

De rol van NADPH oxidasen in cadmium-geïnduceerde oxidatieve stress bij Arabidopsis thaliana

Dennis Mathijsen

promotor :
dr. Ann CUYPERS

co-promotor :
dr. Tony REMANS

Eindverhandeling voorgedragen tot het bekomen van de graad
Master in de biomedische wetenschappen klinische en
moleculaire wetenschappen



Inhoudstabel

Afkortingen	
Dankwoord	
Samenvatting	
1 Inleiding	1
1.1 Cd en Cu toxiciteit	1
1.1.1 Cd toxiciteit op mens, dier en plant	2
1.1.2 Cu toxiciteit op mens, dier en plant	3
1.2 Wat zijn reactieve zuurstofvormen?	4
1.3 “Oxidatieve stress” en antioxidatieve verdediging	5
1.3.1 Lipidenperoxidatie	5
1.3.2 Schade aan proteïnen	7
1.3.3 Schade aan het DNA	7
1.3.4 Antioxidatieve verdediging	7
1.4 Redoxsignalling	9
1.5 Nicotinamide Adenine Dinucleotide Fosfaat oxidase (NADPH oxidase)	10
1.5.1 NADPH oxidase in dieren	10
1.5.2 NADPH oxidase planthomologen	11
1.5.3 NADPH oxidase planthomologen in <i>Arabidopsis thaliana</i>	11
1.6 Doel van het onderzoek	13
2 Materiaal en methoden	15
2.1 Plantmateriaal en sterilisatie van zaden	15
2.2 Hydrocultuur	15
2.3 Vertikale agarplaten	16
2.4 Bepaling van mutante genotypen met Polymerase Chain Reaction (PCR)	16
2.4.1 Extractie van genomisch DNA	16
2.4.2 Concentratie- en zuiverheidsbepaling van DNA	16
2.4.3 DNA amplificatie met behulp van PCR	17
2.4.4 Visualisatie van PCR fragmenten met gelelektroforese	17
2.5 Bepaling van de genexpressie	18
2.5.1 RNA extractie	18
2.5.2 Concentratiebepaling RNA	18
2.5.3 Reverse transcriptie	18
2.5.4 Kwantitatieve analyse van genexpressie met real time PCR	18
2.6 Analyse van de primaire wortelgroei	20
2.7 Bepaling van de activiteit van enzymen	21
2.7.1 SOD	21
2.7.2 SPOD	22
2.7.3 GPOD	22
2.7.4 GR	23
2.7.5 APOD	23
2.7.6 CAT	23
2.8 Analyse van de graad van lipidenperoxidatie	23
2.9 Statistische analyse	24
3 Resultaten	25
3.1 Bepaling van mutante genotypen met PCR	25
3.2 Groeiparameters van het wild type en de <i>rbohC</i> , <i>rbohD</i> en <i>rbohF</i> mutanten na Cd-blootstelling	26
3.3 Analyse van de primaire wortelgroei na blootstelling aan Cd	27

3.4	Bepaling van de genexpressie	30
3.4.1	Zoektocht naar superieure referentiegenen	30
3.4.2	Kwantitatieve analyse van genexpressie met real time PCR	32
3.5	Analyse van enzymactiviteiten van oxidatieve stress gerelateerde enzymen bij Cd-blootstelling.....	40
3.6	Analyse van het gehalte aan lipidenperoxidatie	43
4	Discussie	44
	Referenties	48

Afkortingen

•OH	hydroxyl radicaal	mtDNA	mitochondriaal DNA
ABA	abscisinezuur	NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Fosfaat Oxidase
ASA	ascorbaat	nDNA	nucleair DNA
AtRBOH	<i>Arabidopsis thaliana</i> RBOH	O ₂	zuurstof
BFB	bromofenolblauw	O ₂ ⁻	superoxide anion
Ca	calcium	OH ⁻	hydroxide anion
CAT	catalase	Pb	lood
Cd	cadmium	PCR	polymerase chain reaction
cDNA	copy DNA	POD	peroxidase
CdSO ₄	cadmiumsulfaat	PVP	polyvinylpirolidine
Cu	koper	RBOH	respiratory burst oxidase homoloog eiwit
CuSO ₄	kopersulfaat	<i>RBOH</i>	gen dat codeert voor RBOH
DHA	dehydroascorbaat	<i>rboh</i>	<i>RBOH</i> mutant
DHAR	dehydroascorbaatreductase	RNA	ribonucleic acid
DNA	desoxyribonucleic acid	ROS	reactive oxygen species
FAD	flavine adenine dinucleotide	rRNA	ribosomaal RNA
Fe	ijzer	SAZ	syringaldazine
gDNA	genomisch DNA	SOD	superoxidedismutase
GR	glutathionreductase	Zn	zink
GSH	glutathion		
GSSG	glutathiondisulfide		
H ₂ O	water		
H ₂ O ₂	waterstofperoxide		
HR	Hyperreactieve respons/allergische reactie		
MDA	malondialdehyde		
MDHA	monodehydroascorbaat		
MDHAR	monodehydroascorbaatreductase		
mRNA	messenger RNA		

Dankwoord

Nu de eindstreep van mijn studie in zicht is zou ik mij graag willen wenden tot de mensen die mij doorheen mijn reeds afgelegde weg gesteund, bijgestaan en geholpen hebben.

Als eerste zou ik mijn dank willen betuigen aan mijn promotor dr. Ann Cuypers om mij de kans te geven mijn stage onder haar hoede te vervullen en voor haar hulp bij het ontwerpen van deze thesis. Ook wil ik prof. dr. Emmy Van Kerkhove bedanken voor het nalezen en beoordelen van dit eindwerk.

Ten tweede ben ik enorm veel dank verschuldigd aan mijn persoonlijke begeleider en tevens co-promotor dr. Tony Remans. Zijn steun, hulp en grote kennis van zaken hebben enorm bijgedragen aan deze thesis. Nooit had hij het te druk en nooit was er iets teveel om hem te vragen. Kortom, altijd was hij daar om mij in raad en daad bij te staan, hiervoor nogmaals mijn welgemeende dank.

Daarnaast zou ik ook nog graag de collega-studenten en medewerkers van het microbiologisch labo willen danken voor de aangename sfeer. Hierbij gaat er een speciaal dankwoord uit naar Liesbeth Lijnen, Sherwin Vaesen, Sebastian Vandeput, Nico Hollanders, Andy Smeets en drs. Kelly Opdenakker voor hun hulp bij het soms langdradige en eentonige labowerk en de lay out ontwikkeling van deze thesis.

Ook moet drs. Karen Smeets vernoemd worden aangezien zij een onoverzienbare rol heeft gespeeld in mijn stage.

Tevens zou ik graag mijn ouders, familieleden en kennissen bedanken om mij de middelen, de mogelijkheid en steun te bieden deze studierichting te volgen.

Als laatste zou ik graag mijn vriendin, partner en zielsverwante Reny Smolders willen danken. Haar onuitputtelijk begrip en steun doorheen deze ietwat zwaardere tijd hebben onmiskenbaar enorm bijgedragen niet alleen aan de verwezenlijking van deze thesis, maar ook aan alle dingen die ik tot nog toe bereikt heb in dit leven.

Mijn oprechte excuses aan diegenen die ik vergeten ben te vermelden in dit dankwoord ondanks hun bijdrage aan deze thesis. Voor u allen eveneens een oprechte dank u!

Samenvatting

Sinds de industriële revolutie van eind 19^e eeuw, tot en met de jaren zeventig van de vorige eeuw werd er massaal metalen gewonnen uit ertsen. Metalen zoals zink (Zn), koper (Cu) en lood (Pb) werden geëxtraheerd uit ertsen door middel van verhitting. Hierbij kwam cadmium (Cd) vrij, dat vervolgens zowel lucht, water als bodems verontreinigde. Tot op heden ondervindt men hinder van de toxische effecten van dit metaal dat schade kan aanrichten aan zowel mens, dier als aan het milieu. Dit komt door het feit dat het kan interageren met bepaalde biologische en fysiologische processen in deze organismen. Op het cellulaire niveau is een algemeen effect waarneembaar, namelijk oxidatieve stress. Oxidatieve stress wordt gekenmerkt door een verstoring van de redoxbalans in de richting van de pro-oxidanten. Deze kunnen schade aanrichten aan eiwitten, lipiden en zijn zelfs in staat het DNA aan te tasten.

In deze studie werd de mogelijke rol van NADPH oxidasen als regulator in het veroorzaken van oxidatieve stress na Cd-blootstelling, in *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia), onderzocht. Hiervoor werden NADPH oxidase mutanten *rbohC*, *rbohD* en *rbohF* bestudeerd zowel op het niveau van plantmorfologie als op het cellulaire niveau. Op het morfologische niveau werd er gekeken naar het effect van Cd-blootstelling op de primaire wortelgroei. Op het cellulaire niveau werd er gekeken naar de effecten van Cd-blootstelling op de genexpressieprofielen en enzymactiviteiten van een aantal pro- en antioxidatieve enzymen. Vervolgens werd er ook gekeken naar het gehalte aan lipidenperoxidatie.

Het valt op te merken dat *rbohF* mutanten reeds oxidatieve stress ondervinden zonder dat ze blootgesteld zijn aan Cd, wat een rol voor RBOHF in het handhaven van de cellulaire redoxbalans naar voren brengt. Verder komen de voorgelegde resultaten met betrekking tot het wild type plant overeen met voorgaand onderzoek, zodat een kader bestond om daarvan afwijkende resultaten in de NADPH oxidase mutanten te interpreteren. Deze studie staft het reeds bestaande vermoeden dat NADPH oxidasen een belangrijke rol spelen in Cd-geïnduceerde oxidatieve stress. Vooral de RBOHC en RBOHD isovormen spelen een belangrijke regulatorische rol, aangezien uitschakeling van deze enzymen leidt tot een verstoorde respons op blootstelling aan Cd. Zo hebben ze onder andere een invloed op de expressie van lipoxygenasen, die eveneens een belangrijke rol spelen bij Cd blootstelling. De hypothese dat lipoxygenase expressie gereguleerd wordt door NADPH oxidasen wordt besproken.

1 Inleiding

Sinds de jaren tachtig is er meer en meer onderzoek uitgevoerd rond de aspecten van milieuverontreiniging door toxische metalen, waaronder Cadmium (Cd), in de Noord-Limburgse en Antwerpse Kempen [1]. Steden en gemeenten gelegen in deze regio, zoals Lommel en Overpelt, hebben tot op heden te kampen met een ware Cd overlast. De huidige Cd problematiek is een rechtstreeks gevolg van een historische verontreiniging. Sinds de industriële revolutie van eind 19^e eeuw, tot en met de jaren zeventig van de vorige eeuw, werd er massaal metalen gewonnen uit ertsen. Metalen zoals zink (Zn), koper (Cu) en lood (Pb) werden geëxtraheerd uit ertsen door middel van verhitting. Hierbij kwam Cd vrij, dat vervolgens zowel lucht, water als bodems verontreinigde. In de jaren '70 werd er overgeschakeld naar elektrolytische technieken voor de winning van metalen. Hierdoor vond een opmerkelijke daling van de Cd emissie plaats [1-3]. De jaarlijkse emissies daalden van 125.000 kg in 1950 tot 130 kg in 1989 [3]. Desalniettemin blijft Cd, omdat het element is dat niet kan afgebroken worden in de natuur, wel aanwezig in de bodems gelegen in de omgeving van de voormalige zinkfabrieken [2, 3]. Tot op heden ondervindt men hinder van de toxische effecten van dit metaal.

Net als Cd kan ook Cu als een toxisch metaal beschouwd worden. De reden hiervoor is dat Cu, wanneer het in voldoende hoge concentraties voorkomt, eveneens schadelijke effecten kan hebben op het milieu en haar organismen. Cu kan, net als Cd, als gevolg van natuurlijke (erosie, vulkaanuitbarstingen) en/of antropogene (metaalindustrie, meststoffen, bestrijdingsmiddelen) activiteiten plaatselijk in verhoogde concentraties voorkomen [4].

1.1 Cd en Cu toxiciteit

Toxische metalen zoals Cu en Cd kunnen schade aanrichten aan zowel mens, dier als aan het milieu. Dit komt door het feit dat zij kunnen interageren met bepaalde biologische en fysiologische processen in deze organismen. Interacties met bepaalde essentiële processen en pathways kunnen verstoringen teweegbrengen die nefast zijn voor het levensonderhoud van het organisme [2-4].

1.1.1 Cd toxiciteit op mens, dier en plant

Voor bijna alle organismen die op deze aarde leven is Cd een niet-essentieel element. Niet-essentieel betekent dat Cd niet gebruikt kan worden in biologische processen die nodig zijn om het leven te onderhouden [5]. Chemisch gezien vertoont Cd echter veel overeenkomsten met calcium (Ca) en Zn. Hierdoor kan het gemakkelijk opgenomen worden door planten en stapelt het zich in het bijzonder op in bladgroenten zoals sla en spinazie [6, 7]. Als gevolg van zijn hoge halfwaardetijd kan Cd bioaccumuleren in deze organismen. Wanneer deze planten vervolgens geconsumeerd worden door hogere organismen, zoals bepaalde dieren en/of de mens, vindt er een verdere opstapeling van het Cd plaats. Hierdoor zijn metallisch Cd en Cd-verbindingen zelfs in zeer lage concentraties uiterst giftig [2, 3].

Wanneer planten blootgesteld worden aan Cd kan dit resulteren in een verminderde biomassa-productie. Deze groei-belemmering wordt onder andere veroorzaakt doordat Cd aan proteïnen wordt gebonden, waardoor het de fotosynthese- en transpiratie-activiteit van planten kan beperken alsook het celademhalingspercentage kan laten stijgen. Een belangrijke rol in de inhibitie van de transpiratie wordt vervuld door abscisinezuur (ABA). ABA is een plantenhormoon dat instaat voor het sluiten van de huidmondjes, die zich aan de boven- en/of onderkant van de blaadjes van planten bevinden. Cd is in staat de productie van dit hormoon te verhogen [6]. De inhibitie van de fotosynthese- en transpiratie-activiteit parallel met een inhibitie van de opname van macro- en micronutriënten spelen een belangrijke rol in de waargenomen groei-inhibitie. Als gevolg van de hoge bindingscapaciteit van Cd ten opzichte van proteïnen kan het ook de functie van enzymen die betrokken zijn in de antioxidatieve verdediging gaan aantasten, waardoor er op cellulair niveau indirect oxidatieve stress kan ontstaan [7].

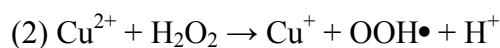
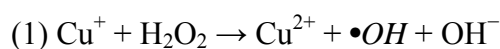
De opname van Cd bij mensen vindt vooral plaats via het voedsel. Voedsel dat rijk is aan Cd, zoals groene bladgroenten, eetbare zeewieren en dierlijke organen (lever), zal de Cd-concentratie in het menselijke lichaam doen toenemen [2, 3, 8]. Als mensen roken worden ze eveneens blootgesteld aan hoge concentraties Cd. Tabaksrook bevat gemiddeld 2 µg Cd waarvan tijdens de inhalatie ongeveer 10% door de longen opgenomen wordt, waarna het door het bloed naar de rest van het lichaam wordt getransporteerd [3, 9]. Mensen die leven in de omgeving van gevaarlijke afvalstortplaatsen of fabrieken die Cd uitstoten in de lucht evenals mensen die werken in een metaalraffinaderij kunnen ook blootgesteld worden aan

hogere concentraties dan de gemiddelde persoon. De inhalatie van Cd-dampen of Cd-partikels kan ernstige schade aan de longen toebrengen, wat zelfs de dood tot gevolg kan hebben. Via het bloed wordt het opgenomen Cd (orale inname of inhalatie) vervolgens naar de lever getransporteerd. Hier kan het accumuleren of gaat het eiwitcomplexen vormen die naar de nieren afgevoerd worden. Cd accumuleert eveneens in de nieren, waar het de filtermechanismen beschadigt. Hierdoor worden essentiële eiwitten en suikers uitgescheiden (proteïnurie, glucosurie en aminoacidurie) en vindt er een verdere degeneratie van de nieren plaats. Het duurt heel lang (halfwaardetijd gelegen tussen 10 en 30 jaar) vooraleer Cd dat zich in de nieren heeft opgestapeld wordt uitgescheiden [2, 3, 9].

Lage blootstelling aan Cd geeft geen onmiddellijke gezondheidsproblemen, maar schaadt de gezondheid op lange termijn; het verstoort, zoals reeds gesteld, de werking van de nieren, kan de beenderen minder sterk maken alsook de morfologische botstructuur aantasten (osteoporose, botbreuken en “itai itai” ziekte) [2, 3, 9, 10]. Door zijn grote chemische overeenkomst met Zn kan Cd de plaats van Zn in belangrijke verbindingen innemen en hun activiteit hierdoor belemmeren [7, 10]. Omdat Zn ook belangrijk is voor de spermaproductie, kan deze door de inname van Cd worden verstoord [11]. Uit een recent (2006) en grootschalig onderzoek in de Noord-Limburgse en Antwerpse kempen is gebleken dat er een verband is tussen het inademen van met Cd vervuild stof en het voorkomen van longkanker [12]. Het wordt door het “International Agency for Research on Cancer” (IARC) dan ook ingedeeld als een categorie 1 carcinogeen [2].

1.1.2 Cu toxiciteit op mens, dier en plant

In tegenstelling tot Cd is Cu wel degelijk een essentieel element. Cu speelt een belangrijke rol in verschillende biologische processen en fungeert dikwijls als een co-factor voor bepaalde enzymen, zoals Cu/Zn superoxidedismutase (SOD). De toxiciteit van hoge concentraties Cu is, naast zijn betrokkenheid als co-factor in de functie van veel enzymen, een rechtstreeks gevolg van het feit dat het, in tegenstelling tot Cd, een redoxreactief element is. Dit wil zeggen dat Cu op cellulair niveau kan deelnemen aan de Fenton reactie:



Hierbij wordt het zeer reactieve hydroxylradicaal, één van de reactieve zuurstofvormen (ROS), gevormd dat op zijn beurt in staat is oxidatieve stress te induceren.

In planten uit een overmaat aan Cu zich meestal als een algemene groeibelemmering gepaard gaande met symptomen zoals chlorose, necrose, bladverkleuring en een geïnhibeerde wortelgroei. Deze zijn het gevolg van de effecten van Cu op verschillende enzymen, het fotosynthese-apparaat evenals zijn effect op de mitochondriale elektronentransportketen. Op cellulair niveau draagt eveneens de oxidatieve stress die ontstaat bij Cu-intoxicatie bij aan de geobserveerde symptomen [13].

Wanneer landbouwgronden verontreinigd zijn met koper, zullen dieren concentraties koper binnenkrijgen die schadelijk zijn voor hun gezondheid. Vooral schapen zijn gevoelig voor kopervergiftiging. Bij hen worden de effecten van koper reeds zichtbaar bij zeer lage concentraties [14].

Vaak komen mensen via hun werk in aanraking met koper. In de werkomgeving kan de besmetting met koper leiden tot een griepachtige aandoening, die bekend staat als metaalkoorts. Deze gesteldheid verdwijnt na twee dagen en is het resultaat van een allergische reactie.

Herhaalde blootstelling aan koper kan irritatie veroorzaken aan de neus, mond en ogen waarbij symptomen zoals hoofdpijn, buikpijn, duizeligheid, overgeven en diarree gepaard kunnen gaan. Het is nog niet duidelijk of koper kankerverwekkend is. Industriële blootstelling aan koperdampen of aerosolen kan resulteren in metaaldampkoorts met atrofische veranderingen in het neusslijmvlies. Chronische kopervergiftiging resulteert in “Wilson’s Disease”, met als symptomen levercirrhose, hersenbeschadiging, geboortefwijkingen en koperneerslag in het hoornvlies [4].

1.2 Wat zijn reactieve zuurstofvormen?

ROS staat voor “reactive oxygen species”, en zijn een verzameling van reactieve zuurstofvormen die zowel vrije radicalen als niet-radicalen omvatten. De radicalen worden gekenmerkt door de aanwezigheid van een ongepaard elektron op hun buitenste elektronenschil. De productie van ROS is een onvermijdbaar gevolg van aërobe respiratie. Wanneer de terminale oxidasen (cytochroom c en het alternatieve oxidase) reageren met zuurstof (O_2), worden er 4 elektronen getransfereerd wat resulteert in de vorming van water (H_2O). Maar een klein percentage van de elektronen die doorheen de elektronentransportketen

migreren, kunnen overgedragen worden op O_2 . In plaats van een transfer van 4 elektronen wordt er dan slechts 1 elektron getransfereerd en dat resulteert in de vorming van het superoxide anion (O_2^-). Het percentage van de O_2 -consumptie dat effectief leidt tot de vorming van O_2^- in plantenweefsels wordt geschat op 1 à 2% [15, 16]. Het gevormde O_2^- kan niet doorheen membranen diffunderen en heeft een zeer korte halfwaardetijd. Het wordt onmiddellijk omgezet naar H_2O_2 door SOD isoenzymen. H_2O_2 heeft een relatief langere levensduur en bezit wel de capaciteit om door een membraan te diffunderen. In normale omstandigheden wordt het gevormde H_2O_2 gereduceerd tot H_2O en O_2 door het enzym catalase (CAT) of peroxidase (POD). Maar in de nabijheid van transitie-metalen, zoals Cu en ijzer (Fe), kan het omgezet worden naar het $\bullet OH$. Dit is de meest reactieve vorm van ROS. Het heeft een heel korte halfwaardetijd en kan niet enzymatisch verwijderd worden, hierdoor gaat het dus zeer snel reageren met macromoleculen in zijn directe omgeving. ROS zijn in staat op verschillende niveaus schade aan te richten. Zij kunnen zowel eiwitten, lipiden als het DNA aantasten [16].

1.3 “Oxidatieve stress” en antioxidatieve verdediging

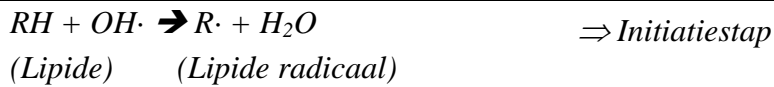
Onder normale fysiologische omstandigheden bestaat er een evenwicht tussen pro- en antioxidanten. Tijdens periodes van stress kan dit evenwicht echter verstoord worden en kan dit aanleiding geven tot “oxidatieve stress”. De verstoring van het evenwicht onder stresscondities kan het resultaat zijn van een overdreven ROS productie of een belemmerde antioxidatieve verdediging [17].

1.3.1 Lipidenperoxidatie

Lipidenperoxidatie is de oxidatieve degradatie van lipiden. Het is een proces waarbij vrije radicalen worden gereduceerd gepaard gaand met de oxidatie van de lipiden waaruit de lipidendubbellaag van het celmembraan is opgebouwd. Dit resulteert op zich dan in celschade. Het proces van lipidenperoxidatie wordt gekenmerkt door een kettingreactie waarbij meestal de poly-onverzadigde vetzuren een rol spelen. Deze vetzuren bevatten immers ethyleen C-groepen tussen hun dubbele bindingen en het zijn net deze ethyleen groepen die een zeer reactief waterstof atoom bevatten. Lipidenperoxidatie wordt gekenmerkt door drie belangrijke stappen: initiatie, propagatie en terminatie.

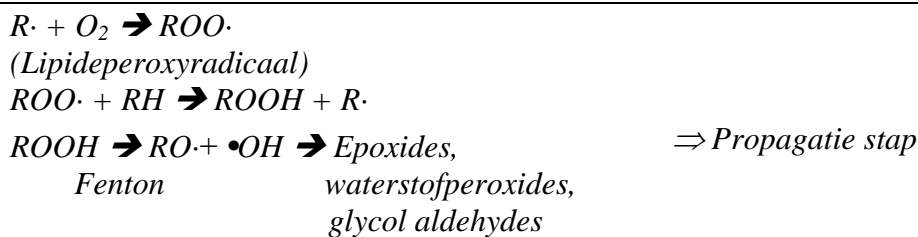
Initiatie

Tijdens de initiatiestap wordt er een vetzuurradicaal geproduceerd. Hierbij is in levende cellen een belangrijke rol voor ROS weggelegd. De meeste reactieve vorm van zuurstof, namelijk het $\bullet\text{OH}$, kan een waterstofatoom onttrekken van een meervoudig onverzadigd vetzuur om zo H_2O en een vetzuurradicaal te vormen.



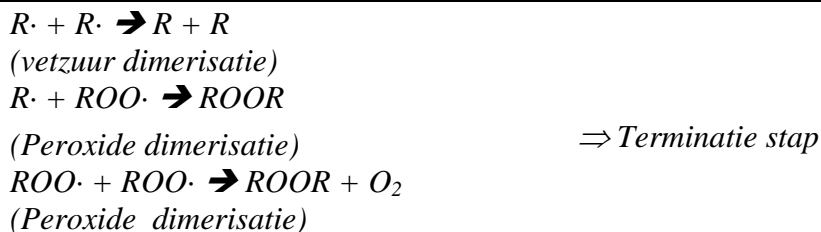
Propagatie

In deze stap gaat het gevormde vetzuurradicaal, door zijn zeer onstabiel karakter, snel reageren met zuurstof wat leidt tot de vorming van een lipideperoxyradicaal. Dit, eveneens onstabiel molecule, gaat reageren met andere vrije vetzuren waardoor andere vetzuurradicalen ontstaan en lipidehydroperoxiden (LOOH) of, wanneer het met zichzelf reageert, een cyclisch peroxide geproduceerd wordt. Deze cyclus herhaalt zich omdat het nieuwe vetzuurradicaal op dezelfde manier gaat reageren.



Terminatie

Een radicalaire reactie leidt altijd tot de productie van een nieuw radicaal. Daarom wordt het ook een “kettingreactie mechanisme” genoemd. Deze kettingreactie kan enkel gestopt worden wanneer 2 radicalen gaan interageren en er een niet-radicaal molecule gevormd wordt.



Lipidenperoxidatie kan leiden tot breuken in of verkorting van vetzuurketens wat resulteert in verhoogde membraanrigiditeit en –permeabiliteit [15, 16].

1.3.2 Schade aan proteïnen

Proteïnen kunnen vlot aangetast worden door chemische interacties met ROS. Vooral de thiolgroepen van proteïnen zijn gevoelig voor oxidaties. Bepaalde aminozuren zoals cysteïne, proline en arginine kunnen gemodificeerd worden. Cysteïne kan geoxideerd worden tot cystine. Proline en arginine worden omgezet naar glutamyl semialdehyde. Zulke veranderingen kunnen de functie van een eiwit beïnvloeden. In sommige gevallen wordt een beschadigd eiwit in situ herstelt maar het komt ook voor dat het hele eiwit wordt gedegradeerd en verwijderd [15].

1.3.3 Schade aan het DNA

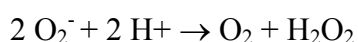
Alle ROS, maar vooral •OH, kunnen ook lesies in het DNA induceren die aanleiding kunnen geven tot deleties, mutaties, adducten en andere lethale genetische effecten. Karakterisatie van deze beschadigingen heeft erop gewezen dat zowel het suiker gedeelte als de basen van het DNA gevoelig zijn voor oxidatie. Oxidatie kan vervolgens leiden tot degradatie van de base, breuken in de ketens en cross-linking met proteïnen [18].

1.3.4 Antioxidatieve verdediging

Ter verdediging tegen de schadelijke effecten van ROS beschikken alle aërobe organismen over een complex antioxidantief verdedigingssysteem. Dit systeem bestaat zowel uit enzymatische componenten als metabolieten, die onderandere instaan voor het neutraliseren van vrije radicalen. Tot de enzymatische component van de antioxidantieve verdediging behoren enzymen zoals SOD, CAT en POD. Ascorbaat, glutathion en het membraangebonden α -tocoferol daarentegen zijn voorbeelden van antioxidantieve metabolieten [17, 19].

SOD

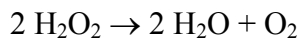
Het SOD is een enzyme dat de omzetting van het O_2^- naar O_2 en H_2O_2 kataliseert volgens volgende reactie:



Van het SOD zijn drie isozymen gekend en deze verschillen in hun compartimentalisatie. Het mangaan SOD (MnSOD) wordt vooral aangetroffen in de mitochondriën en in de peroxisomen. Het koper/zink SOD (Cu/ZnSOD) daarentegen bevindt zich vooral in het cytosol, terwijl het ijzer SOD (FeSOD) meestal in de chloroplast voorkomt.

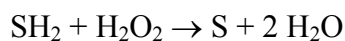
CAT en POD

Zowel CAT als POD staan in voor de verwijdering van H₂O₂. CAT verwijdt H₂O₂ volgens volgende reactie:



CAT wordt vooral teruggevonden in de peroxisomen en in de mitochondriën van aërobe cellen.

POD is een enzym dat H₂O₂ verwijdt via de oxidatie van andere organische substraten. Dit gebeurt aan de hand van deze reactie:

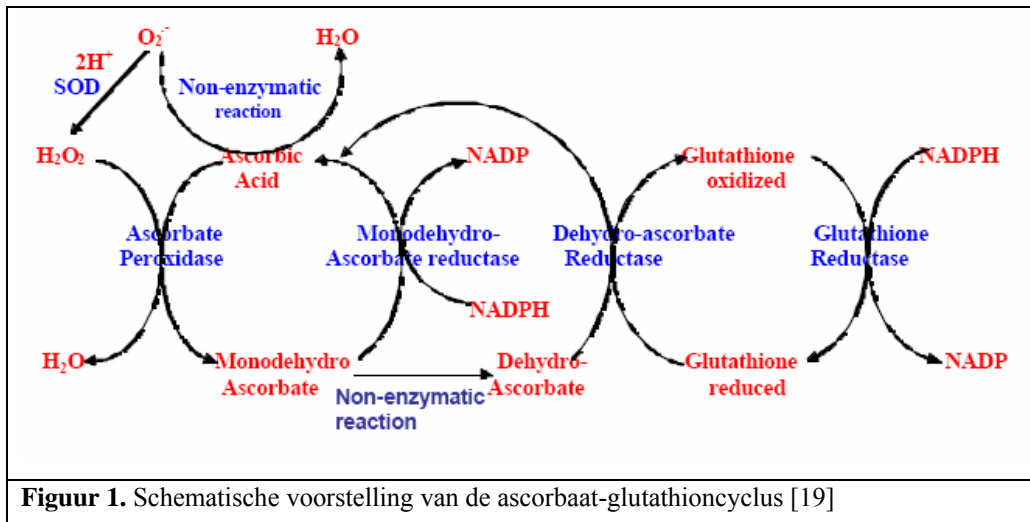


POD's kunnen in verschillende celcompartimenten voorkomen, velen zijn membraangebonden enzymen maar ascorbaatperoxidase (APOD) bijvoorbeeld bevindt zich vooral in de chloroplast [17, 19].

Ascorbaat- glutathioncyclus

Ascorbaat (AsA) bevindt zich in hoge concentraties in de chloroplast, het cytosol, de vacuole, de mitochondriën en in de apoplastische ruimte van bladcellen. Het is één van de belangrijkste antioxidanten van de plant en vervult een fundamentele rol in het verwijderen van H₂O₂. In de chloroplast komen SOD en APOD enzymen zowel in oplosbare vorm als aan thylakoidgebonden vorm voor. Hierdoor kan O₂⁻ dat aan het membraanoppervlak gegenereerd wordt dadelijk gevangen en vervolgens omgezet worden naar H₂O₂. Het gevormde H₂O₂ kan dan onmiddellijk geneutraliseerd worden door het membraangebonden APOD. AsA fungeert eveneens als cofactor voor een groot aantal enzymen [19].

Glutathion (GSH) is een enzym dat werkt als een disulfide reductans en zo in staat is de thiol groepen van enzymen te beschermen, ascorbaat te regenereren en interacties kan aangaan met singlet zuurstof en hydroxyl radicalen. Het kan eveneens herbiciden detoxificeren door middel van conjugatie. Deze detoxificatie gebeurt ofwel spontaan, ofwel door de activiteit van één van de glutathion-S-transferases. Glutathion kan ook de genexpressie reguleren als respons op omgevingsstress en aanvallen van pathogenen [19].



De reductie van H_2O_2 naar water door AsA vindt plaats in twee opeenvolgende stappen. Eerst wordt H_2O_2 omgezet naar H_2O door APOD en hierbij wordt monodehydroascorbaat (MDHA) gevormd. Wanneer het gevormde MDHA niet onmiddellijk gereduceerd wordt, vindt een niet-enzymatische omzetting naar dehydroascorbaat (DHA) plaats. Twee enzymen staan in voor de regeneratie van het AsA. Het monodehydroascorbaatreductase (MDHAR) dat gebruik maakt van NADPH als reductans en het dehydroascorbaatreductase (DHAR) dat gekoppeld is aan GSH. De reductie van AsA door het DHAR gaat gepaard met de oxidatie van GSH, waardoor glutathiondisulfide (GSSG) gevormd wordt. Het GSSG wordt vervolgens terug gereduceerd door glutathionreductase (GR), dat hiervoor gebruik maakt van NADPH. Deze keten van opeenvolgende reacties wordt de ascorbaat-glutathion cyclus genoemd [19].

1.4 Redoxsignalling

ROS zijn duidelijk betrokken in het celmetabolisme en een aantal celfysiologische processen en responsen zijn reeds grondig onderzocht. Deze beschrijven niet enkel een rol voor ROS in geprogrammeerde celdood of “apoptosis” maar ook effecten zoals de inductie van verdedigingsmechanismen en mobilisatie van ionentransportsystemen. Hierdoor worden ROS steeds vaker beschreven als moleculen die een belangrijke rol spelen in “redoxsignalling” of oxidatieve signaaltransductie. H_2O_2 vervult, door zijn relatief lange levensduur en diffusiecapaciteit, hierin een belangrijke rol. Door zijn specifieke karakteristieken kan het H_2O_2 fungeren als een “second messenger” in biologische systemen. Het is reeds aangetoond dat H_2O_2 , wanneer het in lage concentraties voorkomt, een regulerende functie kan vervullen. Het kan de productie van bepaalde plantenhormonen evenals de genexpressie van

antioxidatieve genen beïnvloeden. Ook kan het interacties aangaan met moleculen betrokken bij de signaaltransductieketen om zo de groei en ontwikkeling van de plant te beïnvloeden. Het kan dus gesteld worden dat ROS niet alleen leiden tot de schadelijke effecten van oxidatieve stress maar eveneens een belangrijke rol kunnen vervullen in de mechanismen die leiden tot adaptatie aan bepaalde biotische of abiotische stresscondities [16, 20].

1.5 Nicotinamide Adenine Dinucleotide Fosfaat Oxidase (NADPH oxidase)

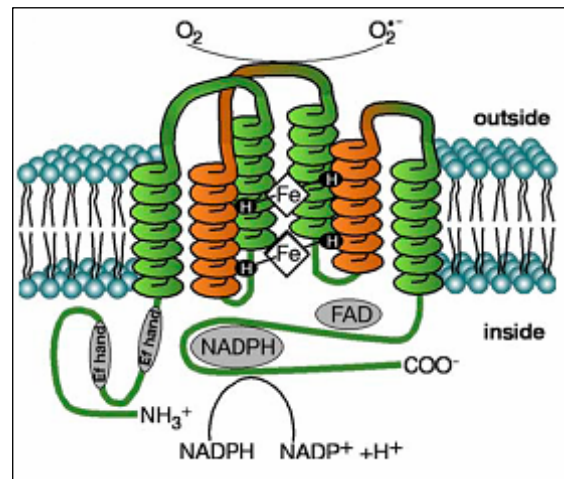
Het NADPH oxidase complex is een membranair enzymcomplex. Het is in staat O_2^- te produceren met behulp van de transfer van elektronen, afkomstig van NADPH binnen in de cel, doorheen de plasmamembraan en deze over te dragen naar moleculair zuurstof. De activiteit van NADPH oxidase wordt verhoogd onder verschillende stresscondities zoals tijdens de “respiratory burst”. De “respiratory burst” is een respons op lichaamsvreemde indringers, zoals bacteriën of parasieten, ter verdediging van het gastheerorganisme. In deze respons wordt er gebruik gemaakt van ROS om deze mogelijk schadelijke indringers te vernietigen en te verwijderen [21, 22].

1.5.1 NADPH oxidase in dieren

Het dierlijk NADPH oxidase enzymcomplex bestaat uit zes subunits. Deze zijn respectievelijk een Rho guanosine trifosfatase (GTPase), meestal RAC1 of RAC2 (waarbij RAC staat voor Rho-gerelateerd C3 botulinum toxine substraat), *gp91phox*, *p22phox*, *p47phox* en *p67phox* (waarbij *phox* staat voor fagocytisch oxidase). In zoogdieren is het enzymcomplex in normale situaties latent aanwezig in de neutrofielen. Maar zowel onder abiotische (zoals langdurige voedsel- of waterdeprivatie) als biotische stress condities (zoals tijdens de “respiratory burst”) kan het geactiveerd worden en gaat het zich assembleren in de membraan om vervolgens zijn functie uit te voeren [21].

1.5.2 NADPH oxidase planthomologen

De plantaardige homologen van het dierlijk NADPH oxidase worden respiratory burst oxidase homologen (RBOH's) genoemd. Zij staan eveneens in voor de productie van ROS tijdens verschillende stresscondities. Op structureel niveau vertonen de RBOH's echter wel een aantal verschillen (figuur 2). In tegenstelling tot het dierlijk NADPH oxidase is de plantaardige homolog een membraangebonden enzym. Het bevat cytosolaire FAD- en NADPH- bindende domeinen en bestaat uit 6 transmembranaire helices. De derde en de vijfde helix binden twee heemgroepen, die nodig zijn voor de transfer van elektronen doorheen het membraan naar extracellulair O_2 . De RBOH's worden eveneens gekenmerkt door de aanwezigheid van elongatiefactors (EF hands) aan hun N-terminale uiteinden. Deze EF hands bevatten een Ca-bindend motief. Dit kan wijzen op een mogelijke regulatorische rol van Ca bij de functie van deze RBOH's [22, 23].



Figuur 2. Illustratieve voorstelling van de structuur van een NADPH oxidase planthomoloog of respiratory burst oxidase homolog (RBOH) [22]

1.5.3 NADPH oxidase planthomologen in *Arabidopsis thaliana*

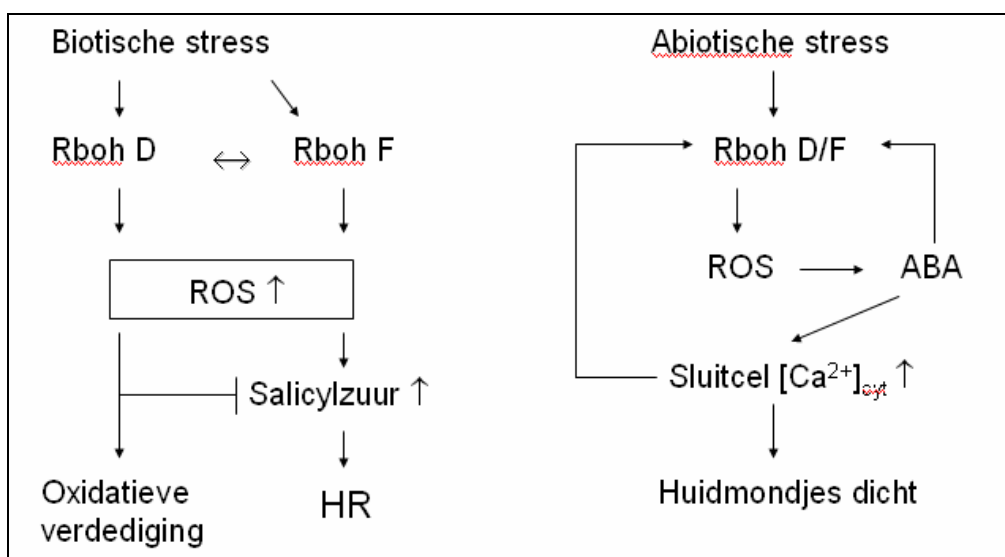
Tot op heden zijn er 10 *Arabidopsis thaliana* isovormen gekend van de RBOH's (*AtRBOHA-J*). Deze isovormen staan eveneens in voor de productie van ROS, en zijn betrokken in fysiologische en ontwikkelingsprocessen. Op transcriptieel niveau vertonen zij echter wel een weefsel-specifieke distributie, die opgedeeld kan worden in 3 hoofdklassen; expressie doorheen heel de plant (*AtRBOHD* en *F*), expressie in de wortels (*AtRBOHA, B, C, D, E, F, G* en *I*) en expressie op een pollenspecifieke manier (*AtRBOHH* en *J*). Het expressieniveau van deze isovormen wordt beïnvloed door zowel biotische als abiotische factoren. De meest voorkomende abiotische inductiefactoren zijn anoxie/hypoxie en stikstofdepletie, terwijl *AtRBOHC, D, E* en *F* eveneens kunnen geïnduceerd worden door allerlei biotische stressfactoren [22, 23].

AtRBOH C, D en F isovormen

Analyse van mutanten heeft uitgewezen dat de isovorm RBOHC een belangrijke rol vervult bij de vorming van wortelhaartjes, terwijl RBOHD de isovorm is die constant tot expressie komt doorheen heel de plant. Uit de analyse is eveneens gebleken dat RBOHF de isovorm is waarvan de expressie verhoogd als gevolg van biotische stressfactoren [24-26].

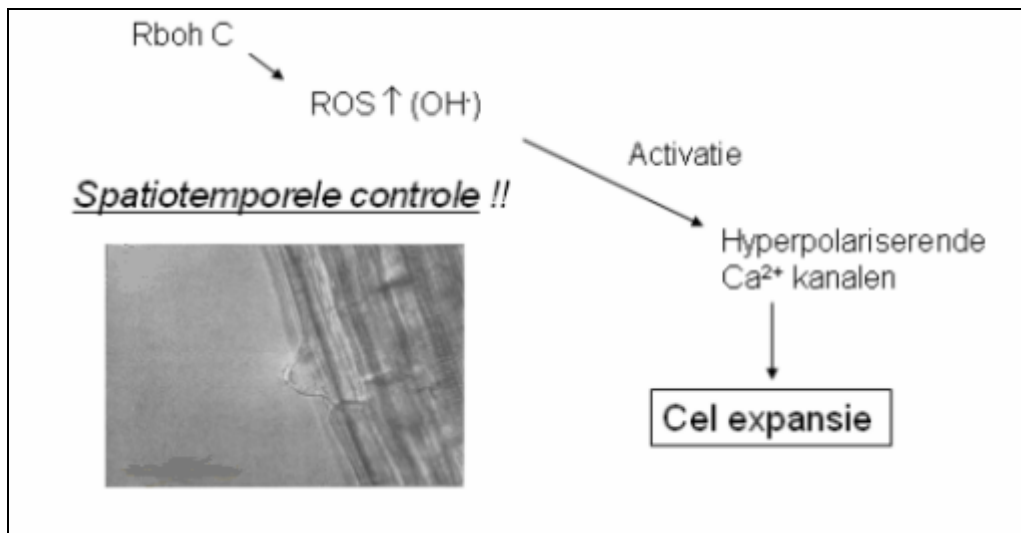
Onder abiotische stresscondities vervullen de isovormen RBOHD en RBOHF een vergelijkbare rol. De ROS afkomstig van RBOHD en/of RBOHF, geproduceerd onder abiotische stress, functioneren als intermediären in de ABA signalisatie tijdens sluiting van de stomata of huidmondjes. H_2O_2 induceert de activatie van Ca^{2+} kanalen waardoor de cytosolaire Ca^{2+} concentratie toeneemt in de sluitcellen. Zowel *RBOHD* als *RBOHF* komen tot expressie in de sluitcellen en worden transcriptioneel geactiveerd door ABA. Er kan eveneens een positieve “feedback loop” ontstaan waarbij de stijging in cytosolaire Ca^{2+} de expressie van beide isovormen verhoogt (figuur3) [24-26].

Onder biotische stresscondities zijn er echter wel verschillen tussen de functies van RBOHD en RBOHF. Bij biotische stress gaan de ROS, geproduceerd door RBOHF, de productie van salicylzuur verhogen om zo een hypersensitieve respons (HR) op gang te brengen tegen de biotische stressfactor. Daarentegen staan de ROS, geproduceerd door RBOHD, in voor de oxidatieve verdediging tegen de stressfactor door middel van ‘respiratory burst’. De ROS afkomstig van RBOHD inhiberen eveneens de productie van salicylzuur om zo een allergische reactie te onderdrukken (figuur 3) [24-26].



Figuur 3. Schematische voorstelling van de functies van de isovormen RBOHD en RBOHF onder biotische en abiotische stresscondities [24-26].

Van de *RBOHC* isovorm is geweten dat deze vooral in de wortels tot expressie komt en dat het een belangrijke rol speelt bij de vorming van wortelhaartjes. Het reguleert namelijk de celexpansie tijdens wortelhaarvorming. ROS afkomstig van *RBOHC* zijn in staat de hyperpolariserende Ca^{2+} kanalen te activeren die verantwoordelijk zijn voor de gelokaliseerde celexpansie gezien bij de vorming van wortelhaartjes. Het zeer reactieve $\bullet\text{OH}$ speelt hierin de belangrijkste rol (figuur 4) [24-26].



Figuur 4. Schematische voorstelling van de rol van isovorm *RBOHC* tijdens de vorming van wortelhaartjes. Linksonder: microscopisch beeld van gelokaliseerde celexpansie tijdens wortelhaarvorming [24-26].

1.6 Doel van het onderzoek

In deze studie wordt de mogelijke rol van NADPH oxidasen als regulator in het veroorzaken van oxidatieve stress na Cd-blootstelling in *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia) onderzocht. Hiervoor wordt er zowel op het niveau van plantmorfologie als op het cellulaire niveau gekeken om zo eveneens de relatie tussen beide niveaus te kunnen analyseren. Op het morfologische niveau wordt er gekeken naar het effect van Cd-blootstelling op de primaire wortelgroei van het wild type en een aantal *rboh* mutanten. Op het cellulaire niveau wordt er gekeken naar de effecten van Cd-blootstelling op de genexpressieprofielen van een aantal pro- en antioxidatieve enzymen in het wild type en in *rboh* mutanten. Aangezien een verandering op het niveau van genexpressie niet altijd een verandering op het eiwitniveau impliceert, worden eveneens de enzymactiviteiten van een aantal oxidatieve stress gerelateerde enzymen

geanalyseerd. Vervolgens wordt er ook gekeken naar het gehalte aan lipidenperoxidatie in het wild type en in *rboh* mutanten om ook hierin mogelijke verschillen te analyseren.

2 Materiaal en methoden

2.1 Plantmateriaal en sterilisatie van zaden

Bij alle uitgevoerde experimenten werd er gebruik gemaakt van wild type *Arabidopsis thaliana*, ecotype Columbia (Col-0) en 3 NADPH oxidase mutanten, namelijk *rbohC*, *rbohD* en *rbohF* [24]. Deze zijn respectievelijk gemuteerd, door middel van een dSpm transposon insertie, in de genen coderend voor isovormen *RBOHC*, *RBOHD* en *RBOHF*.

Voor gebruik werden zaden gesteriliseerd volgens een zacht sterilisatieprotocol. Hierbij werden zaadjes overgebracht in een kegelvormig geplooid filterpapiertje (Whatman No. 542). Het kegelvormige filterpapiertje met de zaadjes werd dichtgeplooid en dichtgehouden met behulp van een plasticen paperclip en gedurende 1 min. overgebracht in een beker met 70% (v/v) ethanol. Hierna werd het ethanol vervangen door een Na-hypochloriet oplossing (70 ml gedestilleerd H₂O (dH₂O), 50 µl (10%) Triton X-100 en 30 ml Na-hypochloriet, uit een commerciële oplossing met 4% beschikbare chlorine) waarin de zaadjes gedurende 10 min. verbleven. Vervolgens werden de zaadjes gespoeld (4 à 5x) met kleine hoeveelheden steriel, gedestilleerd water waarna ze gedurende 4x 5 min. geweekt werden in grotere volumes steriel dH₂O om daarna overgebracht te worden naar een steriel petrischaaltje.

2.2 Hydrocultuur

Arabidopsis thaliana zaden werden gesteriliseerd (zie 2.1) en op vochtig filterpapier bewaard gedurende 2 dagen bij 4°C (stratificatie). Zaden werden gezaaid op gezuiverd Rijnzand (gespoeld met water, gedroogd bij 90°C en gezeefd met een 1 mm zeef) dat zich bevond in plastic buisjes die aan de onderzijde afgeschermd waren met een 400 µm nylon membraan. De plantjes groeiden op hydrocultuur bij een diurne/nocturne temperatuur van 22°C/18°C, 12 uren licht en 65% vochtigheid. Voor de kweek op hydrocultuur werd gebruik gemaakt van een aangepast Hoagland medium: macronutriënten (20x verdund), ijzer en micronutriënten (beide 10x verdund) [27]. Drie weken oude zaailingen werden gedurende 24h blootgesteld aan verhoogde metaalconcentraties, waarna zowel blad- als wortelstalen werden geoogst (+/- 100 mg per staal in 2 ml epjes) en onmiddellijk bevroren werden met vloeibare stikstof en bewaard bij -70°C. In het “huishoudgenen” experiment werd enkel gebruik gemaakt van het wild type. De planten werden blootgesteld aan CdSO₄ (2 of 10 µM) of CuSO₄ (0,5 of 2 µM), en vergeleken met een niet blootgestelde controlegroep. Bij de kweek met NADPH oxidase mutanten werd er gebruik gemaakt van genotypes Col-0 (wild type) en mutanten *rbohC*,

rbohD en *rbohF*, die blootgesteld werden aan 5 μM CdSO_4 en vergeleken met een niet blootgestelde controlegroep voor elk genotype.

2.3 Vertikale agarplaten

Voor de wortelgroei analyse werden *Arabidopsis thaliana* zaailingen (Col-0, *rbohC*, *D* en *F*) gegroeid in verticale agarplaten (vierkante petrischaal 12/12, Greiner Bio-one, Kremsmunster, Oostenrijk), op B5/50 medium (50x verdund Gamborg's B5 medium met 0.5% sucrose en 1% agar) [28]. Voorafgaand aan het zaaien werden de zaden gesteriliseerd (zie 2.1). Per plaat werden een 20-tal zaden op één horizontale lijn, +/- 1 cm van de bovenkant af, gezaaid op het groeimedium waarna de plaat afgesloten werd met parafilm waarin twee 2 cm lange openingen gemaakt werden voor luchtuitwisseling. Na een incubatietijd van 2 à 3 dagen op 4°C werden de platen overgebracht naar de groeikamer op 22°C, 12u licht/donker en een lichtintensiteit van 140 $\mu\text{Einstein}$. Na zeven dagen gegroeid te hebben werden plantjes met een vergelijkbare wortellengte (binnen een genotype) vervolgens overgezet op transferplaten met B5/50 + CdSO_4 (0, 5, 10, 15 en 30 μM). Het hele proces, zowel het gieten van de platen (40 ml groeimedium/plaat), het zaaien van de zaden als het overzetten van de plantjes op de transferplaten gebeurde steeds onder steriele omstandigheden.

2.4 Bevestigen van mutante genotypen met Polymerase Chain Reaction (PCR)

2.4.1 Extractie van genomisch DNA

Bladstalen (+/- 100 mg) van zowel het wild type als van de mutanten werden onder bevroren omstandigheden fijngemalen. Hiervoor werden, aan elk epje, 1 of 2 propere, stalen bolletjes met 2 mm diameter toegevoegd om dan gedurende 2x 30 s aan een amplitude van 80 geschud te worden met de Retsch Mixer Mill MM2000 (Retsch, Haan, Duitsland). Vervolgens werd het DNA, uit het fijngemalen bladweefsel, geïsoleerd met behulp van de 'DNeasy Plant Mini Kit' (QIAGEN, Venlo, Nederland) volgens het bijhorende protocol.

2.4.2 Concentratie- en zuiverheidsbepaling van DNA

De concentratie en de zuiverheid van het DNA, in de bekomen extracten, werden bepaald met de Nanodrop® spectrofotometer ND-1000 (Isogen Life Science, IJsselstein, Nederland).

2.4.3 DNA amplificatie met behulp van PCR

Genomisch DNA fragmenten werden geamplificeerd met PCR gebruik makend van ‘TaKaRa Taq™’ (TAKARA BIO INC., Otsu, Shiga, Japan) DNA polymerase (0.05 units per 25 µl reactie), bijgevoegde PCR buffer, 200 µM dNTPs, 200 nM van elke primer en 10 – 50 ng van het genomisch DNA staal. Bij de gebruikte primers hoorden transposon specifieke primers dSpm11 (GGTGCAGCAAAACCCACACTTTTACTTC) en dSpm1 (CTTATTTTCAGTAAGAGTGTGGGGTTTTGG) en specifieke primers voor elk *RBOH* gen: MAT211 (GTCGCCAAAGGAGGCGCCGA), MAT212F (CGAAGAAGATCTGGAGACGAGA), MAT37C (ATCTAAAGCTAGATGCCTTAGC), MAT62C (TAGCTTCTCCATGTGACCGCG), MAR92b (GGATACTGATCATAGGCGTGGCTCCA) en MAT171F (CTTCCGATATCCTTCAACCAACTC). Aanwezigheid van de dSpm transposon insertie (mutante allelen) werd opgespoord door de aanmaak van PCR producten gebruik makend van een transposonspecifieke primer in combinatie met een genspecifieke primer, namelijk voor *rbohC*: dSpm11/MAT37C, voor *rbohD*: dSpm1/MAT211 en voor *rbohF*: dSpm1/MAT212F. De aanwezigheid van wild type allelen werd opgespoord met twee genspecifieke primers, namelijk voor *RBOHC*: MAT62C/MAT37C, voor *RBOHD*: MAT211/MAR92B en voor *RBOHF*: MAT171F/MAT212F. met de Het PCR programma werd gelopen op een Mastercycler® gradient (Eppendorf, Hamburg, Duitsland):

- 5 min op 94°C
 - 30 s op 94°C
 - 30 s op 55°C
 - 45 s op 72°C
 - 5 min op 72°C
- } ⇒ 35 cycli

2.4.4 Visualisatie van PCR fragmenten met gelelektroforese

Hierbij werd gebruik gemaakt van 1.2% agarose 10000x geconcentreerd gelRed in (1x) TAE-buffer. Als “loading buffer” werd gebruik gemaakt van bromofenolblauw (BFB). Er werd gekozen voor een 100 bp DNA ladder (New England Biolabs). De gel werd gelopen bij 100 V gedurende +/- 30 min. Vervolgens werden de DNA fragmenten gevisualiseerd met behulp van een BioRad “gel documentation system” (BIORAD, Hercules, Californië)

2.5 Bepaling van genexpressie

2.5.1 RNA extractie

Blad- en wortelstalen van +/- 100 mg werden, onder bevroren conditie, fijngemalen zoals reeds beschreven onder 2.4.1. Vervolgens werd het RNA uit de stalen geëxtraheerd behulp van de 'RNeasy plant mini kit' (Qiagen, Venlo, Nederland), volgens het bijgeleverde protocol en een elutie van RNA met 2 x 30 µl RNase vrij water. De verkregen extracties werden meteen bevroren en bewaard bij een temperatuur van -70°C na concentratiebepaling (zie 2.5.2).

2.5.2 Concentratiebepaling RNA

De concentratie en de zuiverheid van het RNA werden bepaald met de Nanodrop® spectrofotometer ND-1000 (Isogen Life Science, IJsselstein, Nederland). Dit apparaat meet de absorptie van het staal bij verschillende golflengtes (230, 260 en 280 nm). De absorptie van 1 unit bij een golflengte van 260 nm komt overeen met 40 ng RNA/µL. De zuiverheid van het staal werd bepaald aan de hand van zuiverheid-ratio's (A260/A280 en A260/A230). De concentratie van de RNA stalen werd dan aangepast naar 250 ng/µl waarna vervolgens opnieuw de reële concentratie bepaald werd.

2.5.3 Reverse transcriptie

Het geïsoleerde RNA werd omgezet naar copy DNA (cDNA) door een reverse transcriptie gebruik makend van random hexamer primers. Hiervoor werd gebruik gemaakt van RT-PCR uitgevoerd met de 'QuantiTect Reverse Transcription Kit' (Qiagen, Venlo, Nederland), volgens het bijgeleverde protocol, en de Mastercycler® gradient (Eppendorf, Hamburg, Duitsland). Deze techniek bevat een eerste stap om gDNA doeltreffend te verwijderen. De reactie werd uitgevoerd met 1 µg RNA voor elk staal. Het bekomen cDNA werd 10x verdund door het toevoegen van 180 µl 10x verdunde TE-buffer (1mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA) en bewaard op -20°C.

2.5.4 Kwantitatieve analyse van genexpressie met Real Time PCR

De real time PCR werd uitgevoerd met 'QuantiTect Power SYBR Green' (Qiagen, Venlo, Nederland) en de ABIprism® 7000 (Applied Biosystems, Lennik, België) volgens bijgevoegd protocol, met 2,5 µl cDNA (of 2,5 µl dH₂O voor de negatieve controle) en 300 nM van elke

primer. Optimale primersequenties werden ontwikkeld met Primer Express v2.0 (Applied Biosystems). De efficiëntie van de primers werd getest op een 4-voudige verdunningsreeks van één van de stalen in 10x verdunde TE-buffer pH 8.0. Voor het “huishoudgenen” experiment werden volgende primersequenties ontwikkeld, in 5'-3' orientatie:

<i>ACT2</i> -forward	CTTGCACCAAGCAGCATGAA
<i>ACT2</i> -reverse	CCGATCCAGACACTGTACTTCCTT
<i>AT5G55840</i> -forward	AAGACAGTGAAGGTGCAACCTTACT
<i>AT5G55840</i> -reverse	AGTTTTTGAGTTGTATTTGTCAGAGAAAG
<i>AT5G46630</i> -forward	TCGATTGCTTGGTTTGGGAAGAT
<i>AT5G46630</i> -reverse	GCACTTAGCGTGGACTCTGTTTGATC
<i>AT5G15710</i> -forward	TTTCGGCTGAGAGGTTTCGAGT
<i>AT5G15710</i> -reverse	GATTCCAAGACGTAAAGCAGATCAA
<i>AT5G08290</i> -forward	TTACTGTTTCGGTTGTTCTCCATTT
<i>AT5G08290</i> -reverse	CACTGAATCATGTTTCGAAGCAAGT
<i>AT4G34270</i> -forward	GTGAAAACCTGTTGGAGAGAAGCAA
<i>AT4G34270</i> -reverse	TCAACTGGATAACCCTTTCGCA
<i>AT4G33380</i> -forward	TTGAAAATTGGAGTACCGTACCAA
<i>AT4G33380</i> -reverse	TCCCTCGTATAACATCTGGCCA
<i>AT4G26410</i> -forward	GAGCTGAAGTGGCTTCCATGAC
<i>AT4G26410</i> -reverse	GGTCCGACATACCCATGATCC
<i>AT2G32170</i> -forward	ATCGAGCTAAGTTTGGAGGATGTAA
<i>AT2G32170</i> -reverse	TCTCGATCACAAACCCAAAATG
<i>AT2G28390</i> -forward	AACTCTATGCAGCATTGATCCACT
<i>AT2G28390</i> -reverse	TGATTGCATATCTTTATCGCCATC
<i>AT5G25760</i> -forward	CTGCGACTCAGGGAATCTTTCTAA
<i>AT5G25760</i> -reverse	TTGTGCCATTGAATTGAACCC.

De relatieve genexpressie werd, voor elk gen, bepaald met de standaardcurve methode of de delta Ct methode. De relatieve stabiliteit van de kandidaat huishoudgenen werd bepaald met behulp van de geNorm© software [29].

Voor het experiment waarin de genexpressie van een aantal pro- en antioxidatieve enzymen geanalyseerd werd, werd de genexpressie van *LOX1* en *LOX2* (lipoxygenase 1 en 2), *CAT1* (catalase 1), *GRI* (glutathion reductase), *APX1* (ascorbaatperoxidase 1), *RBOHA*, *RBOHC*, *RBOHD*, *RBOHE* en *RBOHF*, *GPX2* (guajacolperoxidase 2), *MSD1* (mangaanSOD), *FSD1* (ijzerSOD) en *CSD1* en *CSD2* (Cu/ZnSOD 1 en 2) gemeten. Als referentiegenen werd gebruik gemaakt van de twee meest stabiele huishoudgenen uit het “huishoudgenen” experiment, namelijk *AT2G28390* en *AT5G15710*. De PCR reacties werden gelopen met

volgende primersets: *AT2G28390*-forward en *AT2G28390*-reverse, *AT5G15710*-forward en *AT5G15710*-reverse, en vervolgens:

APX1-forward TGCCACAAGGATAGGTCTGG
APX1-reverse CCTTCCTTCTCTCCGCTCAA
APX2-forward GAGATGTGTTTGGTCGGATGG
APX2-reverse CTCGAATCCTGAACGCTCC
CAT1-forward AAGTGCTTCATCGGGAAGGA
CAT1-reverse CTTCAACAAAACGCTTCACGA
CSD1-forward TCCATGCAGACCCTGATGAC
CSD1-reverse CCTGGAGACCAATGATGCC
CSD2-forward GAGCCTTTGTGGTTCACGAG
CSD2-reverse CACACCACATGCCAATCTCC.
FSD1-forward CTCCAATGCTGTGAATCCC
FSD1-reverse TGGTCTTCGGTTCTGGAAGTC
GPX2-forward ACAAGGAGCAAGGGTTGGAG
GPX2-reverse CCTGGTGCAGACAGTTTGTGG
GRI-forward TCTGGACGCCAGGAAAAGAC
GRI-reverse ATGATCTCAGCTGCATCAGGA
LOX1-forward TTGGCTAAGGCTTTTGTTCGG
LOX1-reverse GTGGCAATCACAAACGGTTC
LOX2-forward TTTGCTCGCCAGACACTTG
LOX2-reverse GGGATCACCATAAACGGCC
MSD1-forward ATGTTTGGGAGCACGCCTAC
MSD1-reverse AACCTCGCTTGCATATTTCCA
RBOHA-forward CATTTTCGCTAGGCCAAACTG
RBOHA-reverse TTCACTAACCCAGCTGCTCCA
RBOHC-forward TCACCAGAGACTGGCACAATAAA
RBOHC-reverse GATGCTCGACCTGAATGCTC
RBOHD-forward TATGCATCGGAGAGGCTGCT
RBOHD-reverse TAGAGACAACACGTTCCCGGG
RBOHE-forward GTGATGCAAGATCAACCCTGA
RBOHE-reverse GCCTTGCAAAATGTGTTCTCA
RBOHF-forward GGTGTCATGAACGAAGTTGCA
RBOHF-reverse AATGAGAGCAGAACGAGCATCA

2.6 Analyse van de primaire wortelgroei

De lengte van de primaire wortel werd dagelijks (gedurende 5 dagen) en op de zevende dag gemarkeerd van zodra de plantjes waren overgezet op de behandelingen. Op dag zeven na

transfer werden de verticale agarplaten gescand (HP Scanjet 3970). De groei van de primaire wortel werd bepaald uit deze digitale beelden met behulp van de OPTIMAS™ software.

2.7 Bepaling van de activiteit van enzymen

Blad- en wortelstalen (+/- 200 mg) werden fijngemalen, met mortier en stamper, in 2 ml (0.1 M) Tris-HCL buffer (pH 7.8), een spatelpunt polyvinylpirolidine (PVP) en een spatelpunt zand. Vervolgens werd het fijngemalen staal afgefilterd en overgebracht in een centrifugeerbuisje, om gedurende 10 min., bij 4°C en 13500 rpm gecentrifugeerd te worden. De potentiële enzymactiviteiten, bij een overmaat aan substraat, werden spectrofotometrisch bepaald in verdund supernatans (2x verdund met Tris-HCL buffer, pH 7.8) bij 25°C. Het principe van de uitgevoerde enzymmetingen is gebaseerd op de wet van Lambert-Beer, welke stelt dat in het lineaire gebied de concentratieverandering over de tijd rechtevenredig is met de extinctieverandering over de tijd indien er rekening gehouden wordt met de extinctiecoëfficiënt (ϵ) en de weglengte van het licht doorheen het cuvet (d).

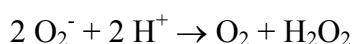
$$\Delta C/\Delta t = \Delta A/\Delta t * 1/(\epsilon*d)$$

De activiteiten van volgende enzymen werden bepaald: SOD, syringaldazineperoxidase (SPOD), GPOD, APOD en GR.

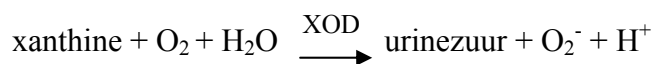
2.7.1 SOD

De activiteit van SOD werd bepaald bij een golflengte van 550 nm. Hiervoor werd gebruik gemaakt van 100 μ l extract in 590 μ l 50 mM kaliumfosfaatbuffer (pH 7.8), 100 μ l 1mM EDTA, 100 μ l 0.5 mM xanthine, 100 μ l 0.1 mM cytochroom c en 10 μ l (14.3 mU) xanthine oxidase (XOD).

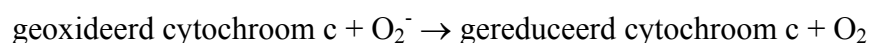
SOD staat in voor de dismutatie van O_2^- naar H_2O_2 volgens:



In het cuvet wordt O_2^- gevormd door de interacties van de xanthine met het XOD:



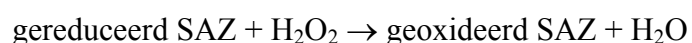
De analyse van SOD activiteit is gebaseerd op de inhibitie van de omzetting van O_2^- door het cytochroom c, als gevolg van de competitieve interactie tussen SOD en het cytochroom c. Hiervoor wordt eerst een meting uitgevoerd op een blanco staal. In deze blanco vindt enkel de omzetting van O_2^- plaats door het cytochroom c volgens:



Na toevoeging van het staal wordt er eveneens O_2^- omgezet door SOD waardoor de werking van het cytochroom c competitief geïnhibeerd wordt. Het is deze reactie, waarbij 1 unit overeenkomt met 50 % inhibitie van het cytochroom c ten opzichte van het blanco staal, waaruit de potentiële activiteit van het SOD berekend wordt [30].

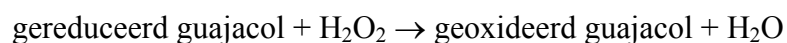
2.7.2 SPOD

De potentiële activiteit van het SPOD werd bepaald aan de hand van de vorming van geoxideerd syringaldazine (SAZ), gemeten bij een golflengte van 530 nm. Hiervoor werd 100 μl staal toegevoegd aan 780 μl 0.1 M Tris buffer (pH 7.5), 100 μl 10 mM H_2O_2 , en 20 μl SAZ (1,2 mg/ml). SPOD reduceert H_2O_2 tot H_2O en maakt hierbij gebruik van SAZ als substraat dat geoxideerd wordt in deze reactie [31].



2.7.3 GPOD

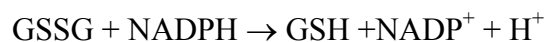
GPOP heeft dezelfde functie als SPOD maar maakt gebruik van guajacol, in plaats van SAZ, als substraat voor de omzetting van H_2O_2 [32].



De potentiële activiteit van GPOD wordt bepaald bij een golflengte van 436 nm (geoxideerd guajacol). Hiervoor werd 50 μl extract toegevoegd aan 750 μl 0.1 M kaliumfosfaat buffer (pH 7), 100 μl 8 mM H_2O_2 en 100 μl 18 mM guajacol.

2.7.4 GR

GR is een enzym dat geoxideerd glutathion (GSSG) reduceert tot glutathion (GSH) volgens [32]:



De potentiële activiteit van GR werd gemeten bij een golflengte van 340 nm (vorming van GSH). Hiervoor werd gebruik gemaakt van 150 μl extract in oplossing met 815 μl Tris buffer (pH 8), 17.5 μl GSSG (50 mg/ml) en 17.5 μl NADPH (5 mg/ml).

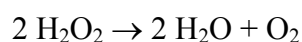
2.7.5 APOD

De potentiële activiteit van APOD werd gemeten bij een golflengte van 298 nm (geoxideerd Na-ascorbaat) en hiervoor werd 200 μl extract toegevoegd aan 665 μl hepes EDTA buffer (pH 7), 100 μl 30 mM Na-ascorbaat en 35 μl 20 mM H_2O_2 . APOD maakt gebruik van Na-ascorbaat voor de reductie van H_2O_2 naar H_2O en wordt hierbij zelf geoxideerd [33].



2.7.6 CAT

CAT is een enzym dat instaat voor de verwijdering van H_2O_2 met de vorming van H_2O [32].



De potentiële activiteit van dit enzym werd bepaald bij een golflengte van 240 nm. Hiervoor werd 100 μl extract toegevoegd aan 730 μl 0.1 mM kaliumfosfaat buffer (pH 7) en 170 μl 5 mM H_2O_2 .

2.8 Analyse van de graad van lipidenperoxidatie

De graad van lipidenperoxidatie werd zowel voor blad- als wortelstalen bepaald aan de hand van het aanwezige malondialdehyde (MDA)-gehalte, gemeten met de spectrofotometer (Shimadzu, UV/VIS 1601 PC) bij een golflengte van 532 nm. Hiervoor werden stalen

gehomogeniseerd in, afhankelijk van hun gewicht, 2 of 3 ml (0.1%) trichloorazijnzuur (TCA) met mortier en stamper. Na centrifugatie (10 min. aan 13500 rpm) werd per staal 500 μ l supernatans in duplo gepipetteerd in 2 ml (0.5%) 2-thiobarbituurzuur (TBA). Als blanco werd gebruik gemaakt van 500 μ l (0.1%) TCA in 2 ml (0.5%) TBA. Vervolgens werden de stalen gedurende 30 min. overgebracht naar een warmwaterbad (95°C), waarna ze dadelijk op ijs geplaatst werden of af te koelen. Eens afgekoeld werden de stalen nogmaals gecentrifugeerd (10 min. aan 13500 rpm) en werd de absorptie van elk staal ten opzichte van de blanco gemeten bij 532 en 600 nm volgens de methode van Dhindsa et al. [34]. De absorptie bij een golflengte van 600 nm komt overeen de met aspecifieke absorptie waarvoor in de berekeningen dient gecorrigeerd te worden.

2.9 Statistische analyse

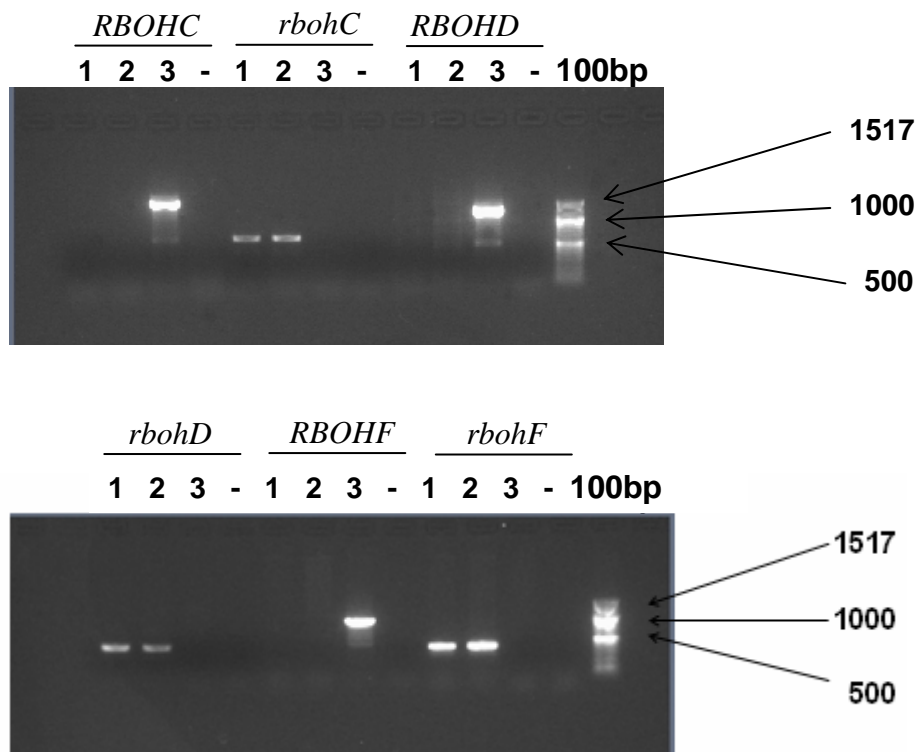
Statistische analyses werden uitgevoerd met GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego California USA). Normaliteit van de gegevens werd gecontroleerd met een “D’Agostino and Pearson omnibus normality test”, en een ln-transformatie werd toegepast om de niet normaal verdeelde gegevens te normaliseren. Een “two-way ANOVA” werd uitgevoerd gevolgd door “Bonferroni post-tests” voor het vergelijken van genotype effect binnen behandeling met Col-O en het vergelijken van behandelingseffect binnen een genotype.

3 Resultaten

In deze studie werd de mogelijke rol van NADPH oxidasen als regulator in het veroorzaken van oxidatieve stress na Cd-blootstelling, in *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia), onderzocht. Hiervoor werden NADPH oxidase mutanten *rbohC*, *rbohD* en *rbohF* bestudeerd op het niveau van plantmorfologie als op het cellulaire niveau. Op het morfologische niveau werd er gekeken naar het effect van Cd-blootstelling op de primaire. Op het cellulaire niveau werd er gekeken naar de effecten van Cd-blootstelling op de genexpressieprofielen van een aantal pro- en antioxidatieve enzymen. Aangezien een verandering op het niveau van genexpressie niet altijd een verandering op het eiwitniveau impliceert, werden eveneens de enzymactiviteiten van een aantal oxidatieve stress gerelateerde enzymen geanalyseerd. Vervolgens werd er ook gekeken naar het gehalte aan lipidenperoxidatie.

3.1 Bevestigen van mutante genotypen met PCR

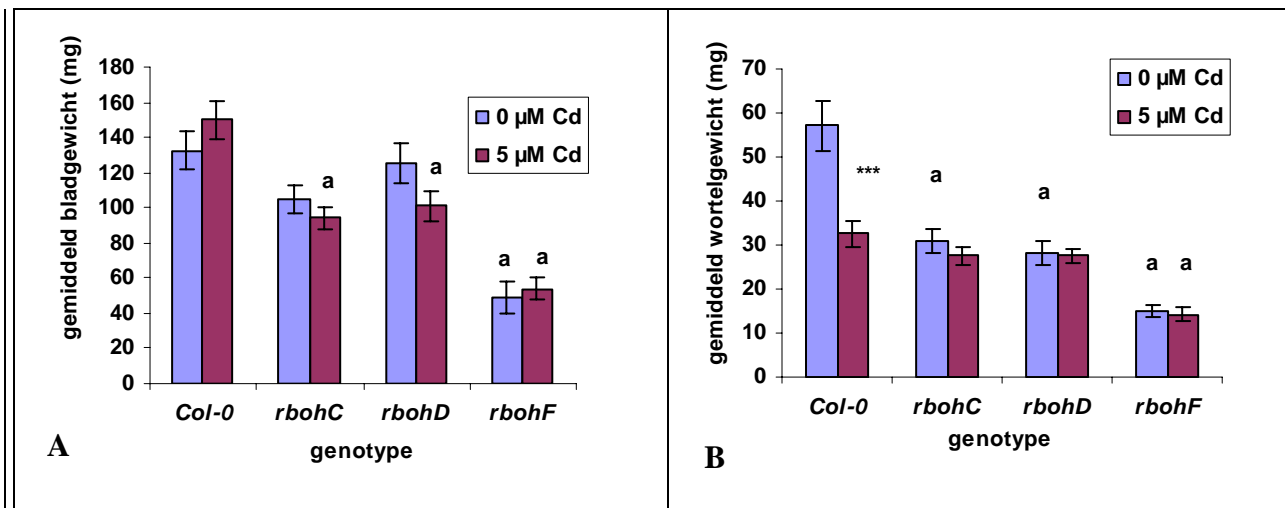
Genomisch DNA (gDNA) werd geëxtraheerd van enkele stalen van de kweek met NADPH oxidase mutanten en van enkele stalen van een niet-gerelateerde kweek met mutanten om vervolgens met PCR na te gaan of het wel degelijk over zuivere (homozygote) mutanten ging. Aanwezigheid van de dSpm transposon insertie (mutante allelen) werd opgespoord door de aanmaak van PCR producten gebruik makend van een transposon specifieke primer in combinatie met een genspecifieke primer. Het wild type allel werd gedetecteerd met twee genspecifieke primers. Voor homozygoot *rbohC*, *rbohD* en *rbohF* zou er per mutant één DNA fragment van respectievelijk, 600 bp, 360 bp en 350 bp aanwezig moeten zijn. In geval van heterozygotie zou zowel het wild type allel als het desbetreffende mutant allel aanwezig zijn. De geobserveerde DNA fragmenten (figuur 5) staven de aanwezigheid van de transposon insertie en afwezigheid van het wild type gen bij elk mutant genotype, en de afwezigheid van de transposon insertie en aanwezigheid van het wild type allel voor het wild type genotype. De aanwezigheid van één DNA fragment per genotype wijst op homozygotie voor het desbetreffende gen. Hieraan blijkt eveneens voldaan te zijn.



Figuur 5. PCR-amplificatie van wild type (*RBOHC*, *RBOHD* en *RBOHF*) en mutante allelen (*rbohC*, *rbohD* en *rbohF*) in genomisch DNA geïsoleerd uit de desbetreffende mutant (1 en 2) en uit wild type (3) ter bevestiging van homozygote mutante genotypes. “-” is negatieve controle.

3.2 Groeiparameters van het wild type en de *rbohC*, *rbohD* en *rbohF* mutanten na Cd-blootstelling

Wild type en mutante *Arabidopsis thaliana* zaailingen werden gedurende drie weken gekweekt op hydrocultuur waarna ze gedurende een periode van 24h blootgesteld werden aan 5 μM Cd. Het gemiddelde blad- en wortelgewicht werd berekend voor blootgestelde planten en controle planten (figuur 6). Het gewicht van de blaadjes blijkt niet significant verschillend tussen controleplanten en behandelde planten voor elk genotype. Uit de grafiek kan echter wel een genotype effect afgeleid worden daar het gemiddelde bladgewicht van het *rbohF* genotype beduidend lager (± 50 mg) ligt zowel in de behandelde als in de niet behandelde planten (figuur 6A). In de wortels treed er een duidelijke daling van het gemiddelde gewicht op, van ± 55 naar ± 35 mg, bij wild type planten na blootstelling aan 5 μM Cd. Deze daling wordt niet gezien bij de mutante genotypes. Er kan wel opgemerkt worden dat het gemiddelde gewicht voor niet behandelde planten voor elk mutant genotype reeds lager ligt dan dat van wild type planten (figuur 6B).

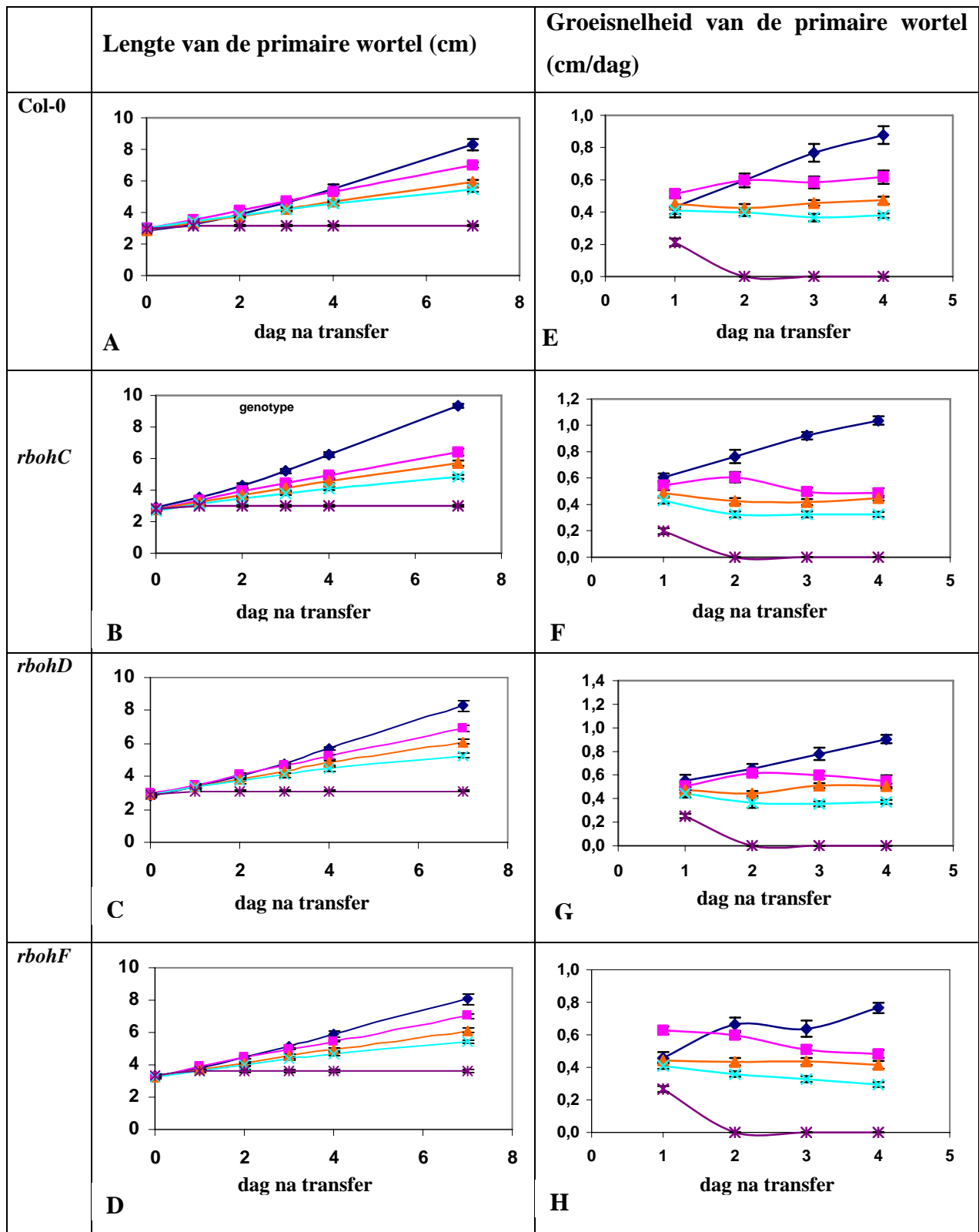


Figuur 6. Gemiddeld bladgewicht (A) en wortelgewicht (B) van *A. thaliana* zaailingen na 3 weken hydrocultuur en 24h blootstelling aan Cd. Waardes representeren het gemiddelde gewicht \pm S.E. voor de geoogste planten, zoals afgeleid uit het totaalgewicht van 5 tot 12 geoogste stalen met daarin 2 tot 7 planten.

3.3 Analyse van de primaire wortelgroei na blootstelling aan Cd

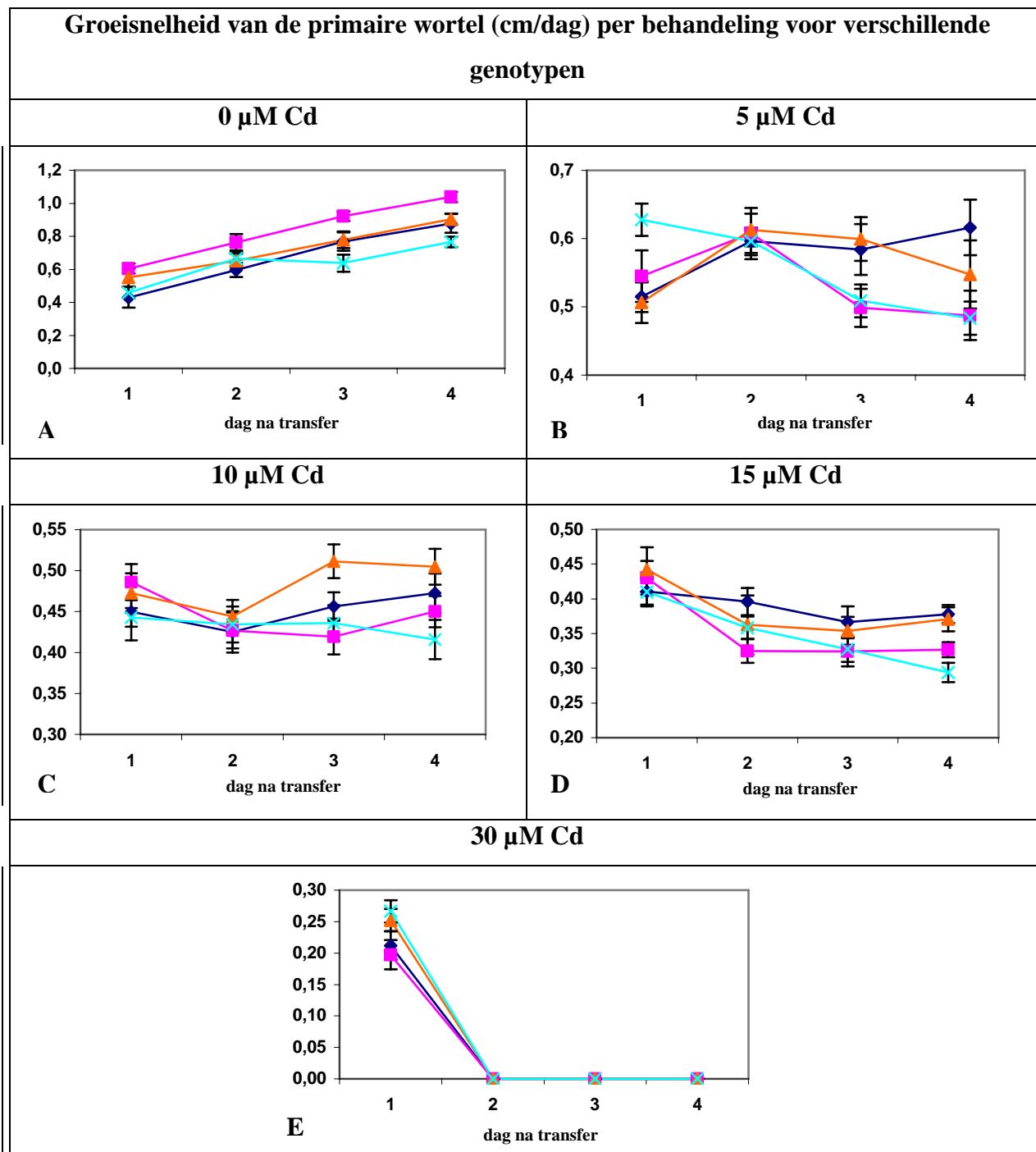
Om een eventueel verschillend effect van Cd-blootstelling op de wortel tussen de verschillende genotypen te onderzoeken werd een analyse van de primaire wortelgroei uitgevoerd op verticale agarplaten. De lengte van de primaire wortel van wild type en mutante planten werd dagelijks (gedurende 5 dagen en op de zevende dag) gemarkeerd van zodra de plantjes waren overgezet op de behandelingen (0 μM , 5 μM , 10 μM , 15 μM en 30 μM Cd). Hieruit konden groeicurves gemaakt worden.

De gemiddelde groeisnelheid van de primaire wortel van zowel wild type als mutante planten neemt af naarmate de blootstellingconcentratie aan Cd toeneemt (figuur 7 E-H). Bij blootstelling aan 0 μM is er een toename van de groeisnelheid terwijl deze bij blootstelling aan 5, 10 en 15 μM Cd constant blijft en lager ligt naarmate de blootstellingconcentratie hoger is. Bij een blootstelling aan 30 μM Cd stoppen de wortels na 24h volledig met groeien. Dit effect resulteert in kortere primaire wortels naarmate de Cd blootstelling hoger is (figuur 7 A-D).



Figuur 7. (A-D) Gemiddelde lengte (cm) en (E-H) gemiddelde groeisnelheid (cm/dag) van de primaire wortel van 1 week oude wild type en mutante *A. thaliana* zaailingen na blootstelling aan verschillende concentraties Cd (● 0 μM , ● 5 μM , ● 10 μM , ● 15 μM , ● 30 μM). Waardes representeren gemiddelde lengte (\pm S.E.) en gemiddelde groeisnelheid (\pm S.E.) voor elk genotype, afgeleid van de lengtes en groeisnelheden van 8 to 12 planten per genotype, per behandeling.

Om mogelijke genotype effecten te onderzoeken werd de groeisnelheid van verschillende genotypes binnen éénzelfde behandeling geanalyseerd en dit voor elke blootstellingconcentratie (figuur 8).



Figuur 8. Gemiddelde groeisnelheid van verschillende genotypes (● Col-0, ● rbohC, ● rbohD, ● rbohF) bij blootstelling aan 0 µM Cd (A), 5 µM Cd (B), 10 µM Cd (C), 15 µM Cd (D) en 30 µM Cd (E). Waarden representeren gemiddelde groeisnelheid (\pm S.E.) voor elk genotype, afgeleid van de lengtes en groeisnelheden van 8 tot 12 planten per genotype, per behandeling.

Algemeen kan gesteld worden dat de gemiddelde groeisnelheid van de primaire wortel voor elk onderzocht genotype een vergelijkbare respons vertoont. Als de genotypen binnen één behandeling vergeleken worden kan er opgemerkt worden dat het verloop van de groeisnelheid, na behandeling, van het *rbohD* genotype het meest overeenkomt met dat van het wild type. Terwijl de groeisnelheid van *rbohC* en *rbohF* wortels na 3d blootstelling aan 5µM Cd al sterk wordt geïnhibeerd, vindt deze inhibitie in *rbohD* wortels pas plaats na 4d blootstelling. Het vergelijkbare verloop tussen de groeisnelheden van Col-0 en *rbohD* wortels kan eveneens, maar in mindere mate, teruggevonden worden bij blootstellingconcentraties van 5, 10 en 15 µM Cd. Bij blootstelling aan 30 µM stopt de wortel na 24h met groeien, en dit in elk van de betrokken genotypen. Vermits de groeicurves dicht bij elkaar liggen zullen deze experimenten herhaald moeten worden met meerdere planten per genotype om kleine verschillen te kunnen bevestigen.

3.4 Bepaling van genexpressie

3.4.1 Zoektocht naar superieure referentiegenen

Aangezien het aan te raden is bij analyses van genexpressieprofielen één of meerdere stabiel(e) huishoud- of referentiegen(en) te betrekken in de analyse werd er gekozen om voorafgaand aan de analyse een ‘huishoudgenen’ experiment uit te voeren. Gepaste kandidaat huishoudgenen werden gekozen op basis van een reeds gepubliceerd artikel [35]. In het huishoudgenen experiment werd de stabiliteit van de genexpressie van een traditioneel referentiegen (*ACTINE*) vergeleken met de stabiliteit van een aantal nieuwe referentiegenen, en dit in verschillende weefsels (blad/wortel) en bij relatief hoge en lage Cd en Cu concentraties.

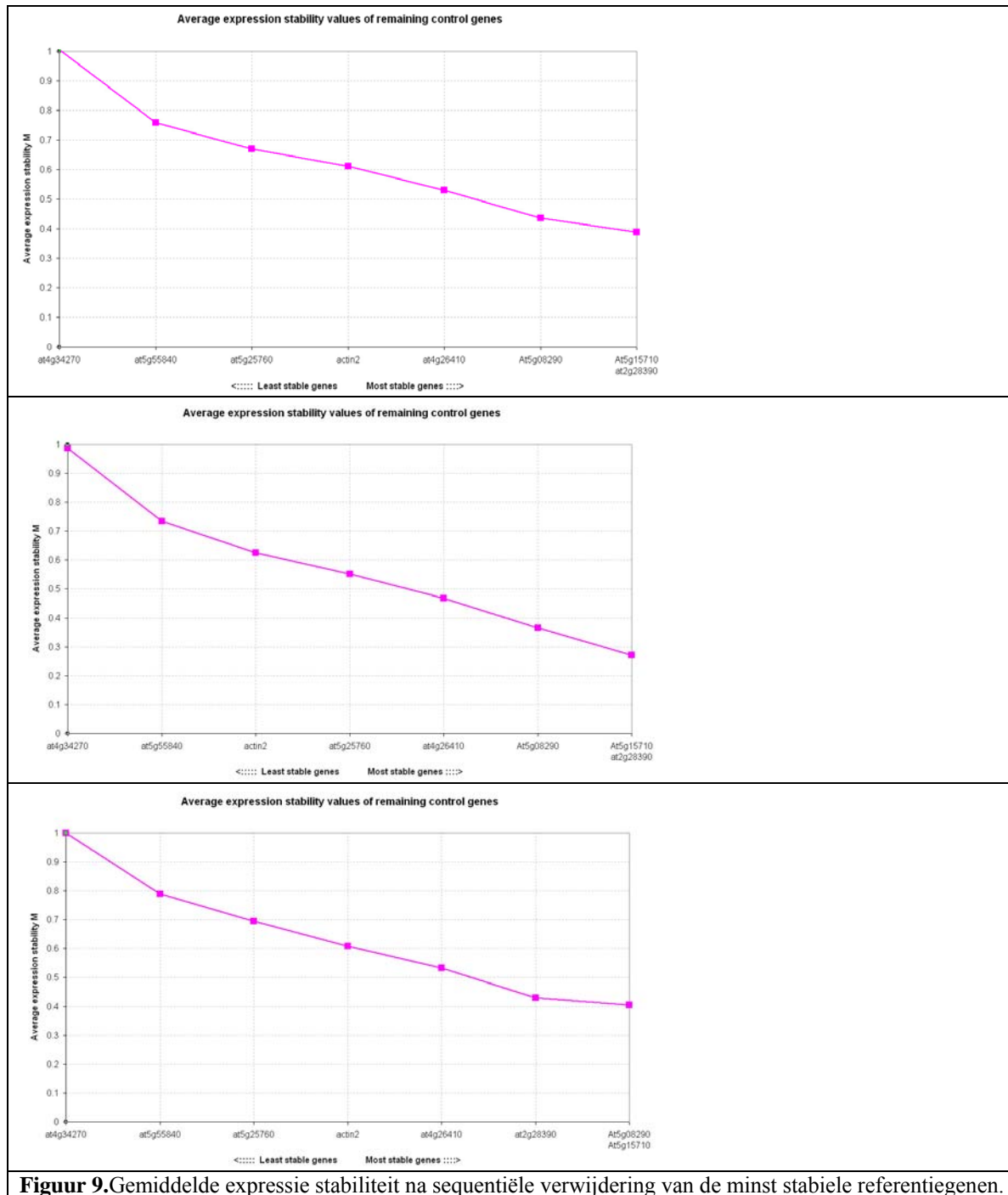
GeNorm is een algoritme dat de expressiestabiliteit van referentiegenen bepaalt, en dat een normalisatiefactor berekent aan de hand van meerdere huishoudgenen. Het onderliggende principe hiervoor is dat de ratio van expressie tussen twee ideale referentiegenen identiek is in alle stalen (tussen alle behandelingen, weefsels,...). In de praktijk varieert deze ratio. In geNorm wordt voor alle genen de variatie met de andere genen bepaald en hier wordt vervolgens een maat *M* (gemiddelde variatie van dit gen met alle andere genen) aan toegekend. Genen met laagste *M*-waarde vertonen de meest stabiele expressie (tabel 1). Vervolgens worden de genen met de hoogste *M*-waarde één voor één geselecteerd en uit het logaritme verwijderd tot de twee meest stabiele genen overblijven (figuur 9). Deze genen zijn

de gepaste referentiegenen die gebruikt kunnen worden voor de normalisatie van de expressie-waarden bekomen uit het gewenste experiment.

Als de Cd en Cu behandelingen samen in aanmerking werden genomen, en bij enkel de Cd behandeling, bleef de expressie van *AT5G15710* en *AT2G28390* zowel in de wortels als in de blaadjes het stabielst. Indien enkel de Cu behandeling in acht genomen werd waren *AT5G08290* en *AT5G15710* de meest stabiele referentiegenen. De volgorde van eliminatie van de referentiegenen bleef ongeveer hetzelfde terwijl de M-waarden voor Cu hoger lagen dan voor Cd.

Tabel 1. Stabiliteit van de referentiegenen in blad en wortel bij blootstelling aan Cd of Cu. De waardes komen overeen met de M-waardes toegekend door geNorm. Lagere M-waardes betekent hogere stabiliteit van expressie in de verschillende behandelingen en organen die in aanmerking genomen werden.

M-waardes					
Gen	blad en wortel Cd en Cu	Gen	blad en wortel Cd	Gen	blad en wortel Cu
<i>AT5G15710</i> <i>AT2G28390</i>	0.39	<i>AT5G15710</i> <i>AT2G28390</i>	0.27	<i>AT5G08290</i> <i>AT5G15710</i>	0.41
<i>AT5G08290</i>	0.44	<i>AT5G08290</i>	0.36	<i>AT2G28390</i>	0.43
<i>AT4G26410</i>	0.53	<i>AT4G26410</i>	0.47	<i>AT4G26410</i>	0.53
<i>ACTINE2</i>	0.61	<i>AT5G25760</i>	0.55	<i>ACTINE2</i>	0.61
<i>AT5G25760</i>	0.67	<i>ACTINE2</i>	0.63	<i>AT5G25760</i>	0.69
<i>AT5G55840</i>	0.76	<i>AT5G55840</i>	0.73	<i>AT5G55840</i>	0.79
<i>AT4G34270</i>	1.00	<i>AT4G34270</i>	0.99	<i>AT4G34270</i>	1.00



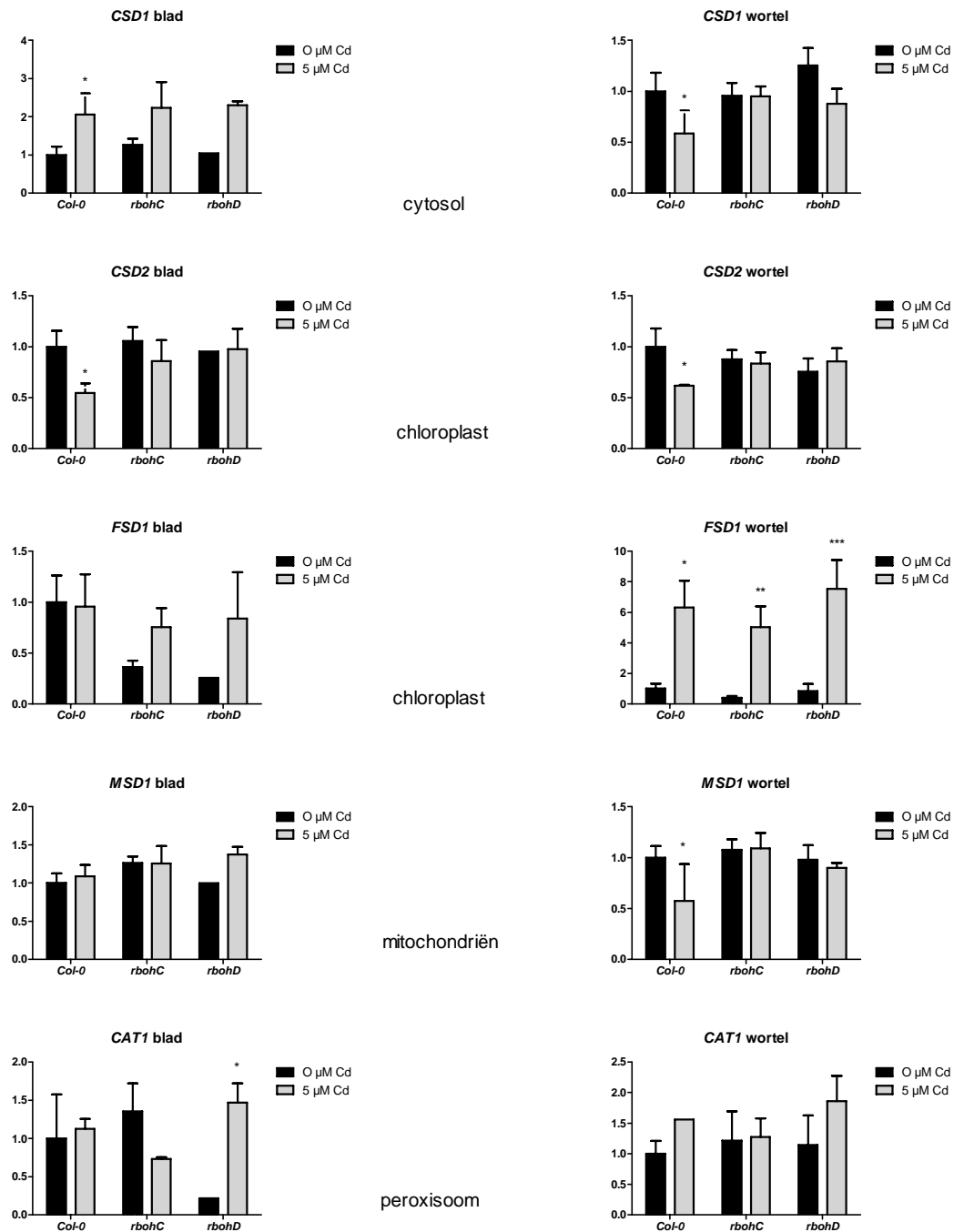
Figuur 9. Gemiddelde expressie stabiliteit na sequentiële verwijdering van de minst stabiele referentiegenen.

3.4.2 Kwantitatieve analyse van genexpressie met Real Time PCR

De genexpressie van relevante pro- en antioxidatieve genen werd geanalyseerd met behulp van real time PCR.

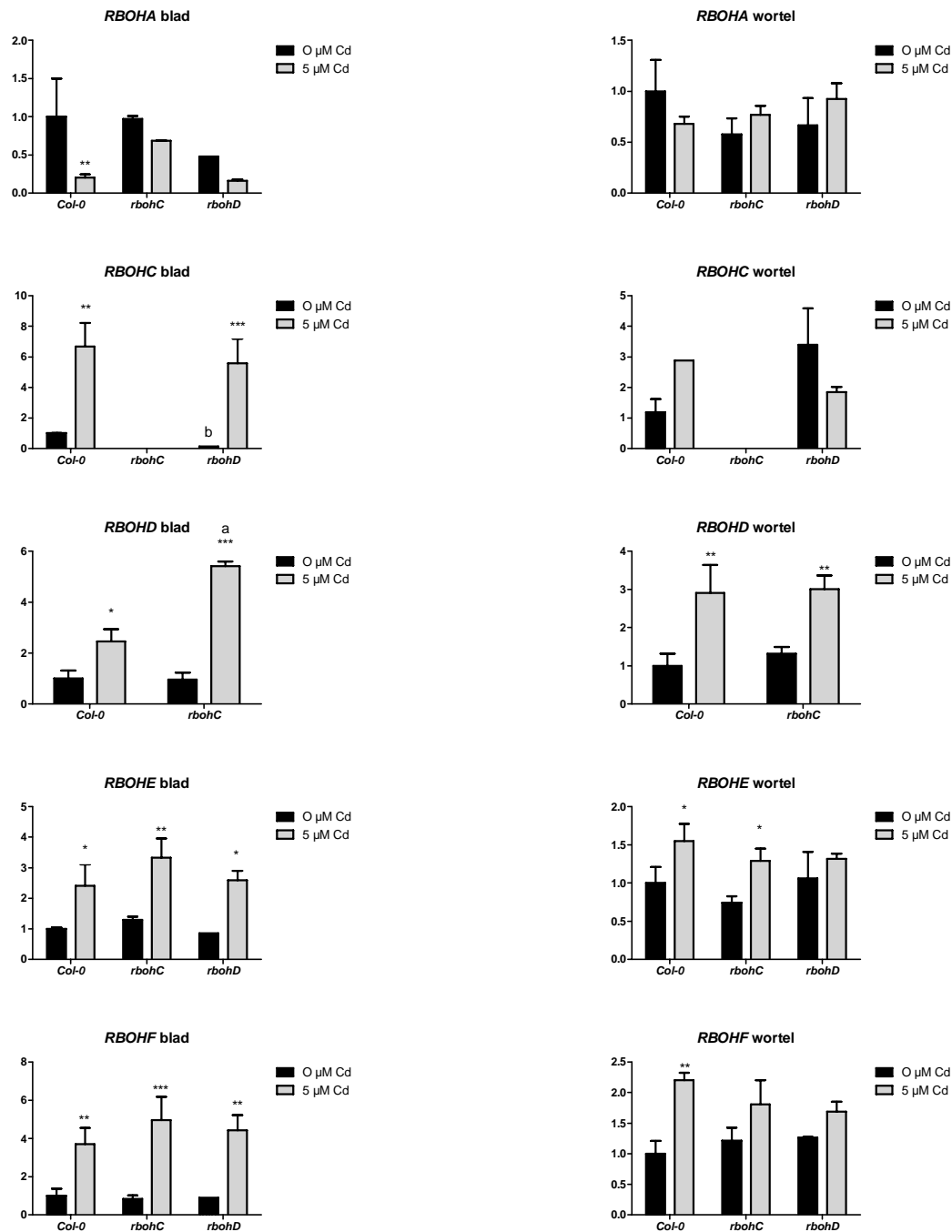
De genexpressie van een aantal O_2^- - en H_2O_2 -neutraliserende enzymen werd voor verschillende genotypen (Col-0, *rbohC* en *rbohD*) onderzocht na blootstelling aan 5 μ M Cd en vergeleken met een controle groep (figuur 10). Voor het *rbohF* genotype waren er slechts een beperkt aantal stalen, waarvoor besloten werd ze te gebruiken voor enzymmetingen. De

expressie van *CSD1* wordt in de blaadjes verhoogd met een factor 1,5 tot 2 na blootstelling aan 5µM Cd, en dit voor elk genotype. In de wortels vindt deze inductie niet plaats en lijkt de genexpressie in het wild type significant en in het *rbohD* genotype lichtjes geïnhibeerd te worden. De expressie van *CSD2* in de blaadjes en wortels blijkt in het wild type significant verlaagd te worden na behandeling terwijl de expressie in *rbohC* en *rbohD* mutanten min of meer constant blijft. De *FSD1*-expressie in de blaadjes na blootstelling aan Cd vertoont een vergelijkbaar verloop binnen de verschillende genotypen maar de expressie in het *rbohC* en *rbohD* genotype ligt bij de controlebehandeling merkkelijk lager dan deze van het wild type. In de wortels vindt voor elk genotype een significante inductie van *FSD1*-expressie met een factor van 5 tot 7 plaats na blootstelling. Ook hier zijn er geen opmerkelijke verschillen van expressie in de controle behandelden op te merken tussen de verschillende genotypen. *MSD1* lijkt zowel in blad als wortel en zowel in de controle behandeling als na blootstelling min of meer onveranderd tot expressie te komen, behalve in de wortels van het wild type. Hier doet er zich namelijk een significante daling van de expressie na behandeling voor. De expressie van *CAT1* lijkt zowel in blad als wortel onderhevig aan genotype effecten. Terwijl de *CAT1*-expressie in de blaadjes bij de controle behandeling vergelijkbaar is voor het wild type en *rbohC*, ligt deze voor *rbohD* beduidend lager en terwijl de expressie na blootstelling in *rbohC* onderdrukt wordt blijkt de expressie van *CAT1* significant geïnduceerd te worden in *rbohD*. In de wortels is de expressie van *CAT1* alvorens blootstelling vergelijkbaar voor elk genotype. Na blootstelling vindt er een lichte, maar niet significante up-regulatie (factor 1,5) plaats in het wild type en *rbohD* terwijl deze niet waargenomen wordt in het *rbohC* genotype.



Figuur 10. Genexpressie van O_2^- -en H_2O_2 -neutraliserende enzymen (Cu/ZnSOD: *CSD1* en 2; FeSOD: *FSD1*; MnSOD: *MSD1* en catalase: *CAT1*), afkomstig van 3 weken oude *A. thaliana* zaailingen, na 24h blootstelling aan 0 μ M Cd (■) en 5 μ M Cd (▒) verkregen met behulp van real time PCR. De waarden representeren de relatieve genexpressie, bepaald met behulp van de Δ Ct-waarden en genormaliseerd ten opzichte van 2 referentiegenen. De waarden zijn het gemiddelde \pm standaardfout van 3 of 4 (uitzonderlijk 1 of 2) biologische herhalingen. (significantieniveaus: ***: $P < 0.01$; **: $P < 0.05$; *: $P < 0.1$, voor behandelingseffecten en a: $P < 0.01$; b: $P < 0.05$; c: $P < 0.1$, voor genotype effecten).

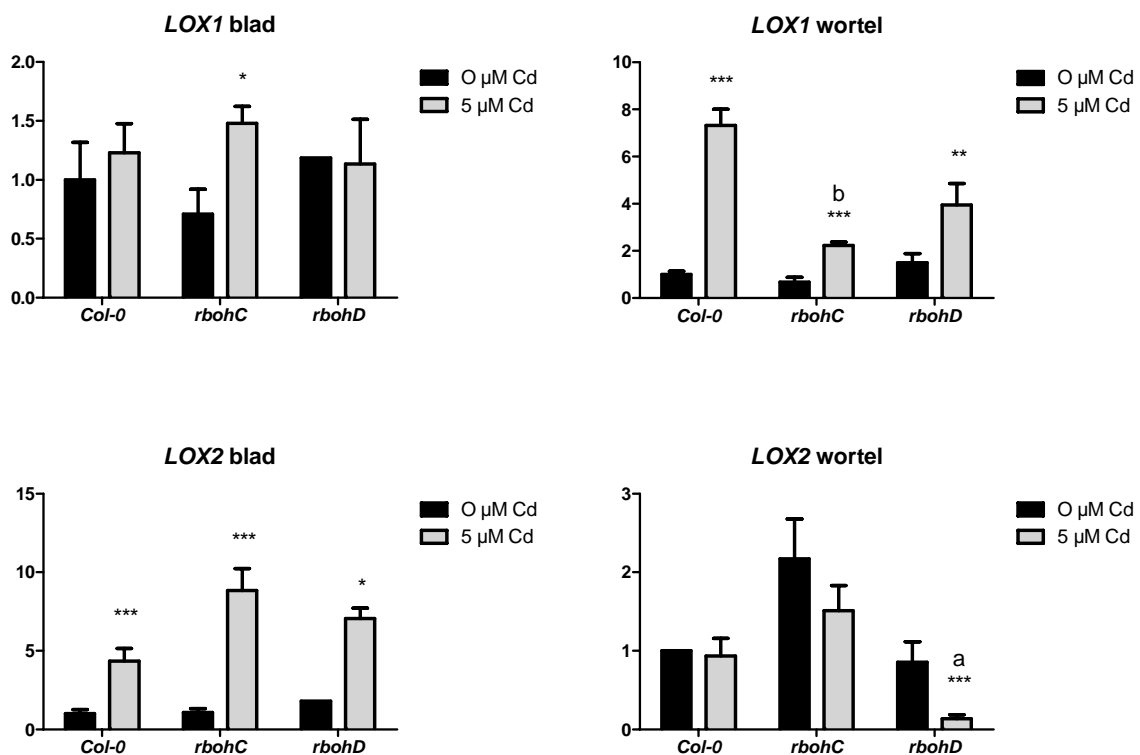
Vervolgens werden de genexpressieprofielen van een aantal NADPH oxidase genen geanalyseerd (figuur 11). De relatieve genexpressie werd voor een aantal *RBOH* isovormen na behandeling, in blad en wortel, bepaald voor elk betrokken genotype en vergeleken met een controle. De expressie van *RBOHA* wordt enkel in de blaadjes van het wild type significant geïnhibeerd. De expressie van *RBOHC* daarentegen wordt zowel in blad en wortel sterk geïnduceerd, respectievelijk met factor 6 en 5, in het wild type. In de blaadjes van het *rbohD* genotype daarentegen ligt de expressie bij de controle behandeling veel lager, in vergelijking met het wild type, maar vindt er vervolgens een veel sterkere inductie (factor 40, van 0.15 naar ± 4) plaats na blootstelling. In de wortels van het *rbohD* genotype blijkt net het tegenovergestelde het geval. Hier ligt de expressie bij de controle behandeling opmerkelijk hoger, in vergelijking met het wild type, en vindt er vervolgens na blootstelling een inhibitie van *RBOHC*-expressie plaats. De expressie van *RBOHD* na blootstelling wordt althans in de blaadjes sterker geïnduceerd in het *rbohC* (factor 5) genotype dan in het wild type (factor 2). In de wortels is er geen sprake van een verschil. De expressie van *RBOHE* en *RBOHF* vertoont in elk betrokken genotype een gelijkaardig verloop in de blaadjes na behandeling met 5 μM Cd. De expressie van beide genen wordt na blootstelling in elk genotype significant verhoogd in de blaadjes en in het wild type wortels. In de wortels kan er sprake zijn van een mild genotype effect, daar de expressie van beide genen in mindere mate lijkt geïnduceerd te worden in de mutante genotypen dan in het wild type bij Cd behandeling.



Figuur 11. Genexpressie van NADPH oxidasen, afkomstig van 3 weken oude *A. thaliana* zaailingen, na 24h blootstelling aan 0 μM Cd (■) en 5 μM Cd (▒) verkregen met behulp van real time PCR. De waarden representeren de relatieve genexpressie, bepaald met behulp van de ΔC_t -waarden en genormaliseerd ten opzichte van 2 referentiegenen. De waarden zijn het gemiddelde \pm standaardfout van 3 of 4 (uitzonderlijk 1 of 2) biologische herhalingen. (significantieniveaus: ***: $P < 0.01$; **: $P < 0.05$; *: $P < 0.1$, voor behandelingseffecten en a: $P < 0.01$; b: $P < 0.05$; c: $P < 0.1$, voor genotype effecten)

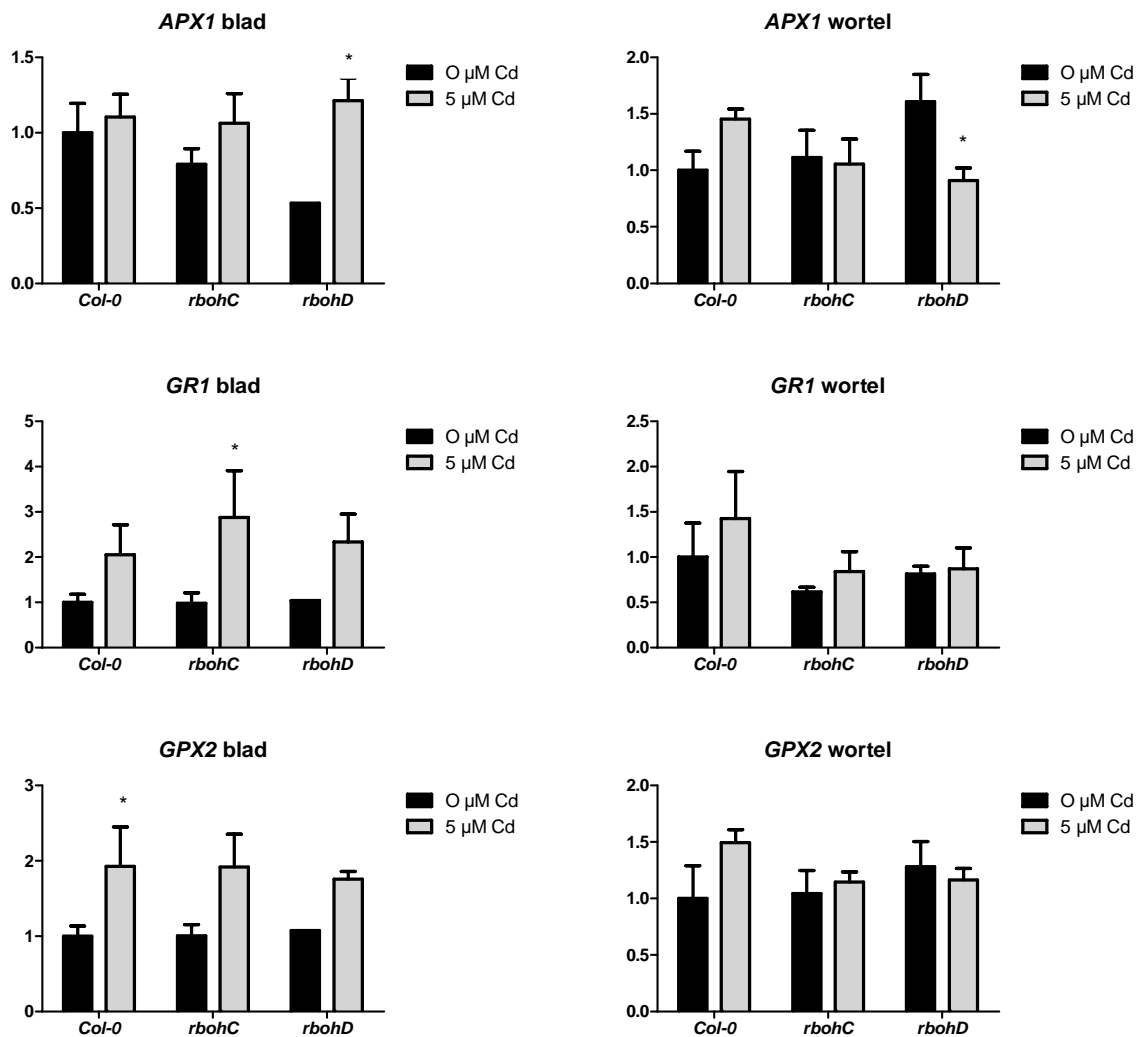
Ook het verloop van de genexpressie van een aantal lipidenperoxidatie-inducerende genen (lipoxygenase 1 en 2 of *LOX1* en *LOX2*) werd onderzocht (figuur 12). Vooreerst kan

opgemerkt worden dat de expressie van *LOX1* in de blaadjes beduidend lager ligt in vergelijking met de expressie in de wortels, vice versa voor de expressie van *LOX2* (data niet weergegeven). De expressie van *LOX1* in de blaadjes is zeer vergelijkbaar in het wild type en het *rbohD* genotype. In het *rbohC* genotype is er echter wel een verschil merkbaar. De expressie ligt immers duidelijk lager in de controle behandeling en wordt vervolgens geïnduceerd na blootstelling tot het niveau van expressie van *LOX1* na behandeling in de andere genotypen. Bij wild type wortels ondergaat *LOX1* een enorme up-regulatie van zijn genexpressie (factor 7) terwijl deze stijging in veel kleinere mate gezien wordt in het *rbohC* en *rbohD* genotype (factor 2 en factor 4, respectievelijk). De expressie van *LOX2* in de blaadjes stijgt significant voor elk genotype na blootstelling. In de wortels wordt de expressie van *LOX2* enkel door het *rbohD* genotype significant gehïbeerd na blootstelling aan 5 μM Cd.



Figuur 12. Genexpressie van lipidenperoxidatie-inducerende enzymen (lipoxygenase: *LOX1* en 2), afkomstig van 3 weken oude *A. thaliana* zaailingen, na 24h blootstelling aan 0 μM Cd (■) en 5 μM Cd (▒) verkregen met behulp van real time PCR. De waardes representeren de relatieve genexpressie, bepaald met behulp van de ΔCt -waarden en genormaliseerd ten opzichte van 2 referentiegenen. De waardes zijn het gemiddelde \pm standaardfout van 3 of 4 (uitzonderlijk 1 of 2) biologische herhalingen. (significantieniveaus: ***: $P < 0.01$; **: $P < 0.05$; *: $P < 0.1$, voor behandelingseffecten en a: $P < 0.01$; b: $P < 0.05$; c: $P < 0.1$, voor genotype effecten).

Tot slot werd de genexpressie van een aantal peroxidasen en een aantal enzymen, betrokken in de ascorbaat-glutathioncyclus, bekeken (figuur 13). Zowel bij de expressie van *APXI* in de blaadjes als in de wortels is er een genotype effect zichtbaar. Terwijl de expressie in de wild type en *rbohC* blaadjes na behandeling onveranderd blijft is er een duidelijke en tevens significante stijging in het *rbohD* genotype te zien die echter te maken heeft met een verminderde expressie van *APXI* in *rbohD* onbehandeld. In de wortels daarentegen is er volgend op blootstelling enkel een significante inhibitie van de genexpressie te zien in *rbohD*. Ook kan opgemerkt worden dat de expressie van *APXI* voorafgaand aan blootstelling, in de wortels van *rbohD* hoger ligt dan in de wortels van de andere genotypen. Er is eveneens in de blaadjes een vergelijkbare toename te zien in de genexpressie van *GRI*, tussen de verschillende genotypen, na blootstelling aan Cd. Deze toename blijkt in de bladeren alleen in het *rbohC* genotype significant te zijn. De expressie van *GPX2* vertoont, net als *GRI*, een vergelijkbaar verloop in elk genotype ter hoogte van de blaadjes. De expressie neemt na blootstelling in elk genotype toe, maar enkel in het wild type wordt een significante verhoging van de expressie behaald. In de wortels wordt dit niet teruggevonden. De expressie blijft relatief onveranderd in de mutante genotypen.



Figuur 13. Genexpressie van peroxidasen en ascorbaat-glutathioncyclus-gerelateerde enzymen (GPOD: *GPX2*; APOD: *APX1* en 2; GR: *GRI*), afkomstig van 3 weken oude *A. thaliana* zaailingen, na 24h blootstelling aan 0 μM Cd (■) en 5 μM Cd (▒) verkregen met behulp van real time PCR. De waarden representeren de relatieve genexpressie, bepaald met behulp van de ΔCt -waarden en genormaliseerd ten opzichte van 2 referentiegenen. De waarden zijn het gemiddelde \pm standaardfout van 3 of 4 (uitzonderlijk 1 of 2) biologische herhalingen. (significantieniveaus: ***: $P < 0.01$; **: $P < 0.05$; *: $P < 0.1$, voor behandelingseffecten en a: $P < 0.01$; b: $P < 0.05$; c: $P < 0.1$, voor genotype effecten).

Als de meest in het oog springende effecten van het *rbohC* en *rbohD* genotype samengevat worden, blijkt dat *CSD1*, *CSD2* en *MSD1* in de wortel geïnhibeerd worden na Cd behandeling, terwijl dit niet het geval is voor de mutanten. Dit is hetzelfde voor *CSD2* in het blad. Verder is er een hogere *RBOHD* expressie in het blad van de *rbohC* mutant na blootstelling, en is de expressie van *RBOHC* in de wortel ontregeld in de *rbohD* mutant. De expressie van *LOX1* daalt in de wortels van de mutanten na blootstelling.

3.5 Analyse van enzymactiviteiten van oxidatieve stress gerelateerde enzymen bij Cd-blootstelling

Aangezien een verandering op het niveau van genexpressie niet altijd een verandering op het eiwitniveau impliceert, werden eveneens de enzymactiviteiten van een aantal oxidatieve stress gerelateerde enzymen geanalyseerd. De potentiële enzymactiviteiten werden spectrofotometrisch bepaald in blad en wortel, voor alle betrokken genotypen, na blootstelling aan 5 μ M Cd, en vergeleken met niet behandelde controle planten (tabel 1).

De activiteit van het O₂⁻-neutraliserende SOD lijkt min of meer constant te blijven na blootstelling in het wild type en in *rbohC* en *rbohD* genotype. Opmerkelijk is dat in het *rbohF* genotype de activiteit van dit enzym voorafgaand aan blootstelling significant hoger ligt in vergelijking met de andere genotypen. Na blootstelling blijkt deze verhoogde activiteit sterk geïnhibeerd te worden binnen dit genotype. De activiteit van het H₂O₂-neutraliserende enzym CAT lijkt min of meer constant te blijven na behandeling. In de blaadjes van zowel wild type als mutante genotype *Arabidopsis thaliana*-plantjes zorgt een blootstelling van 24h aan 5 μ M voor een inductie van activiteit van H₂O₂-neutraliserende enzymen, zoals SPOD en GPOD. De potentiële enzymactiviteit van SPOD verdubbelt bijna na 24h behandeling, en dit in elk betrokken genotype. Ook GPOD vertoont een stijging in activiteit in wild type, in *rbohC*, in *rbohF* en in mindere mate in *rbohD* na blootstelling. Blootstelling aan 5 μ M Cd beïnvloedt, in de blaadjes, eveneens de activiteit van enzymen betrokken in de ascorbaat-glutathioncyclus. De activiteit van GR wordt, in elk genotype, gehalveerd na behandeling. Daarentegen neemt de activiteit van APOD in het wild type, in het *rbohC* en *rbohD* genotype en in mindere mate in het *rbohF* genotype toe.

Het SOD vertoont in de wortels eveneens een bijna constante activiteit in het wild type en *rbohD* genotype. In het *rbohC* en *rbohF* genotype is er echter sprake van een stijging van de activiteit na blootstelling. De activiteit van CAT stijgt zowel in het wild type als in het *rbohC* en *rbohF* genotype, terwijl een lichte daling van activiteit te zien is in het *rbohD* genotype. In de wortels neemt de activiteit, die beduidend hoger is dan in de blaadjes, van de, H₂O₂-neutraliserende, enzymen SPOD en GPOD na behandeling wederom toe in elk genotype behalve *rbohF*. De activiteit van het, ascorbaat-glutathioncyclus-gerelateerde, GR stijgt in het wild type en blijft constant of daalt in de mutanten. De activiteit van het APOD neemt, na

behandeling, in de wortels in elk genotype behalve in *rbohD* toe. In het *rbohD* genotype is een opmerkelijke daling van de APOD-activiteit te zien na blootstelling aan 5 μ M Cd.

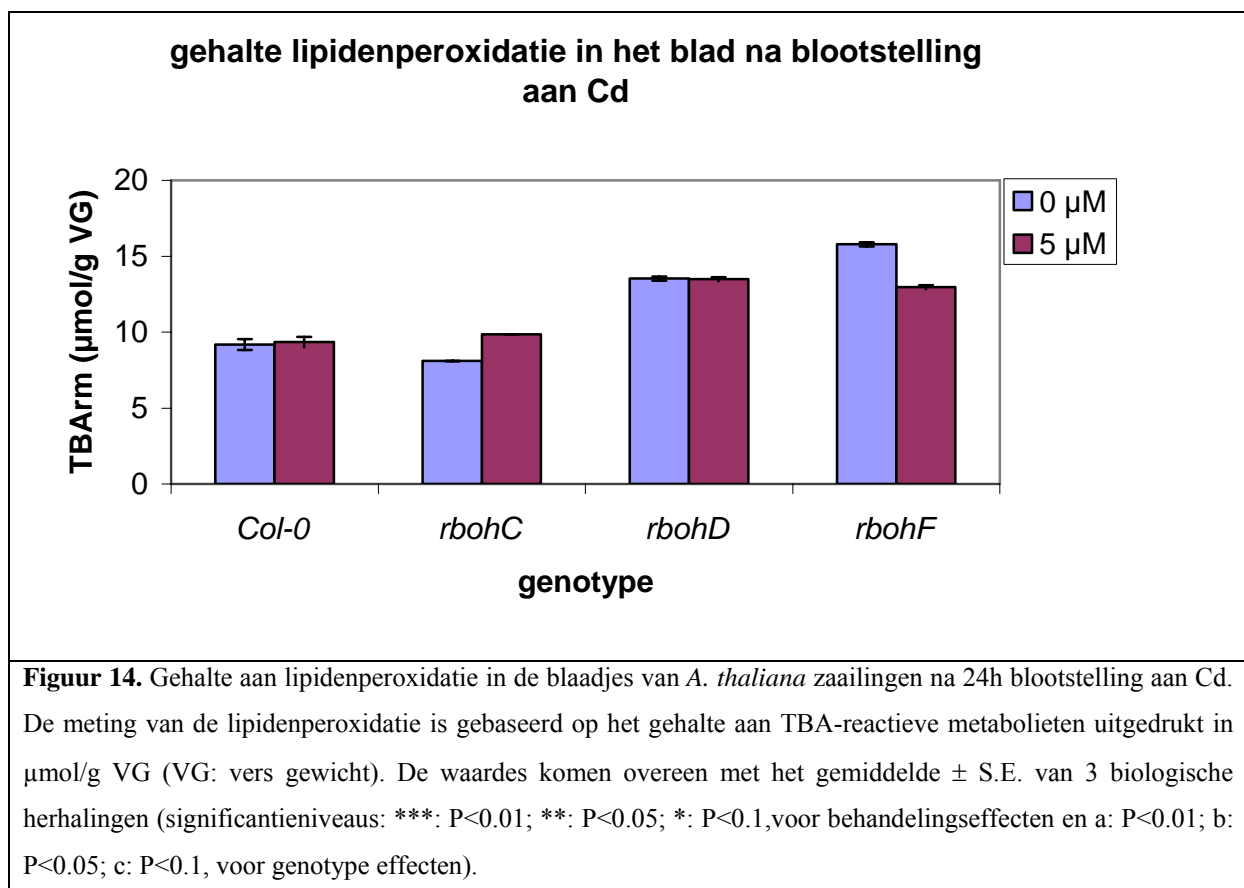
Tabel 2. Potentiële enzymactiviteiten van oxidatieve stress-gerelateerde enzymen in 3 weken oude *A. thaliana* zaailingen na 24h blootstelling aan 0 μM en 5 μM Cd. De enzymactiviteiten werden gemeten in blad- en wortelextracten en uitgedrukt in $\text{mU g}^{-1} \text{VG}^{-1}$. (SOD: superoxidedismutase; CAT: catalase; SPOD: syringaldazineperoxidase; GPOD: guajacolperoxidase; APOD: ascorbaatperoxidase; GR: glutathionreductase). De waardes zijn het gemiddelde \pm S.E. van 4 biologische herhalingen (significantieniveaus: ***: $P < 0.01$; **: $P < 0.05$; *: $P < 0.1$, voor behandelingseffecten en a: $P < 0.01$; b: $P < 0.05$; c: $P < 0.1$, voor genotype effecten).

Blad								
	Col-0		<i>rbohC</i>		<i>rbohD</i>		<i>rbohF</i>	
enzym	0 μM Cd	5 μM Cd	0 μM Cd	5 μM Cd	0 μM Cd	5 μM Cd	0 μM Cd	5 μM Cd
SOD	123718 ± 10982	102781 ± 13111	125754 ± 16906	150705 ± 46675	133825 ± 25841	130248 ± 18444	206621 b ± 21982	117842 * ± 17073
CAT	214 ± 30	222 ± 35	241 ± 55	289 ± 72	325 ± 146	402 ± 135	286 ± 76	300 ± 50
SPOD	4074 ± 479	7462 ** ± 495	5154 ± 217	8700 ** ± 1136	3448 ± 834	6857 ** ± 1361	5242 ± 839	7743 ± 912
GPOD	1208 ± 148	1867 * ± 54	1431 ± 111	1770 ± 177	1121 ± 290	1301 ± 101	1286 ± 286	1972 * ± 408
APOD	16552 ± 855	19253 ± 1595	18663 ± 3085	23877 * ± 2298	18322 ± 1147	23355 * ± 1146	12324 ± 1875	14483 ± 1666
GR	1060 ± 52	453 *** ± 80	1051 ± 62	646 ** ± 152	1094 ± 129	591 *** ± 43	887 ± 155	480 ** ± 48
Wortel								
	Col-0		<i>rbohC</i>		<i>rbohD</i>		<i>rbohF</i>	
enzym	0 μM Cd	5 μM Cd	0 μM Cd	5 μM Cd	0 μM Cd	5 μM Cd	0 μM Cd	5 μM Cd
SOD	210678 ± 79982	211449 ± 30290	200835 ± 60264	314968 ± 40356	209511 ± 30222	199459 ± 43771	273920 ± 100115	355384 ± 277442
CAT	158 ± 13	215 * ± 13	141 ± 9	162 ± 10	161 ± 11	125 b ± 39	82 ± 41	179 ** ± 20
SPOD	17792 ± 2423	20305 ± 2310	13327 ± 2844	17003 ± 1093	14399 ± 1735	16283 ± 2435	12348 ± 5877	15620 ± 2885
GPOD	13761 ± 1148	17885 ± 2558	11206 ± 1207	18144 * ± 2734	12560 ± 1023	14260 ± 1804	14911 ± 5050	15113 ± 938
APOD	12863 ± 4061	18485 ± 2389	11883 ± 2271	15365 ± 1251	13661 ± 1644	9678 b ± 2813	8779 ± 496	14357 ± 2255
GR	255 ± 113	482 * ± 84	527 ± 151	457 ± 46	414 ± 20	365 ± 52	514 ± 76	539 ± 47

3.6 Analyse van het gehalte aan lipidenperoxidatie

Om de graad van lipidenperoxidatie te analyseren in bladcellen werd het gehalte aan TBA-reactieve metabolieten zoals MDA spectrofotometrisch bepaald (figuur 14).

De blaadjes afkomstig van het *rbohD* en *rbohF* genotype vertonen voorafgaand aan behandeling een hoger aantal TBA-reactieve metabolieten, in vergelijking met het wild type en het *rbohC* genotype. Na blootstelling aan 5 μM Cd vindt er een zeer matige stijging plaats van deze reactieve metabolieten in *rbohC*-blaadjes. Deze stijging wordt niet gezien in de andere onderzochte genotypen. Opmerkelijk is dat er zich in het *rbohF* genotype na behandeling een daling van TBA-reactieve componenten lijkt voor te doen.



4 Discussie

Cd is een fytotoxisch metaal dat gemakkelijk door planten kan worden opgenomen. Wanneer planten blootgesteld worden aan Cd resulteert dit in een verminderde biomassa-productie. Deze groeibelemmering wordt veroorzaakt doordat Cd interacties kan aangaan met biologische processen die belangrijk zijn voor het levensonderhoud van het organisme. Zo kan Cd bindingen aangaan met bepaalde proteïnen betrokken in essentiële biologische processen, waardoor het onder andere de fotosynthese- en transpiratieactiviteit van planten kan beperken [6, 36-38]. De reeds vaak beschreven groeibelemmering van planten als gevolg van Cd-intoxicatie komt in deze studie wederom duidelijk naar voor (figuur 6). Blootstelling aan Cd leidt ook hier tot een sterk verminderde biomassa-productie, vooral zichtbaar ter hoogte van de wortels. Ook de groei van de primaire wortel in verticale agarplaten ondervindt duidelijk hinder van de aanwezigheid van dit toxisch metaal. De groeisnelheid voor deze jonge plantjes neemt exponentieel toe in de controle behandeling, maar bij blootstelling aan Cd stagneert deze groeisnelheid, en komt afhankelijk van de externe concentratie (5-10 of 15 μM) telkens op een lager niveau te liggen. Bij 30 μM is Cd zo toxisch dat het een volledige groei-inhibitie van de primaire wortel induceert. (figuren 7 en 8).

In eerdere studies is reeds aangetoond dat Cd oxidatieve stress induceert in *Arabidopsis thaliana* [39]. Hoewel de onderliggende mechanismen van Cd-geïnduceerde H_2O_2 -productie nog niet volledig gekend zijn, is er een vermoeden dat de productie van ROS bij Cd blootstelling het gevolg is van een daling van de enzymatische en niet-enzymatische verdedigingsmechanismen waardoor er een verstoring van de normale redoxbalans plaatsvindt [7, 38, 39]. Daarnaast zijn er eveneens enzymen die ROS produceren en die mogelijke een rol spelen in de ROS productie na Cd blootstelling [39]. Vervolgens zal de plant als respons hierop zijn verdedigingsmechanismen aanschakelen om zo het evenwicht tussen pro- en antioxidanten te herstellen [7, 38, 39]. De verstoring van de redoxbalans die aan de grond ligt van het ontstaan van oxidatieve stress wordt in deze studie gestaafd. Blootstelling aan Cd resulteert enerzijds in een verhoogde genexpressie van ROS producerende enzymen. Dit kan teruggevonden worden in de genexpressieanalyse aangezien de expressieniveaus van alle *RBOH* isovormen, behalve *RBOHA*, over het algemeen toenemen na behandeling. Naast de inductie van de NADPH oxidasen vindt er eveneens een inductie plaats van de lipoxygenasen, nl. van LOX1 in de wortels en LOX2 in de blaadjes (figuur 11). Anderzijds is er ook een up-

regulatie te zien van de expressie en activiteit van enzymen betrokken bij antioxidatieve verdediging na blootstelling aan Cd (figuur 10, 13 en tabel 2). Volgend op Cd blootstelling is er verder ook een algemene reductie van de expressie van de SOD isovormen waarneembaar, behalve voor *CSD1* in het blad en *FSD1* in de wortels. De expressie van H₂O₂-neutraliserende enzymen blijft relatief constant behalve voor *GPX2*, dat toeneemt in de blaadjes. Dit kan eveneens teruggevonden worden in de waargenomen enzymactiviteiten waar een lichte stijging in activiteit op te merken is van de POD's terwijl dit voor catalase niet het geval is. Uit de gepresenteerde data kan eveneens een activatie van een aantal componenten, deel uitmakend van de ascorbaat-glutathioncyclus, afgeleid worden aangezien zowel de expressie als enzymactiviteit van APOD en GR toeneemt in de wortels.

Eén van de meest schadelijke en tevens meest kenmerkende gevolgen van Cd-geïnduceerde oxidatieve stress is lipidenperoxidatie. Lipidenperoxidatie is een kettingreactie van oxidatieve degradaties van lipiden dewelke een directe afbraak van de biomembraan kan veroorzaken. De membraanfluiditeit neemt af terwijl de permeabiliteit toeneemt [15-18, 39, 40]. Lipidenperoxidatie kan ontstaan door een verhoogde productie van ROS en/of verhoogde expressie en activiteit van lipoxygenasen. De data in deze studie tonen een toename van de genexpressie van lipidenperoxidatie-inducerende enzymen *LOX1* (wortel) en *LOX2* (blad) volgend op Cd behandeling aan (figuur 12). Uit deze bevindingen kan geconcludeerd worden dat lipoxygenasen mogelijk een belangrijke initiërende rol spelen in het ontstaan van Cd-geïnduceerde lipidenperoxidatie, wat eveneens overeenstemt met de literatuur [39, 40].

Om een optimale werking van het antioxidatieve verdedigingssysteem te garanderen kan de plant beroep doen op een uiterst gesofisticeerd signalisatienetwerk dat zowel intercompartmentaal, binnen een weefsel, als tussen de verschillende weefsels werkt. Hierin is een belangrijke rol weggelegd voor de lipoxygenasen en de NADPH oxidasen [16, 20, 39-41]. Uit de literatuur is gebleken dat de chloroplast en het cytosol het gevoeligst zijn voor de effecten van Cd. De chloroplast fungeert immers, althans in het blad, als een sensor voor omgevingsinformatie [39]. De specifieke lokalisatie van de verhoogde *LOX1*-expressie in de wortels en de *LOX2*-expressie in de blaadjes zijn in overeenstemming met reeds eerder uitgevoerde analyses [39, 40]. Er heerst een sterk vermoeden dat deze specifieke lokalisatie te maken heeft met de rol die door de lipoxygenasen vervuld wordt in de redoxsignalisatie. De enzymatische peroxidatie van poly-onverzadigde vetzuren, geïnduceerd door onder andere lipoxygenasen, geeft immers aanleiding tot de activatie van de belangrijke oxylipine

signaalketen. Deze signaalketen ligt namelijk aan de oorsprong van veel signaalmoleculen betrokken in verschillende verdedigingsreacties zoals respons op aanvallen van pathogenen en herbiciden. Een voorbeeld hiervan zijn de jasmonaten die zowel betrokken zijn in de signalisatie van verwonding als een rol spelen bij de verdediging tegen welbepaalde pathogene indringers [40].

NADPH oxidasen zijn enzymen die in staat zijn ROS te produceren die aan de oorzaak liggen van oxidatieve stress. Hun rol in biotische interacties, abiotische stress en in de ontwikkeling is reeds bewezen [22-26]. De expressie van de plantaardige isovormen wordt door allerlei factoren beïnvloed. De meest voorkomende abiotische inductiefactoren zijn anoxie/hypoxie en stikstofdepletie, terwijl *RBOHC*, *D*, *E* en *F* eveneens kunnen geïnduceerd worden door allerlei biotische stressfactoren [24-26]. Uit dit onderzoek kan tevens een belangrijke rol voor NADPH oxidasen in het ontstaan van metaal-geïnduceerde oxidatieve stress afgeleid worden. De data tonen immers een duidelijke up-regulatie van RBOH's aan. De genexpressies van *RBOHC*, *RBOHD*, *RBOHE* en *RBOHF* stijgen over het algemeen zowel in de wortels als in de blaadjes van aan Cd blootgestelde planten (figuur 11).

Analyse van de RBOH-knock outs benadrukt eveneens hun belangrijkheid in de normale ontwikkeling, aangezien de mutante genotypen reeds een groeibelemmering vertonen onder normale fysiologische condities. Deze groeiachterstand is in de blaadjes en in de wortels het duidelijkst in de *RBOHF*-knock out. Deze vertoont eveneens een verhoogd gehalte aan lipidenperoxidatie onder normale omstandigheden (figuur 14). Dit alles kan te wijten zijn aan een verstoring in de waterhuishouding van de plant aangezien *RBOHF* een belangrijke rol speelt in de regulatie van de sluiting van stomata onder abiotische stresscondities (figuur 3). De ROS afkomstig van *RBOHF*, geproduceerd onder abiotische stress, functioneren als intermediären in de ABA signalisatie tijdens sluiting van de stomata of huidmondjes. H_2O_2 induceert de activatie van Ca^{2+} kanalen waardoor de cytosolaire Ca^{2+} concentratie toeneemt in de sluitcellen. *RBOHF* komt tot expressie in de sluitcellen en wordt transcriptioneel geactiveerd door ABA. Er kan eveneens een positieve “feedback loop” ontstaan waarbij de stijging in cytosolaire Ca^{2+} de expressie van deze isovorm verhoogt [24-26].

Uit de voorgelegde resultaten kan het vermoeden van een rol van NADPH oxidasen bij het ontstaan van Cd-geïnduceerde oxidatieve stress gesuggereerd worden. Hierbij lijken vooral de *RBOHC* en *RBOHD* isovormen een belangrijke regulatorische rol te spelen, aangezien uitschakeling van deze enzymen leidt tot een verstoorde respons na blootstelling aan Cd. De

afwezigheid van deze enzymen resulteert zowel in een veranderd morfologisch voorkomen van de plant als in een veranderde cellulaire respons op Cd-intoxicatie.

Er is een hogere *RBOHC* expressie in het blad van de *rbohD* mutant na blootstelling, wat erop kan wijzen dat de *RBOHC* isovorm misschien in staat is het tekort aan *RBOHD* te complementeren. Verder is de expressie van *RBOHC* in de wortel is ontregeld in de *rbohD* mutant, de expressie van *RBOHC* is namelijk in de controle behandeling reeds verhoogd.

Uit de genexpressie analyse komt er eveneens een mogelijke regulatorische rol voor de *RBOHD* isovorm naar boven. Er is reeds gerapporteerd dat een proteïne, gecodeerd door *RBOHD*, nodig is voor een ROS-afhankelijk signaal dat de hoeveelheid *APX1* op peil houdt tijdens lichtstress [42]. Deze bevinding wordt in deze studie bevestigd in die zin dat de data aantonen dat de genexpressie van *APX1* verhoogd is bij de controle behandeling in het *rbohD* genotype, maar enkel in de wortels van de plant, wat suggereert dat *APX1* expressie onder directe controle staat van *RBOHD*.

De verkregen data tonen eveneens een mogelijke regulatorische invloed aan van NADPH oxidasen op de genexpressie van beide *LOX*-genen. De expressie van *LOX1* in de wortels ligt na blootstelling beduidend lager in de *rbohC* en *rbohD* mutanten. De expressie van *LOX2* in de blaadjes ligt daarentegen hoger in de mutante genotypen dan in het wild type na behandeling.

Verder blijkt dat *CSD1*, *CSD2* en *MSD1* in de wortel geïnhibeerd worden na Cd behandeling, terwijl dit niet het geval is voor de *rbohC* en *rbohD* mutanten. Dit is hetzelfde voor *CSD2* in het blad. Hieruit zou een rol van *RBOHC* of *RBOHD* op de expressie van de verschillende SOD isovormen kunnen afgeleid worden waarbij *RBOHC* of *RBOHD* een negatieve invloed uitoefent op de expressie van deze isovormen bij behandeling met Cd. Als we dit combineren met het feit dat de expressie van *LOX1* eveneens daalt in de wortels van de mutanten na blootstelling, zouden we als hypothese kunnen stellen dat *RBOHC* en/of *RBOHD* in de wortel een positieve invloed hebben op de expressie *LOX1*, dat op zijn beurt dan verantwoordelijk is voor het negatieve effect op de expressie van *CSD1*, *CSD2* en *MSD1*. Om deze mogelijke betrokkenheid van de lipoxygenasen in deze signaalketen verder uit te diepen zou het nuttig zijn onderzoeken uit te voeren met *LOX* mutanten. Dit zou zeker kunnen bijdragen aan een verduidelijking van de componenten die een rol spelen in de signaalketens betrokken bij het ontstaan van en reactie op oxidatieve stress na Cd-blootstelling.

Referenties

- [1] Lauwerys R, Amery A, Bernard A, Bruaux P, Buchet JP, Claeys F, et al. Health effects of environmental exposure to cadmium: objectives, design and organization of the cadmibel study: a cross-sectional morbidity study carried out in Belgium from 1985 to 1989. *Environmental Health Perspectives* 1990;87:283–289.
- [2] Nawrot T, Roels HA, Thijs L, Vangronsveld J, Richart T, Van Hecke E, et al. Longkankerrisico en blootstelling aan cadmium via het milieu: antwoord op de kritiek met toetsing van de causaliteit. *Tijdschrift voor Geneeskunde* 2007;63(2-3):59-70.
- [3] 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.
- [4] Georgopoulos PG, Roy A, Yonone-Lioy MJ, Opiekun RE, Lioy PJ. Copper environmental dynamics and human exposure issues. Prepared for: The International Copper Association. 2001. URL: http://www.ccl.rutgers.edu/reports/ICA/ICA2002_copper1.pdf.
- [5] Hashima M.A., Chub K.H. Biosorption of cadmium by brown, green, and red seaweeds. *Chemical Engineering Journal* 2004; 97:249–255.
- [6] 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;31:539-548.
- [7] Suwalsky M, Villena F, Norris B, Cuevas F, Sotomayor CP. Cadmium-induced changes in the membrane of human erythrocytes and molecular models. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2004;98:1061–1066.
- [8] Almela C, Clemente M J, Vélez D , Montoro R. Total arsenic, inorganic arsenic, lead and cadmium contents in edible seaweed sold in Spain. *Food and Chemical Toxicology* 2006;44:1901–1908.
- [9] Godt J, Scheidig F, Grosse-Siestrup C, Esche V, Brandenburg P, Reich A, et al. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology* 2006, 1:22.
- [10] Kjellström T. Mechanism and epidemiology of bone effects of cadmium. *Cadmium in the Human Environment: Toxicity and Carcinogenicity* (Nordberg G, Alessio L, Herber R, eds). IARC Scientific Publications 1992;118:301-310.
- [11] Henson MC, Chedrese PJ. Endocrine disruption by cadmium, a common environmental toxicant with paradoxical effects on reproduction. *Experimental Biology and Medicine* 2004;229:383-392.

-
- [12] 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 Journal Of Oncology* 2006;7:119-126.
- [13] Yruela I. Copper in plants. *Brazilian journal of plant physiology* 2005;17(1):145-156.
- [14] Murawski M, Bydlon G, Sawicka-Kapusta K, Wierzchos E, Zakrzewska M, Włodarczyk S, et al. The effect of long term exposure to copper on physiological condition and reproduction of sheep. *Reproductive biology* 2006;6(1):201-206.
- [15] MØller IM. Reactive oxygen species (ROS) and plant respiration. *Plant physiology online* 2006.
- [16] Bhattacharjee S. Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal transduction in plants, review article. *Current Science* 2005;89(7):1113-1121.
- [17] Halliwell B. Reactive Species and Antioxidants. *Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. Plant Biology* 2006; 141:312-322.
- [18] Limlay JA, Linn S. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 1986;240:1302-1309.
- [19] Arora A, Sairam RK, Srivastava GC. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science* 2002;82(10):1227-1238.
- [20] Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Sciences* 2004;9(10):490-498.
- [21] Bedard K, Lardy B, Krause KH. NOX family NADPH oxidases: Not just in mammals. *Biochimie xx* 2007;1-6.
- [22] Sagi M, Fluhr R. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiology* 2006;141:336-340.
- [23] 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.
- [24] Torres MA, Dangl JL, Jones JD. Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;99:517-522.
- [25] Foreman J, Demidchik V, Bothwell JH, Mylona P, Miedema H, torres MA, et al. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 2003;422:442-446.

- [26] Kwak JM, Mori IC, Pei ZM, Leonhardt N, Torres MA, Dangl JL, et al. NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. The EMBO Journal 2003;22(11):2623-2633.
- [27] Smeets K, Ruytinx J, Van Belleghem F, Semane B, Lin D, Vangronsveld J, Cuypers A. Critical evaluation and statistical validation of a hydroponic culture system for *Arabidopsis thaliana*. Plant physiology and biochemistry 2007;submitted.
- [28] Zhang H, Forde BG. An *Arabidopsis* MADS Box Gene That Controls Nutrient-Induced Changes in Root Architecture. Science 1998; 279: 407-409.
- [29] Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A. Accurate normalization of real time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome biology 2002;3(7):research0034.1-0034.11.
- [30] McCord J, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuperein (hemocuperein). J. Biol. Chem. 1969;244:6049-6055.
- [31] Imberty A, Goldberg R, Catesson AM. Tetramethylbenzidine and Para-Phenylenediamine-Pyrocatechol for peroxidase histochemistry and biochemistry – 2 new, non-carcinogenic chromogens for investigating lignification process. Plant Science Letters 1984;35:103-108.
- [32] Bergmeyer HU, Gawenn K, Grassl M. Enzymes as biochemical reagents. In: Methods in enzymatic analysis. Academic Press, New York;1974:p.425-522.
- [33] Gerbling KP, Kelly GJ, Fischer KH, Lutzko E. Partial purification and properties of soluble ascorbate peroxidases from pea leaves. J. Plant Physiol. 1984;115:59-67.
- [34] Dhindsa RS, Plumb-Dhindsa P, Thorpe TA. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. J. Exp. Bot. 1981;32:93-101.
- [35] Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible W-R. Genome-wide identification of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. Plant physiology 2005;139:5-17.
- [36] Smeets K, Cuypers A, Lambrechts A, Semane B, Hoet P, Van Laere A, Vangronsveld J. Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. Plant Physiol Biochem. 2005;43(5):437-44.

- [37] Boonyapookana B, Upatham ES, Kruatrachue M, Pokethitiyook P, Singhakaew S. Phytoaccumulation and phytotoxicity of cadmium and chromium in duckweed *Wolffia globosa*. *Int J Phytoremediation*. 2002;4(2):87-100.
- [38] Schützendübel A, Polle A. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot*. 2002;53(372):1351-65.
- [39] Cuypers A, Smeets K, Ruytinx J, Horemans N, Vanhoudt N, Van Sanden S, et al. Oxidative Stress as a Modulator in Cd and Cu toxicity in *Arabidopsis thaliana* seedlings. ???????
- [40] Montillet J-L, Cacas J-L, Garnier L, Montane' M-H, Douki T, et al. The upstream oxylipin profile of *Arabidopsis thaliana*: a tool to scan for oxidative stresses. *The Plant Journal* 2004;40, 439–451.
- [41] Hall JL. Cellular mechanism for heavy metal detoxification and tolerance. *J. of experimental botany* 2002;53(366):1-11.
- [42] Davletova S, Rizhsky L, Liang H, Shengqiang Z, Oliver DJ, Coutu J, et al. Cytosolic Ascorbate Peroxidase 1 Is a Central Component of the Reactive Oxygen Gene Network of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 2005;Vol. 17, 268–281.

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:

De rol van NADPH oxidasen in cadmium-geïnduceerde oxidatieve stress bij Arabidopsis thaliana

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,

Dennis Mathijssen

Datum: **19.06.2007**