Invloed van cadmiumstress bij Arabidopsis thaliana: transcriptionele veranderingen in regulatiemechanismen.

Kim Donckers

promotor : dr. Ann CUYPERS

co-promotor : Prof. dr. Jaak VANGRONSVELD



hasselt

universiteit

INHOUDSOPGAVE

| L | IJST M | /IET FIGUREN EN TABELLEN | ii | |
|----|--------------------------|--|-------------------------|--|
| L | LIJST MET AFKORTINGEN ii | | | |
| D | DANKWOORDir | | | |
| S | AMEN | JVATTING | v | |
| 1 | INI | LEIDING | 1 | |
| | 1.1 | Cadmiumvervuiling | 1 | |
| | 1.2 | Blootstelling van organismen aan cadmium | 2 | |
| | 1.2. | 7.1 Fysiologische effecten van cadmium op mens en dier | 2 | |
| | 1.2. | 2.2 Fysiologische effecten van cadmium op de plant | 3 | |
| | 1.3 | Cellulaire effecten van cadmium op organismen | 3 | |
| | 1.3. | 2.1 Oxidatieve stress | 3 | |
| | 1.4 | Regulatie van cadmiumgeïnduceerde effecten | 5 | |
| | 1.4. | Calcium signalisatie pathways | 6 | |
| | 1.4. | .2 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways | 7 | |
| | 1.4. | .3 MicroRNA (miRNA) | 10 | |
| | Doel v | van het onderzoek | 12 | |
| 2 | MA | ATERIAAL EN METHODEN | 13 | |
| | 2.1 | Plantenmateriaal en cadmiumblootstelling | 13 | |
| | 2.2 | Elementbepaling | 13 | |
| | 2.3 | Bepaling van genexpressie | 13 | |
| | 2.3. | <i>RNA extractie</i> | 13 | |
| | 2.3. | 2.2 Bepaling concentratie en zuiverheid RNA | 14 | |
| | 2.3. | <i>Reverse transcriptie PCR</i> | 14 | |
| | 2.3. | .4 Kwantitatieve real-time PCR | 15 | |
| | 2.4 | Benaling van genexpressie miRNAs | 17 | |
| | 2.4. | 1 miRNA extractie | 17 | |
| | 2.4 | 2 TaaMan microRNA assay | .17 | |
| | 2.5 | TBA-metingen | 19 | |
| | 2.6 | SOD enzym assay | 19 | |
| | 2.7 | Elektronenmicroscopie | 20 | |
| | 2.8 | Statistische analyse | 20 | |
| 3 | RE | Suitsisene unityse | 21 | |
| U | 31 | Invloed van cadmiumblootstelling op nutriëntenprofiel in Arabidopsis thaliana | 21 | |
| | 3.2 | Microscopische effecten na cadmiumblootstelling in <i>Arabidonsis thaliana</i> | 22 | |
| | 33 | Oxidatieve stress effecten na cadmiumblootstelling in <i>Arabidonsis thaliana</i> | 23 | |
| | 3.4 | Verstoring van de redox balans na cadmiumblootstelling in Arabidonsis thaliana | 23 | |
| | 3 5 | Regulatie van cadmiumgeïnduceerde effecten in <i>Arabidonsis thaliana</i> – studie o | n | |
| | 5.0 | genexpressieniveau | r 26 | |
| | 36 | Regulatie van cadmiumgeïnduceerde effecten in Arabidonsis thaliana – | 20 | |
| | 5.0 | aanvullingen on eiwitniveau | 33 | |
| 4 | פות | scussif | | |
| 5 | | NCLUSIF. | ΔΔ | |
| R | EFFP | PENTIES | <u>דד</u> <u>1</u> 6 | |
| R | | CF | 50 | |
| D. | Riilaa | σμ | 50 | |
| | Dijiag | 5V 1 | | |

LIJST MET FIGUREN EN TABELLEN

Figuren:

| Figuur 1.1 | Signaaltransductie bij stress in planten | 5 |
|--------------|--|----|
| Figuur 1.2 | De SOS pathway in Arabidopsis thaliana | 7 |
| Figuur 1.3 | Signaaltransductie door MAPK cascades | 8 |
| Figuur 1.4 | miRNA pathway in planten | 11 |
| Figuur 2.1 | Tweestaps RT-PCR | 18 |
| Figuur 3.1 | Cortex in wortels van 3 weken oude Arabidopsis thaliana zaailingen gedurende | 22 |
| Eigung 2.2 | 24 uur bioorgestelu dall 0 en 10 μM Cu | LL |
| Figuur 5.2 | zaailingen gedurende 24 uur blootgesteld aan 0 en $10 \mu\text{M}$ Cd | 23 |
| Figuur 3.3 | Lipidenperoxidatie in blaadjes van 3 weken oude <i>Arabidopsis thaliana</i> zaailingen gedurende 24 uur blootgesteld aan 0, 5 en 10 uM Cd | 23 |
| Figuur 3.4 | Genexpressie van ROS-producerende enzymen in wortels en blaadjes van 3 weken oude Arabidopsis thaliana zaailingen gedurende 24 uur blootgesteld aan 0 | |
| | 2 5 en 10 µM Cd | 24 |
| Figuur 3.5 | Genexpressie van antioxidatieve enzymen in wortels en blaadjes van 3 weken | 2. |
| | oude Arabidopsis thaliana zaailingen gedurende 24 uur blootgesteld aan 0, 2, 5 en | 20 |
| Eisen 2.6 | $10\mu\text{M}\text{Ca}$ | 26 |
| Figuur 5.0 | bleedies van <i>CDPKT</i> en componenten van de SOS pathway in worters en | |
| | blootstelling aan 0, 2, 5 en 10 µM Cd | 27 |
| Figuur 3.7 | Genexpressie van componenten betrokken bij MAPK cascades in wortels en | 21 |
| | on 0, 2, 5 on 10 uM Cd | 20 |
| Figuur 3.8 | Genexpressie van transcriptiefactoren en <i>NIG1</i> in wortels en blaadjes van 3 | 29 |
| | weken oude Arabidopsis thaliana zaailingen 24 uur blootgesteld aan 0, 2, 5 en 10 | 20 |
| E | μM Cd | 30 |
| Figuur 3.9 | Arabidopsis thaliana zaailingen 24 uur blootgesteld aan 0 (2) 5 en 10 uM Cd | 31 |
| Figuur 3.10 | Schematisch overzicht van genexpressie van componenten betrokken bij calcium- | 01 |
| U | signalisatie in wortels en blaadjes van 3 weken oude Arabidopsis thaliana | |
| | zaailingen na 24 uur blootstelling aan cadmium | 32 |
| Figuur 3.11 | Schematisch overzicht van genexpressie van componenten betrokken bij MAPK cascades in wortels en blaadies van 3 weken oude Arabidonsis thaliana | |
| | zaailingen na 24 uur blootstelling aan cadmium | 33 |
| Figuur 3.12 | Veranderingen in SOD activiteit in wortels en blaadies van 3 weken oude | 55 |
| 1 .5uur 5.12 | Arabidopsis thaliana zaailingen na 24 uur blootstelling aan 0, 5 en 10 μ M Cd | 34 |
| | | |

Tabellen:

| Forward en revers primers van de genen waarvan de genexpressie werd gemeten | |
|---|--|
| met behulp van real-time PCR gebruik makend van SYBR Green chemie | 50 |
| Elementconcentraties in wortels van 3 weken oude Arabidopsis thaliana | |
| zaailingen gedurende 24 uur blootgesteld aan 0, 2, 5 en 10 µM Cd | 21 |
| Elementconcentraties in blaadjes van 3 weken oude Arabidopsis thaliana | |
| zaailingen gedurende 24 uur blootgesteld aan 0, 2, 5 en 10 µM Cd | 22 |
| Dikte van de xyleemvaten in wortels van 3 weken oude Arabidopsis thaliana | |
| zaailingen gedurende 24 uur blootgesteld aan 0, 5 en 10 µM Cd | 23 |
| | Forward en revers primers van de genen waarvan de genexpressie werd gemeten met behulp van real-time PCR gebruik makend van SYBR Green chemie Elementconcentraties in wortels van 3 weken oude <i>Arabidopsis thaliana</i> zaailingen gedurende 24 uur blootgesteld aan 0, 2, 5 en 10 μ M Cd Elementconcentraties in blaadjes van 3 weken oude <i>Arabidopsis thaliana</i> zaailingen gedurende 24 uur blootgesteld aan 0, 2, 5 en 10 μ M Cd Dikte van de xyleemvaten in wortels van 3 weken oude <i>Arabidopsis thaliana</i> zaailingen gedurende 24 uur blootgesteld aan 0, 2, 5 en 10 μ M Cd |

LIJST MET AFKORTINGEN

| ROS | Reactieve zuurstofvormen | |
|----------------------------|---|--|
| O ₂ | Superoxide anion | |
| H_2O_2 | Waterstofperoxide | |
| SOD | Superoxide dismutase | |
| FSD1 | Ijzer SOD 1 | |
| CSD1 | Koper/zink SOD1 | |
| CSD2 | Koper/zink SOD2 | |
| MnSOD | Mangaan SOD | |
| CAT | Catalase | |
| APX | Ascorbaatperoxidase | |
| LOX | Lipoxygenase | |
| RBOH | Respiratoire burst oxidase homoloog | |
| | NADPH-oxidase | |
| МАРК | Mitogen-activated proteïne kinase | |
| МАРКК | Mitogen-activated proteïne kinase kinase | |
| МАРККК | Mitogen-activated proteïne kinase kinase kinase | |
| OXI1 | Oxidative signal-inducible kinase 1 | |
| Ser/Thr kinase activiteit | Serine/threonine kinase activiteit | |
| Thr/Tyr kinase activiteit | Threonine/tyrosine kinase activiteit | |
| CDPK | Calcium-afhankelijk proteïne kinase | |
| CBL | Calcineurin B-like proteïne | |
| СІРК | CBL interacting proteïne kinase | |
| SOS | Salt-overly sensitive | |
| NIG1 | NaCl induceerbaar gen | |
| miRNA | microRNA | |
| RISC | RNA-induced silencing complex | |
| AGO1 | Argonaute 1 | |
| TBA | Thiobarbituurzuur | |
| PP2C | Proteïne fosfatase 2C | |
| ABA | Abscisinezuur | |
| ABI1 | Abscisic acid insensitive 1 | |

DANKWOORD

Het voorbije half jaar heb ik kennis gemaakt met het fundamenteel wetenschappelijk onderzoek. Deze 6 maanden waren dan ook een zeer leerrijke periode voor mij. Tijdens mijn stage kon ik altijd rekenen op de hulp en steun van een fantastische groep mensen. Deze pagina had ik dan ook graag gebruikt om al deze mensen te bedanken.

Allereerst wil ik graag mijn promotor, Dr. Ann Cuypers, en copromotor, Prof. Dr. Jaco Vangronsveld, bedanken om mij de kans te geven om stage te lopen in het labo Milieubiologie. Zij stonden altijd klaar voor mij met hun wijze raad en suggesties. Verder wil ik hen ook bedanken voor het kritisch nalezen en verbeteren van mijn thesis. Mijn tweede beoordelaar, Prof. Dr. Jan Colpaert wil ik bedanken voor het nalezen en beoordelen van mijn thesis.

Een zeer groot woord van dank gaat ook uit naar mijn begeleidster Karen Smeets. Zij was degene die van 's morgens tot 's avonds klaarstond voor mij, en dit altijd met evenveel enthousiasme. Zij stond mij altijd met raad en daad bij in het labo, maar ook daarbuiten bij het analyseren van de data. Zij heeft mij geleerd om wetenschappelijk te redeneren. Veel van haar kostbare tijd heeft zij ook opgeofferd aan het nalezen en verbeteren van mijn thesis. Heel hard bedankt, Karen!

Verder wil ik heel het labo milieubiologie, plantenfysiologie en dierkunde bedanken voor de fijne sfeer in het labo. Ann Wijgaerts wil ik bedanken voor de uitleg die zij mij heeft gegeven over de PAGE techniek en de iso-SOD kleuringen. Mijn medestudenten wil ik ook bedanken voor de fijne werksfeer. Liesbeth en Dennis ben ik een woord van dank verschuldigd voor de hulp bij het voorbereiden, onderhouden en oogsten van de kweken.

Een speciaal woord van dank gaat ook uit naar mijn ouders, die mij de kans hebben gegeven om deze studie te kunnen volgen. Verder kunnen mijn vriend Niel, broer Pieter en zus Katrien ook niet ontbreken op deze pagina. Zij toonden telkens weer interesse in mijn stageonderwerp, en zijn mij al die tijd blijven steunen. Als laatste, maar daarom niet minder belangrijk, wil ik al mijn vrienden en vriendinnen van Biomedische Wetenschappen bedanken voor al de gezellige momenten tijdens deze 4 jaren.

SAMENVATTING

Als gevolg van antropogene bronnen werden sinds de 19^e eeuw lucht, water en bodem vervuild met cadmium. Dit niet-essentieel toxische metaal is reeds toxisch bij lage concentraties voor zowel plant, dier als mens. Blootstelling van een organisme aan cadmium zal leiden tot de verstoring van verschillende fysiologische processen, zoals schade aan lever, nieren, bot en longen bij mens en dier. Bij planten wordt onder andere de fotosynthese verstoort. Een mogelijke oorzaak van deze fysiologische verstoringen is het ontstaan van oxidatieve stress op cellulair niveau. Oxidatieve stress wordt gedefinieerd als een onevenwicht in het voorkomen van pro-oxidanten en anti-oxidanten. Hierbij zullen pro-oxidanten, zoals reactieve zuurstofvormen, zorgen voor de beschadiging aan allerlei biomoleculen: DNA, eiwitten en membraanlipiden. Zo worden verschillende functies verstoord. De antioxidatieve verdediging zal in deze stress-situatie geactiveerd worden en zorgen voor bescherming. De manier waarop deze antioxidatieve verdediging geactiveerd wordt, is tot op heden nog onvoldoende gekend.

In deze studie werd de rol van MAPK cascades en calcium-signalisatie pathways op genexpressieniveau bestudeerd bij de regulatie van cadmiumgeïnduceerde effecten. Verder werd er ook gezocht naar specifieke miRNAs die belangrijk zijn onder cadmiumstress. Er werd getracht om deze genexpressiepatronen in verband te stellen met deze van ROS-producerende en antioxidatieve enzymen. Als modelorganisme werd gebruik gemaakt van *Arabidopsis thaliana*, omwille van een grote beschikbaarheid aan moleculaire informatie en technieken.

Uit de resultaten van deze studie kan besloten worden dat calcium een belangrijke factor lijkt te zijn in de regulatie van cadmiumgeïnduceerde stresseffecten. Componenten die belangrijk zijn in calcium-signalisatie, en waarvan tot nu toe enkel van geweten was dat ze belangrijk zijn bij zoutstress, werden op genexpressieniveau gewijzigd onder invloed van cadmiumstress. Verder toonde deze studie een stijging in genexpressie van componenten betrokken bij MAPK cascades als gevolg van cadmiumblootstelling. Ook een stijging in genexpressie van antioxidatieve genen werd aangetoond in dit onderzoek. Enkel de genexpressie van *Cu/ZnSOD* bleek te dalen onder cadmiumstress. Een specifiek miRNA dat hiervoor verantwoordelijk zou kunnen zijn, kwam in deze studie verhoogd tot expressie.

INLEIDING

1

Metaalvervuiling is een groot probleem in onze samenleving. De gecontamineerde gebieden in België zijn ondermeer de Maasvallei bij Luik, Noord-Limburg en de Antwerpse Kempen. Een belangrijk onderdeel van deze vervuiling is cadmium. Eerder onderzoek in Noord-Limburg en de Antwerpse Kempen toonde verhoogde cadmiumgehalten op sites in Balen, Lommel en Overpelt (1). Omwille van zijn bewezen toxische effecten voor zowel mens, dier en plant, krijjaja da zal wel lukke

gen verschillende aspecten rond cadmiumvervuiling de laatste jaren steeds meer aandacht (2).

1.1 Cadmiumvervuiling

Cadmium is een niet-essentieel divalent toxisch metaal en komt voor in de verschillende compartimenten van het ecosysteem: lucht, water en grond. Cadmium kan op verschillende manieren terechtkomen in het milieu. Enerzijds gebeurt dit op natuurlijke wijze. Anderzijds zijn menselijke activiteiten een zeer grote bron van cadmiumvervuiling.

Een natuurlijke bron aan cadmium is de concentratie aanwezig in de aardkorst. Deze hoeveelheid kan vrijkomen door verwering van mineralen, bosbranden of vulkaanuitbarstingen. De voornaamste oorzaak van cadmiumvervuiling zijn echter menselijke activiteiten. Als gevolg van de non-ferro metaal industrie komt cadmium namelijk vrij als bijproduct door het smelten van vooral zink, maar ook lood en koper. Op deze manier zal cadmium terechtkomen in de lucht, en kan het binden aan kleine stofdeeltjes. Cadmium dat wordt vrijgezet in de omgeving zal zich vooral concentreren in de bodem. Maar ook de landbouw zorgt, door het gebruik van meststoffen en pesticiden, rechtstreeks voor vervuiling van de bodem. Als gevolg van afvloeiing kan cadmium eveneens in het watersysteem terechtkomen (3).

Naast pollutie, wordt cadmium ook gebruikt bij de vervaardiging van verscheidene producten, zoals stabilisator in PVC producten, kleurpigment en bij de vervaardiging van nikkelcadmium batterijen.

1.2 Blootstelling van organismen aan cadmium

Aangezien cadmium aanwezig is in verschillende onderdelen van het ecosysteem, kunnen organismen ook op verschillende manieren worden blootgesteld. Planten die groeien op vervuilde grond, zullen cadmium opnemen via de wortels. Ook kan cadmium door planten via de blaadjes worden opgenomen. Vooral bladgroenten zoals sla, spinazie en selder nemen gemakkelijk cadmium op via de wortels, waardoor het via de voedselketen bij mens en dier terechtkomt. Mensen en dieren kunnen ook een hoeveelheid cadmium opnemen als gevolg van pica gedrag. Voor mens en dier is respiratoire opname ook mogelijk door het inademen van cadmiumrijke stofdeeltjes in de lucht. Een andere belangrijke respiratoire bron zijn sigaretten. Verder gebeurt cadmiumopname ook, weliswaar in beperkte mate, dermaal (4).

1.2.1 Fysiologische effecten van cadmium op mens en dier

Cadmium heeft een uitzonderlijk lang biologisch halfleven in het menselijk lichaam van 10 tot 30 jaar (2). Organen zoals lever, nieren, bot en longen worden hoofdzakelijk aangetast door cadmium. Na opname komt cadmium terecht in het bloed, waarna het getransporteerd wordt naar de lever. Hier zal cadmium binden aan metallothioneïne (MT) en getransporteerd worden naar andere organen, zoals de nieren. Er werd reeds aangetoond dat cadmiumblootstelling leidt tot het ontstaan van tubulaire en glomerulaire schade. Dit zal leiden tot renale disfunctie. Na opname wordt cadmium immers geconcentreerd in de nier, waardoor urinaire cadmiumexcretie biomerker de is levenslange een voor cadmiumblootstelling (5). Verder kan cadmium ook leiden tot botschade, al is dit vaak een effect van hoge blootstelling (Itai-Itai-ziekte, Japan) (6).

Ook werd cadmium door het IARC (international agency for research on cancer) geklassificeerd als een carcinogene stof van categorie 1. Recent epidemiologisch onderzoek toont aan dat een verhoogde blootstelling aan cadmium van een gewone populatie leidt tot een verhoogd risico op kanker, vooral longkanker (2). Eerder werd reeds aangetoond dat fabriekswerkers een verhoogd risico hebben op longkanker (7).

1.2.2 Fysiologische effecten van cadmium op de plant

Planten zijn sedentaire organismen. Wanneer zij dus groeien in vervuilde gebieden, wordt hun normaal functioneren verstoord. Een eerste belangrijk zichtbaar fysiologisch effect is een inhibitie van de groei. Verder kan cadmium zorgen voor een verminderde opname van mineralen, zoals nitraten, en water. Door een inhibitie van nitraat reductase in de stengel, zorgt cadmium voor verminderde absorptie en transport van wortel naar stengel van nitraten. Andere belangrijke symptomen van cadmiumblootstelling zijn chlorose, necrose en vermindering in productiviteit en nutritionele kwaliteit.

Fysiologische processen, zoals transpiratie, respiratie en fotosynthese worden geïnhibeerd door cadmium. Cadmium zorgt voor een inhibitie van het openen van de stomata. Hierdoor heeft cadmium een effect op de transpiratie. Fotosynthese kan op verschillende manieren aangetast worden, waaronder inhibitie van de chlorofylbiosynthese, van het fotosynthetische elektronentransport of van de CO_2 -fixatie. Cadmium zorgt voor een inhibitie van Fe(III) reductase in de wortel. Dit leidt tot Fe(II) deficiëntie, wat ook een effect heeft op de fotosynthese (8).

1.3 Cellulaire effecten van cadmium op organismen

Op cellulair niveau induceert cadmium zowel cytotoxische als genotoxische schade. Zo zorgt cadmium voor de beschadiging van verschillende biomoleculen, zoals eiwitten, lipiden en DNA. Cadmium kan cofactoren, zoals Zn, Mn, Ca en Fe, vervangen en interfereert zo met de structuur en functie van ondermeer enzymen en transporteiwitten (9). Andere effecten zijn schade aan DNA strengen (10) en lipidenperoxidatie (11). Een mogelijk oorzaak van deze schade is de inductie van oxidatieve stress.

1.3.1 Oxidatieve stress

Oxidatieve stress is het gevolg van een onevenwicht in het organisme tussen het voorkomen van pro-oxidanten en anti-oxidanten. Bij oxidatieve stress zullen er (relatief) meer pro-oxidanten aanwezig zijn dan anti-oxidanten. Pro-oxidanten zijn onderandere reactieve zuurstofvormen (ROS). ROS worden gevormd als intermediairen bij de reductie van zuurstof tot water in de mitochondria. Verder worden ROS ook onder normale omstandigheden gevormd in de chloroplasten. Het superoxide anion (O_2^{--}) , waterstofperoxide (H_2O_2) en het

hydroxylradicaal (OH) zijn vormen van ROS. Anti-oxidanten zijn bepaalde stoffen die deze vorming van ROS tegengaan.

Organismen beschikken over enzymatische en niet-enzymatische verdedigingsmechanismen om op deze manier de redoxbalans in stand te houden. Tot dit antioxidatieve systeem behoren metabolieten zoals ascorbaat en glutathion. In de chloroplasten speelt de ascorbaatglutathioncyclus een rol bij de verwijdering van H_2O_2 dat geproduceerd wordt tijdens het fotosynthese proces. Enzymen die belangrijk zijn in het antioxidatieve systeem zijn glutathion reductase (GR), superoxide dismutasen (SOD), catalasen (CAT) en peroxidasen (PX). GR zorgt voor de reductie van geoxideerd glutathion. SOD is een antioxidatief enzym dat zorgt voor de omzetting van O_2^- naar O_2 en H_2O_2 . Er bestaan tevens isozymen van SOD, namelijk Cu/ZnSOD, FeSOD en MnSOD. Deze isozymen bevinden zich in verschillende cellulaire compartimenten. Detoxificatie van H_2O_2 gebeurt op zijn beurt door CAT en PX. Ascorbaatperoxidase (APX) is een voorbeeld van een PX (12).

Cadmium is een niet redox-acief element en is dus bijgevolg niet in staat om rechtstreeks ROS zijn te produceren. Indirecte processen ondermeer verstoring van elektronentransportketens, interferentie met de antioxidatieve verdediging en inductie van lipidenperoxidatie (13). Lipidenperoxidatie wordt mogelijk veroorzaakt door een verhoogde activiteit van lipoxygenasen (LOX) die geïnduceerd wordt door cadmium. Deze enzymen zorgen voor de oxidatie van polyonverzadigde vetzuren (PUFA's) naar lipidehydroperoxiden. Een andere manier waarop oxidatieve stress ontstaat, is door de productie van H_2O_2 . H_2O_2 functioneert als signaalmolecule en reguleert veranderingen in expressie van verschillende genen, zoals antioxidatieve genen. Na cadmiumblootstelling blijkt dat NADPH-oxidasen zorgen voor de belangrijkste bron aan H_2O_2 -productie. NADPH-oxidasen (*RBOH* = respiratory burst oxidase homolog) zijn enzymen die zorgen voor de omzetting van O₂ naar O_2^{-} . Vervolgens kan O_2^{-} omgezet worden naar H_2O_2 (14).

Een verandering in activiteit van bepaalde antioxidatieve enzymen en metabolieten werd aangetoond na cadmiumblootstelling (15). Recent is ook aangetoond dat veranderingen in genexpressie van verschillende antioxidatieve enzymen zich voordoen na cadmiumblootstelling. Zo werd meer bepaald een verhoogde transcriptionele expressie van *FeSOD1 (FSD1)* in de wortels vastgesteld. Een verhoogde expressie van *CAT1* werd waargenomen in de blaadjes en wortels. Verder kwam *APX1* ook verhoogd tot expressie in de blaadjes. *CSD2* kwam verlaagd tot expressie zowel in wortels als blaadjes (14).

1.4 Regulatie van cadmiumgeïnduceerde effecten

Zoals eerder aangehaald zal blootstelling aan cadmium op cellulair niveau zorgen voor het ontstaan van oxidatieve stress. Weinig is echter geweten over de regulatie van deze cadmiumgeïnduceerde (oxidatieve stress) effecten. Een aantal studies toonden aan dat bij de signalisatie van abiotische stress, zoals koude, droogte en zoutstress, veranderingen in Ca²⁺, Ca²⁺ signalisatie pathways, MAPK cascades en transcriptiefactoren belangrijk zijn (16). Deze veranderingen zullen op hun beurt zorgen voor de activatie van stress-responsieve genen. Bij stress kan de signalisatie op de volgende manier gebeuren (Figuur 1.1). In een eerste stap

van deze signaaltransductie zullen bepaalde factoren de stress aanvoelen. Hierdoor kunnen signaalmoleculen zoals calcium getransporteerd worden naar het cytoplasma. Ook andere signaalmoleculen, zoals H₂O₂, zullen worden aangemaakt. Vervolgens kunnen verscheidene fosforylatiecascades, zoals mitogen-activated proteïne kinasen (MAPK) en calciumafhankelijke proteïne kinasen (CDPK), geactiveerd worden. Deze fosforylatiecascades zorgen uiteindelijk voor de activatie van bepaalde transcriptiefactoren, die nadien een verhoogde of verlaagde expressie van stress-responsieve genen induceren.



Figuur 1.1. Signaaltransductie bij stress in planten. (figuur aangepast uit Xiong et al, 2002) (16)

Eerder onderzoek toonde reeds aan dat als gevolg van cadmiumblootstelling componenten betrokken bij signaaltransductie, namelijk 3 proteïne kinasen, 4 transcriptiefactoren en 2 calmoduline-gerelateerde eiwitten, transcriptioneel verschillend tot expressie komen (17).

Ook microRNAs kunnen een rol spelen bij de regulatie van cadmiumgeïnduceerde effecten. Weinig is echter geweten over de inductie en de regulatie van deze microRNAs. Wel is aangetoond dat in verschillende stress-situaties genexpressieveranderingen gereguleerd worden door veranderingen in microRNAs (18). Later werd aangetoond dat de genexpressie van anti-oxidatieve enzymen zoals Cu/ZnSOD gereguleerd worden door miRNAs onder koper- en ijzerstress (19).

1.4.1 <u>Calcium signalisatie pathways</u>

In planten leiden verschillende soorten stress, zoals koude, droogte, zoutstress of oxidatieve stress, tot een transiënte stijging van de calciumconcentratie in het cytoplasma. Dit is enerzijds het gevolg van een stijgende influx van het extracellulaire calcium. Anderzijds kan dit ook veroorzaakt worden door vrijzetting van calcium uit intracellulaire opslagplaatsen. De duur, lokalisatie en frequentie van deze stijging wordt bepaald door het type stress (20). Een mogelijke inductor van deze stijging in calcium is H_2O_2 (21). NADPH-oxidasen zorgen mogelijk voor een verhoogde H_2O_2 productie. Ook bij cadmiumblootstelling werd reeds een verhoogde H_2O_2 -productie waargenomen (22).

Veranderingen in cytosolaire calciumconcentratie kunnen worden aangevoeld door bepaalde sensorproteïnen. Deze sensoren calcium maken deel uit van een complex signaaltransductienetwerk. Zo reguleren ze immers de activiteit van bepaalde target proteïnen, die op hun beurt zorgen voor specifieke cellulaire responsen als gevolg van een extracellulaire stimuli. In planten zijn er vier grote families van calciumsensoren geïdentificeerd. Het gaat hierbij over calmodulines (CaM), calmoduline-like proteïnen (CML), calcineurin B-like proteïnen (CBL) en calcium-afhankelijke proteïne kinasen (CDPK). Al deze sensoren zullen binden aan calcium. Dit heeft tot gevolg dat ze een calcium-afhankelijke conformationele verandering zullen ondergaan. Vervolgens zullen deze sensoren interageren met bepaalde proteïnen waardoor de structuur of activiteit van dit interagerend proteïne gereguleerd wordt. Zo zal CBL interageren met een CBL interacting proteïne kinase (CIPK). Het signaaltransductiemechanisme van CDPK verschilt van de andere sensoren doordat ze rechtstreeks geactiveerd kunnen worden. Ze bezitten een serine/threonine (Ser/Thr) kinase activiteit waardoor ze kunnen zorgen voor fosforylatie en activatie van target eiwitten (23).

Een voorbeeld van een calciumgeïnduceerd signaaltransductiepathway is het SOS pathway (Figuur 1.2) dat wordt aangeschakeld onder zoutstress. De eerste factor van deze pathway, salt overly sensitive 3 (SOS3), is een calcium-bindend eiwit dat cytosolisch Ca^{2+} aanvoelt. SOS3 is ook wel gekend als CBL4. Bij de aanwezigheid van Ca^{2+} , zal SOS3 interageren met salt overly sensitive 2 (SOS2 = CIPK24). Op deze manier wordt de Ser/Thr kinase activiteit van SOS2 geactiveerd. Beide SOS3 en SOS2 zijn nodig voor de fosforylatie en activatie van salt overly sensitive 1 (SOS1). SOS1 is een Na⁺/H⁺ antiporter die aanwezig is op het plasmamembraan (24,25).



Figuur 1.2. De SOS pathway in Arabidopsis thaliana.

Andere calciumafhankelijke kinasen die reageren onder stress-situaties zijn ondermeer; AtCPK1, AtCPK10, AtCPK11 en AtCPK30. In *Arabidopsis thaliana* werd aangetoond dat het gen *AtCDPK1* (*AtCPK10*) wordt geactiveerd als gevolg van droogte- en zoutstress. Tevens bleek dat CDPK1 kan zorgen voor de activatie van een stress-induceerbare promotor (26,27). Studies uitgevoerd op planten toonden aan dat een calcium-bindend nucleair proteïne betrokken is bij de signalisatie tijdens zoutstress. Deze transcriptiefactor is nu gekend als NaCl-induceerbaar gen 1 (NIG1) (28).

1.4.2 <u>Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways</u>

MAP kinase of MAPK cascades zijn aanwezig in alle eukaryoten. Dit zijn proteïnen die een kinase activiteit bezitten en op deze manier zorgen voor fosforylatie van bepaalde andere eiwitten. MAPK cascades zijn, net zoals Ca-afhankelijke signalisatiepathways, verantwoordelijk voor de intracellulaire signaaltransductie van extracellulaire signalen naar

intracellulaire targets. Meer bepaald zorgen ze voor veranderingen in genexpressie van target genen.

Deze MAPK pathways worden geactiveerd als gevolg van verschillende extracellulaire stimuli (Figuur 1.3). Het kan hier gaan over zowel externe als interne stimuli. Deze stimuli worden 'gevoeld' door specifieke receptoren, die op hun beurt zorgen voor de activatie van MAPK cascades. Deze cascades zullen aan de hand van fosforylatie zorgen voor activatie van de volgende factor van de cascade. De MAPK cascade bestaat uit 3 hoofdcomponenten, namelijk MAPK kinase kinase (MAPKKK), MAPK kinase (MAPKK) en MAPK. De receptor zal eerst zorgen voor activatie van MAPKKK door fysische interactie of door fosforylatie. MAPKKK zal door zijn Ser/Thr kinase activiteit zorgen voor activatie van MAPKK. MAPKK is een Thr/Tyr kinase dat zal zorgen voor fosforylatie en activatie van MAPK. MAPK bezit tevens Ser/Thr kinase activiteit en zal zorgen voor fosforylatie van transcriptiefactoren. Op deze manier worden transcriptiefactoren geactiveerd, wat zal leiden tot bepaalde cellulaire responsen door de verandering in genexpressie van bepaalde genen (29).



Figuur 1.3. Signaaltransductie door MAPK cascades. (aangepast uit Kaur, 2005) (29)

Studies uitgevoerd op Arabidopsis thaliana toonden reeds aan dat H₂O₂ kan zorgen voor de activatie van een specifiek MAPKKK, namelijk MAPKKK1 (ANP1 = Arabidopsis NPK1like proteïne kinase, waarbij NPK staat voor Nicotiana proteïne kinase). Dit kinase zal op zijn beurt zorgen voor het in gang zetten van een specifieke MAPK cascade, meer bepaald voor een activatie van MPK3 en MPK6. Deze geactiveerde MAPK cascade resulteert in de regulatie van genexpressie. Stress-responsieve genen worden op deze manier geactiveerd (30). Arabidopsis thaliana oxidative signal-inducible kinase 1 (OXI1) is een Ser/Thr kinase dat nodig is voor volle activatie van MPK3 en MPK6 na behandeling met ROS. Hierdoor is OXI belangrijke factor die oxidatieve stress koppelt aan MAPK een signaaltransductiecascades. OXI1 wordt geïnduceerd als respons op verschillende H₂O₂genererende stimuli, zoals verwonding en pathogeninfectie. Ook de kinase activiteit van OXI1 wordt door H₂O₂ geactiveerd door deze stimuli (31). MPK3 en MPK6 kunnen zorgen voor de activatie van de transcriptiefactoren WRKY22 en WRKY29. Studies uitgevoerd op Arabidopsis toonden aan dat de genen van WRKY22 en WRKY29 geïnduceerd werden door een MAP kinase pathway die resistentie responsen op bacteriële en fungi pathogenen medieert. Deze MAPK pathway bestaat uit MEKK1, MKK4/MKK5 en MPK3/MPK6 (32).

In *Arabidopsis* protoplasten, werd MAPKK2 (MKK2) geactiveerd door koude- en zoutstress. Deze activatie gebeurde meer specifiek door het MAPKKK8 (MEKK1). Verder zorgde deze signaaltransductiecascade voor activatie van twee MAPK's, namelijk MPK4 en MPK6. Het resultaat was activatie van stress-geïnduceerde genen (33). MAP kinase 4 substraat 1 (MKS1) werd reeds geïdentificeerd als een substraat van MPK4. MKS1 zal dan op zijn beurt interageren met de transcriptiefactoren WRKY25 en WRKY33. Op deze manier zorgt MKS1 voor de koppeling tussen MAPK cascades en de regulatie van specifieke transcriptiefactoren (34). Tevens werd aangetoond dat WRKY25 een transcriptiefactor is betrokken bij de plant verdediging na pathogen infectie met *Pseudomonas syringae*. Dit leed vervolgens tot een verminderde *PR1* (pathogenesis-gerelateerd gen 1) genexpressie (35).

In planten werd reeds aangetoond dat bepaalde MAPK cascades geactiveerd worden tijdens celdivisie, door hormonen of door pathogenen. Verder worden deze cascades ook geactiveerd door koude-, droogte-, zoutstress of bij verwonding (36).

Tot op heden is nog onvoldoende geweten over de activatie van bepaalde MAPK cascades als gevolg van cadmiumblootstelling. Recent is gebleken uit studies uitgevoerd op *alfalfa* dat cadmiumblootstelling leidt tot de activatie van specifieke MAPK cascade componenten (37).

Verder toonden studies in *Arabidopsis thaliana* aan dat *MEKK1* transcriptioneel geïnduceerd werd bij blootstelling aan hoge CdCl₂ concentraties (17). Activatie van MAPK cascades als gevolg van cadmiumblootstelling zou enerzijds het directe gevolg kunnen zijn van de blootsteling. Anderzijds kan dit ook het indirecte gevolg van de blootsteling zijn door de activatie van ROS. Er werd immers reeds aangetoond dat H₂O₂ zorgt voor de activatie van bepaalde MAPK cascades (30). Bovendien werd er ook (vooral in de blaadjes van *Arabidopsis thaliana*) een verhoogd H₂O₂-gehalte aangetoond bij 24 uur bloostelling aan deze cadmiumconcentraties (22).

1.4.3 <u>MicroRNA (miRNA)</u>

MicroRNAs (miRNA) zijn endogeen aanwezig in de cellen van plant, dier en mens. Het zijn RNA moleculen, die meer specifiek behoren tot de groep van small RNA moleculen. MiRNAs zijn immers slechts enkele nucleotiden lang, namelijk 21 tot 28 nucleotiden. Het zijn finale producten van niet-coderende RNA genen en hebben een rol bij de regulatie van de genexpressie van bepaalde andere target genen. Meer bepaald gebeurt dit op post-transcriptioneel niveau door RNA silencing van target genen.

Bij planten zal aan de hand van transcriptie het miRNA gen worden omgezet in een enkelstrengig transcript (Figuur 1.4). Het mature miRNA bevindt zich in de stemloop regio van dit transcript. Dit mature miRNA zal opgenomen worden in een RNA-induced silencing complex (RISC). RISC bevat tevens het proteïne argonaute1 (AGO1), een RNA slicer enzym. Vervolgens is het miRNA verantwoordelijk voor binding aan een complementair mRNA molecule. Door deze binding zal het mRNA molecule, door AGO1, klieving ondervinden. Zo kan de translatie onderdrukt worden en speelt miRNA een rol bij de regulatie van de genexpressie van bepaalde target genen (38).



Figuur 1.4. miRNA pathway in planten (aangepast uit Jones-Rhoades, 2006) (38)

De vorming van miRNA begint in de nucleus met de transcriptie van het *miRNA* gen met behulp van polymerase II (POL II). Op deze manier wordt pri-miRNA gevormd. Na transcriptie, treedt processing van het pri-miRNA op. Hierbij wordt het pri-miRNA geknipt door een RNase, namelijk DICER-like 1 (DCL1), samen met hyponastic leaves1 (HYL1) en andere cofactoren. Zo ontstaat eerst pre-miRNA, wat maar zeer kortlevend is in planten. Hierna wordt een miRNA-miRNA* duplex gevormd, die een fosfaat groep bevat aan de 5' kant en een 2 nucleotide overhang aan de 3' kant. Methylatie gebeurt dan door hau-enhancer 1 (HEN1) langs de 3' kanten. HASTY (HST) zorgt voor het transport van deze gemethyleerde miRNA-miRNA* duplex van de nucleus naar het cytoplasma. MiRNA* zal dan gedegradeerd worden. Het mature miRNA wordt in het cytoplasma opgenomen in een RNA-induced

silencing complex (RISC). Hierna zal het miRNA zorgen voor het binden van complementaire RNAs en zorgt AGO1 voor klieving van deze RNAs.

Op deze manier zijn miRNA moleculen sleutel regulatoren betrokken bij allerlei pathways. Genen die coderen voor transcriptiefactoren of andere regulatoire proteïnen, die functioneren in plantontwikkeling of signaaltransductie zijn een belangrijke categorie van genen waarop miRNAs hun functie uitoefenen. Verder kunnen miRNAs ook een rol spelen bij allerlei stressresponsen. Meer bepaald werd er reeds aangetoond dat in verschillende stress-situaties genexpressieveranderingen gereguleerd worden door veranderingen in miRNAs (18). Later werd aangetoond dat de genexpressie van anti-oxidatieve enzymen zoals Cu/ZnSOD gereguleerd worden door miRNAs onder koper- en ijzerstress (19). MiR398 zorgt hier voor de klieving van de transcripten van 2 Cu/ZnSOD's, namelijk *CSD1* en *CSD2*.

Tot op heden is er nog weinig geweten over de manier waarop bepaalde componenten van de miRNA pathway gereguleerd worden. Dit is noodzakelijk om de homeostase van het miRNA pathway te behouden. Studies toonden aan dat miR168 verantwoordelijk zou zijn voor de klieving van AGO1. Dit duidt op een negatief feedback mechanisme (39).

Doel van het onderzoek

Blootstelling van een organisme aan cadmium zal leiden tot de verstoring van verschillende fysiologische processen. Een mogelijke oorzaak van deze fysiologische verstoringen is het ontstaan van oxidatieve stress op cellulair niveau. Hierbij zullen ROS zorgen voor beschadiging van DNA, eiwitten en membraanlipiden, en op deze manier verschillende functies verstoren. Weinig is echter geweten over het ontstaan van deze schade, de regulatie van deze processen en de rol van oxidatieve stress hierin. In dit onderzoek zal de regulatie achter de toxische effecten van cadmium bestudeerd worden. Er zal gezocht worden naar mogelijke pathways die hierin een rol spelen. Op genexpressieniveau zullen de rol van Cadmiumgeïnduceerde effecten. Verder zal er in dit onderzoek gezocht worden naar specifieke microRNAs die een rol spelen bij de regulatie van de cadmiumtoxiciteit. Tevens werd de genexpressie van ROS-producerende en antioxidatieve enzymen gemeten. Er werd getracht om zo het genexpressiepatroon van deze genen in verband te kunnen stellen met het expressiepatroon op eiwitniveau van enkele van deze genen.

MATERIAAL EN METHODEN

2.1 Plantenmateriaal en cadmiumblootstelling

2

Als modelorganisme werd gebruikt gemaakt van *Arabidopsis thaliana*. Gedurende een drietal weken werden deze plantjes gekweekt in een hydrocultuur (40). Hierna werden ze blootgesteld aan 0, 2, 5 of 10 μ M cadmium (toegediend als CdSO₄) voor een periode van 24 uur. Dit zijn realistische blootstellingsconcentraties, die ook terug te vinden zijn in het poriewater van sites in Noord-Limburg en de Antwerpse Kempen. Na deze blootstelling, werden er stalen genomen van zowel wortel als blad van ongeveer 100 mg. Deze stalen werden onmiddellijk bevroren in vloeibare stikstof en vervolgens bewaard bij -70°C voor verdere analyse.

2.2 Elementbepaling

Elementbepalingen werden uitgevoerd op stalen van wortels en blaadjes van *Arabidopsis thaliana* zaailingen. Hiertoe werden de wortels eerst éénmaal gespoeld met 1mM Pb(NO₃)₂. Daarna werden ze tweemaal gespoeld met gedestilleerd water gedurende 5 min. Hierdoor werd cadmium dat gebonden was aan het worteloppervlak weggewassen. Voor de blaadjes volstond het om éénmaal te spoelen met gedestilleerd water. Dan werden wortels en blaadjes gedroogd bij 80°C. Vervolgens werden de stalen in een warmteblok met HNO₃ (70-71%) gebracht. Met behulp van 'inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry' (ICP-AES) werd de concentratie van Cd en andere elementen bepaald in de stalen (Perkin-Elmer, 1100B, USA).

2.3 Bepaling van genexpressie

Het meten van de genexpressie gebeurde aan de hand van kwantitatieve Real-time PCR. Hiertoe werd eerst het RNA geëxtraheerd. Van dit RNA werd vervolgens cDNA gemaakt. De real-time PCR reactie werd ingezet op dit cDNA.

2.3.1 <u>RNA extractie</u>

De genexpressie wordt gemeten op het niveau van het mRNA. Hiertoe moest eerst het RNA worden geïsoleerd uit de plantencellen. Dit gebeurde met behulp van de RNeasy plant mini

kit (Qiagen, Venlo, Nederland). Hiertoe werd eerst het staal fijngemalen in vloeibare stikstof. Vervolgens werd lysisbuffer, die tevens guanidine isothiocyanaat (GITC) bevatte, onmiddellijk toegevoegd. Dit leidt tot lysis van de cellen en inhibitie van RNasen. Vervolgens bracht men het lysaat aan op een eerste kolom. Deze zorgt voor verwijdering van celdebris. Na centrifugatie, werd het supernatans overgebracht op een tweede kolom, die het totale RNA bindt op de filter. Tijdens deze stap zorgt ethanol voor een betere binding van het RNA. Vervolgens werden enkele wasstappen ingevoerd om resterende celresten te verwijderen. Tenslotte werd het RNA geëlueerd in 2 x 30 μ l RNase vrij H₂O.

2.3.2 Bepaling concentratie en zuiverheid RNA

De zuiverheid en de concentratie van het RNA werden bepaald met behulp van de nanodrop (ND-1000, Isogen Life Sciences, St-Pieters-Leeuw). Hierbij wordt aan de hand van spectrometrie de absorptie bepaald bij een bepaalde golflengte. De concentratie van het RNA (ng/µl) wordt weergegeven bij een golflengte van 260 nm. De zuiverheid van het RNA wordt bepaald door de ratio's: A260/A280 en A260/A230. De bioanalyzer (2100, Agilent Technologies, Diegem) wordt ook gebruikt om de zuiverheid van het RNA te meten via capillaire gelelektroforese.

2.3.3 <u>Reverse transcriptie PCR</u>

Vooraleer real-time PCR uitgevoerd kan worden, moet van het mRNA eerst cDNA gemaakt worden. Tevens moet het genomisch DNA (gDNA) verwijderd worden. Hiertoe werd gebruik gemaakt van de 'QuantiTect Reverse Transcription Kit' (Qiagen, Venlo, Nederland). Eerst werd een genomische DNA eliminatie reactie uitgevoerd, waarbij gebruik gemaakt werd van gDNA wipeout buffer en RNase-vrij water. Dit werd toegevoegd aan 2 µg template RNA. Voor de cDNA-aanmaak werd gebruik gemaakt van reverse-transcription master mix. Deze bevat quantiscript reverse transcriptase, quantiscript RT buffer en RT primer mix. Voor elke conditie werd er ook 1 noRT staal aangemaakt. Voor de cDNA-aanmaak werd het volgende programma met behulp van de iCycler (Biorad, Nazareth) gelopen:

- 15 min bij 42°C: cDNA-aanmaak door reverse transcriptase

- 3 min bij 95°C: inactivatie reverse transcriptase

Bewaring van het cDNA gebeurde bij -20°C.

2.3.4 <u>Kwantitatieve real-time PCR</u>

Na de cDNA-aanmaak kan een real-time PCR (polymerase chain reaction) reactie worden ingezet. Deze methode steunt op het principe van PCR. Bij PCR gaat men een bepaald cDNA fragment exponentieel vermenigvuldigen. Real-time PCR maakt het verder ook mogelijk om deze geamplificeerde fragmentjes doorheen de tijd te volgen. Meer bepaald zullen data continu verzameld worden tijdens de PCR reactie en niet enkel op het einde. De visualisatie wordt mogelijk gemaakt door het gebruik van fluorescente probes. De graad van fluorescentie geeft op deze manier een beeld over de hoeveelheid cDNA aanwezig in het begin van de reactie. Deze analyses werden uitgevoerd door ABIprism 7000 sequence detection system (SDS) (Applied biosystems, Lennik).

Na de real-time PCR reactie bekomt men achtereenvolgens 3 fasen, namelijk de exponentiële fase, de lineaire fase en de plateau fase. In de eerste fase, de exponentiële fase, treedt er nog bij elke cyclus een verdubbeling op van het amplicon. In de lineaire fase zullen de reactieproducten meer en meer op geraken. Wanneer de reactieproducten helemaal opgebruikt zijn, bevinden we ons in de plateaufase. Hier wordt de reactie gestopt. Voor verdere analyses zal er dan ook altijd gemeten worden in de exponentiële fase. Dan zal er eerst een log-transformatie optreden. Hierdoor wordt de exponentiële fase omgezet naar een lineaire fase. Vervolgens gaat men een bepaalde fluorescentie aanduiden die ongeveer in het midden van deze lineaire fase gelegen is. Dit noemt men de drempelwaarde (Ct). Voor elk staal kan dan bepaald worden hoeveel cycli exact nodig zijn om deze drempelwaarde te bekomen. Wanneer er dan voor een bepaald staal minder cycli nodig zijn om deze fluorescentie te bereiken, zal er ook initieel meer cDNA van dit gen aanwezig zijn geweest.

De visualisatie wordt mogelijk gemaakt door het gebruik van fluorescente probes. Hier kan SYBR Green chemie of Taqman chemie gebruikt worden. SYBR Green is een kleurstof die zeer specifiek bindt op dubbelstrengig DNA. Eenmaal gebonden aan het dsDNA, zal SYBR Green zorgen voor fluorescentie. Deze fluorescentie maakt dan detectie mogelijk. De SYBR green master mix (Applied biosystems, Lennik) bevatte de volgende componenten: $12,5 \ \mu l \ 2x$ QuantiTect SYBR Green PCR master mix, $0,75 \ \mu l$ primer forward, $0,75 \ \mu l$ primer reverse en 6 μl RNase vrij water. Verder werd er aan deze PCR master mix 5 μl cDNA, dat eerst 1/10 verdund werd, toegevoegd. Bij elke Real-time PCR reactie werd er ook gebruik gemaakt van noRT-stalen. Verder werden ook 2 NTC-stalen (non template control) meegenomen. Deze

NTC-stalen bevatten geen 5μ l cDNA, maar 5μ l RNase vrij H₂O. Als er bij deze laatste stalen toch een reactie optreedt, wijst dit op contaminatie.

Een nadeel van het gebruik van deze fluorescentie methode, is dat primer-dimers ook gedetecteerd zullen worden en op deze manier bijdragen tot het gemeten fluorescentie signaal. Om deze primer dimers te kunnen detecteren werd, na afloop van de real-time PCR reactie, gebruik gemaakt van een smeltcurve. Hier zal het cDNA denatureren als gevolg van oplopende temperatuur. Primer-dimers zijn kortere fragmentjes dan het cDNA en zullen dus ook eerder denatureren.

In dit experiment werd met behulp van SYBR Green chemie de genexpressie gemeten van enzymen die zorgen voor ROS productie, antioxidatieve enzymen, kinasen die belangrijk zijn bij regulatiemechanismen en enkele transcriptiefactoren. De forward en reverse primers zijn weergegeven in Bijlage 1. Bij real-time PCR wordt ook steeds gebruik gemaakt van een referentiegen. Er kunnen immers verschillen in expressie optreden die niet te wijten zijn aan de verschillende condities. Dit referentiegen komt constant tot expressie of zal stabiel blijven. Er zal dan ook genormaliseerd worden ten opzichte van dit referentiegen. In dit experiment werd er in de wortels gebruik gemaakt van *actine 2 (ACT2)* als referentiegen. In de blaadjes werden 3 referentiegenen gebruikt, namelijk *At4g26410*, *At5g08290* en *ACT2*. De forward en reverse primers voor deze genen zijn weergegeven in Bijlage 1.

De 96-well plaat die de stalen bevatte, werd ingezet in het Real-time PCR toestel. Een reactievolume van 25 μ l werd ingegeven en het volgende programma werd gelopen met behulp van ABIprism 7000:

- 15 min bij 95°C: activatie van polymerase enzym

- 40 cycli van:

- 15 sec bij 95°C: denaturatie cDNA
- \rightarrow 30 sec bij 50-60°C: annealing primers
- ➢ 30 sec bij 72°C: extensie cDNA

- Smeltcurve

2.4 Bepaling van genexpressie miRNAs

Het meten van de genexpressie van miRNAs gebeurde aan de hand van kwantitatieve Realtime PCR gebruik makend van Taqman chemie. Hiertoe werd ook eerst het miRNA geëxtraheerd. Vervolgens werd enkel cDNA aangemaakt dat specifiek is voor het bepaalde miRNA. Hierna werd real-time PCR uitgevoerd op dit specifieke cDNA.

2.4.1 miRNA extractie

 $MirVana^{TM}$ miRNA isolatie kit (Ambion, Lennik) werd gebruikt op het miRNA uit plantencellen te extraheren. Hiervoor werd eerst het staal fijngemalen in vloeibare stikstof. Er werd onmiddellijk lysis/bindingsbuffer en miRNA homogenate additief toegevoegd. Dit leidt tot lysis van de cellen. Tevens worden hierdoor RNasen geïnactiveerd. Uit het lysaat werden andere cellulaire componenten verwijderd door het toevoegen van Acid-Phenol:Chloroform. Na centrifugatie, werd de bovenste fase afgenomen en overgebracht op een glasvezel filter. Vervolgens werden de grote RNA's geïmmobiliseerd op de filter door het gebruik van een kleine hoeveelheid ethanol. Na centrifugatie bevonden de kleine RNA's zich in het supernatans. Aan het supernatans werd een grote hoeveelheid ethanol toegevoegd. Dit mengsel werd overgebracht op een tweede filter. Door de grote hoeveelheid ethanol bonden de kleine RNA's op de filter. Om resterende celresten te verwijderen werden enkele wasstappen ingevoerd. Tenslotte werd geëlueerd in 100 µl RNase vrij H₂O, voorverwarmd bij 95°C.

2.4.2 TaqMan microRNA assay

Taqman microRNA assays (Applied biosystems, Lennik) werden gebruikt om mature miRNA te kwantificeren. Hiervoor werd gebruik gemaakt van tweestaps RT-PCR (Figuur 2.1). In de eerste stap gebeurde reverse transcriptie door gebruik van de 'TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit'. In deze stap werd cDNA aangemaakt door het gebruik van looped RT primers, dit zijn specifieke primers. De genexpressie werd gemeten van *miR398a*, *miR398b* en *miR168a* (Applied biosystems, Lennik, bestelnummers = miR398a: 4373422, miR398b: 4373423, miR168a: 4373403). Hiervoor werd er eerst een master mix aangemaakt. Deze bevatte 0,15 µl dNTP's (100 mM), 1 µl MultiScribe reverse transcriptase (50 U/µl), 1,50 10x reverse transcription buffer, 0,19 µl RNase inhibitor (20 U/µl), 4,16 µl nuclease vrij water. Aan deze master mix werd 3 µl looped RT primer en 5 µl RNA staal toegevoegd. Zo bevatte

elke 15 µl RT reactie 10 ng RNA staal. Vervolgens werd de volgende reverse transcriptie reactie gelopen met de 'Eppendorf mastercycler gradient' (Eppendorf, Hamburg):

- 30 min bij 16°C: cDNA-aanmaak door reverse transcriptase
- 30 min bij 42°C: cDNA-aanmaak door reverse transcriptase
- 5 min bij 85°C: inactivatie reverse transcriptase



Figuur 2.1. Tweestaps RT-PCR (41)

In de tweede stap werd dit specifieke cDNA geamplificeerd. Visualisatie werd mogelijk gemaakt door het gebruik van een Taqman probe. Deze probe bevat langs de 5' kant een fluorescente reporter dye (FAMTM dye) en een niet-fluorescente quencher dye aan de 3' kant van de probe. De quencher dye zorgt voor de uitdoving van het signaal dat gegenereerd wordt door de fluorescentie dye. Echter bij replicatie zullen deze 2 dyes van elkaar gescheiden worden en zal er wel fluorescentie optreden. Dit principe is gebaseerd op FRET (fluorescence resonance energy transfer). Er werd gebruik gemaakt van 2 μ l product van de reverse transcriptie reactie. Hieraan voegde men 1 μ l Taqman microRNA assay (20x), 10 μ l Taqman 2x Universal PCR master mix en 7 μ l nuclease vrij water toe. Als huishoudgen werd *miR172a* (Applied biosystems, Lennik, bestelnummer: 4373411) gebruikt. Dit was een stabiel gen in zowel wortels als blaadjes. Vervolgens werd een volume van 20 μ l ingevoerd op het PCR-toestel (ABIprism 700) en werd het volgende real-time PCR programma gelopen:

- 10 min bij 95°C: activatie van AmpliTaq Gold enzym
- 40 cycli van:
 - ➢ 15 sec bij 95°C: denaturatie cDNA
 - ➢ 60 sec bij 60°C: annealing primers / extensie van cDNA

Bewaring van het cDNA gebeurde bij -20°C.

2.5 TBA-metingen

De graad van lipidenperoxidatie kan bepaald worden met behulp van TBA (thiobarbituurzuur) - metingen. TBA reageert met afbraakproducten van het lipidenperoxidatieproces, zoals malondialdehyde (MDA). Er werd gebruik gemaakt van ongeveer 200 mg bladmateriaal, van het blad. Dit staal werd gehomogeniseerd in 3 ml trichloorazijnzuur (0,1% TCA, w:v). Hierna bracht men 1 ml supernatans in duplo over in 4 ml TBA (0,5% in 20% TCA, w:v). Vervolgens werd deze oplossing gedurende een 30 min in een warm waterbad bij 95°C gebracht. Hierna werd aan de hand van spectrofotometrie (Schimadzu) de absorptie gemeten bij 532 en 600 nm (42). De absorptie bij 532 nm geeft de binding weer tussen MDA en TBA. De aspecifieke bindingen absorberen bij 600 nm. De extinctiecoëfficient bedraagt 155 cm²/µmol.

2.6 SOD enzym assay

Ter bepaling van de antioxidatieve enzymactiviteit van SOD, werd voor de wortels 300 mg en voor de blaadjes 200 mg plantenmateriaal gehomogeniseerd met behulp van 2 ml extractiebuffer (0,1 M Tris HCl buffer, pH = 7,8), onoplosbare polyvinylpyrolidine (PVP) en zand. Na filtratie werd dit mengsel gecentrifugeerd. Dit extract werd aangebracht op een polyacrylamide gel (7,5% stacking gel, 6% seperating gel). Door lineaire polyacrylamide geleektroforese (PAGE) werden de eiwitten gescheiden op basis van elektrische lading.

Voor visualisatie van SOD werd de gel 20 min geïncubeerd in het donker in een mengsel van: 20 mg nitroblauwtetrazolium (NBT), 60 ml H₂O, 200 μ l 0,5 M EDTA, 10 ml 0,5 M KH₂PO₄, 330 μ l TEMED en 30 ml 0,05 M riboflavine-oplossing. Deze visualisatie berust op een inhibitie van de reductie van riboflavine. Onder invloed van licht en zuurstof werd TEMED omgezet naar O₂⁻. Vervolgens is O₂⁻ verantwoordelijk voor de reductie van riboflavine. Met behulp van NBT ontstaat op deze manier een paars kleurencomplex. SOD zal ook zorgen voor de omzetting van O₂⁻. Op deze manier wordt het ontstaan van een paars kleurencomplex tegengegaan en ontstaan er witte bandjes als gevolg van SOD activiteit. Voor selectieve inhibitie van SOD werden de gels op voorhand 30 min geïncubeerd met fosfaatbuffer die ofwel 1ml 0,2 M KCN of 1ml 0,5 M H_2O_2 bevatte. Een preincubatie met KCN zorgt voor een inhibitie van de Cu-Mn bevattende isozymen van SOD. Door toevoeging van H_2O_2 werden ook de Fe-bevattende SOD-enzymen geïnhibeerd en bleven enkel de MnSOD enzymen over (43). Een hoeveelheid van 40 µl wortel- of bladextract werd aangebracht in de slotjes. Enkel voor de totale enzymactiviteit in de wortel werd 80 µl wortelextract aangebracht.

2.7 Elektronenmicroscopie

Met behulp van vacuüm infiltratie werden stalen, met een maximum grootte van 1 mm², van 3 weken oude wortels van *Arabidopsis thaliana* zaailingen gefixeerd. De gefixeerde weefsels werden 3 keer gespoeld. Vervolgens werd er overnacht gekleurd met 2% uranyl acetaat. Ultrafijne secties (65 nm) werden gemaakt door Leica Ultracut UCT ultramicrotoom, en deze werden aangebracht op kopere coupes. Deze secties werden bestudeerd met een Philips EM 208S transmissie elektronenmicroscoop bij 80 kV en gedigitaliseerd met een Morada 3.0 TEM camera.

2.8 Statistische analyse

Voor de statistische analyse van de data werd gebruik gemaakt van een niet-parametrische Kruskal-Wallis test. Voor de post analyse werd een niet-parametrische multipal comparison test gebruikt. Het principe van deze testen is gebaseerd op het toekennen van een rank aan elke waarde. In deze studie werden de condities behandeld met cadmium vergeleken met de controle conditie. De nulhypothese (gelijke gemiddelden) werd nagegaan op een significantieniveau van 0,05.

3 RESULTATEN

In deze studie werden een aantal aspecten omtrent de regulatie van cadmiumgeïnduceerde effecten in *Arabidopsis thaliana* onderzocht. Er werd gebruik gemaakt van microarray resultaten, uitgevoerd op de wortels van *Arabidopsis thaliana* zaailingen blootgesteld aan 5 en 10 μ M Cd. Deze screening toonde een invloed van cadmium (Cd) op bepaalde regulatiemechanismen aan. In deze studie werden deze resultaten onderzocht met real-time PCR en verder uitgediept. Hiernaast werden ook nog verschillende andere parameters, zoals lipidenperoxidatie, gemeten.

3.1 Invloed van cadmiumblootstelling op nutriëntenprofiel in Arabidopsis thaliana

Naast de concentratie aan cadmium, werd ook de concentratie aan micro- en macronutriënten bepaald in de wortels en blaadjes van 3 weken oude *Arabidopsis thaliana* zaailingen gedurende 24 uur blootgesteld aan cadmium (Tabel 3.1, Tabel 3.2). Een significante stijging in concentratie aan Cd was waarneembaar in zowel wortels en blaadjes, die behandeld werden met dit metaal. Als gevolg van cadmiumblootstelling was er een significante stijging in kaliumconcentratie in de wortels. De calciumconcentratie steeg enkel significant in de blaadjes na blootstelling aan 2 en 5 μ M Cd.

Tabel 3.1. Elementconcentraties in wortels van 3 weken oude *Arabidopsis thaliana* zaailingen gedurende 24 uur blootgesteld aan 0, 2, 5 en 10 μ M Cd. De concentraties werden uitgedrukt in mg kg⁻¹ DG⁻¹ (DG = drooggewicht). Elke waarde is het gemiddelde van 3 biologische herhalingen ± SE. (significantieniveau: *: P < 0,05).

| Elementen | Behandeling | | | |
|-----------|------------------|------------------|------------------|-------------------|
| | 0 μM Cd | 2 μM Cd | 5 μM Cd | 10 µM Cd |
| Cd | 16 ± 1 | 500 ± 48 * | 665 ± 75 * | 4150 ± 934 * |
| Mg | 18447 ± 1619 | 11379 ± 2782 | 16547 ± 1261 | 15623 ± 6043 |
| Mn | 398 ± 30 | 292 ± 59 | 348 ± 28 | 388 ± 122 |
| Zn | 995 ± 32 | 1773 ± 557 | 1005 ± 81 | 703 ± 47 |
| Fe | 18464 ± 898 | 12748 ± 2391 | 17625 ± 1553 | 16040 ± 4401 |
| Ca | 43188 ± 3619 | 43879 ± 8135 | 50284 ± 3141 | 45623 ± 18102 |
| K | 23497 ± 3144 | 10869 ± 887 * | 5984 ± 934 * | 10361 ± 2959 * |
| Cu | 680 ± 36 | 1245 ± 384 | 639 ± 52 | 283 ± 121 |

Tabel 3.2. Elementconcentraties in blaadjes van 3 weken oude *Arabidopsis thaliana* zaailingen gedurende 24 uur blootgesteld aan 0, 2, 5 en 10 μ M Cd. De concentraties werden uitgedrukt in mg kg⁻¹ DG⁻¹. Elke waarde is het gemiddelde van 3 biologische herhalingen ± SE. (significantieniveau: *: P < 0,05).

| Elementen | Behandeling | | | |
|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| | 0 μM Cd | 2 µM Cd | 5 μM Cd | 10 µM Cd |
| Cd | $1 \pm 0,2$ | 400 ± 11 * | 358 ± 28 * | 801 ± 21 * |
| Mg | 7842 ± 193 | 8304 ± 159 | 8166 ± 76 | 8127 ± 121 |
| Mn | 150 ± 11 | 202 ± 13 | 144 ± 2 | 166 ± 1 |
| Zn | 138 ± 12 | 125 ± 7 | 128 ± 4 | 118 ± 7 |
| Fe | 280 ± 87 | 713 ± 558 | 303 ± 71 | 252 ± 68 |
| Ca | 31899 ± 443 | 39464 ± 2997 * | 28751 ± 996 * | 32156 ± 977 |
| K | 34109 ± 506 | 33013 ± 649 | 33659 ± 407 | 35104 ± 1222 |
| Cu | 131 ± 15 | 112 ± 9 | 142 ± 7 | 100 ± 11 |

3.2 Microscopische effecten na cadmiumblootstelling in Arabidopsis thaliana

Met behulp van elektronenmicroscopie werden de effecten van 24 uur blootstelling aan cadmium nagegaan in de wortels van 3 weken oude *Arabidopsis thaliana* zaailingen. Meer bepaald werd er gekeken naar de structuur van de cortex (Figuur 3.1) en naar de dikte van de xyleemvaten (Figuur 3.2, Tabel 3.3). In de wortels vertoonde de cortex een gekronkelde structuur na blootstelling aan 10 μ M Cd. Verder was een dalende trend in dikte van de xyleemvaten van de wortels waarneembaar als gevolg van blootstelling aan 5 en 10 μ M Cd.



Figuur 3.1. Cortex in wortels van 3 weken oude *Arabidopsis thaliana* zaailingen gedurende 24 uur blootgesteld aan 0 en 10 μ M Cd. Aan de hand van elektronenmicroscopie werd de cortex bestudeerd.



Figuur 3.2. Dikte van de xyleemvaten in wortels van 3 weken oude *Arabidopsis thaliana* zaailingen gedurende 24 uur blootgesteld aan 0 en 10 μ M Cd. Aan de hand van elektronenmicroscopie werd de vaatdikte bepaald.

Tabel 3.3. Dikte van de xyleemvaten in wortels van 3 weken oude *Arabidopsis thaliana* zaailingen gedurende 24 uur blootgesteld aan 0, 5 en 10 μ M Cd. Aan de hand van elektronenmicroscopie werd de vaatdikte bepaald. Elke waarde is het gemiddelde van 6 biologische herhalingen ± SE. (significantieniveau: *: P < 0,05).

| Behandeling | 0 µM Cd | 5 µM Cd | 10 µM Cd |
|----------------|----------------|--------------|--------------|
| Vaatdikte (nm) | 1008 ± 272 | 645 ± 21 | 591 ± 17 |

3.3 Oxidatieve stress effecten na cadmiumblootstelling in Arabidopsis thaliana

Cadmiumblootstelling zorgt voor de beschadiging van allerlei biomoleculen, onder andere membraanlipiden. De lipidenperoxidatie werd spectrofotometrisch gemeten aan de hand van TBA-metingen in de blaadjes van 3 weken oude *Arabidopsis thaliana* zaailingen gedurende 24 uur blootgesteld aan cadmium (Figuur 3.3). Een significante stijging in lipidenperoxidatie werd waargenomen na 24 uur blootstelling aan 5 en 10 μ M Cd in de blaadjes.



Figuur 3.3. Lipidenperoxidatie in blaadjes van 3 weken oude *Arabidopsis thaliana* zaailingen gedurende 24 uur blootgesteld aan 0, 5 en 10 μ M Cd. Elke waarde is het gemiddelde van 6 biologische herhalingen ± SE. (significantieniveau: *: P< 0,05).

3.4 Verstoring van de redoxbalans na cadmiumblootstelling in Arabidopsis thaliana

De redoxbalans wordt bepaald door de verhouding van pro-oxidanten en anti-oxidanten aanwezig in de cel. De genexpressie van ROS-producerende en antioxidatieve enzymen werd gemeten in wortels en blaadjes van 3 weken oude *Arabidopsis thaliana* zaailingen blootgesteld aan cadmium gedurende 24 uur.

Genexpressie van ROS-producerende enzymen

Aan de hand van real-time PCR werd de genexpressie van enzymen die zorgen voor ROS productie bepaald in wortels en blaadjes van 3 weken oude *Arabidopsis thaliana* zaailingen na 24 uur cadmiumblootstelling. Meer bepaald werd de genexpressie van NADPH-oxidasen (*RBOHC* en *RBOHD*) en lipoxygenasen (*LOX1* en *LOX2*) gemeten (Figuur 3.4).



Figuur 3.4. Genexpressie van ROS-producerende enzymen (NADPH-oxidasen: *RBOHC* en *RBOHD*; lipoxygenasen: *LOX1* en *LOX2*) in wortels (**□**) en blaadjes (**□**) van 3 weken oude *Arabidopsis thaliana* zaailingen gedurende 24 uur blootgesteld aan 0, 2, 5 en 10 μ M Cd. De genexpressie werd gemeten aan de hand van real-time PCR. Elke waarde is het gemiddelde van 5 biologische herhalingen ± SE (significantieniveau: *: P< 0,05).

Algemeen leidde 24 uur blootstelling aan cadmium tot een verhoging in genexpressie van de gemeten NADPH-oxidasen. In de blaadjes was er een significante stijging in expressie van *RBOHC* na 24 uur cadmiumblootstelling. Hetzelfde gold voor de genexpressie van *RBOHD* in de wortels. In de blaadjes was er enkel een significante stijging in genexpressie van *RBOHD* na blootstelling aan 10 μ M Cd. Verder zorgde cadmiumblootstelling over het algemeen voor een verhoogde genexpressie van de lipoxygenasen, *LOX1* en *LOX2*. Zo werd *LOX1* significant upgereguleerd in de wortels. In de blaadjes was er een significante stijging in genexpressie van *LOX1* bij blootstelling aan 10 μ M Cd waarneembaar. De genexpressie van *LOX2* werd significant verhoogd in de blaadjes bij blootstelling aan 5 en 10 μ M Cd.

Genexpressie van antioxidatieve enzymen

De genexpressie van antioxidatieve enzymen in wortels en blaadjes van 3 weken oude *Arabidopsis thaliana* zaailingen na 24 uur cadmiumblootstelling werd gemeten aan de hand van real-time PCR. Zo werd de genexpressie van Cu/ZnSOD (*CSD1* en *CSD2*), FeSOD (*FSD1*), CAT (*CAT1*) en APX (*APX1* en *APX2*) gemeten na cadmiumblootstelling (Figuur 3.5).

Een dalende trend in genexpressie van de gemeten Cu/ZnSOD's, *CSD1* en *CSD2*, deed zich voor na 24 uur cadmiumblootstelling. Enkel in de wortels was er geen wijziging in genexpressie bij blootstelling aan 10 μ M Cd. Een significante stijging in genexpressie van *CSD2* deed zich voor in de blaadjes na cadmiumblootstelling. Verder steeg de genexpressie van *FSD1* significant in de wortels bij cadmiumblootstelling. Als gevolg van blootstelling aan 5 en 10 μ M Cd steeg ook de genexpressie van *CAT1* significant in beide organen. Algemeen deed zich een stijgende trend in genexpressie van de gemeten APX's, *APX1* en *APX2*, voor na cadmiumblootstelling. Enkel in de wortels was er een dalende trend in genexpressie van *APX1* waarneembaar. De genexpressie van *APX2* werd significant upgereguleerd in de wortels na cadmiumblootstelling.



Figuur 3.5. Genexpressie van antioxidatieve enzymen (*CSD1*, *CSD2*, *FSD1*, *CAT1*, *APX1* en *APX2*) in wortels (**□**) en blaadjes (**□**) van 3 weken oude *Arabidopsis thaliana* zaailingen gedurende 24 uur blootgesteld aan 0, 2, 5 en 10 μ M Cd. De genexpressie werd gemeten aan de hand van real-time PCR. Elke waarde is het gemiddelde van 5 biologische herhalingen ± SE (significantieniveau: *: P< 0,05).

3.5 Regulatie van cadmiumgeïnduceerde effecten in *Arabidopsis thaliana* – studie op genexpressieniveau

Verschillende kinasen zijn betrokken bij de regulatie van cadmiumgeïnduceerde effecten. Het gaat hier over kinasen betrokken bij calcium-signalisatie pathways en componenten van MAPK cascades. Deze kinasen zullen een invloed uitoefenen op bepaalde transcriptiefactoren. Verder spelen ook miRNAs een rol bij de regulatie van cadmiumgeïnduceerde effecten. De genexpressie van deze kinasen, transcriptiefactoren en

microRNAs werd gemeten in wortels en blaadjes van 3 weken oude *Arabidopsis thaliana* zaailingen gedurende 24 uur blootgesteld aan cadmium.

Genexpressie van eiwitten betrokken bij calcium-signalisatie pathways

SOS3, SOS2 en SOS1 zijn componenten van de SOS pathway. Deze componenten en CDPK1 zijn kinasen die betrokken zijn bij calcium-signalisatie pathways. De genexpressie van deze kinasen werd gemeten aan de hand van real-time PCR in wortels en blaadjes van 3 weken oude *Arabidopsis thaliana* zaailingen na 24 uur cadmiumblootstelling (Figuur 3.6).



Figuur 3.6. Genexpressie van *CDPK1* en componenten van de SOS pathway (*SOS3*, *SOS2* en *SOS1*) in wortels (**□**) en blaadjes (**□**) van 3 weken oude *Arabidopsis thaliana* zaailingen na 24 uur blootstelling aan 0, 2, 5 en 10 μ M Cd. De genexpressie werd bepaald met behulp van real-time PCR. Elke waarde is het gemiddelde van 5 biologische herhalingen ± SE (significantieniveau: *: P< 0,05).

Cadmiumblootstelling leidde in de blaadjes tot een significante stijging in genexpressie van *CDPK1*. In de wortels was dit enkel het geval bij blootsteling aan 10 μ M Cd. Een significant verhoogde expressie van *SOS3* was enkel waar te nemen in de wortels na blootstelling aan 5 en 10 μ M Cd. In tegenstelling tot *SOS2* en *SOS1* waar een significant verhoogde genexpressie enkel werd waargenomen in de blaadjes.

Genexpressie van eiwitten betrokken bij MAPK cascades

De genexpressie van eiwitten die belangrijke componenten zijn in MAPK cascades werd aan de hand van real-time PCR gemeten in wortels en blaadjes van 3 weken oude *Arabidopsis thaliana* zaailingen 24 uur blootgesteld aan cadmium (Figuur 3.7).

Zo werd de genexpressie van 3 MAPKKK's gemeten, namelijk ANP1, ANP2 en MEKK1. De genexpressie van *ANP1*, *ANP2* en *MEKK1* werd significant upgereguleerd in de wortels na blootstelling aan 10 μ M Cd. In de blaadjes was ook een significante verhoging in genexpressie van *ANP2* waarneembaar na cadmiumblootstelling.

MKK2 is een MAPKK en ook hiervan werd de genexpressie gemeten. Cadmiumblootstelling leidde enkel in de blaadjes tot een significante verhoging in genexpressie van *MKK2*.

Als laatste werd ook de genexpressie van 3 MAPK's gemeten, namelijk MPK3, MPK4 en MPK6. De genexpressie van *MPK3* en *MPK4* werd in de wortels enkel upgereguleerd bij blootstelling aan 10 μ M Cd. In de blaadjes was een significante stijging in genexpressie van *MPK3*, *MPK4* en *MPK6* waarneembaar na blootstelling aan cadmium. Ook van OXI1, een regulator van MPK3 en MPK6, werd de genexpressie gemeten. *OXI1* werd significant upgereguleerd in de blaadjes als gevolg van cadmiumblootstelling.



Figuur 3.7. Genexpressie van componenten betrokken bij MAPK cascades (MAPKKK: *ANP1* en *ANP2*, *MEKK1*; MAPKK: *MKK2*; MAPK: *MPK3*, *MPK4* en *MPK6*; *OXI1*) in wortels (\blacksquare) en blaadjes (\blacksquare) van 3 weken oude *Arabidopsis thaliana* zaailingen 24 uur blootgesteld aan 0, 2, 5 en 10 µM Cd. De genexpressie werd gemeten aan de hand van real-time PCR. Elke waarde is het gemiddelde van 5 biologische herhalingen ± SE (significantieniveau: *: P< 0,05).

Genexpressie van transcriptiefactoren

De genexpressie van transcriptiefactoren die mogelijk geactiveerd worden door MAPK cascades of door calcium-signalisatie pathways werd aan de hand van real-time PCR gemeten in wortels en blaadjes van 3 weken oude *Arabidopsis thaliana* zaailingen 24 uur blootgesteld aan cadmium (Figuur 3.8).



Figuur 3.8. Genexpressie van transcriptiefactoren, namelijk *WRKY22*, *WRKY25*, *WRKY29* en *NIG1*, in wortels (\blacksquare) en blaadjes (\blacksquare) van 3 weken oude *Arabidopsis thaliana* zaailingen 24 uur blootgesteld aan 0, 2, 5 en 10 µM Cd. De genexpressie werd gemeten aan de hand van real-time PCR. Elke waarde is het gemiddelde van 5 biologische herhalingen ± SE (significantieniveau: *: P< 0,05).

Een inhibitie in genexpressie van *WRKY22* was waarneembaar in wortels en blaadjes na 24 uur blootstelling aan verschillende cadmiumconcentraties. Deze daling was significant in de wortels bij blootstelling aan 2 μ M Cd en in de blaadjes bij blootstelling aan 5 en 10 μ M Cd. In wortels en blaadjes was een stijgende trend in genexpressie van *WRKY25* waarneembaar na cadmiumblootstelling, significant in de blaadjes. Verder had cadmiumblootstelling geen significant effect op de genexpressie van *WRKY29*. In de blaadjes zorgde 24 uur blootstelling aan cadmium voor een daling in genexpressie van *NIG1*, significant bij blootstelling aan 5 μ M Cd. Enkel bij blootstelling aan 10 μ M Cd was er geen verandering in genexpressie van *NIG1* observeerbaar in de blaadjes.

Genexpressie van miRNAs

De genexpressie van enkele miRNAs en AGO1 werd gemeten aan de hand van real-time PCR in wortels en blaadjes van 3 weken oude *Arabidopsis thaliana* zaailingen 24 uur blootgesteld aan cadmium (Figuur 3.9). Meer bepaald werd de genexpressie gemeten van miR398a, miR398b en miR168a.



Figuur 3.9. Genexpressie van miRNAs, namelijk *miR398a, miR398b* en *miR168a*, en *AGO1* in wortels (\square) en blaadjes (\square) van 3 weken oude *Arabidopsis thaliana* zaailingen 24 uur blootgesteld aan 0, (2), 5 en 10 µM Cd. De genexpressie werd gemeten aan de hand van real-time PCR. Elke waarde is het gemiddelde van 5 biologische herhalingen ± SE (significantieniveau: *: P< 0,05).

Een significante stijging in genexpressie van *miR398a* en *miR398b* deed zich voor in beide organen, wortels en blaadjes, na blootstelling aan cadmium gedurende 24 uur. Enkel bij blootstelling aan 10 μ M Cd was er een significante upregulatie in genexpressie van *miR168a* observeerbaar in de wortels. Een dalende trend in genexpressie van *AGO1* deed zich voor in de wortels en blaadjes als gevolg van 24 uur cadmiumblootstelling. Deze daling was significant bij blootstelling aan 5 μ M Cd in de wortels en bij blootstelling aan 5 en 10 μ M Cd in de blaadjes.

Samenvattende figuren

Een algemeen overzicht van de genexpressie van componenten betrokken bij calciumsignalisatie pathways in wortels en blaadjes van 3 weken oude *Arabidopsis thaliana* zaailingen na 24 uur blootstelling aan cadmium is weergegeven in Figuur 3.10.

De genexpressie van kinasen betrokken bij MAPK cascades in wortels en blaadjes van 3 weken oude Arabidopsis thaliana zaailingen na 24 uur blootstelling aan cadmium is weergegeven in samengevat in Figuur 3.11.



Figuur 3.10. Schematisch overzicht van genexpressie van componenten betrokken bij calciumsignalisatie in wortels en blaadjes van 3 weken oude *Arabidopsis thaliana* zaailingen na 24 uur blootstelling aan cadmium. De genexpressie werd gemeten aan de hand van real-time PCR. Grijze gekleurde vakken geven de genexpressie in de wortel weer (stijging in genexpressie = \blacksquare , daling in genexpressie = \blacksquare). Groene omlijnde vakken geven de genexpressie in het blad weer (stijging in genexpressie = \blacksquare , daling in genexpressie = \blacksquare).



Figuur 3.11. Schematisch overzicht van genexpressie van componenten betrokken bij MAPK cascades in wortels en blaadjes van 3 weken oude *Arabidopsis thaliana* zaailingen na 24 uur blootstelling aan cadmium. De genexpressie werd gemeten aan de hand van real-time PCR. Grijs gekleurde vakken geven de genexpressie in de wortel weer (stijging in genexpressie = \blacksquare , daling in genexpressie = \blacksquare). Groene omlijnde vakken geven de genexpressie in het blad weer (stijging in genexpressie = \blacksquare , daling in genexpressie = \blacksquare). *WRKY33* kwam verhoogd tot expressie op de microarray van de wortels.

<u>3.6 Regulatie van cadmiumgeïnduceerde effecten in Arabidopsis thaliana –</u> <u>aanvullingen op eiwitniveau</u>

Na scheiding met behulp van PAGE werd de activiteit van de verschillende SOD-isovormen bepaald in de wortels en blaadjes van 3 weken oude *Arabidopsis thaliana* zaailingen na 24 uur cadmiumblootstelling (Figuur 3.12).

In de wortels was er een daling in de totale SOD-activiteit waar te nemen na blootstelling aan cadmium. Verder bleek cadmiumblootstelling niet te leiden tot veranderingen in activiteit van FeSOD / MnSOD in de wortels. De daling in totale SOD-activiteit in de wortels, is dus waarschijnlijk te wijten aan een daling in activiteit van Cu/ZnSOD na blootstelling aan cadmium. In de blaadjes was een stijging in activiteit van SOD waar te nemen na blootstelling aan 5 μ M Cd. Deze stijging is waarschijnlijk te wijten aan een stijging in activiteit van



FeSOD, daar er geen verschillen zichtbaar waren in de activiteit van MnSOD na cadmiumblootstelling.

Figuur 3.12. Veranderingen in SOD activiteit in wortels en blaadjes van 3 weken oude *Arabidopsis thaliana* zaailingen na 24 uur blootstelling aan 0, 5 en 10 μ M Cd. Door een preincubatie met 0,2 KCN werd de activiteit van FeSOD/MnSOD zichtbaar. De activiteit van MnSOD werd aangetoond door een preincubatie met 0,5 M H₂O₂.

DISCUSSIE

4

Cadmium is een toxisch element voor zowel planten, dieren als mensen. Bij planten werden fysiologische effecten, zoals inhibitie van de groei en fotosynthese, al meerdere malen aangetoond na cadmiumblootstelling (44). Niettegenstaande we in onze studie geen groeireductie hebben vastgesteld, konden we wel duidelijke morfologische veranderingen waarnemen. EM resultaten tonen dat 24 uur blootstelling aan cadmium zorgt voor een aantasting van de cortex in de wortels van *Arabidopsis thaliana* (Figuur 3.1). Deze effecten werden eerder al beschreven na andere stressfactoren zoals zoutstress (45). Door de vernietiging van de eerste barrière, zal cadmium zo ook gemakkelijker kunnen doordringen tot aan de endodermis.

Verder was ook een daling in dikte van de celwand van de xyleemvaten waarneembaar in de wortels van *Arabidopsis thaliana* na 24 uur blootstelling aan cadmium (Figuur 3.2). Een mogelijke verklaring is een verlaagde genexpressie van *PAL1* en *PAL2*, aangetoond in een gelijklopend onderzoek. Phenyl-ammonium lysase 1 (PAL1) en PAL2 zijn enzymen die zorgen voor de synthese van lignine. Lignine is verantwoordelijk voor de opbouw van de celwand (46). Studies uitgevoerd op erwten toonden ook effecten op de xyleemvaten bij blootstelling aan 50 μ M Cl₂Cd gedurende 15 dagen (47). Wij observeren reeds een daling in dikte van de celwand van de xyleemvaten na blootstelling aan lagere cadmiumconcentraties gedurende slechts 24 uur. De verstoring van de cortexstructuur en een daling in dikte van de celwand van de xyleemvaten verklaren mogelijks de significante stijging in cadmiumconcentratie die we terug vinden in wortels en blaadjes na cadmiumblootstelling (Tabel 3.1, Tabel 3.2).

De fysiologische effecten, zoals inhibitie van fotosynthese, zijn mogelijks het gevolg van de effecten die zich op cellulair niveau voordoen als gevolg van cadmiumblootstelling. Zo is het reeds geweten dat cadmium op cellulair niveau leidt tot het ontstaan van oxidatieve stress (48). In deze studie werd, op genexpressieniveau, de invloed van cadmiumstress op de mechanismen achter deze oxidatieve stress gerelateerde pathways bestudeerd. Zo werd er enerzijds gekeken naar 2 signaaltransductiecascades, namelijk calcium-signalisatie pathways en MAPK cascades. Anderzijds werd ook de rol van miRNAs bij cadmiumstress bestudeerd.

Onder normale omstandigheden is er een evenwicht in het organisme tussen het voorkomen van enerzijds pro-oxidanten, zoals ROS, en anderzijds anti-oxidanten (49). Cadmium zal deze redoxbalans verstoren, zodat er relatief meer pro-oxidanten aanwezig zijn (9). We spreken in dit geval van oxidatieve stress. Oxidatieve stress, veroorzaakt door cadmiumblootstelling, kan zorgen voor beschadiging aan allerlei biomoleculen. In dit project wordt bevestigd dat ook membraanlipiden, mogelijks indirect, worden aangetast door cadmium. Meer bepaald steeg de lipidenperoxidatie in blaadjes gedurende 24 uur blootgesteld aan cadmium (Figuur 3.3). Een mogelijke verklaring voor deze verhoogde lipidenperoxidatie is een verhoogde expressie van lipoxygenasen (Figuur 3.4). Lipoxygenasen katalyseren de deoxygenatie van polyonverzadigde vetzuren, op deze manier worden lipidehydroperoxiden gevormd. Andere studies toonden reeds een verhoogde activiteit van lipoxygenasen als gevolg van cadmiumblootstelling (50).

Organismen reageren op deze redoxverstoring door hun antioxidatieve verdedigingssysteem aan te schakelen. Eerder onderzoek toonde aan dat ook na cadmiumblootstelling veranderingen in activiteit van bepaalde antioxidatieve enzymen en metabolieten optreden (15). Ook onze data tonen effecten op het antioxidatieve verdedigingssysteem, zij het op transcriptioneel niveau. Een verhoging in genexpressiepatronen van verschillende antioxidatieve enzymen, behalve Cu/ZnSOD, werd waargenomen als gevolg van cadmiumblootstelling (Figuur 3.5). Omwille van de uitgesproken effecten van cadmium op de SOD genexpressie werd nagegaan of deze verschillen eveneens waarneembaar blijken op activiteiten-niveau. Er zijn 3 isozymen gekend van SOD, namelijk Cu/ZnSOD, FeSOD en MnSOD. Een daling in activiteit van totaal SOD was waarneembaar in de wortels na cadmiumblootstelling (Figuur 3.12). Verder werd de activiteit van FeSOD / MnSOD niet gewijzigd (Figuur 3.12), hetgeen niet in overeenstemming blijkt met de resultaten gevonden op transcriptioneel niveau. Het is mogelijk dat veranderingen in andere isovormen op transcriptioneel niveau zorgen voor deze discrepantie. Eveneens suggereren deze resultaten dat cadmiumblootstelling leidt tot een daling in activiteit van Cu/ZnSOD, een inhibitie die teven geobserveerd werd op genexpressieniveau (Figuur 3.5). Wat de blaadjes betreft, was een stijging in activiteit van totaal SOD waarneembaar bij blootstelling aan 5 µM Cd. Geen verandering in activiteit van MnSOD deed zich voor na cadmiumblootstelling (Figuur 3.12). Wel werd de activiteit van FeSOD / MnSOD verhoogd (Figuur 3.12). Deze resultaten doen ons de hypothese vormen dat de activiteit van FeSOD stijgt na cadmiumblootstelling. Dit in

tegenstelling tot de genexpressie van *FSD1*, deze werd niet gewijzigd als gevolg van cadmiumblootstelling. Ook hier is het mogelijk dat andere vormen van FeSOD, zoals *FSD2* en *FSD3*, verhoogd tot expressie komen.

Dit alles suggereert dat planten blootgesteld aan cadmium, zich trachten aan te passen aan deze stress-situatie door het aanschakelen van antioxidatieve verdediging. Op welke manier deze verdedigingsmechanismen aangeschakeld worden, is tot op heden nog onduidelijk. Signaaltransductiecascades spelen hierin waarschijnlijk een zeer belangrijke rol. Deze cascades bestaan uit verschillende, opeenvolgende proteïne kinasen. Zo worden extracellulaire stimuli omgezet naar een bepaalde cellulaire respons door de genexpressie van bepaalde genen te veranderen. Op deze manier zullen zij zorgen voor de activatie van beschermingsmechanismen tegen de stress-situatie, zoals respons op oxidatieve stress (17).

Tot voor kort werden ROS enkel gezien als toxische moleculen. Nu wordt gesteld dat onder verscheidene biotische en abiotische stress-situaties ROS mogelijks mede verantwoordelijk zijn voor de activatie van deze signaaltransductiecascades en de activatie van 'beschermingsgenen' mediëren (51). Er werd al aangetoond dat cadmiumblootstelling op een indirecte manier zorgt voor een verhoogde ROS accumulatie. Zo toonden studies een verhoging in H₂O₂-productie na cadmiumblootstelling (22). NADPH-oxidasen (RBOH) zijn enzymen die gelegen zijn in de plasmamembraan en zorgen voor de reductie van O₂ naar O₂⁻⁻ (52). Aan de hand van dismutatie kan O₂⁻⁻ omgevormd worden tot H₂O₂, dat al eerder een belangrijke signaalmolecule bleek in cadmiumstress (53). Onze data tonen een verhoogde genexpressie van *RBOHC* en *RBOHD* na 24 uur blootstelling aan cadmium, in zowel wortel en blad (Figuur 3.4). Deze stijging in genexpressie kan resulteren in een verhoogde hoeveelheid H₂O₂, dat kan zorgen voor de activatie van signaaltransductie pathways.

Om de signaaltransductiemechanismen en de rol van ROS hierin verder te ontrafelen werden in dit onderzoek veranderingen in genexpressie van verschillende kinase pathways bestudeerd, namelijk kinasen betrokken bij calcium-signalisatie en bij MAPK cascades.

Invloed van cadmiumstress op calcium-signalisatie

In planten werd reeds aangetoond dat verschillende soorten stress, zoals koude, droogte, zoutstress of oxidatieve stress, leiden tot een transiënte stijging van de calciumconcentratie in het cytoplasma (20). Een mogelijke inductor van deze stijging in calcium is H_2O_2 (21). Een verhoging in H_2O_2 werd, zoals eerder aangehaald, ook al aangetoond na cadmiumblootstelling

(22). Veranderingen in cytosolaire calciumconcentraties kunnen worden aangevoeld door bepaalde calcium sensorproteïnen. Onder andere CDPK's en CBL proteïnen behoren tot deze groep van calciumsensoren. Deze sensoren maken deel uit van een complex signaaltransductienetwerk. Zo reguleren ze de activiteit van bepaalde target proteïnen, die op hun beurt zorgen voor specifieke cellulaire responsen als gevolg van een extracellulaire stimuli.

Uit een microarray-experiment bleek dat veel genen betrokken in de calcium-signalisatie verhoogd of verlaagd tot expressie kwamen wanneer de planten gedurende 24 uur werden blootgesteld aan cadmium. Dit suggereert dat calcium een belangrijke factor zou kunnen zijn tijdens de regulatie van cadmiumgeïnduceerde stresseffecten. Enerzijds zou een cadmiumgeïnduceerde verhoging in ROS verantwoordelijk kunnen zijn voor veranderingen in calciumconcentraties. Uit studies uitgevoerd op de wortels van *Arabidopsis thaliana* bleek dat H_2O_2 zorgt voor een dosis-afhankelijke transiënte stijging in Ca²⁺ influx (54). Anderzijds zou cadmium, omwille van een grote gelijkenis tussen cadmium en calcium, ook de plaats van calcium kunnen innemen. Cadmium en calcium zijn namelijk beide divalente kationen. Cadmium zou mogelijks kunnen binnenkomen langs calciumkanalen. Er werd reeds aangetoond in studies op *Arabidopsis thaliana*, dat Cd²⁺ binnendringt in sluitcellen via calciumkanalen in de plasmamembraan (55). Verder bleken Ca²⁺ kanalen in de wortels van graan permeabel te zijn voor Cd²⁺ (56).

CDPK1 en SOS3 (CBL4) zijn beide sensoren die veranderingen in calciumconcentratie aanvoelen. Als gevolg van blootstelling aan cadmium steeg de genexpressie van deze sensoren in de wortels (Figuur 3.10). Enkel de genexpressie van *CDPK1* steeg ook in de blaadjes door cadmiumblootstelling (Figuur 3.10). Deze resultaten suggereren eveneens een verandering in calciumconcentratie als gevolg van cadmiumblootstelling.

Een verhoogde genexpressie van *CDPK1* na cadmiumblootstelling, kan resulteren in een verhoogde hoeveelheid CDPK1. Dit kinase kan zorgen voor de fosforylatie van bepaalde targetproteïnen. Tot op heden is nog niet geweten welke kinasen onder invloed van cadmiumstress door CDPK1 geactiveerd zouden kunnen worden. Wel werd reeds aangetoond dat in *Arabidopsis thaliana* CDPK1 geactiveerd wordt als gevolg van droogte- en zoutstress (26). Volgens onderzoek uitgevoerd op maïs blad protoplasten is het eveneens mogelijk dat de activatie van CDPK1 gebeurt op een ABA (abscisinezuur) – afhankelijk manier (27). ABA is

een hormoon dat de expressie van verschillende genen induceert, en speelt waarschijnlijk een belangrijke rol in de regulatie onder cadmiumstress (57).

Een ander Ca-afhankelijk pathway is de SOS pathway. Zoals eerder aangehaald is de eerste component van deze pathway de calciumsensor SOS3. Bij aanwezigheid van Ca²⁺, zal SOS3 interageren met SOS2. De Ser/Thr kinase activiteit van SOS2 wordt op deze manier geactiveerd op een calciumafhankelijke manier. Een target van deze SOS3-SOS2 regulatoire pathway is een Na⁺/H⁺ antiporter gelegen in de plasmamembraan. Het *SOS1* gen codeert voor deze antiporter. Tot nu toe heeft onderzoek enkel maar aangetoond dat deze SOS pathway geactiveerd wordt onder zoutstress (24). Onze resultaten tonen dat deze SOS pathway ook belangrijk blijkt te zijn bij cadmiumstress (Figuur 3.10). Zoals eerder vermeld zorgde cadmiumblootstelling voor een significante stijging in genexpressie van *SOS3* in de wortels. De genexpressie van *SOS2* en *SOS1* werd enkel significant upgereguleerd in de blaadjes als gevolg van cadmiumblootstelling, al werd ook een duidelijk stijgende trend in *SOS2*-expressie waargenomen in de wortels.

SOS2 kan, naast SOS1, ook interacties aangaan met PP2C's (proteïne fosfatase 2C), namelijk ABI1 en ABI2. ABI1 (abscisinezuur insensitive 1) kwam tevens verhoogd tot expressie in de wortels na cadmiumblootstelling (microarray). Verder onderzoek zal moeten uitwijzen of ABI1 eveneens in de blaadjes geïnduceerd wordt. ABI1 is een regulator van ABA, een hormoon dat de sluiting van de huidmondjes reguleert. Het werd reeds aangetoond dat cadmium het openen van de huidmondjes inhibeert via ABA (8). De juiste manier waarop dit gebeurt is nog niet gekend, maar een mogelijke rol zou kunnen toegewezen worden aan een activatie van ABI1 door SOS2. Sinds kort toonde onderzoek aan dat H_2O_2 een sleutelmolecule is bij de regulatie van ABA-geïnduceerde sluiting van de huidmondjes. H_2O_2 kan gevormd worden na dismutatie van O_2^{--} geproduceerd door NADPH-oxidasen. Zoals eerder vermeld tonen onze resultaten een stijging in genexpressie *RBOHC* (Figuur 3.4). Mogelijks zijn calcium en kinasen componenten die in dit proces door H_2O_2 geactiveerd kunnen worden (58).

Een derde fosforylatie-target van SOS2 zijn motieven die terug te vinden zijn op het eiwit NIG1. Meer onderzoek is echter nog wel nodig om te bepalen of SOS2 werkelijk een interactie aangaat met en zorgt voor fosforylatie van NIG1. NIG1 is een calcium-bindend nucleair proteïne. Het is een transcriptiefactor die specifiek bindt aan een sequentie die terug te vinden is in de promotor regio van vele zoutstress-gerelateerde genen (36). Als gevolg van

cadmiumstress blijkt een verlaagde genexpressie van *NIG1* in de blaadjes (Figuur 3.10). Mogelijks is NIG1 een negatieve regulator tijdens cadmiumstress.

Algemeen blijkt dat cadmium leidt tot veranderingen in genexpressie van componenten, waarvan reeds bewezen werd dat ze een rol hebben in zoutstress. Dit suggereert dat cadmiumstress en zoutstress zeer gelijkend zijn. Het is ook mogelijk dat ze eenzelfde mechanisme induceren, bijvoorbeeld oxidatieve stress, dat al dan niet een oorzaak of gevolg is van deze gemeenschappelijke stressresponsen.

De specifieke antioxidatieve verdedigingsmechanismen aangeschakeld als gevolg van calcium-signalisatie tijdens cadmiumblootstelling, zijn tot op heden nog niet geweten. Wel toonden studies uitgevoerd op *Arabidopsis* zaailingen dat een H₂O₂-behandeling leidt tot pieken in $[Ca^{2+}]_{cyt}$ en tot een verhoging van GSH-S-transferase 1 (GST-1) transcripten (29). Veranderingen in GST-expressiepatronen na cadmiumblootstelling werden ook waargenomen in gelijklopend onderzoek (46).

Invloed van cadmiumstress op MAPK cascades

MAPK's zijn proteïnen die een kinase activiteit bezitten en op deze manier zorgen voor fosforylatie van bepaalde andere eiwitten. MAPK cascades bestaan uit 3 componenten, namelijk MAPKKK's, MAPKK's en MAPK's. Ze zijn verantwoordelijk voor de intracellulaire signaaltransductie van extracellulaire signalen naar intracellulaire targets. Meer bepaald zorgen ze voor veranderingen in genexpressie van target genen (29). MAPK cascades zijn een tweede kinase pathway waarvan veranderingen in genexpressie als gevolg van cadmiumblootstelling in dit onderzoek bestudeerd werden.

In planten werd reeds aangetoond dat bepaalde MAPK cascades geactiveerd worden tijdens groei, celdood, celdivisie of door hormonen. Verder worden deze cascades ook geactiveerd door pathogenen, koude-, droogte-, zoutstress of bij verwonding (36). Recent is ook gebleken uit studies uitgevoerd op *alfalfa* dat cadmiumblootstelling leidt tot de activatie van specifieke MAPK cascade componenten (37). Deze planten werden blootgesteld aan hoge concentraties CdCl₂ gedurende enkele uren. De resultaten van deze studie tonen aan dat enkel de activiteit van deze MAPK's toenam. De hoeveelheid proteïne aanwezig werd niet veranderd. In onze studie werd gekeken naar veranderingen in genexpressiepatronen van MAPK-componenten na cadmiumblootstelling (Figuur 3.11).

Algemeen tonen onze resultaten aan dat cadmiumblootstelling leidt tot significante upregulaties in de genexpressie van componenten betrokken bij bepaalde MAPK cascades. Activatie van MAPK cascades als gevolg van cadmiumblootstelling kan enerzijds het directe gevolg zijn van de blootstelling. Anderzijds kan dit ook indirecte het gevolg zijn van de blootstelling door activatie van ROS. Zo toonde onderzoek reeds aan dat H_2O_2 verantwoordelijk kan zijn voor de activatie van 2 kinasen namelijk, ANP1 en OXI1 (30, 31). Een verhoogd H_2O_2 -gehalte werd reeds aangetoond na 24 uur bloostelling aan deze cadmiumconcentraties (22). In de blaadjes werd de genexpressie van *OXI1* zeer sterk upgereguleerd als gevolg van cadmiumblootstelling (Figuur 3.7). Hetzelfde geldt ook voor de genexpressie van *RBOHC* in de blaadjes (Figuur 3.4). Mogelijk zorgt dit NADPH-oxidase onder cadmiumstress voor de productie van H_2O_2 , dat vervolgens zal zorgen voor de activatie van OXI1. Een verhoging in *ANP1*-expressie daarentegen was enkel waarneembaar in de wortels (Figuur 3.11). Onderzoek toonde dat ook ANP1 functioneert in een H_2O_2 geïnduceerde signaaltransductiecascade en dat dit resulteert in de activatie van promotors van verdedigingsenzymen zoals *GST6* en *HSP18.2* (30).

Zowel OXI1 als ANP1 zijn positieve regulators van MPK3 en MPK6 (31,30). In de blaadjes was een gelijk genexpressiepatroon observeerbaar voor OXI1 en MPK3/MPK6. Mogelijks zorgt OXI1 onder cadmiumstress voor de activatie van MPK3/MPK6. In de wortels kwam enkel het gen *MPK3* verhoogd tot expressie na cadmiumblootstelling.

Een andere activator van zowel MPK3 als MPK6 is MEKK1, al dan niet via een 'tussen' fosforylatie van MKK2. Eerder onderzoek, eveneens uitgevoerd op *Arabidopsis thaliana* blootgesteld aan (hoge concentraties) CdCl₂, toonde een transcriptionele upregulatie van *MEKK1* (17). In onze resultaten wordt deze verhoging in genexpressie van *MEKK1* al bevestigd na blootstelling aan lagere cadmiumconcentraties in zowel wortel als blad (Figuur 3.7). Een andere studie uitgevoerd op *Arabidopsis* protoplasten toonde dat ook onder koudeen zoutstress deze MAPK cascades (via MEKK1) geactiveerd wordt. Deze MAPK cascade, bestaande uit MEKK1, MKK2, MPK4/MPK6, leidde tot de activatie van verschillende stressgeïnduceerde genen (33). MKK2 kwam enkel in de blaadjes verhoogd tot expressie onder invloed van cadmiumstress en dit expressiepatroon was duidelijk verschillend van dat van MEKK1 (Figuur 3.11). Dit suggereert dat beide genen onder invloed van verschillende mechanismen gereguleerd worden onder cadmiumstress. De genexpressiepatronen van *MKK2* en *MPK4/MPK6* daarentegen volgen wel gelijkaardige expressiepatronen in de blaadjes (Figuur 3.11). Eventueel zou, naast MEKK1, een ander MAPKKK kunnen instaan voor de activatie van deze MAPK-patway. MPK4 blijkt een belangrijk kinase in zowel wortel als blad onder cadmiumstress. Eerder werd al aangetoond dat MEKK1 en MPK4 kunnen functioneren in éénzelfde MAPK cascade. Sinds kort hebben mutantenstudies in *Arabidopsis* aangetoond dat MEKK1, via MPK4, een regulator is voor redox homeostase. Er werd aangetoond dat *MEKK1*-deficiënte planten een misregulatie vertonen in de expressie van genen die betrokken zijn bij cellulaire controle van de redoxbalans. Zo vertoonden *mekk1* en *mpk4* mutanten, een downregulatie in expressie van APX5 en in mindere mate tAPX. APX5 en tAPX zijn respectievelijk een microsomaal en thylakoid APX (59). Onderzoek is echter nog nodig om te bepalen of onder invloed van cadmiumstress activatie van deze antioxidatieve enzymen mogelijk is door MPK4.

Andere mogelijke targets van MPK4 zijn de transcriptiefactoren WRKY25 en WRKY33, via de activatie van MKS1 (34). De genexpressie van *MPK4* en *WRKY25* vertonen gelijkaardige expressiepatronen in zowel wortel als blad (Figuur 3.11). Mogelijks worden deze genen ook upgereguleerd in éénzelfde pathway. Het microarray-experiment toonde dat *WRKY33* eveneens verhoogd tot expressie kwam in de wortel als gevolg van cadmiumblootstelling. Om een beter beeld te krijgen of MPK4 en WRKY33 ook functioneren in dezelfde pathway, zou real-time PCR uitgevoerd moeten worden op de blaadjes.

Verder tonen onze data ook dat ANP2 een belangrijk kinase blijkt te zijn bij cadmiumstress. Een verhoogde genexpressie van *ANP2* was namelijk waar te nemen in wortels en blaadjes (Figuur 3.11). Tot op heden zijn er nog geen mogelijke targets bekend voor ANP2.

Uit deze resultaten kunnen we besluiten dat er in de genexpressie van componenten van deze MAPK-pathways duidelijk verschillen zijn in wortels en blaadjes. Ook zijn de verschillen in de wortels slechts significant na 24 uur blootstelling aan 10 μ M Cd (Figuur 3.7).

Algemeen en voor de meeste genen tonen deze resultaten een signalisatie van wortel naar blad. Er is immers bij blootstelling aan lagere concentraties cadmium reeds een sterkere verhoging in genexpressie in de blaadjes. Een duidelijk voorbeeld hiervan is de genexpressie van *OXI1* (Figuur 3.7). De verschillen in genexpressie van componenten betrokken bij MAPK cascades tussen wortels en blaadjes kunnen ook verklaard worden door een ander soort stresssituatie. De hoeveelheid vrij cadmium en mogelijks ook gecomplexeerde vorm van cadmium verschilt tussen de 2 organen en kan mede aan de oorzaak liggen van deze verschillen in genexpressiepatronen.

Bovendien kunnen verschillen in zowel activiteit als transcriptieconcentratie van de antioxidatieve verdedigingsenzymen kunnen te wijten zijn aan een verschil in onderliggend

regulatiemechanisme. Een voorbeeld is de verhoogde activiteit van het antioxidatief enzym SOD in de blaadjes (Figuur 3.12). De blaadjes vertoonden namelijk meer en duidelijkere veranderingen in genexpressie van componenten van MAPK cascades onder invloed van cadmiumstress. Mogelijks is dit stadium van activatie reeds gepasseerd in de wortels.

Invloed van cadmiumstress op miRNAs

Naast regulatie van stressgerelateerde effecten door signaaltransductiecascades aan de hand van calcium-signalisatie en MAPK cascades, is dit ook mogelijk door andere mechanismen. Zo kunnen miRNAs een rol spelen bij allerlei stressresponsen. MiRNAs zijn finale producten van niet-coderende genen en spelen een rol in de regulatie van de genexpressie van bepaalde andere target genen. Meer bepaald gebeurt dit op post-transcriptioneel niveau door RNA silencing van target genen. Hiervoor wordt het mature miRNA opgenomen in RISC, dat tevens het proteïne AGO1 bevat. MiRNA zal een complementair mRNA molecule binden. Vervolgens zorgt AGO1 voor de klieving van het mRNA molecule (38).

Studies toonden reeds aan dat in verschillende stress-situaties genexpressieveranderingen gereguleerd worden door veranderingen in miRNAs (25). Er werd reeds aangetoond dat de genexpressie van anti-oxidatieve enzymen zoals Cu/ZnSOD gereguleerd worden door miRNAs onder koper- en ijzerstress (26). Zo kan miR398 zorgen voor klieving van de transcripten van Cu/ZnSOD, namelijk *CSD1* en *CSD2*. Op deze manier is miR398 een negatieve regulator van *CSD1* en *CSD2*. Onze data tonen een daling in genexpressie van *CSD1* en *CSD2* onder cadmiumstress (Figuur 3.5). De genexpressie van *miR398a* en *miR398b* daarentegen werd significant upgereguleerd in beiden organen als gevolg van cadmiumblootstelling (Figuur 3.9). Ook onder cadmiumstress kan *miR398* dus verantwoordelijk zijn voor klieving van Cu/ZnSOD transcripten.

Zoals eerder aangehaald is AGO1 een noodzakelijk proteïne in de miRNA pathway. AGO1 zorgt namelijk voor klieving van het target mRNA van een bepaald miRNA. Studies toonden dat transcripten van *AGO1* mogelijke targets zijn van *miR168* (39). Op deze manier is *miR168* belangrijk voor het behouden van de homeostase van de miRNA pathway. Onder cadmiumstress werd een daling in genexpressie van AGO1 waargenomen (Figuur 3.9). Deze daling werd echter niet veroorzaakt door miR168a. Er was namelijk enkel een verhoging in genexpressie van *miR168a* waarneembaar in de wortels na blootstelling aan 10µM Cd.

CONCLUSIE

5

Cadmiumblootstelling leidt tot een verstoring van de redoxbalans. Zo werd de genexpressie van ROS-producerende enzymen upgereguleerd. Vooral NADPH-oxidasen zijn belangrijke ROS producenten, omdat ze indirect zorgen voor de productie van H_2O_2 . H_2O_2 is een belangrijk signaalmolecule dat kan zorgen voor de activatie van verschillende signaaltransductiecascades, waaronder calcium-signalisatie pathways en MAPK cascades.

Uit een microarray-screening bleek dat vele genen, die betrokken zijn bij calcium-signalisatie verhoogd of verlaagd tot expressie komen onder invloed van cadmiumstress. Dit suggereert dat calcium een belangrijke factor zou kunnen zijn tijdens de regulatie van cadmiumgeïnduceerde stresseffecten. De genexpressie van bepaalde kinasen die betrokken zijn bij calcium-signalisatie, waarvan tot op heden vooral een rol was toegekend bij zoutstress, bleken verhoogd te worden als gevolg van cadmiumblootstelling. Het gaat hier over CDPK1 en componenten van de SOS pathway. Verder onderzoek zal moeten aantonen of cadmiumblootstelling effect heeft op de calciumpieken in verschillende delen van de cel, en welke rol H_2O_2 en andere ROS hierin spelen.

De genexpressie van kinasen betrokken bij MAPK cascades werden eveneens upgereguleerd onder invloed van cadmiumstress. OXII blijkt een belangrijke signalisatiefunctie te hebben tijdens cadmiumstress in de blaadjes. ANP1 daarentegen blijkt dan weer een hoofdrol te spelen in de MAPK-cascade geactiveerd in de wortels. Beide MAPKKK's worden gereguleerd door H_2O_2 en fosforyleren MAPK's zoals MPK3 en MPK6, die eveneens verhoogd tot expressie kwamen in dit onderzoek. In de toekomst zullen mutantenstudies duidelijk moeten maken welke targets een bepaalde component van een MAPK cascade heeft onder cadmiumstress.

Calcium-signalisatie pathways en MAPK cascades geïnduceerd door cadmiumstress zouden verantwoordelijk kunnen zijn voor de activatie van antioxidatieve enzymen, die beschermen tegen de stress-situatie. Mogelijks verklaren deze regulatiemechanismen ook de verschillen in activatie en transcriptconcentratie van de antioxidatieve verdediging tussen blad en wortel tijdens cadmiumstress. Algemeen werd ook een stijging in genexpressie van antioxidatieve enzymen, behalve *Cu/ZnSOD*, waargenomen na cadmiumblootstelling. De daling in

genexpressie van *Cu/ZnSOD* is waarschijnlijk het gevolg van een verhoogde *miR398*expressie. Verder onderzoek moet nog duidelijk maken welke target genen geactiveerd worden door deze signaaltransductiecascades.

REFERENTIES

- 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.
- Nawrot T, Plusquin M, Hogervorst J, Roels HA, Celis H, Thijs L, et al. Environmental exposure to cadmium and risk of cancer: a prospective population-based study. Lancet oncology 2006; 7(2): 119-126.
- Staessen J, Roels H, Vangronsveld J, Clijsters H, De Schrijver K, De Temmerman L, et al. Preventiemaatregelen voor bodemverontreiniging met cadmium. Tijdschrift voor geneeskunde 1995; 51(20): 1387-1395.
- Nordberg GF. Environmental exposure and preventive measures in Sweden and EU. Biometals 2004; 17(5): 589-592.
- Thijssen S, Maringwa J, Faes C, Lambrichts I, Van Kerkhove E. Chronic exposure of mice to environmentally relevant, low doses of cadmium leads to early renal damage, not predicted by blood or urine cadmium levels. Toxicology 2007; 229(1-2): 145-156.
- Järup L, Berglund M, Elinder CG, Nordberg G, Vahter M. Health effects of cadmium exposure a review of the literature and a risk estimate. Scandinavian journal of work, environment and health 1998; 24(suppl): 1-52.
- 7. Verougstraete V, Lison D, Hotz P. Cadmium, lung and prostate cancer: a systematic review of recent epidemiological data. Journal of toxicology and environmental health 2003; 6(3): 227-255.
- Sanità di Toppi L, Gabrielli R. Responses to cadmium in higher plants. Environmental and experimental botany 1999; 41: 105-130.
- 9. Stohs SJ, Bagchi D, Hassoun E, Bagchi M. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. Journal of environmental pathology, toxicology and oncology 2001; 20: 77-88.
- Badisa VLD, Latinwo LM, Odewumi CO, Ikediobi CO, Badisa RB, Lambert T, et al. Mechanisms of DNA damage by cadmium and interplay of antioxidant enzymes and agents. Environmental toxicology 2007, 22(2): 144-151.
- Montillet JL, Cacas JL, Garnier L, Montané MH, Douki T, Bessoule JJ, et al. The upstream oxylipin profile of *Arabidopsis thaliana*: a tool to scan for oxidative stresses. The plant journal 2004; 40(3): 439-451.
- Halliwel B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. Plant physiology 2006; 141: 312-322.
- 13. Wang Y, Fang J, Leonard SS, Krishna Rao KM. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. Free radical biology & medicine 2004; 36(11): 1434-1443.
- 14. Smeets K, Ruytinx J, Semane B, Van Belleghem F, Remans T, Van Sanden S, et al. Cadmium-induced transcriptional and enzymatic alterations related to oxidative stress. Environmental and experimental botany: submitted.

- 15. Smeets K, Cuypers A, Lambrechts A, Semane B, Hoet P, Van Laere A, et al. Inducion of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. Plant physiology and biochemistry 2005; 43: 437-444.
- Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK. Cell signaling during cold, drought and salt stress. The plant cell 2002; 14: S165-S183.
- 17. Suzuki N, Koizumi N, Sano H. Screening of cadmium-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. Plant, cell and environment 2001; 24: 1177-1188.
- Sunkar R, Zhu JK. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. The plant cell 2004; 16: 2001-2019.
- Sunkar R, Kapoor A, Zhu JK. Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutasen genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. The plant cell 2006; 18: 2051-2065.
- Knight H. Calcium signalling during abiotic stress in plants. International review of cytology 2000; 195: 269-325.
- 21. Rentel MC, Knight MR. Oxidative stress-induced calcium signaling in *Arabidopsis*. Plant physiology 2004; 135: 1471-1479.
- 22. Cuypers A, Smeets K, Vangronsveld J. Plant physiology 2007, submitted.
- 23. Lecourieux D, Ranjeva R, Pugin A. Calcium in plant defence-signalling pathways. New phytologist 2006; 171: 249-269. (overzichtsartikel)
- Sánchez-Barrena MJ, Martínez-Ripoll M, Zhu JK, Albert A. The structure of the *Arabidopsis thaliana* SOS3: molecular mechanisms of sensing calcium for salt stress response. Journal of molecular biology 2005; 345(5): 1253-1264.
- 25. Shi H, Ishitani M, Kim C, Zhu JK. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. Proceedings of the national academy of sciences 2000; 97(12): 6896-6901.
- Urao T, Katagiri T, Shinozaki K. Two genes that encode Ca²⁺-dependent kinases are induced by drought and high-salt stresses in *Arabidopsis thaliana*. Molecular genetics and genomics 1994; 224: 331-340.
- Sheen J. Ca²⁺-dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. Science 1996; 274: 1900-1902.
- Kim J, Kim H. Functional analysis of a calcium-binding transcription factor involved in plant salt stress signaling. FEBS Letters 2006; 580: 5251-5256.
- Kaur N, Gupta AK. Signal transduction pathways under abiotic stresses in plants. Current science 2005; 88(11): 1771-1780. (overzichtsartikel)
- Kovtun Y, Chiu WL, Tena G, Sheen J. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogenactivated protein kinase cascade in plants. Proceedings of the national academy of sciences 2000; 97(6): 2940-2945.
- 31. Rentel MC, Lecourieux D, Ouaked F, Usher SL, Petersen L, Okamoto H, et al. OXI1 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis*. Nature 2004; 427: 858-861.
- 32. Asia T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, et al. MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. Nature 2002; 415(6875): 977-983.

- 33. Teige M, Scheikl E, Eulgem T, Dóczi R, Ichimura K, Shinozaki K, et al. The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. Molecular cell 2004; 15: 141-152.
- Andreasson E, Jenkins T, Brodersen P, Thorgrimsen S, Petersen NHT, Zhu S, et al. The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. The EMBO journal 2005; 24(14): 2579-2589.
- 35. Zheng Z, Mosher SL, Fan B, Klessig DF, Chen Z. Functional analysis of *Arabidopsis* WRKY25 transcription factor in plant defense against *Pseudomonas syringae*. BMC plant biology 2007; 7: 2-14.
- 36. Tena G, Asia T, Chiu WL, Sheen J. Plant mitogen-activated protein kinase signalling cascades. Current opinion in plant biology 2001; 4(5): 392-400.
- 37. Jonak C, Nakagami H, Hirt H. Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium. Plant physiology 2004; 136: 3276-3283.
- 38. Jones-Rhoades MWJ, Bartel DP, Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. Annual review of plant biology 2006; 57: 19-53.
- 39. Vaucheret H, Mallory AC, Bartel DP. AGO1 homeostasis entails coexpression of *MIR168* and *AGO1* and preferential stabilization of miR168 by AGO1, Molecular cell 2006; 22: 129-136.
- 40. 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: submitted.
- 41. Applied biosystems 2007. URL: <u>https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=602323&tab=</u> <u>DetailInfo</u>
- 42. Dhindsa RS, Plumb-Dhindsa P, Thorpe TA. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. Journal of experimental botany 1981; 32: 93-101.
- Dewir YH, Chakrabarty D, Ali MB, Hahn EJ, Paek KY. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Euphorbia millii* hyperhydric shoots. Environmental and experimental botany 2006; 58: 93-99.
- Dong J, Wu FB, Zhang GP. Effect of cadmium on growth and photosynthesis of tomato seedlings. Journal of Zhejiang university science 2005; 6B(10): 974-980.
- 45. Borges R, Miguel EC, Dias JMR, da Cunha M, Bressan-Smith RE, de Oliveira JG, et al. Ultrastructural, physiological and biochemical analyses of chlorate toxicity on rice seedlings. Plant science 2004; 166: 1057-1062.
- Lijnen L. Invloed van metaalstress op de cellulaire redoxbalans van Arabidopsis thaliana.
 Eindverhandeling tUL School voor Levenswetenschappen, 2007.
- 47. Rodriguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, Zabalza A, Corpas FJ, Gomez M, Del Rio GL, et al. Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation *in vivo*. Plant, cell and environment 2006; 29: 1532-1544.
- 48. Schützendübel A, Polle A. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. Journal of experimental botany 2002; 53(372): 1351-1365.

- 49. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. Free radical biology and medicine 2001; 30(11): 1191-1212. (review)
- 50. Skórzyńska-Polit E, Krupa Z. The activity of lipoxygenase in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh a preliminary study. Cellular and molecular biology letters 2003; 8(2): 279-284.
- 51. Slesak I, Libik M, Karpinska B, Karpinski S, Miszalski Z. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. Acta biochimica polonica 2007; 54(1): 39-50.
- 52. Torres MA, Dangl JL. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. Current opinion in plant biology 2005; 8: 397-403.
- 53. Cho UH, Seo NH. Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. Plant science 2005; 168: 113-120.
- 54. Demidchik V, Shabala SN, Davies JM. Spatial variation in H_2O_2 response of *Arabidopsis thaliana* root epidermal Ca²⁺ flux and plasma membrane Ca²⁺ channels. The plant journal 2007; 49: 377-386.
- 55. Perfus-Barbeoch L, Leonhardt N, Vavasseur A, Forestier C. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. The plant journal 2002; 32: 539-548.
- 56. White PJ. Calcium channels in higher plants. Biochimica et biophysica acta 2000; 1465: 171-189. (overzichtsartikel)
- 57. Sivaci A, Sivaci ER, Sökmen M. Changes in antioxidant activity, total phenolic and abscisic acid constituents in the aquatic plants Myriophyllum spicatum L. and Myriophyllum triphyllum Orchard exposed to cadmium. Ecotoxicology 2007; 16(5): 423-428.
- 58. Desikan R, Cheung MK, Bright J, Henson D, Hancock, Neill SJ. ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. Journal of experimental botany 2004; 55(395): 205-212.
- Nakagami H, Soukupová H, Schikora A, Zarsky V, Hirt H. A mitogen-activated protein kinase kinase mediates reactive oxygen species homeostasis in Arabidopsis. The journal of biological chemistry 2006; 281(50): 38697-38704.

BIJLAGE

<u>Bijlage 1</u>

Tabel 2.1: Forward en reverse primers van de genen waarvan de genexpressie werd gemeten met realtime PRC gebruik makend van SYBR green chemie.

| Gen | ATG-nummer | Forward primer | Reverse primer |
|--------|-------------|---------------------------|--------------------------|
| RBOHC | AT5G51060 | TCACCAGAGACTGGCACAATAAA | GATGCTCGACCTGAATGCTC |
| RBOHD | AT5G47910 | TATGCATCGGAGAGGCTGCT | TAGAGACAACACGTTCCCGGG |
| LOXI | AT1G55020 | TTGGCTAAGGCTTTTGTCGG | GTGGCAATCACAAACGGTTC |
| LOX2 | AT3G45140 | TTTGCTCGCCAGACACTTG | GGGATCACCATAAACGGCC |
| CSD1 | AT1G08830 | TCCATGCAGACCCTGATGAC | CCTGGAGACCAATGATGCC |
| CSD2 | AT2G28190 | GAGCCTTTGTGGTTCACGAG | CACACCACATGCCAATCTCC |
| FSD1 | AT4G25100 | CTCCCAATGCTGTGAATCCC | TGGTCTTCGGTTCTGGAAGTC |
| CATI | AT1G20630 | AAGTGCTTCATCGGGAAGGA | CTTCAACAAAACGCTTCACGA |
| APX1 | AT1G07890 | TGCCACAAGGATAGGTCTGG | CCTTCCTTCTCTCCGCTCAA |
| APX2 | AT1G07890 | GAGATGTGTTTGGTCGGATGG | CTCGAATCCTGAACGCTCC |
| SOS3 | AT5G24270 | CGCTTCTTCACGAATCCGA | TCGTTTTTGCGGTCTGCTT |
| SOS2 | AT5G35410 | ATTATCTTCGATCAAGGCCGG | GTTTCACCAGCAGCCTTTCTT |
| SOS1 | Niet gekend | ACGCCAAACAACAACAAGAGA | ACACATTAACCATGCTGCCG |
| CDPK1 | AT1G18890 | CAAAGCTGGGCTTCAGAAGG | AAACCCATTTCCATCGACATC |
| ANP1 | AT1G09000 | AAGAGAGGACACTGCTCGTGG | TTGCGTCTGTTGCTCTTGAAG |
| ANP2 | AT1G54960 | GGTGACTGGAAAAGCTCCTTG | TTGTCAGGGATTGGAGGATG |
| MEKK1 | AT4G08500 | TGAGATATCGTGGCACAGCC | CCCGAAGCTGGTATCTTTGG |
| MKK2 | AT4G29810 | GGATCCAAACAGTCGAAGCTC | TGCATCTGTGAAGTAGGACGC |
| МРК3 | AT3G45640 | GACGTTTGACCCCAACAGAA | TGGCTTTTGACAGATTGGCTC |
| MPK4 | AT4G01370 | ACATGTCGGCTGGTGCAGT | AATATGGGTGGCACAACGC |
| MPK6 | AT2G43790 | TAAGTTCCCGACAGTGCATCC | GATGGGCCAATGCGTCTAA |
| OXII | AT3G25250 | CGATTATTGTCCGGGACAGA | CTAATACAAGCTCCGCCGC |
| WRKY22 | AT4G01250 | AAACCCATCAAAGGTTCACCA | GGGTCGGATCTATTTCGCTC |
| WRKY25 | AT2G30250 | GAAAGATCCGCAGCAGACG | TCCCAATAATTTCACGAGCG |
| WRKY29 | AT4G23550 | CATGGGCGTGGCGTAAATA | TTGTTTTCTTGCCAAACACCC |
| NIG1 | AT5G46830 | AACCCGAATCCTAGTCCGGT | CTCAGTACATCGCCGCATG |
| AGO1 | AT1G48410 | AACTTGATGCCATCCGCAA | CAAACAGCCTCGTGTGATGAC |
| ACT2 | AT3G18780 | CTTGCACCAAGCAGCATGAA | CCGATCCAGACACTGTACTTCCTT |
| / | AT4G26410 | GAGCTGAAGTGGCTTCCATGAC | GGTCCGACATACCCATGATCC |
| / | AT5G08290 | TTACTGTTTCGGTTGTTCTCCATTT | CACTGAATCATGTTCGAAGCAAGT |

Auteursrechterlijke overeenkomst

Opdat de Universiteit Hasselt uw eindverhandeling wereldwijd kan reproduceren, vertalen en distribueren is uw akkoord voor deze overeenkomst noodzakelijk. Gelieve de tijd te nemen om deze overeenkomst door te nemen, de gevraagde informatie in te vullen (en de overeenkomst te ondertekenen en af te geven).

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling: Invloed van cadmiumstress bij Arabidopsis thaliana: transcriptionele veranderingen in regulatiemechanismen. Richting: Master in de biomedische wetenschappen Jaar: 2007 in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

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

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

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

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

Ik ga akkoord,

Kim Donckers

Datum: 19.06.2007