50 $\mu\text{l}$	950 $\mu\text{l}$
0	0 $\mu\text{l}$	1000 $\mu\text{l}$

De hoge BSA concentraties:

BSA 2000, 1500, 1000, 800, 600, 400, 200 en 0 µg/ml.

Starten met 10 mg/ml BSA.

µg/ml	10 mg/ml BSA	EB
2000	200 µl	800 µl
1500	150 µl	850 µl
1000	100 µl	900 µl
800	80 µl	920 µl
600	60 µl	940 µl
400	40 µl	960 µl
200	20 µl	980 µl
0	0 µl	1000 µl

40 mM MU → maken we als stockoplossing

MW = 198.2 g/mol = 1M

1 mM = 198.2 mg/l

→ 40 mM: dus x40

40 mM = 7928 mg/l

→ 10 ml nodig: 40 mM = (7928 mg/l)/100  
= 79.28 mg/10 ml

Het is moeilijk om 79.28 mg juist af te wegen: Men weegt bijvoorbeeld 80.5 mg.

Dan moet het volume ook aangepast worden (met de regel van 3).

$$\begin{array}{lcl}
 79.28 \text{ mg} & \xrightarrow{: 79.28} & 0 \text{ mg} & \xrightarrow{\times 80.5} & 80.5 \text{ mg} \\
 10 \text{ ml} & \xrightarrow{\hspace{1.5cm}} & 0.126 \text{ ml} & \xrightarrow{\hspace{1.5cm}} & 10.15 \text{ ml} \\
 & & & & = 2 \text{ ml DMSO} + 8.15 \text{ ml EB}
 \end{array}$$

Nodig: 400 µM

40 mM → 1 mL + 9 mL EB → 4 mM

→ 1 mL + 9 mL EB → 400 µM

De verdunningsreeks wordt gemaakt in 2ml buisjes vertrekkende van 400 µM MU:

µM	400 µM MU (in µl)	EB (in µl)
200	1000	1000
150	750	1250
100	500	1500
50	250	1750
25	125	1875
10	50	1950
5	25	1975
0	0	2000

Verdunningsreeks 1x gebruiken.

De 40 mM en 4 mM MU kristalliseert, daarom wordt de 400 µM verdunning ervan bewaard, voor maximum een week in de frigo in 15 ml buisje met aluminiumfolie er rond. Hieruit kan de verdunningsreeks elke dag opnieuw gemaakt worden.

### Biorad

= kleurreagens (kleurt proteïnen)

4x verdunnen: 15 ml dH<sub>2</sub>O + 4 ml Biorad

### Extractie

80 stalen van wortel of blad. Stalen die vergeleken moeten worden op dezelfde dag extraheren en meten.

2 min shredden en buisjes terug in de vloeibare stikstof brengen

350 µl EB (+ β-ME) toevoegen aan bevroren poeder

Vortex tot ontdooid, en dan nog even verder vortexen (30 s-1 min), gebruik eventueel de 24-buisjes-vortexer

15 min op ijs

**Nu even tijd om BSA standaard reeksen te maken**

Vortex

5 min centrifugeren op 4°C op maximale snelheid (13200)

Een gelijke hoeveelheid supernatans van 315 µl voor elk staal afpipetteren en in een nieuw epje doen

**Deze buisjes kunnen vooraf gelabeld worden zodat je enkel moet overpipetteren**

### Meting van proteïne concentratie

Een doorschijnende microplaat (1 plaat):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BSA	BSA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
B	BSA	BSA	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
C	BSA	BSA	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
D	BSA	BSA	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
E	BSA	BSA	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
F	BSA	BSA	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
G	BSA	BSA	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
H	Blanco EB	Blanco EB	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80

- **Kolom 1:**  
10 µl BSA 250, 200, 150, 100, 50, 25 en 0 µg/ml.
- **Kolom 2:**  
10 µl BSA 2000, 1500, 1000, 800, 600, 400, 200, 0 µg/ml.
- H1 en H2: blanco: 10 µl EB
- In A3-H12: 10 µl proteïne-extract
- Overall 200µl Biorad toevoegen
- 10 minuten incuberen op kamertemperatuur



Computer:

Plaat in toestel zetten: Omega →  $\lambda$  595

Plaat lezen via Biorad protein assay.

Standaardcurve maken met wizardfunctie:

Wizard: use blank corrected

lineair regression fit

**Kolom 1:** lineair-lineair

**Kolom 2:** X-logaritmisch-Y-lineair

Gegevens van de microplaat exporteren naar Excel. We willen uiteindelijk alles op dezelfde concentratie brengen, dus wordt er berekend hoeveel EB er nog moet worden toegevoegd bij het staal.

### MUG-assay

Vier zwarte microplaten:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	MIN
A	200 $\mu$ M MU	200	Pr Extr 1	Pr Extr 2	Pr Extr 3	Pr Extr 4	Pr Extr 5	Pr Extr 6	Pr Extr 7	Pr Extr 8	Pr Extr 9	Pr Extr 10	0
B	150	150	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15/30
C	100	100	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	30/60
D	50	50	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	45/90
E	25	25	Pr Extr 11	Pr Extr 12	Pr Extr 13	Pr Extr 14	Pr Extr 15	Pr Extr 16	Pr Extr 17	Pr Extr 18	Pr Extr 19	Pr Extr 20	0
F	10	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	15/30
G	5	5	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	30/60
H	0	0	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	45/90

- MUG assaybuffer in oventje leggen op 37°C
- In kolom 1 en 2: 150  $\mu$ l van de verdunningsreeks van MU (Rij H is blanco = 0  $\mu$ M MU)
- In A3-H12: 75  $\mu$ l proteïne-extract in 4-voud (4 tijdstippen)
- 75  $\mu$ l assay buffer toevoegen aan A3-H12
- Onmiddellijk 50  $\mu$ l 0.2M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 9.6 in kolom 1 en 2 (Stop buffer en maximale fluorescentie).  
En ook in rij A3-A12 en rij E3-E12 (= tijdstip 0 min)
- Platen in oventje zetten op 37°C

#### **BLADSTALEN:**

- Na 15 min: stop buffer in B3-B12 en F3-F12
- Na 30 min: stop buffer in C3-C12 en G3-G12
- Na 45 min: stop buffer in D3-D12 en H3-H12  
-->Telkens de platen opnieuw in het oventje zetten op 37°C

#### **WORTELSTALEN:**

- Na 30 min: stop buffer in B3-B12 en F3-F12
- Na 60 min: stop buffer in C3-C12 en G3-G12
- Na 90 min: stop buffer in D3-D12 en H3-H12  
-->Telkens de platen opnieuw in het oventje zetten op 37°C

Plaat lezen via MUG assay: ex. 355, em. 460

Standaardcurve met wizardfunctie: lineair regression fit

lineair-lineair  $\mu$ M MU/min

Slope in Excel berekenen: nmol MU/min/mg proteïne

### Bijlage 3

Gelelektroforese:

In dit experiment wordt er met de small gel gewerkt.

De small gel bestaat uit:

- 50 ml 1x TAE-buffer
- 0.5 g agarose (1%)

a. 50x TAE-buffer:

242 g Tris

57.1 ml azijnzuur

37.2 g EDTA (MW 372)

b. b. 1x TAE-buffer:

20 ml 50x TAE-buffer

980 ml dH<sub>2</sub>O

c. c. 20x agarose loading dye (1  $\mu$ l / staal):

2 ml glycerol

7.5 mg bromophenolblue

6.7 mg EDTA

8 ml dH<sub>2</sub>O

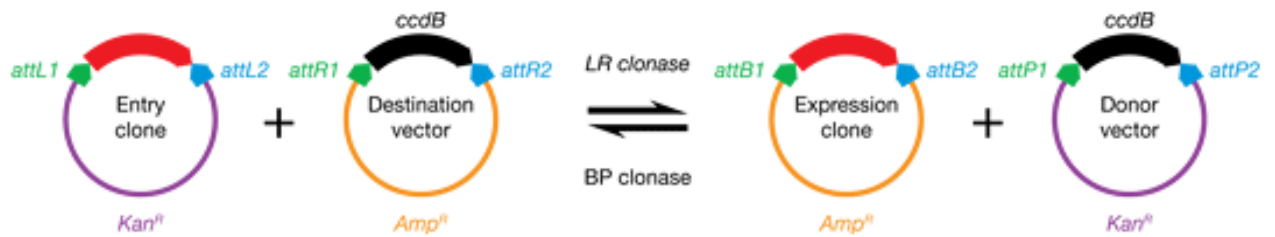
Nadat er 0.5 g agarose werd toegevoegd aan 50 ml 1x TAE buffer, zette men het een 50-tal seconden in de microgolf, totdat het agarose in de buffer goed opgelost is. Vervolgens werd de gel in een bakje gegoten. Wanneer de gel gestold was, plaatste men de gel in een grotere bak. Er werd 1x TAE-buffer over de gel en in de bak gegoten, zodat de gel onder de vloeistof lag. Hierna bracht men 5  $\mu$ l ladder aan op de gel. Bij de stalen, die de PCR-reactie ondergaan hadden, werd 5  $\mu$ l loading buffer toegevoegd, waarna  $\pm$  40  $\mu$ l van elk staal op de gel werd aangebracht. De gel liet men gedurende een uur lopen op 80 Volt.

## Bijlage 4

Tabel 7: Ligatiereactie

	LOX3 (in $\mu$ l)	LOX5 (in $\mu$ l)	Controle (in $\mu$ l)
RNAse-vrij water	5	5	13
Ligatiebuffer	4	4	4
pENTR1A vector	2	2	2
PCR fragment	8	8	/
DNA ligase	1	1	1
Totaal	20	20	20

## Bijlage 5



Figuur 6: Gateway® LR Clonas

## Auteursrechtelijke overeenkomst

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

**Metaalspecifieke regulaties in de promotoractiviteit van de lipoxygenase genen in Arabidopsis thaliana**

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,

**Bielen, An**

Datum: **15/06/2010**