

2010
2011

GENEESKUNDE

master in de biomedische wetenschappen: milieu en gezondheid

Masterproef

De invloed van glutathion op de verdediging tegen cadmium-geïnduceerde oxidatieve stress in Arabidopsis thaliana.

Promotor :
Prof. dr. Ann CUYPERS

Promotor :
prof. dr. L. HERNANDEZ

Dirk Meysen

Masterproef voorgedragen tot het bekomen van de graad van master in de biomedische wetenschappen, afstudeerrichting milieu en gezondheid

De transnationale Universiteit Limburg is een uniek samenwerkingsverband van twee universiteiten in twee landen:
de Universiteit Hasselt en Maastricht University

universiteit
hasselt

UNIVERSITEIT VAN DE TOEKOMST



Maastricht University

Universiteit Hasselt | Campus Diepenbeek | Agoralaan Gebouw D | BE-3590 Diepenbeek
Universiteit Hasselt | Campus Hasselt | Martelarenlaan 42 | BE-3500 Hasselt



Maastricht University

universiteit
hasselt

UNIVERSITEIT VAN DE TOEKOMST

2010
2011

GENEESKUNDE

master in de biomedische wetenschappen: milieu en gezondheid

Masterproef

De invloed van glutathion op de verdediging tegen cadmium-geïnduceerde oxidatieve stress in Arabidopsis thaliana.

Promotor :
Prof. dr. Ann CUYPERS

Promotor :
prof. dr. L. HERNANDEZ

Dirk Meyssen

Masterproef voorgedragen tot het bekomen van de graad van master in de biomedische wetenschappen, afstudeerrichting milieu en gezondheid

Senior practical training:

De invloed van glutathion op de verdediging tegen cadmium-geïnduceerde oxidatieve stress in *Arabidopsis thaliana*.

Periode: 16 november 2010 – 19 augustus 2011

Meyssen Dirk (0624331)

2^{de} master Biomedische wetenschappen

Milieu en Gezondheid

Promotor (intern): Prof. Dr. Cuypers Ann

Promotor (extern): Prof. Dr. Hernandez Luiz

Begeleider: Jozefczak Marijke

Faculteit: Wetenschappen

Onderwijsinstelling: Centrum voor Milieukunde

Onderzoeksgroep: Milieubiologie

Academische instelling: Universiteit Hasselt

Diepenbeek, België

School voor levenswetenschappen

transnationale Universiteit Limburg

Inhoudsopgave

Voorwoord	1
Lijst met afkortingen	2
Samenvatting.....	3
1 Inleiding.....	5
1.1 Toxische effecten van cadmium in mensen	5
1.2 Cadmium in planten	6
1.2.1 Opname, transport en opslag van cadmium.....	6
1.2.2 Effecten van cadmium in planten.....	7
1.3 Oxidatieve stress	7
1.3.1 Pro-oxidanten.....	7
1.3.2 Anti-oxidanten.....	10
1.4 Glutathion.....	11
1.5 Genexpressie onder metaalstress	12
1.6 Objectieven	14
2 Materiaal en methoden	15
2.1 Plantenmateriaal en groeicondities	15
2.1.1 Plantcultuur op agarplaten.....	15
2.1.2 Hydrocultuur	16
2.2 Metingen van lipidenperoxidatie	16
2.3 Thiol derivatisatie	16
2.4 Genexpressie	17
2.5 Enzymmetingen.....	18
2.6 Statistische analyse	19
3 Resultaten.....	21
3.1 Effect van Cd op de wortelgroeilengte.....	21
3.2 Thiol derivatisatie	22
3.3 Meting van lipidenperoxidatie	24
3.4 Enzymmetingen.....	24
3.5 Genexpressie	26
3.5.1 Genexpressie in de wortel.....	26
3.5.2 Genexpressie in het blad	26
4 Discussie	29

4.1	De invloed van glutathion op de cadmiumsensitiviteit van <i>Arabidopsis thaliana</i> en de complexatie van vrije Cd-ionen.....	29
4.2	De invloed van glutathion op oxidatieve stress parameters met een focus op de SOD regulatie bij Cd stress.....	31
4.3	Toekomstperspectieven.....	33
4.4	Synthese.....	34
5	Referenties.....	35

Voorwoord

Bloed, zweet, drie computers en veel tijd heeft het gekost om deze thesis te maken. Natuurlijk had ik dit niet alleen kunnen afronden maar heb ik kunnen rekenen op verschillende mensen, die ik bij deze dan ook wil bedanken. In de eerste plaats wil ik graag professor dr. Ann Cuypers bedanken voor de mogelijkheden die zij mij geschonken heeft. Eerst en vooral legde zij de contacten met het labo in Madrid maar nog meer wil ik haar bedanken voor het aanmoedigen en steunen om deze unieke kans te grijpen. Daarnaast wil ik ook mijn begeleidster Marijke Jozefczak heel hard bedanken omdat zij de persoon was bij wie ik dagelijks terecht kon voor hulp, vragen of besprekingen. Ook voor haar enthousiasme, geduld en positieve moed wanneer het nodig was verdient zij alle lof. Verder wil ik professor dr. Luiz E. Hernandez en Juan Sorbrino bedanken voor het opvangen in het labo in Madrid, de begeleiding in het labo en het wegwijzen in de Spaanse levensstijl. Dr. Henk Schat wil ik bedanken voor de in Amsterdam uitgevoerde metingen. Verder wil ik ook alle collega studenten en doctoraatstudenten, zowel in Madrid als Diepenbeek, bedanken voor de aangename babbels, interesse in mijn project en bemoedigende woorden als het nodig was. Ook wil ik de mensen die buiten het labo altijd voor me klaarstonden bedanken. Op de eerste plaats mijn ouders, broers en zus , voor de mogelijkheden die ze mij gegeven hebben maar nog meer voor de steun, moeite en energie die zij altijd opbrengen voor mij. Ook Charlotte wil ik bedanken voor haar ijzere geduld (vooral) in de laatste weken, luisterend oor en optimisme. Tenslotte bedank ik alle vrienden uit Diepenbeek en Eksel om mijn studententijd onvergetelijk te maken.

Lijst met afkortingen

APx	ascorbaatperoxidase
AsA	ascorbaat
Ca	calcium
CAT	catalase
Cd	cadmium
CSD	koper/zink-superoxidedismutase
Cu	koper
DHA	dehydroascorbaat
DHAR	dehydroascorbaatreductase
Fe	ijzer
FSD	ijzer-superoxidedismutase
GR	glutathionreductase
GSH	glutathion
GSSG	glutathiondisulfide
H ₂ O ₂	waterstofperoxide
LOX	lipoxygenase
mBrB	monobromobimaan
MDHA	monodehydroascorbaat
MDHAR	monodehydroascorbaatreductase
miR	microRNA
O ₂	zuurstof
O ₂ ^{•-}	superoxide
¹ O ₂	singlet zuurstof
°OH	hydroxylradicaal
PC	fytochelatine
PCS	fytochelatine synthase
ROS	reactieve zuurstofvormen
SOD	superoxidedismutase

Samenvatting

De industriële evolutie, aan het begin van de 20^{ste} eeuw, deed de vraag en het gebruik van zware metalen in de staalnijverheid en mijnbouw stijgen met als gevolg meer verontreiniging in de omgeving. Verschillende gebieden dragen deze historische vervuiling nog steeds met zich mee. De lage cadmium (Cd) concentraties kunnen bioaccumuleren en ernstige gevolgen hebben voor zowel planten, dieren als mensen. Hoewel Cd niet redox-actief is, zal oxidatieve stress één van de belangrijkste effecten van Cd zijn. Oxidatieve stress wordt gedefinieerd als een verstoring van de cellulaire redox balans tussen pro- en anti-oxidanten, in het voordeel van de pro-oxidanten en kan leiden tot schade of signalisatie. Om schade te beperken of de redox balans te controleren is er het antioxidatief verdedigingsysteem. De antioxidatieve metaboliet glutathion (GSH) zal zowel optreden als Cd scavenger en als belangrijk onderdeel in de ascorbaat-glutathion cyclus.

In deze studie werd de invloed van de antioxidatieve metaboliet GSH op de Cd-geïnduceerde oxidatieve stress in *Arabidopsis thaliana* bestudeerd. Naast het wildtype *col-0* werd gebruik gemaakt van GSH-deficiënte mutanten *cad2-1*, *pad2-1* en *rax1-1*. De gevolgen voor groei, Cd complexering en oxidatieve stress parameters werden onderzocht in *A. thaliana* zaailingen na blootstelling aan 5 µM Cd gedurende 24 u in alle genotypes.

De *cad*-mutant vertoonde reeds onder controle omstandigheden een verminderde groei, maar in alle genotypen werd de groei dosis-afhankelijk geïnhibeerd bij een stijgende Cd concentratie. Fytochelatines (PC's) zijn polypeptiden gebouwd met GSH als substraat en zijn omwille van de talrijke aanwezigheid van cysteïnes belangrijke liganden om Cd te complexeren in de cel en zo de metaalhomeostase te bewaren. Na een behandeling met Cd werden er in alle genotypes PC's gevormd, maar de PC productie was lager in GSH-deficiënte mutanten in vergelijking met het wildtype omdat het initieel GSH gehalte veel lager ligt. Een fysiologische parameter voor oxidatieve stress is de lipidenperoxidatie, waar er geen significante verschillen werden waargenomen noch tussen de verschillende genotypen, noch na Cd blootstelling. De verminderde aanwezigheid van GSH wordt gecompenseerd door een verhoging in andere antioxidatieve enzymen zoals catalase (CAT) en glutathionreductase (GR). Bovendien reguleren de GSH-deficiënte mutanten de SOD expressie verschillend als in *col-0* met voornamelijk een verhoging van de transcriptiesnelheid van koper/zink-SOD genen. Op deze manier wordt de negatieve regulatie van de Cd-geïnduceerde miR398's beperkt. Bij een gebrek aan GSH worden onmiddellijk alternatieve antioxidatieve mechanismen aangeschakeld in *A. thaliana* zaailingen na Cd-blootstelling. Hieruit kan besloten worden dat GSH betrokken is in de regulatie van Cd-geïnduceerde oxidatieve stress.

1 Inleiding

Zware metalen worden gedefinieerd als een groep elementen met een dichtheid groter dan 5 g/cm³. Deze elementen, bijvoorbeeld lood (Pb), kwik (Hg) en cadmium (Cd), komen in de vorm van metaalertsen voor in de aardkorst, water en lucht. De industriële evolutie, aan het begin van de 20^{ste} eeuw, deed de vraag naar zware metalen stijgen met een verhoogde uitstoot van zware metalen in de biosfeer tot gevolg. Belangrijke bronnen van antropogene vervuiling zijn de staalnijverheid en mijnbouw. Verschillende gebieden dragen deze historische vervuiling nog steeds met zich mee. Cadmium (Cd) komt in lage concentraties (1 mg/kg droog gewicht) voor in de aardkorst (1). De uitstoot van zinksmelterijen in het noorden van de Belgische Kempen hebben echter voor een lokaal verhoogde concentratie (0,5-24 mg/kg droog gewicht) gezorgd (1). Vanuit de bodem kunnen Cd en andere zware metalen naar het grondwater lekken en in het drinkwater terecht komen. Bovendien kan Cd vanuit de bodem opgenomen worden door planten en dieren waardoor het in de voedselketen terechtkomt. Op deze manier wordt de populatie aan Cd blootgesteld via de orale route. Sigarettenrook of vervuild opgewaaid stof kunnen ook metaalpartikels bevatten en vormen een extra risico (2). Ondanks het inzicht in de nefaste gevolgen van Cd en samen met de verstrengde milieuwetgeving die zorgden voor een vermindering in gebruik van schadelijke metalen, blijft Cd in de voedselketen voorkomen. Het grote gevaar is dat kleine Cd concentraties kunnen bioaccumuleren en ernstige gevolgen hebben voor zowel planten, dieren als mensen.

1.1 Toxische effecten van cadmium in mensen

De opname van Cd in het lichaam hangt af van de blootstellingswijze. De opname via inhalatie wordt geschat op ongeveer 30 tot 60% terwijl de gastro-intestinale opname slechts 5% bedraagt (2). De absorptie is afhankelijk van de partikelgrootte, de oplosbaarheid van het molecuul en de duur van de blootstelling. Acute effecten van Cd blootstelling zijn ademhalingsproblemen, abdominale pijn en spierpijn. Eens opgenomen ondergaat Cd slechts weinig metabolische veranderingen maar zal het bindingen aangaan met verschillende proteïnen. Primair zal Cd opgeslagen worden in de lever en de nieren. Verder kan ongebonden Cd vrij voorkomen in het bloed en essentiële elementen zoals bijvoorbeeld calcium (Ca) in het bot vervangen. Door de lange halfwaardetijd van Cd in het lichaam van 20 tot 40 jaar is de excretie van Cd slechts zeer minimaal en is de Cd concentratie in de urine een goede maat om de levenslange blootstelling aan Cd te schatten (2). Tevens zorgt deze lange halfwaardetijd voor chronische effecten zoals osteoporose, nierfalen en vermoedelijk zelfs carcinogene effecten (3). De ernstige gezondheidseffecten geven aan dat de blootstelling aan Cd zo laag mogelijk gehouden moet worden.

1.2 Cadmium in planten

Omdat de fysiologische grens tussen deficiëntie en toxiciteit van micronutriënten zeer klein is beschikken planten over een metaalhomeostase netwerk. Dit netwerk bestaat uit fysiologische en moleculaire mechanismen die fluctuaties in essentiële transitie metalen, zoals koper (Cu), aanpassen maar ook verdedigen tegen verhoogde concentraties van niet-essentiële metalen, zoals Cd, die schade kunnen aanrichten.

1.2.1 Opname, transport en opslag van cadmium

De opname van Cd door planten wordt sterk gereguleerd door zijn concentratie in de bodem en de biobeschikbaarheid. Dit laatste wordt bepaald door zowel de omgeving als de eigenschappen van het metaalpartikel. De belangrijkste abiotische factoren van de biobeschikbaarheid zijn de pH van de omgeving, de oplosbaarheid in water, de redoxpotentiaal, de temperatuur en de concentratie van andere elementen (4, 5). Wortels kunnen de beschikbaarheid van essentiële metaalionen, zoals ijzer (Fe^{2+}), koper (Cu^{2+}), zink (Zn^{2+}) en calcium (Ca^{2+}), verhogen door de rhizosfeer te verzuren met behulp van membranaire protonen-pompen en de actieve secretie van “low molecular weight” (LMW) componenten (4). Verder zorgt een negatieve membraanpotentiaal voor een drijvende kracht voor de opname van verschillende kationen. De blootstelling en metaalaccumulatie in planten wordt bepaald door de activiteit van de opname en de efficiëntie van de translocatie in de plant. Mobilisatie en transport van ionen langs de plasmamembraan is de eerste stap in de opname van metalen. Planten bezitten geen specifiek opnamemechanisme voor Cd aangezien het niet essentieel is voor de plant. Door de sterke gelijkenis met andere kationen, zoals Ca^{2+} , magnesium (Mg^{2+}), Zn^{2+} , zal Cd^{2+} in competitie treden voor dezelfde transmembranaire carriers van deze essentiële ionen. Eens getransporteerd over de plasma membraan ontstaan er Cd-ligand complexen door de binding met LMW liganden en functionele groepen van macromoleculen. Cd heeft een sterke affiniteit voor thiolgroepen (SH). Dit maakt glutathion (GSH)-, met zijn SH groep op het cysteïne, en GSH-afgeleide polypeptiden zoals fytochelatines (PC's), de belangrijkste cytosolaire bindingspartners. Voor het transport naar de bovengrondse delen van de plant moet het xyleem bereikt worden waarvoor verschillende factoren verantwoordelijk zijn. De activiteit van metaal sekwestrerende pathways in de wortelcellen, de beschikbaarheid en mobiliteit van het metaal en de radiale passage door de wortelcortex, endodermis en de opname in het xyleem zijn belangrijk (4). Toch zal de concentratie van Cd in de wortels groter blijven dan in de bovengrondse gedeelten aangezien Cd in de meeste omgevingscondities via de wortels binnendringt (6).

1.2.2 Effecten van cadmium in planten

De opname van toxische elementen, zoals Cd, in de planten heeft gevolgen op verschillende niveaus. Morfologische kenmerken van blootstelling aan Cd zijn groei-inhibitie en bladchlorose (vergeling van de bladeren door een tekort aan nutriënten). De chlorose wordt veroorzaakt door directe en indirecte effecten van Cd met bv. Mg aanwezig in chlorofyl (bladgroen) van het blad (7). Daarnaast worden ook verschillende fysiologische processen verstoord waaronder de waterbalans, de opname en het transport van verschillende nutriënten (Ca, Mg en kalium (K)), de fotosynthese en de stomatale opening (4). Hoewel Cd niet redox-actief is, zal oxidatieve stress één van de belangrijkste effecten van Cd zijn. Oxidatieve stress kan aanleiding geven tot een verhoogde productie van gedeeltelijke gereduceerde of geactiveerde vormen van zuurstof (O_2) en zijn derivaten (8, 9). Deze reactieve zuurstof species (ROS) veroorzaken de negatieve gevolgen in de cel waaronder schade aan het DNA, lipidenperoxidatie, oxidatie van aminozuren in proteïnen en bijgevolg het inactiveren van specifieke enzymen. Naast negatieve gevolgen is ROS ook zeer belangrijk bij oxidatieve signaaltransductie. Het is dus van belang om de cellulaire redox-balans die bestaat uit pro- en anti-oxidanten onder controle te houden.

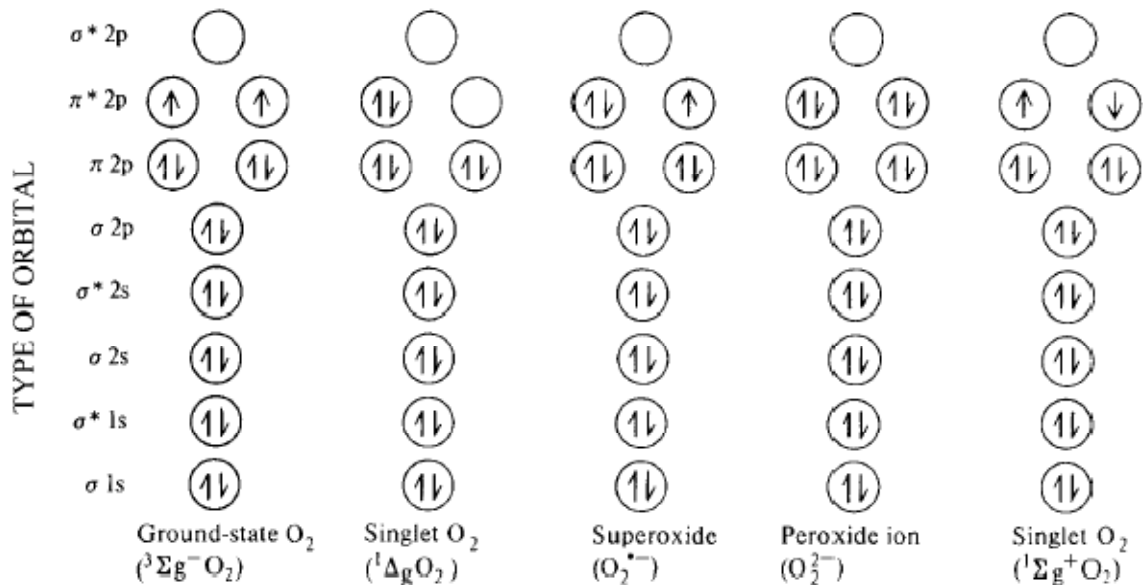
1.3 Oxidatieve stress

Door de complexe interacties tussen Cd ionen en het metabolisme zijn er een divers aantal cellulaire responsen mogelijk in de celorganellen. Op het cellulair niveau induceert Cd oxidatieve stress wat tot fysiologische effecten kan leiden. Oxidatieve stress wordt gedefinieerd als een verstoring van de cellulaire redox balans tussen pro- en anti-oxidanten, in het voordeel van de pro-oxidanten. De balans wordt mede bepaald door de fysiologische conditie van de plant en de integratie van verschillende parameters zoals omgeving, ontwikkeling- en/of biochemische stimuli. De belangrijkste componenten van oxidatieve stress zijn de vorming van ROS enerzijds en de ROS-scavengers anderzijds.

1.3.1 Pro-oxidanten

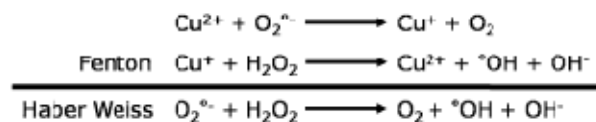
Pro-oxidanten kunnen oxidatieve stress induceren door het produceren van ROS of het inhiberen van antioxidatieve systemen. ROS is een algemene omschrijving die zuurstofradicalen en niet-radicalen derivaten van zuurstof bevat (8, 9). Ze worden onder normale omstandigheden geproduceerd in celorganellen met een hoge oxiderende metabole snelheid of met een sterk oxiderende capaciteit, zoals de elektrontransportketen, en zijn zeer reactief. In de grondtoestand, de meest stabiele vorm, bevat O_2 twee ongepaarde elektronen met eenzelfde spin (Figuur 1). Hierdoor kan O_2 slechts met één elektron per keer reageren. Door deze spinrestrictie kent O_2 een lage reactiviteit met de meeste niet-radicalen.

De meest reactieve O₂ vorm, singlet zuurstof (¹O₂), ontstaat door een toevoeging van energie uit bijvoorbeeld zonlicht waardoor de spinrestrictie wordt opgeheven. De herschikking van de elektronen zal tot gevolg hebben dat het oxiderend vermogen sterk toeneemt.



Figuur 1: Een vereenvoudigde voorstelling van de elektronenverdeling van het diatomair zuurstofmoleculen en zijn afgeleiden (8).

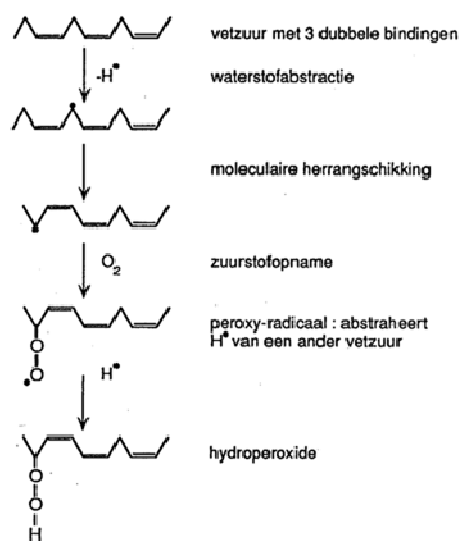
Indien één elektron in plaats van energie wordt aangeboden aan O₂, zal het superoxide anion (O₂^{•-}) gevormd worden. Bijkomende toevoeging van een elektron levert het peroxide ion (O₂²⁻) op wat in de cel voorkomt als waterstofperoxide (H₂O₂) door de toevoeging van twee protonen (H⁺). Dit kan volledig gereduceerd worden tot H₂O en O₂ of gedeeltelijk tot het hydroxylradicaal (°OH). Dit laatste gebeurt doordat vrije redox-actieve metalen, zoals Fe²⁺ en Cu²⁺, de productie van °OH radicalen stimuleren door de Fenton-reactie. De reductie van het geoxideerde metaal kan bekomen worden door de Haber-Weiss reactie met O₂^{•-} als substraat (Figuur 2) (8-10).



Figuur 2: De Fenton reactie en de reductie van het geoxideerd metaal vormen de Haber Weiss reactie (11).

De niet-enzymatische productie van O₂^{•-} gebeurt in de chloroplasten, mitochondriën en peroxisomen als een bijproduct van metabole processen zoals fotosynthese en respiratie. NADPH-oxidasen (“Respiratory burst homolog “ (Rboh) oxidasen) gelegen op de plasmamembraan zijn de belangrijkste enzymatische bron van O₂^{•-} in planten (11, 12). Ze gebruiken elektronen afkomstig van intracellulair NADPH om O₂^{•-} te vormen van O₂. en hebben functies in cellulaire processen zoals celproliferatie, signalisatie en apoptose maar zijn ook zeer belangrijk bij de immunrespons van

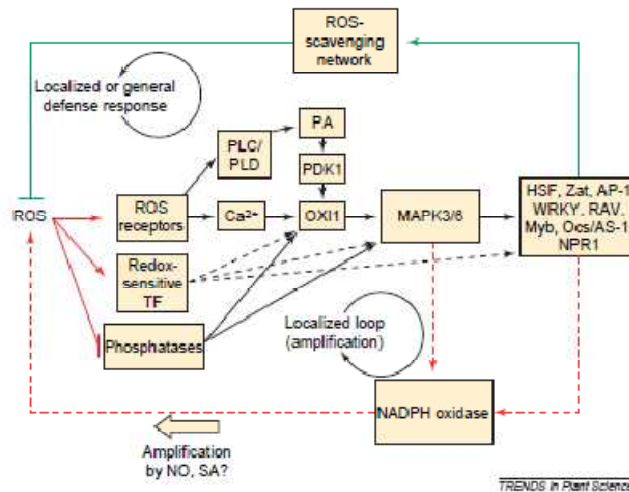
planten tegen pathogenen (12). Onder normale omstandigheden hebben lipoxygenasen (LOXs) een rol in het membraanmetabolisme van cellen, alsook in de productie van oxylipines (precursor van het plantenhormoon jasmonaat) die belangrijk zijn in de ontwikkeling van de plant. Bij een sterke upregulatie onder stress-omstandigheden katalyseren ze de peroxidatie van polyonverzadigde vetzuren in de membranen met membraandegradatie tot gevolg. Een verhoging van lipoxygenase-activiteit kan verder ook aanleiding geven tot de productie van ROS alsook een verhoging van oxylipines die van belang kunnen zijn in de stress-respons. Een stimulatie van de LOX activiteit kan veroorzaakt worden door de verhoogde aanwezigheid van ROS ten gevolge van metaalstress, maar



deze metaalgeïnduceerde ROS productie kan ook direct aanleiding geven tot lipidenperoxidatie (Figuur 3). De oxidatie van membraanlipiden is het gevolg van vrije radicalen ontstaan door oxidatieve stress, zoals $^{\bullet}OH$. Deze radicalen onttrekken protonen aan de membraanlipiden waardoor lipidenradicalen ontstaan. Deze zijn onstabiel en reageren verder met O_2 waardoor steeds nieuwe lipidenradicalen ontstaan. De kettingreactie wordt enkel gestopt indien twee lipidenradicalen met elkaar reageren.

Figuur 3: Initiatie en verspreiding van lipidenperoxidatie.

De gevolgen van ROS kunnen zijn: de degradatie van proteïnen, de cross-linking van DNA en lipidenperoxidatie in de membranen. Naast negatieve gevolgen heeft ROS ook een beschermende functie en een rol als signaalmolecule (Figuur 4). De oxidatieve burst, het snel vrijzetten van grote hoeveelheden ROS, is een verdedigingsmiddel tegen pathogenen (11). Binnen de plantcellen wordt ROS gedetecteerd via ROS-receptoren, redox gevoelige transcriptiefactoren of de directe inhibitie van fosfatasen die op hun beurt de mitogen-activated proteïne kinasen (MAPK) activeren (9). Bij lage concentraties ROS wordt de amplificatie van de ROS signalisatie versterkt door de NADPH oxidasen, bij hoge concentraties wordt het antioxidatief verdedigingssysteem geactiveerd (9).



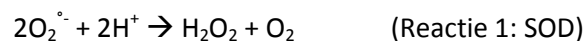
Figuur 4: Algemeen model van signaaltransductie door ROS (9)

1.3.2 Anti-oxidanten

Om de gevolgen van oxidatieve stress te beperken hebben organismen antioxidatieve mechanismen ontwikkeld die nodig zijn bij een verhoogde ROS productie. Zo worden ROS in balans gehouden door dit antioxidatief verdedigingssysteem dat bestaat uit zowel enzymen als metabolieten in alle subcellulaire compartimenten van de cel.

1.3.2.1 Antioxidatieve enzymen

Superoxidedismutasen (SOD) zijn metallo-enzymes die de dismutatie van het zeer reactieve $O_2^{\circ-}$ tot H_2O_2 katalyseren (Reactie 1).



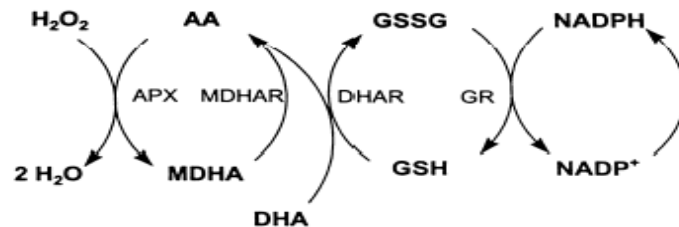
De SOD's worden ingedeeld in verschillende isoenzymen naargelang het metaal dat dienst doet als cofactor, zo zijn er FeSOD, Cu/ZnSOD en mangaan SOD (MnSOD) aanwezig. Ongeacht het metaal werken alle SOD's via dezelfde reactie waarbij twee $O_2^{\circ-}$ gekatalyseerd worden tot H_2O_2 en O_2 . Het gevormde H_2O_2 zal op zijn beurt verder gereduceerd worden door catalasen (CAT) (Reactie 2) en ascorbaat peroxidasen (APx) (Figuur 5).



Het heem-bevattende CAT zal fungeren als een katalysator bij het afbreken van H_2O_2 tot H_2O en O_2 zonder het verbruik van cellulaire reducerende equivalenten. Het heeft een lage substraataffiniteit maar een hoge reactiesnelheid indien twee H_2O_2 moleculen binden op het actieve gedeelte van CAT (10, 11). Terwijl CAT actief zijn bij ernstige stress situaties zullen peroxidasen (Px) de cel beschermen bij een lager niveau van oxidatieve stress. De detoxificatie van H_2O_2 gebeurt via oxidatie van andere organische substraten (11).

1.3.2.2 Antioxidatieve metabolieten

Antioxidatieve metabolieten hebben antioxidantische eigenschappen en zijn daarnaast ook essentieel in verschillende metabole processen. De belangrijkste metabolieten in planten zijn ascorbaat (AsA) of vitamine C, glutathion (GSH) en vitamine E. De eerste twee zijn essentiële onderdelen van de AsA-GSH cyclus (Figuur 5). Deze cyclus bestaat uit de oxidatie en reductie van AsA, GSH en NADPH.



Figuur 5: Schematische weergave van de ascorbaat-glutathion cyclus.

Ascorbaat is in mM concentraties aanwezig in de cel. Het is een primair antioxidant en heeft daarnaast belangrijke functies in de regulatie van fotosynthese, het behoud van enzymactiviteiten en de groei van zowel wortels als celwand verdikking. In de cyclus gebruikt APx twee moleculen van AsA om H_2O_2 te reduceren tot H_2O en monodehydroascorbaat (MDHA) te vormen. Dit is een radicaal met een korte levensduur en zal spontaan dispropotioneren tot dehydroascorbaat (DHA). Dit zal op zijn beurt gereduceerd worden tot AsA door dehydroascorbaatreductase (DHAR), wat GSH gebruikt als substraat. Ook kan MDHA rechtstreeks terug gereduceerd worden tot AsA met behulp van het NADPH-afhankelijke monodehydroascorbaatreductase (MDHAR) (10). Glutathion vormt het centrale element van het tweede deel van de cyclus, de thiol cyclus. Glutathiondisulfide (GSSG), bestaande uit twee geoxideerde GSH moleculen, wordt gevormd in het eerste deel van de cyclus. Glutathion reductase (GR) zal de reductie van GSSG naar GSH katalyseren met verbruik van NADPH (10).

1.4 Glutathion

GSH (γ - glutamyl-L-cysteinyglycine) is een tripeptide dat in mM concentraties aanwezig is in de cel. De biosynthese van GSH gebeurt in twee stappen. In de eerste stap, gekatalyseerd door γ -glutamylcysteïne synthetase (γ -ECS), worden L-glutamaat en L-cysteïne gekoppeld tot γ -glutamylcysteïne (γ -EC). In de tweede stap wordt glycine toegevoegd aan het C'-einde van γ -EC onder invloed van GSH synthetase om zo een compleet GSH molecule te vormen (13). De chemische reactiviteit van de thiolgroep maakt het molecule geschikt voor verschillende biochemische functies in organismen.

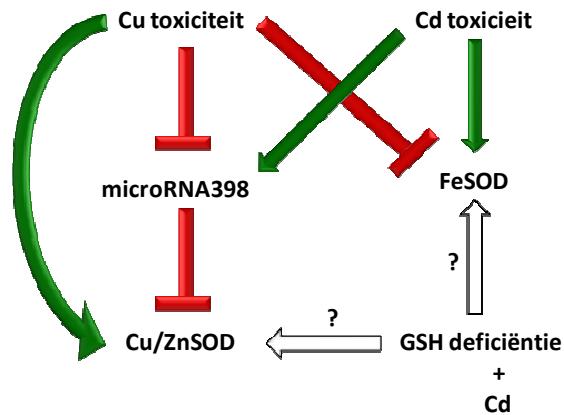
Naast functies in de opslag en transport van gereduceerd zwavel, de synthese van proteïnen en nucleïnezuren en als modulator van enzymactiviteiten heeft GSH een belangrijke tweevoudige

functie in het detoxificatiesysteem van Cd en Cd-geïnduceerde oxidatieve stress. Zo zal GSH optreden als Cd scavenger en als essentieel onderdeel in de AsA-GSH cyclus (14).

Dankzij de hoge affiniteit van Cd voor de -SH op cysteïne van GSH, vormt deze een directe ligand voor het ontstaan van GSH-Cd complexen. Het vrij Cd wordt zo onbeschikbaar voor het celmetabolisme en mechanismen die oxidatieve stress kunnen induceren worden geblokkeerd. De aanwezigheid van metaalionen activeert het enzym fytochelatine synthetase (PCs) om zo PC's te vormen met GSH als substraat (13-15). GSH zal polymeriseren in moleculen met een algemene structuur van $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ en vormt ketens van twee tot elf moleculen om zo efficiënter Cd te binden. Ze worden geproduceerd in het cytosol, maar worden getransporteerd naar de vacuolen nadat ze een complex vormen met Cd. Zo wordt het metaalion verwijderd van gevoelige enzymen en de homeostase binnen de cel behouden.

1.5 Genexpressie onder metaalstress

Alle vormen van stress zoals koude, droogte en zoutstress veroorzaken een specifieke respons op cellulair niveau. Metaalstress, zoals Cd stress, zal specifieke genen stimuleren of inhiberen. Bij Cd stress wordt onder andere een verhoging in de genexpressie van componenten betrokken bij MAPK cascades, Ca signalisatie pathways en antioxidatieve genen waargenomen (16, 17). Genexpressie wordt niet alleen op het transcriptieniveau geregeld maar ook posttranscriptioneel. Naast intronen splicing, toevoeging van een poly(A) staart en 5' capping kunnen genen gereguleerd worden door microRNA's (miR). Een microRNA is een niet-coderende RNA sequentie van ongeveer 21 nucleotiden, vaak terug te vinden in het RNA-induced silencing complex (RISC). Een specifiek gen wordt negatief gereguleerd door een bijna perfecte binding van het complementaire mRNA, waardoor dit mRNA transcript hetzij gedegradeerd wordt, hetzij niet meer vertaald kan worden in een eiwit. Het microRNA398 (miR398) heeft *CSD1* en *CDS2* als target, die respectievelijk coderen voor Cu/ZnSOD in het cytosol en de chloroplast (18-21) (Figuur 6).



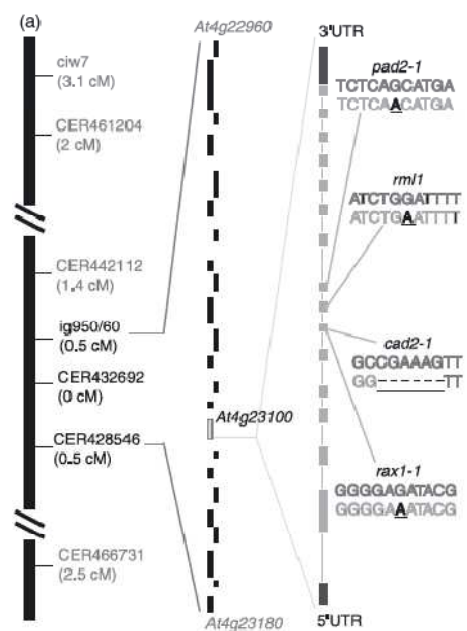
Figuur 6: Overzicht van de SOD regulatie bij Cu, Cd en een GSH deficiëntie mutant met Cd.

Een onderzoek, uitgevoerd door Sunkar *et al* (2008) toonde aan dat oxidatieve stress, veroorzaakt door Cu toxiciteit, de transcriptie van miRNA398 downreguleert (19). Deze downregulatie is belangrijk voor de posttranscriptionele inductie van *CSD1* en *CSD2* expressie onder Cu toxiciteit. Een tegengesteld effect werd vastgesteld onder Cd stress in het wildtype van *Arabidopsis thaliana*, waarbij een upregulatie van miR398 en een posttranscriptionele verlaging van mRNA's coderend voor *CSD1* en *CSD2* werd vastgesteld (17). Indien een GSH-deficiënte mutant, *cad2-1*, werd blootgesteld aan Cd zorgde dit voor een verhoging van de genexpressie van *CSD1* en *CSD2*. Een verklaring werd gevonden in de verhoogde transcriptieniveaus van de primaire transcripten van *CSD1* en *CSD2* (*hnCSD1* en *hnCSD2*) in *cad2-1*. Hierdoor is de transcriptiesnelheid van beide *CSD*'s enorm toegenomen in deze mutant, zodat dit het downregulerend effect van de Cd-geïnduceerde miR398's beperkt (Figuur 6). Een gebrek aan GSH heeft dus een positieve invloed op de transcriptiesnelheid van *CSD1* en *CSD2* waardoor onmiddellijk alternatieve antioxidatieve mechanismen worden aangeschakeld door deze planten na Cd-blootstelling.

1.6 Objectieven

Volgende kennis van de functies en de onderlinge moleculaire mechanismen van alle eiwitten na een blootstelling aan Cd zijn nodig om een beter inzicht te krijgen in de snelle respons van de plant op zware metalen. In dit onderzoek wordt er een verband gezocht tussen het thiolmetabolisme en de regulatie van het antioxidatieve verdedigingssysteem. Preliminare data, uit de eigen onderzoeksgroep, toonde aan dat een GSH-deficiënte mutant, *cad2-1*, de genexpressie van SOD op een onbekende manier verhoogt. De posttranscriptionele downregulatie door miR398 werd overkomen en het antioxidant Cu/ZnSOD, in tegenstelling tot bij het wildtype, geactiveerd. De focus van dit project ligt dan ook op de invloed van het GSH niveau op de SOD regulatie. Het is belangrijk dat de functies van GSH verder onderzocht worden, aangezien het reeds een rol heeft als Cd-scavenger en als antioxidant in de AsA-GSH cyclus. In deze studie wordt er gebruik gemaakt van vier genotypes van *Arabidopsis thaliana*, één wildtype en drie mutanten met elk een verschillende hoeveelheid GSH. *Arabidopsis* is een veelvuldig gebruikt modelorganisme, dit omdat het genoom volledig gekend is en de planten eenvoudig te cultiveren zijn.

Om de objectieven te bekomen werden *A. thaliana* planten (*col-0*, *cad2-1*, *pad2-1*, *rax1-1*) in hydrocultuur en op agarplaten gekweekt en daarna blootgesteld aan Cd (Figuur 7). De cadmiumgevoeligheid van de verschillende genotypes werd bepaald aan de hand van de wortellengtes bij verschillende Cd concentraties. Thiolprofielen werden opgesteld om het thiolmetabolisme te onderzoeken bij het wildtype en de GSH-deficiënte mutanten. De lipidenperoxidatie, een effect van oxidatieve stress, werd onderzocht door de membraanintegriteit van zowel wortels als blaadjes te meten. Op cellulair niveau werd de activiteit van verschillende antioxidatieve enzymen gemeten. Verder werd de genexpressie van zowel de primaire als de mature transcripten gemeten van verschillende factoren betrokken



Figuur 7: Genetsche kaart van mutanten gelegen op chromosoom van *Arabidopsis*.

bij de SOD regulatie. Het doel van dit project is meer inzicht te verwerven in de specifieke functies van GSH in de Cd respons. De kennis, verkregen met dit modelorganisme, kan overgebracht worden naar andere organismen. Planten kunnen zo toleranter gemaakt worden tegen metaalstress of gebruikt worden voor de revegetatie van verontreinigde bodems.

2 Materiaal en methoden

2.1 Plantenmateriaal en groeiomstandigheden

Van het modelorganisme *A. thaliana* werden naast het wildtype *col-0* (Lehle seeds, Round RockTX,USA) ook 3 GSH deficiënte mutanten gebruikt. De Cd sensitieve 2-1 (*cad2-1*; Christophe Cobbett, Melbourne University Australia), beschreven in Cobbett *et al.*, (1998), bevat ongeveer 15-45% GSH in vergelijking met het wildtype (22, 23). Regulator van APX2 1-1 (*rax1-1*; Phil Mullineaux University of Essex, England) bezit 20–50% GSH van het wildtype en is geïdentificeerd door de expressie van het door foto-oxidatieve stress induceerbare APX2 (22). De “fytoalexin deficiënt” mutant *pad2-1* (NASC) heeft ongeveer 22% van de totale hoeveelheid GSH van het wildtype. De mutanten vertonen een gelijkaardig fenotype als het wild type onder normale groeiomstandigheden. Aan deze 4 genotypen (*col-0*, *cad2-1*, *pad2-1*, *rax1-1*) werd een vijfde toegevoegd. Root meristemless 1 (*rml1*; Vernoux *et al.*, 2000) bezit een gemuteerd allel van GSH1 en bezit slechts 3% van de wild type hoeveelheid GSH. Door deze lage hoeveelheid GSH vertoont de Rml1 mutant een minder ontwikkeld fenotype (24).

2.1.1 Plantcultuur op agarplaten

De wortelgroeilengte van het wildtype en de mutanten werd gecontroleerd door een groei-experiment, bij verschillende Cd-concentraties, op verticale agarplaten. De zaadjes werden gesteriliseerd volgens het protocol van Balcells en voor de kieming gezaaid op 1% agar (Agar N° 4, Bacteriological, Lab M limited, Lancashire, UK) met 0,5% sucrose in verticale platen (25). Het medium is gebaseerd op Gamborg's B5 medium en aangepast zodat het medium bestond uit de 0,02 mM $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$; 0,02 mM MgSO_4 ; 0,02 mM CaCl_2 ; 0,02 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,49 mM KNO_3 (macronutriënten) en 0,970 μM H_3BO_3 ; 1,183 μM $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,100 μM $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,139 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,021 μM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,002 μM $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,090 μM KI (micronutriënten) (26). Aan de macro- en micronutriënten werd 0,002 mM $\text{FeNO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ toegevoegd en 0,05% (w/v) MES ((2-[N-morpholino] ethane sulfonic acid, Sigma) buffer toegevoegd. Daarna werd het medium op een pH van 5,7 tot 5,8 gebracht met KOH. De agarplaten werden drie dagen in het donker bij 4°C bewaard na het zaaien zodat de zaadjes met een gelijke kieming kunnen starten. De verticale agarplaten werden rechtop geplaatst in een gerandomiseerde volgorde in de groeikamer (12u licht/donker cyclus, 18°C, 65% RV, 165 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Na een week werden de planten met eenzelfde wortellengte in een steriele omgeving overgezet naar agarplaten zonder toevoeging van sucrose en behandeld met Cd (0; 1; 2; 5; 7,5; 10 μM Cd). De daaropvolgende week werd de wortellengte van de hoofdwortel elke dag op hetzelfde tijdstip aangeduid. Op de laatste dag werden de verticale

agarplaten gescand en de wortellengte per dag bepaald met de hulp van het softwareprogramma Optimas (Optimas Corporation; 6,1).

2.1.2 Hydrocultuur

Zaden van de 5 genotypes werden gesteriliseerd volgens het protocol van Balcells en gedurende 3 dagen in het donker bewaard op 4°C. Dit zodat alle zaadjes in hetzelfde kiemingsstadium zitten. De zaden werden gekweekt in hydrocultuur met een op Hoagland gebaseerde nutriëntenoplossing (27). De macronutriënten bestaan uit 10,1 mM KNO₃; 3,0 mM Ca(NO₃)₂·4H₂O; 2,0 mM NH₄H₂O₄ en 2,0 mM MgSO₄·7H₂O. De micronutriënten uit 46,3 μM H₃BO₃; 9,15 μM MnCl₂·4H₂O; 0,3 μM CuSO₄·5H₂O; 0,6 μM H₂MoO₄ en 1,6 μM ZnSO₄·7H₂O. De toegevoegde ijzernutriënten bestaan uit 16,4 μM FeSO₄·7H₂O en 8,1 μM Na₂-EDTA. De groeikamer had een lichtintensiteit van 165 μmol m⁻²s⁻¹, een licht- en donker cyclus van 12u en een vochtigheidsgehalte van 65%. Na een week werd zuurstof toegevoegd en het medium 2 maal per week ververs. Na 3 weken werd de helft van de planten blootgesteld aan 5 μM Cd via de wortels, de andere helft diende als controle. Na 24 u werden de wortels en blaadjes geoogst, bevroren in vloeibare stikstof en bewaard bij -70°C voor verdere analyse.

2.2 Metingen van lipidenperoxidatie

Thiobarbituurzuur reactieve metaboliëten (TBA-rm) worden gebruikt als een maat voor de lipidenperoxidatie van de membranen. Wortel- en bladstalen die bewaard werden in de -70°C vriezer werden gehomogeniseerd in 1 ml 0.1% trichloorazijnzuur (TCA) in een mortier. Eerst werden de stalen gecentrifugeerd (13500 rpm, 10 min, 4°C), waarna 400 μl van het supernatans werd overgebracht in 1 ml 0.5% thiobarbituurzuur (TBA) opgelost in 20% TCA. Dit werd gedurende 30 minuten verwarmd bij 95°C en daarna onmiddellijk gekoeld op ijs. De centrifugatiestap werd herhaald en het supernatans in een cuvet overgebracht. De spectrofotometer registreert eerst een eerste absorbantie bij een golflengte van 532 nm waarna bij 600 nm de specifieke absorbantie wordt gemeten, die gebruikt wordt als correctie van de meting zoals beschreven door Dhindsa *et al* (1981) (28).

2.3 Thiol derivatisatie

Antioxidatieve metaboliëten, zoals GSH en PC's, kunnen gelabeld worden met een fluorescente component zoals monobromobimaan (mBrB) om gedetecteerd te worden met behulp van een high-performance liquid chromatography (HPLC). De thiolprofielen van de verschillende genotypes werden onderzocht onder zowel controlecondities als na Cd behandeling. De bevroren blad en wortel stalen werden elk gehomogeniseerd met kwartzand en 10 μl N-acetyl cysteine (NAC) en 990 μl DTPA (6,3 mM)-0,1% trifluoro-azijnzuur (TFA). De interne standaard, NAC, werd gebruikt om

de meting te normaliseren terwijl DTPA-TFA oxidatie voorkomt. De stalen werden gecentrifugeerd voor 10 min (13 000 rpm, 4°C) waarna 500 µl van het supernatans overgeplaatst werd in een Costar-spin filter eppendorf (Corning Incorporation, USA) om voor 30 seconden gecentrifugeerd te worden. De stalen werden zo gezuiverd van kleine partikels. In een zuiver epje werd 450 µl HEPPS (200 mM) – 6,3 mM diethyleentriaminepentaazijnzuur (DTPA), 10 µl mBrB en 250 µl staal samengevoegd en gevortext. De incubatieperiode van 30 min op 45°C gebeurde in het donker waarna de reactie werd gestopt door toevoeging van 300 µl 1 M methaan-sulfonyl zuur (MSA). De stalen werden bewaard op 4°C tot de meting in de HPLC. Een standaardreeks van gekende concentraties GSH (0, 5, 10, 15, 20 µM) werd gemeten om een standaardcurve op te stellen (29). De metingen werden uitgevoerd met dank aan dr. Henk Schat (Faculteit der Aard- en levenswetenschappen, vrije Universiteit Amsterdam).

2.4 Genexpressie

De bevroren plantenstalen werden fijn gemalen door toevoeging van twee stalen bolletjes en het gebruik van de Retsch MM 2000 Mixer Mill op een amplitude van 80. Het RNA werd geëxtraheerd met behulp van de mirVana Kit (Ambion, Lennik). Het bekomen RNA werd gecontroleerd op concentratie met behulp van de NanoDrop® ND-1000 Spectrofotometer (NanoDrop Technologies Inc, Isogen Life Science, Nederland) op 260 nm. De zuiverheid werd gecontroleerd door de 260/280 en de 260/230 ratio's te berekenen. De stalen werden bewaard bij -70°C tot reverse transcriptie werd uitgevoerd. Om contaminatie met genomisch DNA te vermijden tijdens de cDNA synthese, werd eerst de Turbo DNA-free™ Kit gebruikt (Ambion, Lennik) en vervolgens de High-capacity cDNA Reverse transcription Kit (Applied biosystems, USA) voor de eigenlijke reverse transcriptie in de Mastercycler (Eppendorf, Duitsland). Van elk staal werd 1 µg RNA gebruikt als input voor de cDNA synthese om variatie binnen de stalen te beperken. Het bekomen cDNA werd 10 maal verdund in Tris-EDTA buffer (1/10) en bewaard bij -20°C. De genexpressie werd gemeten met behulp van het Fast SYBR Green Master Mix Protocol (Applied biosystems, Lennik) in het 7900 Fast Real-Time PCR toestel (Applied Biosystems, Lennik). Voor elk staal werd 2 µl cDNA gebruikt. De genexpressie werd genormaliseerd ten opzichte van drie referentie genen: *Fbox*, *SAND* en *TIP41*-like met de $2^{-\Delta Ct}$ -methode zoals beschreven in Remans *et al* (2008) (30). In tabel 1 worden de primersequenties en de loci gegeven van de verschillende genen die gemeten werden tijdens de genexpressieanalyses weergegeven.

Tabel 1: Overzicht van de onderzochte genen met de locus, forward en reverse primer van elk gen.

Gen	Locus	Forward primer	Reverse primer
Sand familie (referentie eiwit)	AT2G28390	AACTCTATGCAGCATTTGATCCACT	TGATTGCATATCTTTATCGCCATC
Fbox (referentie eiwit)	AT5G15710	TTTCGGCTGAGAGGTTTCGAGT	GATTCCAAGACGTAAAGCAGATCAA
TIP41 (referentie eiwit TIP41 familie)	AT4G34270	GTGAAAACCTGTTGGAGAGAAGCAA	TCAACTGGATACCCTTTTCGCA
CSD1 (koper/zink superoxide dismutase 1)	AT1G08830	TCCATGCAGACCCTGATGAC	CCTGGAGACCAATGATGCC
CSD2 (koper/zink superoxide dismutase 2)	AT2G28190	GAGCCTTTGTGGTTCACGAG	CACACCACATGCCAATCTCC
CSD3 (koper/zink superoxide dismutase 3)	AT5G18100	GTTGTTGTGCATGCGGATCC	CACATCCAACCTCTCGAGCCTG
FSD1 (ijzer superoxide dismutase 1)	AT4G25100	CTCCAATGCTGTGAATCCC	TGGTCTTCGGTTCTGGAAGTC
FSD2 (ijzer superoxide dismutase 2)	AT5G51100	TTGGAAAGGTTCAAGTCGGCT	CATTGCAACGTCAAGTCTATTCG
FSD3 (ijzer superoxide dismutase 3)	AT5G23310	AACGGGAATCCTTTACCCGA	TGTCTCCACCACCAGGTTGC
hnCSD1 (hetero-nucleair koper/zink superoxide dismutase 1)	AT1G08830	ACTGTTGGAGATGATGGTATGCCT	GAGAGAGTAGCGAAATTTGATGCAA
hnCSD2 (hetero-nucleair koper/zink superoxide dismutase 2)	AT2G28190	TCACTATGACTTAGGCTGCGATTG	GATGGTCCGAATTTGCGATTAA
hnMIR398a (hetero-nucleair MIR398a)	AT2G03445	AGAAGAAGAGAAGAACAACAGGAGGTG	ATTAGTAAGGTGAAAAATGGAACAGG
hnMIR398b (hetero-nucleair MIR398b)	AT5G14545	TAACAAGAAGATATCAATATATCATG	ACCATTGGTAAATGAGTAAAAGCCAGCC
hnMIR398c (hetero-nucleair MIR398c)	AT5G14565	TCGAAACTCAAAGTAAACAGTCC	TTTGGTAAATGAATAGAAGCCACG

2.5 Enzymmetingen

Bevroren wortel- en bladstalen werden gehomogeniseerd met ijskoude 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7,8), waaraan 1 mM EDTA en 1 mM dithiothreitol werden toegevoegd, samen met een kleine hoeveelheid polyvinylpyrrolidone. De homogene vloeistof werd gedurende 15 min gecentrifugeerd (4°C) op de maximale snelheid. Een gedeelte van het staal werd verder verdund, de rest werd terug ingevroren op -70°C voor verdere eiwitanalyse. Voor de wortels werd het supernatans vijf maal verdund met dezelfde extractiebuffer, voor de blaadjes was dit 10 maal. De enzymen in het staal werden spectrofotometrisch gemeten op een temperatuur van 25°C. Analyse van SOD was gebaseerd op de inhibitie van cytochroom C op 550 nm (31). Guajacolperoxidase (GPx) en syringaldazine peroxidase (SPx) activiteiten werden gemeten op 436 en 530 nm volgens Bergmeyer *et al* (1974) en Imberty *et al* (1984) respectievelijk (32, 33). De analyse van de GR en CAT activiteit gebeurde op 340 en 240 nm, beschreven door Bergmeyer (1974). Door de instabiliteit van APx gebeurde de extractie van het staal in aanwezigheid van ascorbaat (10 mM) in de extractiebuffer. De meting gebeurde op 298 nm volgens de methode van Gerbling (34).

2.6 Statistische analyse

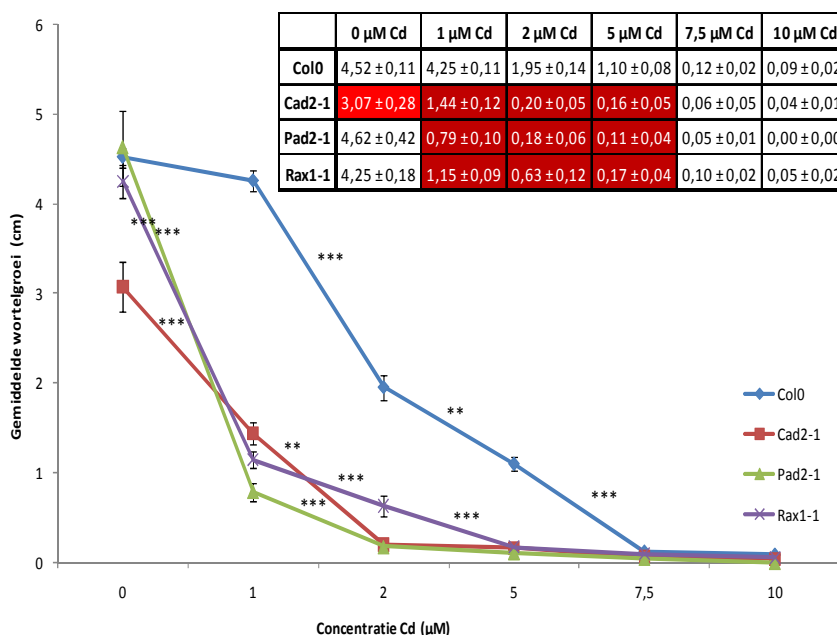
Alle resultaten werden gecontroleerd op outliers met behulp van Graphpad software (2002-2005). Deze maakt gebruik van een Grubb test om te bepalen of een waarde significant verschilt (p -waarde $< 0,05$) van de andere waarden. De gevonden outliers werden niet meegenomen in de verdere analyse. Er werd getest op normaliteit met behulp van vier testen: Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Cramer-von Mises en Anderson-Darling. De homoscedasticiteit werd gecontroleerd op de G-plot. Indien de normaliteit of de homoscedasticiteit niet voldaan was, werd een logaritmische, vierkantswortel, inverse of tweede macht transformatie gebruikt. Alle waarden, zonder de outliers, werden geanalyseerd op significante verschillen met behulp van SAS 9.2. Een één-weg ANOVA werd toegepast om significante verschillen te ontdekken tussen de genotypes of de behandeling. De wortelgroeilengte werd geanalyseerd met een Kruskal-Wallis test.

3 Resultaten

Oxidatieve stress, veroorzaakt door zware metalen, heeft ernstige gevolgen voor alle organismen. Het antioxidatieve metaboliet GSH heeft een tweevoudige functie in de verdediging tegen de Cd-geïnduceerde oxidatieve stress. Het is zowel belangrijk als onderdeel van de AsA-GSH cyclus en als Cd-scavenger. Preliminare data toonden aan dat GSH deficiënte planten verschillend reageren op Cd toxiciteit dan het wildtype van *A. thaliana*. Om dit te onderzoeken werden volgende experimenten opgezet. De cadmiumsensitiviteit van de vier genotypes werd getest door de wortelgroeilengte bij verschillende concentraties Cd meten. Een thiolderivatisatie werd gebruikt om de verhouding tussen GSH en PCs te bepalen en zo het GSH metabolisme als Cd-scavenger te onderzoeken. De gevolgen van de Cd-geïnduceerde oxidatieve stress werden nagegaan op basis van toxiciteit alsook op antioxidatieve verdediging. Lipidenperoxidatie werd gebruikt als biomarker om oxidatieve membraandegradatie na Cd-blootstelling te bestuderen. Het antioxidatief verdedigingssysteem werd onderzocht door de analyse van de activiteiten van verschillende belangrijke antioxidatieve enzymen te meten. Een speciale focus werd gegeven aan de regulatie van SOD en de invloed van GSH op deze regulatie. Dit werd onderzocht door de genexpressie van zowel primaire transcripten als de mature transcripten van SOD's en de bijbehorende microRNA's te meten.

3.1 Effect van Cd op de wortelgroeilengte

De wortels van het wildtype en de GSH-deficiënte mutanten werden blootgesteld aan een reeks Cd concentraties (0 -; 1 -; 2 -; 5 -; 7,5 -; 10 μM Cd) gedurende een week om zo de cadmiumsensitiviteit van de verschillende genotypen te bepalen. De wortellengte van de *cad*-mutant was reeds bij 0 μM Cd significant lager dan deze bij het wildtype ($p < 0.05$) (Figuur 8).



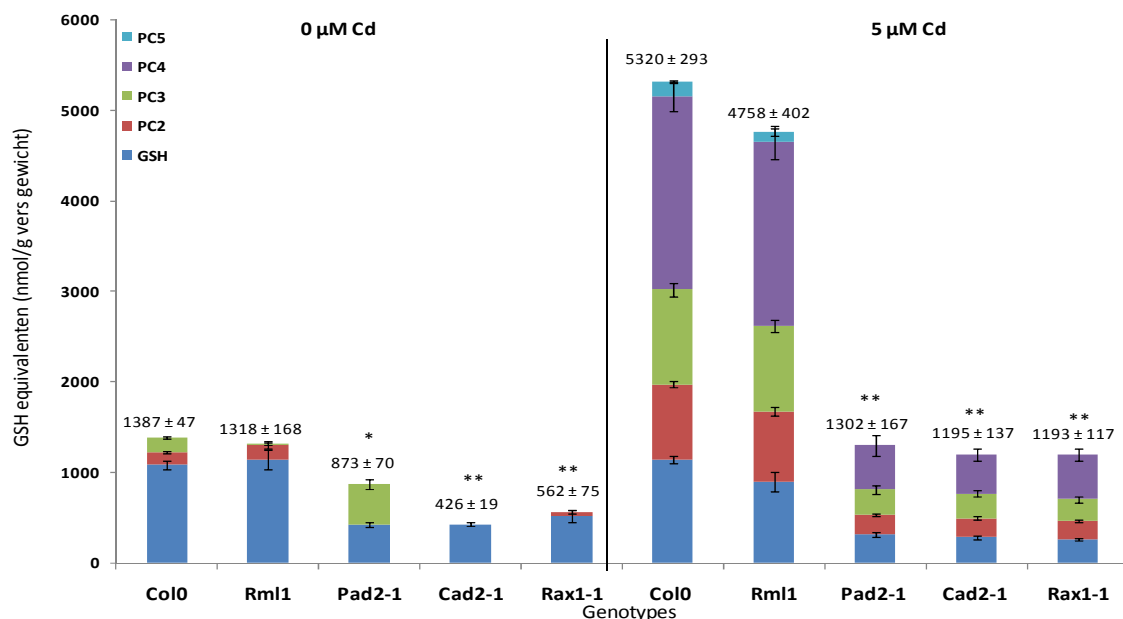
Figuur 8: Gemiddelde wortelgroeilengte van drie weken oude planten na blootstelling aan 0 tot 10 μM Cd. Significante dalingen van de wortelgroeilengte binnen hetzelfde genotype worden weergegeven op de grafiek (significantieniveaus: * $p < 0,1$; ** $p < 0,05$; *** $p < 0,01$). De tabel toont de gemiddelde wortelgroeilengte bij elke concentratie waarbij verschillen van genotypes ten opzichte van het wildtype van elke concentratie zijn aangeduid.

$p < 0,05$ $p < 0,01$

De aanwezigheid van 1 μM Cd zorgt voor een significante daling ($p < 0,01$) in de groei van alle mutanten terwijl deze bij *col-0* gelijk blijft. Ook bij 2 en 5 μM Cd is de wortelgroei van *col-0* steeds hoger als deze bij de mutanten ($p < 0,01$). Geen enkel genotype vertoont nog groei bij de twee hoogste Cd concentraties.

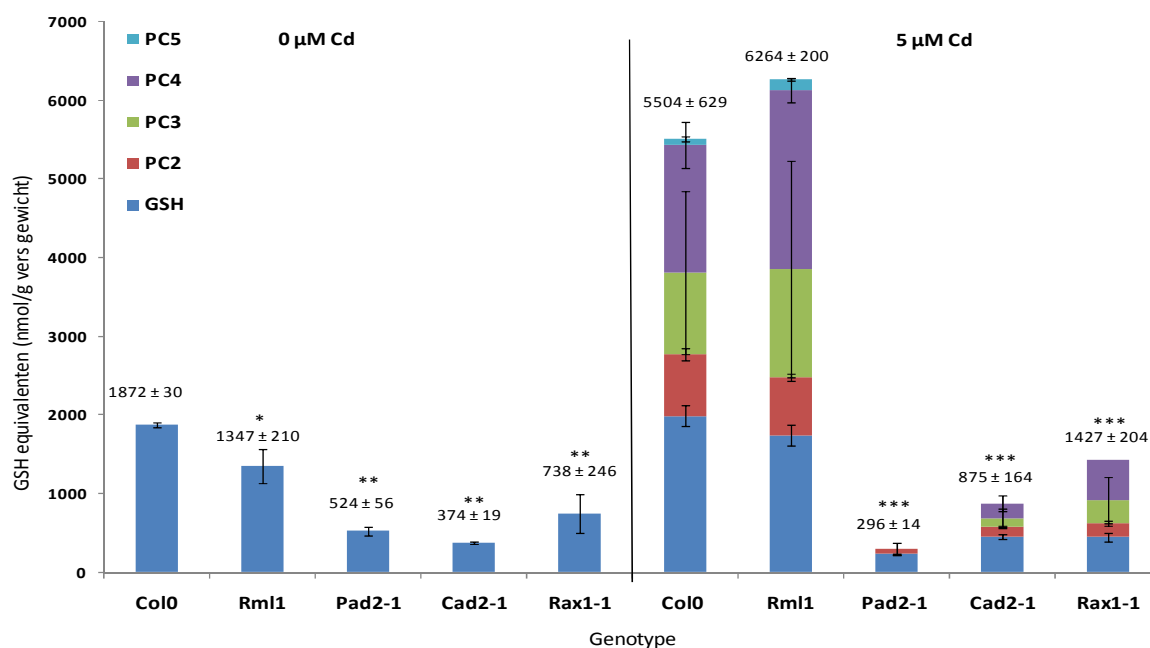
3.2 Thiol derivatisatie

Het fluorescent labelen van thiolen maakt het mogelijk om voor elk genotype een thiolprofiel op te stellen voor wortel en blad. De bindingsefficiëntie van mBrB daalt bij een stijgend aantal thiolen, voor GSH, PC2, PC3 en PC4 werden respectievelijk 100%, 71%, 58%, 27% gebruikt. De efficiëntie van mBrB voor PC5 is niet geweten en werd bijgevolg gelijkgesteld aan 100%. De *cad*, *pad* en *rax*-mutant verschillen van het wildtype en de *rm1*-mutant in de totale hoeveelheid GSH equivalenten in de wortels bij zowel 0 als 5 μM Cd. In de wortels is er een significant verschil in het niveau van GSH en de afgeleiden tussen de controle en de Cd conditie bij alle genotypen, uitgezonderd van het GSH niveau van *col-0* en *rm1* in de wortels (Figuur 9) (Tabel 2). Het GSH niveau in de mutanten daalt, terwijl het niveau van de PC's stijgt. Alleen in *pad*-mutant is er een significante daling van PC3 ($p < 0,05$) (Tabel 2).



Figuur 9: Gemiddelde weergave van het GSH en PC niveau (GSH equivalenten in nmol/g VG) \pm SE bij drie weken oude blaadjes. Het totaal aantal GSH equivalenten is weergegeven boven elk genotype samen met significante verschillen met *col-0* van dezelfde conditie (* $p < 0,1$; ** $p < 0,05$). Zie ook tabel 2.

In de blaadjes werd enkel GSH gemeten onder controle condities, fytochelatines werden veelvuldig gemeten na Cd behandeling. Net als in de wortels, verschillen de *cad*, *pad* en *rax*-mutant van het wildtype en de *rm1*-mutant in totale hoeveelheid GSH equivalenten in controle en Cd condities. Bij de *pad*-mutant is er een significante verlaging ($p < 0,05$) van het GSH-niveau bij Cd toxiciteit.



Figuur 10: Gemiddelde weergave van het GSH en PC niveau (GSH equivalenten in nmol/g VG) ± SE bij drie weken oude wortels. Het totaal aantal GSH equivalenten is weergegeven boven elk genotype samen met significante verschillen met Col0 van dezelfde conditie (* p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001). Zie ook tabel 2

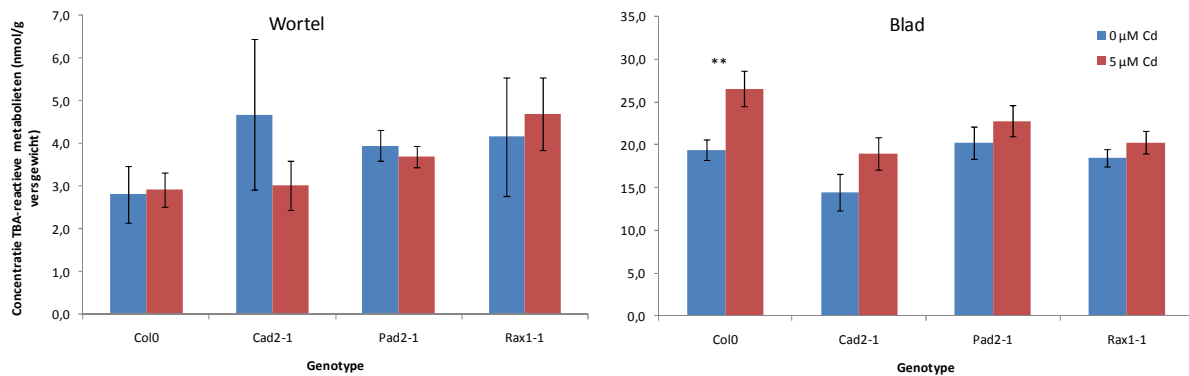
Tabel 2 geeft een overzicht van de thiol derivatisatie en significanties.

Tabel 2: Resultaten van de thiol derivatisatie uitgedrukt in GSH equivalenten, bij drie weken oude wortels en blaadjes van *A. thaliana*. Genotypes die significant (p < 0,05) van mekaar verschillen zijn aangeduid met (*) of (**). Het cadmium effect wordt weergegeven door de significantieniveaus: p < 0,05 p < 0,05

		Wortel				
		<i>col-0</i>	<i>rml1</i>	<i>pad2-1</i>	<i>cad2-1</i>	<i>rax1-1</i>
0 μM Cd	GSH	1081 ± 43	1135 ± 108	424 ± 22*	426 ± 19*	515 ± 64*
	PC2	144 ± 11	165 ± 43	0*	0*	47 ± 17*
	PC3	163 ± 16*	18 ± 18**	450 ± 54	0**	0**
	PC4	0	0	0	0	0
	PC5	0	0	0	0	0
5 μM Cd	GSH	1143 ± 41	896 ± 104*	315 ± 26**	283 ± 17**	258 ± 15**
	PC2	828 ± 34	776 ± 45	214 ± 14*	211 ± 19*	207 ± 16*
	PC3	1052 ± 73	950 ± 69	281 ± 45*	271 ± 36*	236 ± 32*
	PC4	2133 ± 164	2023 ± 180	493 ± 114*	430 ± 68*	493 ± 66*
	PC5	164 ± 13	113 ± 43	0*	0*	0*
		Blad				
		<i>col-0</i>	<i>rml1</i>	<i>pad2-1</i>	<i>cad2-1</i>	<i>rax1-1</i>
0 μM Cd	GSH	1872 ± 30	1348 ± 210*	524 ± 57**	374 ± 19**	739 ± 247**
	PC2	0	0	0	0	0
	PC3	0	0	0	0	0
	PC4	0	0	0	0	0
	PC5	0	0	0	0	0
5 μM Cd	GSH	1987 ± 132	1742 ± 127	230 ± 10*	453 ± 32*	447 ± 52*
	PC2	784 ± 82	742 ± 46	67 ± 7*	118 ± 20*	173 ± 26*
	PC3	1036 ± 159	1373 ± 103	0*	115 ± 46*	297 ± 69*
	PC4	1623 ± 292	2271 ± 150	0	188 ± 83	510 ± 95
	PC5	75 ± 31	137 ± 12	0*	0*	0*

3.3 Meting van lipidenperoxidatie

Het effect van oxidatieve stress op de membraanintegriteit werd bepaald door de TBA-rm te meten in zowel de wortels als de blaadjes (Figuur 10). In de wortels werd er geen significant verschil waargenomen tussen behandelde of niet-behandelde plantjes. In de blaadjes vertoonde *col-0* een significante stijging ($p < 0,05$) na behandeling met 5 μM Cd. Verder vertonen de mutanten in de blaadjes een kleine, echter niet significante, verhoging in TBA-rm na behandeling met Cd.



Figuur 11: Concentratie TBA-reactieve metabolieten (nmol/g vers gewicht) \pm SE bij drie weken oude planten, blootgesteld aan 0 μM of 5 μM Cd. Significantienniveau: ** $p < 0,05$

3.4 Enzymmetingen

Om een beter beeld te krijgen van de antioxidatieve verdediging onder Cd stress werden de enzymactiviteiten van belangrijke antioxidatieve enzymen zoals SOD, GR, CAT, GPOD en APx, bepaald met behulp van de spectrofotometer. Drie weken oude plantjes werden via de wortel gedurende 24 u blootgesteld aan 5 μM Cd. Bij blootstelling aan Cd, werd in elke mutant ter hoogte van de wortels een stijging in SOD activiteit waargenomen. Enkel bij de *cad2-1* en *rax1-1* mutant is deze stijging significant ($p < 0,05$). De CAT activiteit van alle mutanten was na behandeling significant verhoogd ($p < 0,05$) ten opzichte van het wildtype *col-0*. Binnen hetzelfde genotype werd een stijging van de CAT en GR activiteit gevonden na behandeling. Bij CAT was deze stijging, uitgezonderd bij *pad2-1* ($p = 0,1078$), significant (*col-0*: $p < 0,1$; *rax1-1*: $p < 0,1$; *cad2-1*: $p < 0,05$). In tegenstelling bij *col-0* veranderde de GR activiteit van de mutanten wel na behandeling. Er was een significante stijging bij *rax1-1* ($p < 0,1$), *cad2-1* ($p < 0,05$) en *pad2-1* ($p < 0,01$).

Tabel 3: Enzymactiviteiten (mU/g vers gewicht) van drie weken oude wortels, blootgesteld aan 5 μ M Cd. Significantieniveaus ($p < 0,1$ *, $p < 0,05$ **, $p < 0,01$ *) voor het cadmiumeffect.**

Behandeling	Genotype	SOD		GR		CAT		GPOD		APx	
0 μ M Cd	<i>col-0</i>	25025	± 5057	361	± 49	41	± 6	6698	± 512	60324	± 2848
	<i>rax1-1</i>	51695	± 13187	377	± 4	61	± 5	6755	± 2609	69284	± 817
	<i>cad2-1</i>	54270	± 11054	326	± 19	62	± 5	8412	± 1011	68597	± 11410
	<i>pad2-1</i>	39719	± 22023	396	± 20	66	± 7	7023	± 1009	60524	± 6234
5 μ M Cd	<i>col-0</i>	17870	± 3510	365	± 47	56	± 4*	8502	± 1155	83989	± 10055**
	<i>rax1-1</i>	58777	± 8751	449	± 20*	79	± 6*	12972	± 2528	78714	± 18101
	<i>cad2-1</i>	53215	± 17323	473	± 32**	78	± 7**	10164	± 1033	74870	± 3920
	<i>pad2-1</i>	37790	± 3536	538	± 23***	80	± 2	9077	± 1779	61167	± 12917

In vergelijking met het wildtype, was in de blaadjes enkel de GPOD activiteit van de mutanten verhoogd bij 0 μ M Cd. Deze verhoging was significant voor *cad2-1* ($p < 0,05$) en *pad2-1* ($p < 0,05$). Verder zorgt de Cd toxiciteit voor een significante verhoging van APx bij *col-0* ($p < 0,05$).

Tabel 4: Enzymactiviteiten (mU/g vers gewicht) van drie weken oude blaadjes, blootgesteld aan 5 μ M Cd. Significantieniveaus ($p < 0,1$ *, $p < 0,05$ **, $p < 0,01$ *) voor het cadmiumeffect.**

Behandeling	Genotype	SOD		GR		CAT		GPOD		APX	
0 μ M Cd	<i>col-0</i>	104053	± 20536	1569	± 68	439	± 45	6232	± 495	135584	± 6889
	<i>rax1-1</i>	122804	± 23925	1099	± 169	335	± 10	8093	± 2248	151517	± 8692
	<i>cad2-1</i>	108467	± 32382	1288	± 252	340	± 10	9139	± 1123	140959	± 4946
	<i>pad2-1</i>	139534	± 34971	1129	± 49	396	± 21	10811	± 1232	129953	± 13663
5 μ M Cd	<i>col-0</i>	81994	± 34223	1449	± 88	299	± 47*	27930	± 3030***	147716	± 8346
	<i>rax1-1</i>	136061	± 43664	1063	± 171	315	± 69	19857	± 7269***	117080	± 13609*
	<i>cad2-1</i>	143028	± 16538	1124	± 158	358	± 40	17954	± 3881	108115	± 18475
	<i>pad2-1</i>	108111	± 10170	1010	± 173	344	± 72	18282	± 4396	118244	± 22474

3.5 Genexpressie

Om meer diepgang te verwerven in de regulatie van de antioxidatieve verdediging onder Cd stress, werd specifieke aandacht gegeven aan de genexpressie van SOD en de invloed van GSH gehalten hierop in controle condities en na behandeling met Cd. De expressie van mature transcripten van verschillende genen betrokken bij de SOD regulatie werden bepaald in de wortels en de blaadjes. Verder werden ook de primaire transcripten van *CSD* en *miR398* bepaald. Vier genotypes van *A. thaliana* (*col-0*, *cad2-1*, *pad2-1*, *rax1-1*) werden via de wortels gedurende 24u blootgesteld aan 5 μM Cd. De effecten van de mutanten bij 0 μM Cd ten opzichte van het wildtype bij 0 μM Cd werden bestudeerd (genotype effecten). Daarnaast werd het effect van de behandeling met Cd binnen hetzelfde genotype vergeleken (Cd effect).

3.5.1 Genexpressie in de wortel

De resultaten van verschillende SOD isovormen vertonen een aantal verschillen op het transcriptieniveau tussen de mutanten en het wildtype in de wortels onder controle-omstandigheden (Tabel 5). Er is een verschil in de expressie van *FSD1* tussen de genotypes. De mutanten *cad2-1* ($p < 0,05$) en *pad2-1* ($p < 0,05$) vertonen een significante stijging in de genexpressie van *FSD1*. De *rax*-mutant vertoont ook een stijging, deze is echter niet significant. Verder werd een verhoging van *hnMIR398c* vastgesteld bij *cad2-1* en *pad2-1*, alleen bij de eerste is deze significant ($p < 0,1$). Tabel 5 toont ook de effecten van Cd toxiciteit op de genen. De mutanten vertonen een significante verhoging van zowel de primaire als de mature transcripten van *CSD1*. Daarnaast is er ook een stijging van *hnMIR398a* bij alle mutanten, maar niet significant bij *rax1-1*. De expressie van *FSD2* is significant verlaagd ($p < 0,05$) bij zowel het wildtype als de mutanten. Dit in tegenstelling tot *FSD1* wat significant verhoogd ($p < 0,05$) is bij alle genotypes, buiten bij *pad2-1* waar geen verhoging werd vastgesteld.

3.5.2 Genexpressie in het blad

In de blaadjes is er, net als in de wortels, een genotypisch verschil in de expressie van *FSD1*. Het transcriptieniveau is verhoogd bij alle mutanten, maar enkel significant bij *pad2-1* ($p < 0,05$) (Tabel 6). De *cad*-mutant vertoont een significante verlaging ($p < 0,05$) van zowel *hnCSD1* als *hnCSD2*, terwijl bij *pad2-1* en *rax1-1* respectievelijk deze eerste en tweede significant verlaagd zijn. Het effect van Cd op de genotypes is zichtbaar in een significante verlaging van het transcriptieniveau van *FSD2* ($p < 0,01$) en *FSD3*. Er is een significante verhoging van de primaire en mature transcripten van *CSD1* in de *col-0*, *cad* en *pad*-mutant.

Tabel 5: Het transcriptieniveau van verschillende genen in drie weken oude wortels na 24 u blootstelling aan 5 µM Cd. Het gemiddelde van de relatieve waarden (± SE) wordt weergegeven. Genotype effect zijn relatieve gemiddelden (*col-0*: n=8, mutanten: n=4) van de genotypes bij 0 µM Cd ten opzichte van het wildtype bij 0 µM Cd. Het cadmiumeffect zijn de relatieve gemiddelden van de genotypes bij 5 µM Cd ten opzichte van hetzelfde genotype bij 0 µM Cd.

Significantieniveaus:

p < 0,1 p < 0,05 p < 0,01 p < 0,1 p < 0,05 p < 0,01

Genotype effect in de wortel				Gen	Cadmium effect in de wortel			
<i>col-0</i>	<i>rax1-1</i>	<i>cad2-1</i>	<i>pad2-1</i>		<i>col-0</i>	<i>rax1-1</i>	<i>cad2-1</i>	<i>pad2-1</i>
1 ± 0,05	1,02 ± 0,12	0,94 ± 0,1	1,11 ± 0,13	CSD1	0,9 ± 0,08	1,69 ± 0,24	2 ± 0,17	1,66 ± 0,19
1 ± 0,16	0,96 ± 0,14	1,2 ± 0,15	1,52 ± 0,29	CSD2	1,14 ± 0,1	1,79 ± 0,36	1,34 ± 0,23	0,93 ± 0,18
1 ± 0,05	1,19 ± 0,1	0,95 ± 0,08	1,1 ± 0,09	CSD3	0,98 ± 0,06	0,67 ± 0,05	0,82 ± 0,1	0,75 ± 0,14
1 ± 0,27	4,59 ± 1	4,74 ± 0,25	8,38 ± 1,42	FSD1	28,76 ± 7,04	5,46 ± 1,2	2,58 ± 0,55	1,66 ± 0,48
1 ± 0,05	1,03 ± 0,11	0,94 ± 0,08	1,01 ± 0,07	FSD2	0,69 ± 0,02	0,68 ± 0,03	0,57 ± 0,07	0,71 ± 0,08
1 ± 0,14	1,08 ± 0,07	0,67 ± 0,04	0,91 ± 0,09	FSD3	0,43 ± 0,05	0,89 ± 0,08	1,72 ± 0,21	0,83 ± 0,2
1 ± 0,08	1,48 ± 0,31	0,93 ± 0,26	0,91 ± 0,1	hnCSD1	1,01 ± 0,09	1,79 ± 0,21	3,49 ± 0,37	5,04 ± 0,38
1 ± 0,15	1,29 ± 0,16	1 ± 0,22	1 ± 0,16	hnCSD2	0,75 ± 0,07	1,47 ± 0,2	2,3 ± 0,36	3,51 ± 0,47
1 ± 0,4	0,54 ± 0,03	0,22 ± 0,2	0,6 ± 0,32	hnMIR398a	1,5 ± 0,39	38,78 ± 16,18	7,27 ± 0,86	3,42 ± 0,92
1 ± 0,17	0,26 ± 0,08	1,36 ± 0,45	0,6 ± 0,2	hnMIR398b	0,79 ± 0,13	3,77 ± 0,38	1,35 ± 0,04	2,95 ± 1,02
1 ± 0,43	1,1 ± 0,34	4,13 ± 1,85	3,09 ± 0,8	hnMIR398c	13,34 ± 3,35	17,45 ± 2,81	1,46 ± 0,12	17,49 ± 4,01

Tabel 6: Het transcriptieniveau van verschillende genen in drie weken oude blaadjes na 24 u blootstelling aan 5 µM Cd. Het gemiddelde van de relatieve waarden (± SE) wordt weergegeven. Genotype effect zijn relatieve gemiddelden (*col-0*: n=8, mutanten: n=4) van de genotypes bij 0 µM Cd ten opzichte van het wildtype bij 0 µM Cd. Het cadmiumeffect zijn de relatieve gemiddelden van de genotypes bij 5 µM Cd ten opzichte van hetzelfde genotype bij 0 µM Cd.

Significantieniveaus:

p < 0,1 p < 0,05 p < 0,01 p < 0,1 p < 0,05 p < 0,01

Genotype effect in het blad				Gen	Cadmium effect in het blad			
<i>col-0</i>	<i>rax1-1</i>	<i>cad2-1</i>	<i>pad2-1</i>		<i>col-0</i>	<i>rx1-1</i>	<i>cad2-1</i>	<i>pad2-1</i>
1 ± 0,06	1,42 ± 0,10	1,30 ± 0,13	1,14 ± 0,14	CSD1	2,45 ± 0,26	1,47 ± 0,37	2,29 ± 0,16	2,87 ± 0,12
1 ± 0,08	1,20 ± 0,13	1,65 ± 0,35	1,29 ± 0,13	CSD2	0,81 ± 0,11	0,40 ± 0,10	0,30 ± 0,05	0,34 ± 0,03
1 ± 0,09	1,13 ± 0,10	1,05 ± 0,14	1,16 ± 0,09	CSD3	0,47 ± 0,06	0,74 ± 0,19	0,63 ± 0,07	0,44 ± 0,07
1 ± 0,17	3,60 ± 1,47	3,66 ± 0,97	10,85 ± 4,70	FSD1	4,13 ± 1,83	1,38 ± 1,04	1,58 ± 0,45	0,29 ± 0,07
1 ± 0,08	1,03 ± 0,07	0,86 ± 0,11	1,20 ± 0,04	FSD2	0,40 ± 0,04	0,44 ± 0,09	0,45 ± 0,05	0,21 ± 0,03
1 ± 0,16	1,11 ± 0,18	1,25 ± 0,11	1,25 ± 0,06	FSD3	0,71 ± 0,05	0,45 ± 0,08	0,30 ± 0,09	0,43 ± 0,08
1 ± 0,04	0,81 ± 0,32	0,35 ± 0,04	0,38 ± 0,05	hnCSD1	1,54 ± 0,13	1,67 ± 0,32	5,21 ± 0,36	5,51 ± 0,29
1 ± 0,09	0,55 ± 0,07	0,45 ± 0,11	0,78 ± 0,17	hnCSD2	0,23 ± 0,04	0,80 ± 0,07	0,80 ± 0,12	0,50 ± 0,08
1 ± 0,37	5,86 ± 3,06	0,53 ± 0,06	1,28 ± 0,36	hnMIR398a	149,09 ± 35,13	3,55 ± 0,92	13,99 ± 4,74	3,74 ± 1,19
1 ± 0,17	0,83 ± 0,12	2,09 ± 0,47	1,69 ± 0,41	hnMIR398b	1,34 ± 0,16	0,92 ± 0,24	0,35 ± 0,07	0,39 ± 0,11
1 ± 0,28	0,50 ± 0,25	0,59 ± 0,21	0,13 ± 0,02	hnMIR398c	3,95 ± 1,85	159,25 ± 113,14	23,34 ± 7,58	113,00 ± 11,37

4 Discussie

Wereldwijd hebben verhoogde metaalconcentraties in de omgeving gevolgen voor mensen, dieren en planten. Naast de gereduceerde groei, chlorose en de verstoring van fysiologische processen zoals de fotosynthese is oxidatieve stress een zeer belangrijk effect van Cd toxiciteit. Hoewel Cd een niet-redox actief metaal is, zal het ROS induceren via indirecte mechanismen zoals interactie met het antioxidatieve verdedigingssysteem, interfereren met de elektronentransportketen of inductie van lipidenperoxidatie (17). Dit veroorzaakt een verstoring in de balans tussen pro- en antioxidanten in het voordeel van de pro-oxidanten. De antioxidatieve metabooliet GSH heeft een dubbele functie in de bescherming tegen Cd toxiciteit. Het is enerzijds in staat om het vrij Cd te binden en zo onbeschikbaar te maken en anderzijds vormt het een belangrijk onderdeel van de AsA-GSH cyclus. Hoewel GSH al vaak bestudeerd werd, is meer kennis over zijn precieze functie in het antioxidatieve verdedigingssysteem belangrijk. Meer inzicht in de onderliggende moleculaire mechanismen en respons op metaaltoxiciteit zijn belangrijk voor de selectie van planten voor fyto-remediatie of het verhogen van de voedselkwaliteit. Dit project bestudeerde de rol van GSH als een regulator in de Cd-geïnduceerde stress respons, specifiek in de activatie van superoxidodismutase. De invloed van GSH of het ontbreken ervan op de Cd respons werd zo verder onderzocht. In deze studie werden vier genotypen van *A. thaliana* (wildtype en GSH deficiënte mutanten) blootgesteld aan Cd en de effecten in wortel en blad geanalyseerd.

4.1 De invloed van glutathion op de cadmiumsensitiviteit van *Arabidopsis thaliana* en de complexatie van vrije Cd-ionen

Op cellulair niveau induceert vrij Cd de productie van ROS, wat aanleiding kan geven tot zowel schade, bv. lipidenperoxidatie in de membranen, alsook aanpassing aan de stress-omstandigheden door de activatie van signalisatie pathways zoals MAPK. De exacte rol van ROS in de activatie van signaal transductie pathways die betrokken zijn in de bescherming tegen Cd stress moet nog verder onderzocht worden. Voor deze studie werden naast het wildtype oorspronkelijk vier genotypen met een verminderde GSH pool in hydrocultuur gekweekt. Na een groeiperiode van drie weken werden de planten via de wortels blootgesteld aan een Cd-concentratie van 5 μ M. Een studie, uitgevoerd door Parisy *et al* (2006) op de blaadjes stelt dat mutanten *cad2-1*, *pad2-1*, *rax1-1* en *rml1* respectievelijk 15-45%, 22%, 20-50% en 3% van de GSH voorraad van het wildtype bevatten (22). Met het fluorescente molecuul mBrB kunnen thiolen gelabeld worden en gemeten met behulp van HPLC technologie, om zo het GSH niveau in de mutanten te bepalen. De resultaten van de thiol-derivatisatie toonden echter een opmerkelijk resultaat (figuur 6 en 7). De *rml*-mutant vertoonde een gelijkaardig aantal GSH equivalenten als het wildtype in de wortels, dit werd bevestigd in de blaadjes. Uit dit resultaat werd besloten om de *rml1*-mutant in de daaropvolgende experimenten

niet meer te gebruiken. Het GSH metabolisme kan beïnvloed worden door omgevingsfactoren wat kan leiden tot kleine variaties in het GSH niveau bij hetzelfde genotype in verschillende groeiomstandigheden. Desalniettemin was enerzijds het GSH niveau van de *rm1* mutant veel te hoog, maar werd er anderzijds ook geen sterk fenotype vastgesteld in deze mutant zodat we met zekerheid kunnen stellen dat we geen *rm1* mutant hebben verkregen van NASC.

Cobett *et al* (1998) beschreven geen fenotypische verschillen tussen het *cad2-1* genotype en *col-0* bij afwezigheid van metalen (23). Parisy *et al* (2006) deed dit ook voor de andere mutanten (22). Deze resultaten worden in het algemeen bevestigd in dit onderzoek, hoewel de *cad*-mutant reeds bij 0 μ M een significant verminderde groei ($p < 0,05$, figuur 4) vertoont. Verder vertonen alle mutanten een dosisafhankelijke groeireductie onder Cd-stress. De wortels van het wildtype groeien aanvankelijk beter bij lage Cd concentraties dan deze bij de mutanten, tot hogere Cd concentraties waarbij deze toxisch worden. De verminderde aanwezigheid van GSH zorgt enerzijds voor een verminderde vorming van Cd chelatoren (Figuur 9 en 10) alsook een verminderde antioxidatieve capaciteit, en bijgevolg meer oxidatieve stress wat zijn weerslag heeft op de wortelgroei.

Een belangrijk mechanisme in planten om een lage concentratie van vrij Cd in de cel te behouden is metaalchelatie door LMW moleculen zoals GSH en PC's (29). De interactie met kritische cellulaire componenten wordt door deze LMW voorkomen. De aanwezigheid van Cd zal het enzym fytochelatine synthase upreguleren waardoor PC's geproduceerd worden met GSH als substraat. In de wortels en de blaadjes wordt bevestigd dat de GSH niveaus van de mutanten lager liggen dan het niveau van het wildtype (Figuur 9 en 10), waardoor de beschikbare pool aan bouwstenen voor PC's beperkt is en er bijgevolg meer vrij Cd aanwezig is in deze genotypen. Na behandeling met Cd werden er PC's geproduceerd in alle genotypen (14). Het GSH niveau van *col-0* blijft hetzelfde na behandeling, terwijl de reeds onder controle condities verlaagde GSH pool van de mutanten significant daalde. Dit kan verklaard worden doordat de mutatie van de mutanten zich bevinden op het katalytische gedeelte van γ -ECS, het eerste biosynthese enzym bij de GSH productie (22). De mutanten kunnen zich minder snel aanpassen aan een GSH vermindering door de productie van PC's (29). In de blaadjes zijn onder controle condities geen PC's zichtbaar terwijl de aanwezigheid van Cd de productie van PC's stimuleert. Alleen *col-0*, zowel in de wortels als de blaadjes, beschikt over voldoende GSH voorraad om PC5 te vormen. Toch moet er rekening gehouden worden met de detectiemethoden die niet specifiek genoeg zijn voor lage concentraties en de correctiefactor voor de bindingsefficiëntie van mBrB aan het thiol. Het fluorescente molecuul mBrB veroorzaakt sterische hinder voor andere moleculen die willen binden. De efficiëntie van de binding daalt dus bij een toenemende PC lengte. Voor PC5 werd deze nooit getest en werd de bindingsefficiëntie 100%. Vermoedelijk ligt deze lager en bevatten de planten meer PC5 dan waargenomen werd

4.2 De invloed van glutathion op oxidatieve stress parameters met een focus op de SOD regulatie bij Cd stress

Zoals eerder aangegeven kan vrij Cd in de cel aanleiding geven tot een verhoogde ROS productie en interferentie met het antioxidatieve verdedigingssysteem met oxidatieve stress tot gevolg. Een fysiologische parameter voor oxidatieve stress is lipidenperoxidatie. Cd-geïnduceerde ROS kunnen reageren met polyonverzadigde vetzuren waardoor lipidenradicalen ontstaan. Er ontstaat een kettingreactie die de membraanintegriteit aantast en kan waargenomen worden met een meting van de TBA-rm. In eerder onderzoek werd waargenomen dat Cd stress bovendien een verhoging in de LOX activiteit veroorzaakt. Een hoge activiteit van dit enzym zal deze niet-enzymatische lipidenperoxidatie versterken (35). Er zijn verschillende verdedigingsmechanismen in de cel die deze kunnen beschermen tegen de lipidenperoxidatie. Naast tocoferolen, die belangrijk zijn bij het behoud van de membraanintegriteit, is vooral GSH belangrijk als directe scavenger van vrije radicalen (35). De GSH-deficiënte mutanten zijn dus minder beschermd tegen ROS-geïnduceerde lipidenperoxidatie. Desalniettemin werd er geen verschil vastgesteld in het gehalte aan lipidenperoxidatie in de wortels noch tussen de verschillende genotypen noch na behandeling (Figuur 11). In de blaadjes werd na behandeling enkel een significante verhoging gevonden in het wildtype ($p < 0,05$). Het is dus zeer interessant om in verder onderzoek het gehalte aan tocoferolen in de verschillende genotypen en bij de verschillende behandelingen na te gaan.

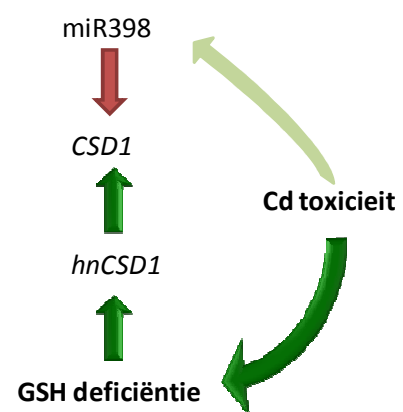
Het effect van Cd op de antioxidatieve capaciteit is dubbel: enerzijds induceert Cd oxidatieve stress via de inhibitie van antioxidanten, anderzijds activeert het antioxidatieve componenten door de verstoring van de redox balans en oxidatieve signalisatie. Dit werd onderzocht door de activiteiten van verschillende belangrijke antioxidatieve enzymen te meten in wildtype en GSH-deficiënte mutanten. Bij de omzetting van H_2O_2 naar H_2O zijn zowel CAT als Px van belang. Catalase is een H_2O_2 scavenger voornamelijk aanwezig in peroxisomen en belangrijk voor het wegvangen van hoge gehalten aan H_2O_2 in de cel om op die manier oxidatieve schade te beperken (36). In de GSH-deficiënte mutanten zien we een stijgende tendens onder controle omstandigheden van de CAT activiteit ten opzicht van het wildtype, wat erop kan wijzen dat deze mutanten onder normale omstandigheden reeds meer oxidatieve stress ervaren en dit door compensatie trachten te beperken. Blootstelling aan Cd zal er voor zorgen dat de CAT activiteit verhoogt in de wortels (Tabel 3) en tevens in hogere mate in de mutanten in vergelijking met het wildtype.

Bij het reguleren van het H_2O_2 gehalte voor oxidatieve signaaltransductie, spelen Px een belangrijke rol. Hierin vormt de AsA-GSH cyclus een belangrijk onderdeel waarbij AsA fungeert als substraat van APx in de reductie van H_2O_2 waarbij het zelf geoxideerd wordt. Om het geoxideerde AsA te recyclen is er voldoende gereduceerd GSH nodig wat hierbij geoxideerd wordt tot GSSG, wat op

zijn beurt opnieuw kan gereduceerd worden door GR met verbruik van NADPH (Figuur 5). De mutanten hebben minder GSH reserves, waarvan reeds een deel wordt opgebruikt voor de PC productie, en zullen de activiteit van GR verhogen om onmiddellijk al het GSSG terug te reduceren tot GSH. De resultaten van de enzymmetingen in de wortels tonen bij de *rax*, *cad* en *pad*-mutant een significante stijging in de GR activiteit na Cd-blootstelling (Tabel 3). Bovendien wordt er vastgesteld dat de wildtype planten een verhoging van de APX activiteit vertonen bij Cd-blootstelling, die niet wordt teruggezien bij de verschillende mutanten. Dit alles wijst erop dat de antioxidatieve capaciteit van de GSH-deficiënte mutanten wat betreft de AsA-GSH cyclus zeer sterk beperkt wordt.

Naast de reductie van H_2O_2 , is de neutralisatie van het $O_2^{\cdot -}$ door SOD's een belangrijk enzymatisch antioxidatief systeem. De verandering in SOD activiteit werd bestudeerd op het transcriptie en eiwit niveau bij een realistische Cd omgevingsconcentratie. Door gebruik te maken van GSH-deficiënte mutanten kan ook de rol van GSH in de regulatie van SOD expressie nagegaan worden. Hoewel er een sterke tendens tot verhoogde SOD activiteit wordt waargenomen in de wortels van de mutanten in vergelijking met het wildtype, wat op antioxidatieve compensatie zou kunnen duiden, is het van belang om meer biologische herhalingen te meten om dit duidelijk te maken. Bij het meten van de SOD activiteit wordt de totale activiteit van de verschillende isozymen samen bepaald. Daarom werd er op transcriptie niveau nagegaan wat de bijdrage is van de verschillende SOD-isovormen.

Het *FSD1* gen is reeds bij 0 μM Cd verhoogd in de mutanten (significant ($p < 0,05$) in de *cad* en *pad*-mutant) en vormt een compensatiemechanisme voor de GSH deficiëntie en vermindering in antioxidatieve capaciteit. Na blootstelling aan Cd is er een verhoging in de expressie van *FSD1* in alle genotypen, in tegenstelling tot *FSD2* wat significant verlaagd is ($p < 0,05$). De blootstelling aan en opname van Cd in de planten gebeurt via de wortels. Het proces van opname en translocatie van metalen naar de bovengrondse gedeelten van de plant zorgt ervoor dat de effecten later optreden. Alle genotypen vertonen een significante daling van *FSD2* en *FSD3* genexpressie bij Cd stress, terwijl de genexpressie van *FSD1* niet verandert, zoals reeds eerder is aangetoond door Smeets *et al* (2008) (36). Bij de *pad*-mutant is deze expressie tien maal verhoogd ($p < 0,0,1$) wat veel hoger is dan de twee andere mutanten.



Figuur 11: Overzicht van de CSD1 expressie onder Cd toxiciteit.

Zowel Cu/ZnSOD als FeSOD zijn belangrijke antioxidatieve enzymen die de dismutatie van het reactieve $O_2^{\cdot -}$ tot H_2O_2 katalyseren. Het onderzoek van Cuypers *et al* (2011) toonde aan dat bij Cd stress miRNA398 werd upreguleerd waardoor mRNA's van *CSD1* en *CSD2* posttranscriptioneel verlaagd werden (36). Preliminare resultaten van de eigen onderzoeksgroep gaven indicaties dat de SOD regulatie van GSH-deficiënte mutanten tegengesteld reageert op Cd stress. Dit werd verder onderzocht door een SOD-genexpressieprofiel op te stellen voor blad en wortel. De mutanten vertonen in de wortels een opmerkelijke SOD-genexpressieprofiel na 24 u blootstelling aan 5 μ M Cd (Tabel 5). Ze vertonen een verhoging van de primaire en mature transcripten van *CSD1*. De transcriptiesnelheid van *CSD1* wordt op deze manier verhoogd om de negatieve regulatie van de Cd geïnduceerde miR398's te beperken (Figuur 11). Een gebrek aan GSH heeft dus een positieve invloed op de transcriptiesnelheid van *CSD1* waardoor onmiddellijk alternatieve antioxidatieve mechanismen worden aangeschakeld door deze planten na Cd-blootstelling. Dit wijst er tevens op dat de genexpressie van *CSD1* sterk onder invloed staat van GSH en de bijbehorende cellulaire redox balans. In tegenstelling tot het *CSD1* gen reageert het *CSD2* gen onafhankelijk van de GSH gehalten, en wordt ook sterk downgereguleerd in de blaadjes na Cd blootstelling (19, 37). Het miR398 is betrokken in zowel biotische als abiotische stress situaties. Naast Cd, tonen recente studies een negatieve correlatie tussen miR398 en *CSD1* mRNA's in Cu^{2+} , Fe^{3+} , zout en licht stress (37). Dus, de werking van verschillende stress factoren verloopt op een gelijkaardige wijze in planten, maar verder onderzoek naar de rol van miR398 in een stress respons is noodzakelijk.

4.3 Toekomstperspectieven

In de nabije toekomst is het belangrijk dat de experimenten aangevuld worden op verschillende gebieden. Eerst en vooral zou de *rml1*, die slechts 3% van de normale hoeveelheid GSH bevat, opgenomen moeten worden in de herhalingen van deze experimenten. De bijna totale afwezigheid van GSH kan zo onderzocht worden. Aangezien GSH een belangrijke Cd scavenger is kan de invloed van GSH op de Cd opname in blad en wortel bepaald worden door een metaalbepaling uit te voeren en op deze manier een nutriëntenprofiel op te stellen. De resultaten van de invloed van GSH op de SOD regulatie dienen bevestigd te worden op het eiwitniveau. Dit kan gebeuren door de in-gel activiteiten van antioxidatieve enzymen te bepalen. Zo kan ook de activiteit van de verschillende isovormen van SOD bepaald worden. In tegenstelling tot de verminderde hoeveelheid GSH in de mutanten is het eveneens interessant om in de toekomst te werken met een mutant met een overmaat aan GSH.

4.4 Synthese

De interactie tussen Cd toxiciteit en het antioxidatieve metaboliet GSH werd onderzocht op het modelorganisme *Arabidopsis thaliana* op cellulair niveau. Het zware metaal Cd is niet redox-actief en induceert ROS via indirecte mechanismen. Om de metaalstress te beperken en de redox balans te controleren beschikt de cel over een antioxidatief verdedigingssysteem. Onderdeel van dit systeem is GSH, een LMW proteïne, dat in staat is om zowel vrij Cd te complexeren als een belangrijke functie in de AsA-GSH cyclus heeft. In deze studie werden, naast het wildtype, drie verschillende GSH-deficiënte mutanten (*cad2-1*, *pad2-1* en *rax1-1*) gebruikt.

Cadmium veroorzaakte een dosisafhankelijke groei-inhibitie in alle genotypen van *A. thaliana*, toch stopt de groei van de mutanten reeds bij lagere concentraties dan het wildtype. De mutatie in het katalytische gedeelte van het eerste biosynthese enzym van GSH zorgt dat de mutanten zich minder snel aanpassen aan een GSH vermindering door de productie van PC's. De verminderde aanwezigheid van GSH zorgt enerzijds voor een verminderde vorming van Cd chelatoren alsook een verminderde antioxidatieve capaciteit, en bijgevolg meer oxidatieve stress. Het effect van Cd op de antioxidatieve capaciteit is dubbel: enerzijds induceert Cd oxidatieve stress via de inhibitie van antioxidanten, anderzijds activeert het antioxidatieve componenten door de verstoring van de redox balans en oxidatieve signalisatie. In de GSH-deficiënte mutanten zien we een stijging in CAT activiteit ten opzicht van het wildtype, wat erop kan wijzen dat mutanten onder normale omstandigheden reeds meer oxidatieve stress ervaren en dit door compensatie trachten te beperken. Daarnaast hebben mutanten minder GSH reserves, waarvan reeds een deel wordt opgebruikt voor de PC productie onder Cd stress, en zullen ze de activiteit van GR verhogen om onmiddellijk al het GSSG terug te reduceren tot GSH. De neutralisatie van het $O_2^{\bullet -}$ door SOD's is een belangrijk enzymatisch antioxidatief systeem, waarvan bij de mutanten de transcriptiesnelheid van *CSD1* enorm verhoogd is na Cd blootstelling. Op deze manier wordt de negatieve regulatie van de Cd geïnduceerde miR398's beperkt. Een gebrek aan GSH heeft dus een positieve invloed op de transcriptiesnelheid van *CSD1* waardoor onmiddellijk alternatieve antioxidatieve mechanismen worden aangeschakeld door deze planten na Cd-blootstelling.

Tot conclusie kan gesteld worden dat GSH een belangrijke invloed heeft op metaalgeïnduceerde oxidatieve stress: enerzijds als primair antioxidant en anderzijds als regulator in de antioxidatieve respons.

5 Referenties

1. 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;87:283-9. Epub 1990/07/01.
2. Nawrot TS, Staessen JA, Roels HA, Munters E, Cuypers A, Richart T, et al. Cadmium exposure in the population: from health risks to strategies of prevention. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*. 2010;23(5):769-82. Epub 2010/06/03.
3. Satarug S, Garrett SH, Sens MA, Sens DA. Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. *Environmental health perspectives*. 2010;118(2):182-90. Epub 2010/02/04.
4. Clemens S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*. 2006;88(11):1707-19. Epub 2006/08/18.
5. Cutler JM, Rains DW. Characterization of cadmium uptake by plant tissue. *Plant physiology*. 1974;54(1):67-71. Epub 1974/07/01.
6. Das P, Samantaray S, Rout GR. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environ Pollut*. 1997;98(1):29-36. Epub 1997/01/01.
7. Van Belleghem F, Cuypers A, Semane B, Smeets K, Vangronsveld J, d'Haen J, et al. Subcellular localization of cadmium in roots and leaves of *Arabidopsis thaliana*. *The New phytologist*. 2007;173(3):495-508. Epub 2007/01/25.
8. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*. 2006;141(2):312-22. Epub 2006/06/09.
9. Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in plant science*. 2004;9(10):490-8. Epub 2004/10/07.
10. Noctor G, Foyer CH. ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*. 1998;49:249-79. Epub 2004/03/12.
11. Cuypers A, Plusquin M, Remans T, Jozefczak M, Keunen E, Gielen H, et al. Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*. 2010;23(5):927-40. Epub 2010/04/03.
12. Torres MA, Dangl JL. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current opinion in plant biology*. 2005;8(4):397-403. Epub 2005/06/09.
13. Peterson AG, Oliver DJ. Leaf-targeted phytochelatin synthase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale*. 2006;44(11-12):885-92. Epub 2006/11/25.
14. Seth CS, Remans T, Keunen E, Jozefczak M, Gielen H, Opdenakker K, et al. Phytoextraction of toxic metals: a central role for glutathione. *Plant, cell & environment*. 2011. Epub 2011/04/14.
15. Pomponi M, Censi V, Di Girolamo V, De Paolis A, di Toppi LS, Aromolo R, et al. Overexpression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase in tobacco plants enhances Cd(2+) tolerance and accumulation but not translocation to the shoot. *Planta*. 2006;223(2):180-90. Epub 2005/09/01.
16. Cuypers A, Smeets K, Ruytinx J, Opdenakker K, Keunen E, Remans T, et al. The cellular redox state as a modulator in cadmium and copper responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Journal of plant physiology*. 2011;168(4):309-16. Epub 2010/09/11.
17. Smeets K, Opdenakker K, Remans T, Van Sanden S, Van Belleghem F, Semane B, et al. 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(18):1982-92. Epub 2009/08/28.
18. Jagadeeswaran G, Saini A, Sunkar R. Biotic and abiotic stress down-regulate miR398 expression in *Arabidopsis*. *Planta*. 2009;229(4):1009-14. Epub 2009/01/17.

19. Sunkar R, Kapoor A, Zhu JK. Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in Arabidopsis is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *The Plant cell*. 2006;18(8):2051-65. Epub 2006/07/25.
20. Bouche N. New insights into miR398 functions in Arabidopsis. *Plant signaling & behavior*. 2010;5(6):684-6. Epub 2010/04/20.
21. Beauclair L, Yu A, Bouche N. microRNA-directed cleavage and translational repression of the copper chaperone for superoxide dismutase mRNA in Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology*. 2010;62(3):454-62. Epub 2010/02/05.
22. Parisy V, Poinssot B, Owsianowski L, Buchala A, Glazebrook J, Mauch F. Identification of PAD2 as a gamma-glutamylcysteine synthetase highlights the importance of glutathione in disease resistance of Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology*. 2007;49(1):159-72. Epub 2006/12/06.
23. Cobbett CS, May MJ, Howden R, Rolls B. The glutathione-deficient, cadmium-sensitive mutant, *cad2-1*, of Arabidopsis thaliana is deficient in gamma-glutamylcysteine synthetase. *The Plant journal : for cell and molecular biology*. 1998;16(1):73-8. Epub 1998/11/10.
24. Vernoux T, Wilson RC, Seeley KA, Reichheld JP, Muroy S, Brown S, et al. The ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2 gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *The Plant cell*. 2000;12(1):97-110. Epub 2000/01/15.
25. Balcells L, Coupland G. The presence of enhancers adjacent to the Ac promoter increases the abundance of transposase mRNA and alters the timing of Ds excision in Arabidopsis. *Plant molecular biology*. 1994;24(5):789-98. Epub 1994/03/01.
26. Gamborg OL MR, Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells.: *Experimental Cell Research*; 1968.
27. Smeets K, Ruytinx J, Van Belleghem F, Semane B, Lin D, Vangronsveld J, et al. Critical evaluation and statistical validation of a hydroponic culture system for Arabidopsis thaliana. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale*. 2008;46(2):212-8. Epub 2007/11/21.
28. Dhinsa R, Plumb-Dhinsa P, Thorpe T. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J Exp Bot*. 1981;32:101.
29. Semane B, Cuypers A, Smeets K, Van Belleghem F. Cadmium responses in Arabidopsis thaliana: glutathione metabolism and antioxidative defence system. *Physiologia Plantarum* 2007;129:10.
30. Remans T, Smeets K, Opendakker K, Mathijssen D, Vangronsveld J, Cuypers A. Normalisation of real-time RT-PCR gene expression measurements in Arabidopsis thaliana exposed to increased metal concentrations. *Planta*. 2008;227(6):1343-9. Epub 2008/02/15.
31. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *The Journal of biological chemistry*. 1969;244(22):6049-55. Epub 1969/11/25.
32. A. Imberty RG, A.M. Catesson, . Tetramethylbenzidine and p-phenylenediamine-pyrocatechol for peroxidase histochemistry and biochemistry: two new noncarcinogenic chromogens for investigating lignification processes. *Plant science*. 1984;35:103-8.
33. H.U. Bergmeyer KG, M. Grassl, i. Enzymes as biochemical reagents. Academic Press. 1974;Bergmeyer (Ed.) *Methods in Enzymatic Analysis*.
34. K.P. Gerbling JKG, K.H. Fischer, E. Latzko,115 (1984) 59–67. Partial purification and properties of soluble ascorbate peroxidases from pea leaves. *Plant Physiol*. 1984;115:59-67.
35. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of clinical nutrition*. 1993;57(5 Suppl):715S-24S; discussion 24S-25S. Epub 1993/05/01.
36. Smeets KR, J. Semane, B. Cuypers, A. Cadmium-induced transcriptional and enzymatic alterations related to oxidative stress. *Environmental and Experimental Botany*. 2008;63:8.

37. Cheng ZY, D. Haili, L. MiR398 and plant stress responses. *Physiologia Plantarum*. 2011;143:9.

Auteursrechtelijke overeenkomst

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

De invloed van glutathion op de verdediging tegen cadmium-geïnduceerde oxidatieve stress in Arabidopsis thaliana.

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

Jaar: **2011**

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,

Meyssen, Dirk

Datum: **25/08/2011**