

# *Adaptieve zinktolerantie mechanismen in het ectomycorrhiza fungus *Suillus luteus**

**Sherwin Vaesen**

promotor :  
Prof. dr. Jan COLPAERT

co-promotor :  
dr. Ann CUYPERS

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



---

# Inhoudstafel

---

## Lijst met afkortingen

## Voorwoord

## Samenvatting

<b>Hoofdstuk 1: Inleiding</b> .....	<b>1</b>
1 Zware metalen .....	1
2 Zink .....	1
3 Zinktoxiciteit .....	2
3.1 Oxidatieve stress .....	3
3.2 Cellulaire effecten .....	3
3.3 Fysiologische effecten .....	4
4 Verdedigingsmechanismen tegen metaalstress .....	5
4.1 Directe verdedigingsmechanismen .....	5
4.2 Indirecte verdedigingsmechanismen .....	7
5 Transportmechanismen van zink .....	10
5.1 ZIP metaalionentransporters .....	11
5.2 CDF metaalionentransporters .....	12
6 Zinktolerantie .....	13
7 Ectomycorrhiza fungus <i>Suillus luteus</i> .....	14
7.1 Mycorrhiza .....	14
7.2 Doel van het onderzoek met <i>Suillus luteus</i> als studiemodel .....	14
<b>Hoofdstuk 2: Materialen en methoden</b> .....	<b>16</b>
1 Fungusmateriaal .....	16
2 Metaalextracties .....	17
3 Lipidenperoxidatie bepaling .....	17
4 Spectrofotometrisch bepalen van enzymactiviteiten .....	18
4.1 Extractie .....	18
4.2 Spectrofotometrisch bepalen van enzymactiviteiten .....	18
5 RNA-extractie en Real Time PCR .....	20
5.1 RNA-extractie .....	20
5.2 RNA-concentratie bepaling en kwaliteitscontrole .....	20
5.3 Synthese van cDNA .....	21
5.4 Real-Time PCR: kwantitatieve analyse van genexpressie .....	21
6 Statistische analyse .....	22
<b>Hoofdstuk 3: Resultaten</b> .....	<b>23</b>
1 Zinkopname .....	23
2 Biomassa bepaling .....	24
3 Lipidenperoxidatie .....	26
4 Bepaling van de enzymactiviteiten .....	27
5 Genexpressie .....	30
<b>Hoofdstuk 4: Discussie</b> .....	<b>31</b>
1 Zinkopname .....	31
2 Biomassa .....	31
3 Lipidenperoxidatie .....	32
4 Enzymactiviteiten .....	33
5 Genexpressie .....	35
6 Algemene conclusie .....	36
<b>Referenties</b> .....	<b>37</b>

---

# Lijst met afkortingen

---

ATP: adenosine trifosfaat  
CDF: 'Cation diffusion facilitator'  
CuZnSOD: koper en zink bevattende superoxidedismutase  
DNA: desoxyribonucleïnezuur  
Fe: ijzer  
GAPDH: glyceraldehyde fosfaat dehydrogenase  
GPx: glutathionperoxidase  
GSH: gereduceerde glutathion  
GSSG: geoxideerde glutathion  
GST: glutathion-S-transferase  
G6PDH: glucose-6-fosfaat dehydrogenase  
HSP: 'heat shock proteins'  
kDa: kilodalton  
Mg: magnesium  
MDA: malondialdehyde  
Mn: mangaan  
MT: metallothioneïne  
M6PDH: mannose-6-fosfaat dehydrogenase  
N: stikstof  
NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide fosfaat  
P: fosfaat  
PC: fytochelatine  
PCR: 'Polymerase chain reaction'  
RNA: ribonucleïnezuur  
ROS: reactieve zuurstofvormen  
SOD: superoxidedismutase  
SH-groep: thiol- of sulfhydrylgroep  
Zn: zink  
ZIP: 'Zrt-, Irt-like proteins'

---

# Voorwoord

---

Deze thesis werd mogelijk gemaakt dankzij de hulp van veel mensen. Hierbij wil ik ze allemaal daarvoor bedanken.

Ten eerste zou ik graag mijn begeleidster, Drs. Joske Ruytinx, heel fel willen bedanken. Joske, bedankt voor uw onmisbare begeleiding, hulp, raad en voor het nalezen van dit eindwerk. Ook Prof. Dr. Jan Colpaert wil ik bedanken voor alle hulp en om mij de kans te geven stage te mogen doen in het CMK, alsook mijn co-promotor, Dr. Ann Cuypers, voor haar raad en hulp in het labo. Prof. Dr. Johan Robben zou ik ook willen bedanken voor het lezen en beoordelen van mijn eindwerk.

Verder wens ik ook nog mijn labo-collega's Dennis Mathijssen, Liesbeth Lijnen, Bruno Reiners en alle personeelsleden en studenten in het CMK bedanken voor de fijne sfeer en hulp in het labo.

Tenslotte wil ik mijn ouders en vrienden ook bedanken. Bedankt voor jullie steun en bereidheid om mij te helpen, zoals mij te helpen voorzien van (voet)schimmelmateriaal. Alhoewel dit niet de soort schimmels ik nodig had, wil ik hen toch bedanken voor het gebaar.

Kortom, bedankt allemaal!

---

# Samenvatting

---

Populaties van verschillende biota die blootgesteld worden aan hoge zinkconcentraties ondervinden een sterke selectiedruk. Deze selectiedruk kan tot het ontstaan van zinktolerante populaties leiden, zoals bij de *Suillus* populaties die goed groeien in de buurt van zinksmelters in Noord-Limburg [1]. De ectomycorrhiza fungus *Suillus luteus* is een wortelsymbiont die vaak gevonden wordt in met Zn gecontamineerde regio's en waarvan reeds aangetoond werd dat hij de zware metaaltotoxiciteit in zijn gastheerplant kan verminderen. Er zijn verscheidene potentiële mechanismen die een rol kunnen spelen in de metaaltolerantie.

Om meer inzicht en kennis te krijgen in het ontstaan van zinktoxiciteit en adaptieve zinktolerantie werd in onze studie gebruik gemaakt van zinksensitieve en zinktolerante *Suillus luteus* isolaten. Deze isolaten werden blootgesteld aan 20, 200, 500 en 1000  $\mu\text{M}$  zink (Zn) gedurende 24 uren. De zinkopname in de isolaten werd gemeten, alsook de biomassa, de activiteit van 2 anti-oxidatieve enzymen (catalase en superoxidedismutase (SOD)) en glucose-6-fosfaat dehydrogenase (G6PDH) en de genexpressie van glyceraldehyde fosfaat dehydrogenase (GAPDH), glutathion-S-transferase (GST), mannose-6-fosfaat dehydrogenase (M6PDH) en thioredoxine. De enzymactiviteiten werden fotospectrometrisch bepaald en de genexpressie via real-time PCR. Ook de mogelijke Zn-geïnduceerde lipidenperoxidatie werd via malondialdehyde-vorming fotospectrometrisch bepaald.

Analyses van de Zn-opname toonden aan dat de Zn-sensitieve isolaten significant meer Zn accumuleerden dan de tolerante. De sensitieve groep hadden een lagere biomassa dan de tolerante bij 500 en 1000  $\mu\text{M}$  Zn. De sensitieve isolaten hadden een lagere lipidenperoxidatie dan de tolerante. De sensitieve fungi hadden een grotere catalase- en G6PDH-activiteit dan de tolerante bij hoge externe zinkconcentraties en er was geen significant verschil waarneembaar in de SOD-activiteit tussen de sensitieve en tolerante isolaten. De genexpressie van de 4 eerder vermelde genen toonde geen significante verschillen tussen de tolerante en sensitieve isolaten.

Op basis van onze resultaten konden we concluderen dat de zinktoxiciteit op de biomassa waarschijnlijk niet te wijten is aan Zn-geïnduceerde oxidatieve stress en lipidenperoxidatie, dat het tolerantie mechanisme niet te wijten is aan een meer gestimuleerde enzymactiviteit van catalase, G6PDH en SOD, dat tolerantie niet gepaard gaat met een verandering in de genexpressie van de eerder vermelde genen en dat Zn-tolerantie waarschijnlijk te wijten is aan een hogere exclusie van Zn.

---

# Hoofdstuk 1: Inleiding

---

## 1 Zware metalen

Zware metalen zijn metalen met een dichtheid groter dan  $5 \text{ g/cm}^3$  [1, 2]. De meeste zware metalen hebben niet volledig gevulde d orbitalen. Deze orbitalen zorgen ervoor dat de zware metaalkationen met andere componenten kunnen binden [2].

Een aantal zware metalen, zoals ijzer, zink en koper, zijn essentiële micro-nutriënten in planten, micro-organismen en mens die onmisbaar zijn voor verschillende levensprocessen, zoals de groei en ontwikkeling. Maar bij hoge concentraties kunnen deze micro-nutriënten toxisch worden voor het organisme. Het is dus zeer belangrijk dat de intracellulaire concentraties van deze zware metalen nauw gereguleerd worden [2, 3, 4].

Er zijn ook zware metalen, zoals cadmium, lood en kwik, die het organisme niet nodig heeft om zijn levenscyclus te voltooien. Deze kunnen al bij zeer lage concentraties toxisch zijn. Hersenen, nieren en het zenuwstelsel in de mens kunnen aangetast worden [3].

## 2 Zink

Het zware metaal zink (Zn) is een micronutriënt dat onmisbaar is in het leven [5]. Zink is essentieel voor de groei en ontwikkeling, het immuunrespons, neurologische functies en reproductie van de mens en micro-organismen [6, 7, 8]. De belangrijkste biochemische rollen van zink zijn het stabiliseren van organische componenten en membranen en als constituent van duizenden proteïnen in plantaardig en dierlijk weefsel, zoals metalloenzymen. Voorbeelden van metalloenzymen zijn superoxide dismutase, DNA polymerase, koolstof anhydrase, enzovoort. Door deze uitgebreide aanwezigheid van zink in verscheidene proteïnen, is zink in veel cellulaire processen betrokken, zoals in de synthese van nucleïnezuren en proteïnen, het koolhydratenmetabolisme, het metabolisme van de beenderen, het zuurstoftransport en in de bescherming tegen vrije radicaalschade (als antioxidant) [6].

Op cellulair niveau kan men de functie van zink in 3 categorieën indelen: katalytisch, structureel en regulatorisch [8].

### *Katalytische rol*

Bijna 100 gekende en verschillende enzymen zijn afhankelijk van zink om hun functie als katalysator uit te voeren in chemische reacties. Zink-afhankelijke enzymen kunnen in alle gekende klassen van enzymes gevonden worden [8]. De 6 grote klassen van enzymen zijn oxidoreductasen (oxidatie-reductie reacties), transferasen (groep transfer reacties), hydrolasen (hydrolyse reacties), lyasen (additie of verwijdering van groepen om dubbele bindingen te vormen), isomerasen (isomerizatie reacties) en ligasen (ligatie van 2 substraten) [9].

### *Structurele rol*

Gebonden zink stabiliseert de structuren van RNA, DNA, biologische membranen, ribosomen en metallozymen, zoals het antioxidant koper-zink superoxide dismutase. Bij dieren heeft men kunnen aantonen dat zinkdeficiëntie geassocieerd wordt met posttranslationele modificaties van plasmamembraanproteïnen. Het verlies van zink in biologische membranen zorgt voor de oxidatie van SH-groepen van belangrijke plasma membraanproteïnen, waardoor deze proteïnen hun functie verliezen. Dus te kort aan Zn verhoogt de gevoeligheid voor oxidatieve schade in het celmembraan [6, 10].

### *Regulatorische rol*

Proteïnen met een zink-vinger-motief kunnen genexpressie reguleren door als transcriptie factoren te fungeren. Zink speelt een rol in de 'cell-signaling' en er werd aangetoond dat zink een invloed heeft in het vrijlaten van hormonen en in de transmissie van zenuwimpulsen. Zink speelt ook een rol in de apoptose, een belangrijk proces tijdens de groei en ontwikkeling [4]. Zink inhibeert apoptose door de activiteit van caspase 3 te onderdrukken [11].

## **3 Zinktoxiciteit**

Eerdere studies hebben aangetoond dat Zn verschillende fysiologische processen inhibeert, zoals de respiratie en groei van fungi, het ontkiemen van fungussporen, de groei van algen en protozoa, bacteriële conjugatie en replicatie van rhinovirussen. Concentraties van zink die de normale natuurlijke omgevingsconcentraties overstijgen worden voornamelijk veroorzaakt door antropogene activiteiten [7]. Overmaat aan dit zware metaal veroorzaakt ook oxidatieve stress en het verlaagt de nutriëntenopname in planten en micro-organismen [12].

De exacte mechanismen van de zinktoxiciteiten zijn nog niet volledig opgehelderd, maar toxiciteit treedt waarschijnlijk op door vervanging van andere essentiële kationische

cofactoren (zoals Fe, Mn en Mg) in proteïnen die uiteindelijk leidt tot het verlies van de functie van die proteïnen. Een andere mogelijkheid is het onrechtstreeks effect van toxisch Zn, namelijk via Zn-geïnduceerde oxidatieve stress of ROS [5].

### 3.1 Oxidatieve stress

In een studie werd er geconcludeerd dat toxische concentraties aan zink oxidatieve schade kunnen veroorzaken, omdat een verhoogde lipidenperoxidatie in de met Zn-behandelde bonen waargenomen werd. Dit zou een mogelijke indicatie kunnen zijn van een Zn-geïnduceerde oxidatieve stress [13]. De onderliggende cellulaire mechanismen van het ontstaan van deze Zn-geïnduceerde oxidatieve stress zijn nog onbekend [5]. Ondanks het feit dat zink geen redox-actief metaal is, wordt blootstelling aan toxische Zn-concentraties in verband gebracht met de vorming van ROS. Dit gebeurt waarschijnlijk via zijn capaciteit om gebonden ijzer, een redox-actief metaal, in DNA en proteïnen te vervangen. Een ander potentiël mechanisme is het stimulerend effect van Zn op de activiteit van ferrireductasen, die ook superoxide radicalen kunnen genereren [14]. Oxidatieve stress is een verstoring van het evenwicht tussen reactieve zuurstofvormen (ROS) en de anti-oxidatieve verdediging. Tijdens zo'n stress situatie is de productie van ROS groter dan de cellulaire anti-oxidatieve bescherming. ROS, zoals  $O_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot OH$  en  $H_2O_2$ , kunnen serieuze toxische effecten op de celfunctie en celmetabolisme hebben, doordat ze verschillende biomoleculen kunnen schaden zoals DNA, proteïnen en membraanlipiden. ROS kunnen ook apoptose induceren [15, 16]. Andere oorzaken van overproductie van ROS kunnen een verstoring van het elektrontransportketen in het membraan van de mitochondriën zijn en een excessieve stimulatie van NAD(P)H oxidase. Naast de negatieve effecten kunnen ROS ook voordelig zijn, maar dan in lage concentraties. ROS zijn onder andere betrokken in de 'oxidative burst' als bescherming tegen pathogenen en ze spelen een rol in de cellulaire signaaltransductie die betrokken zijn in verschillende processen, zoals celgroei en differentiatie [17].

### 3.2 Cellulaire effecten

Toxische zinkconcentraties kunnen verschillende biomoleculen nadelig beïnvloeden. Uit een studie werd er geconcludeerd dat blootstelling aan een toxische zinkconcentratie de hoeveelheid oplosbare proteïnen in de cel significant vermindert. Dit zou een indicatie kunnen zijn van een verstoorde proteïnesynthese in de cel [13]. Het exacte moleculaire mechanisme en oorzaak van deze verstoring is nog onduidelijk. Het zou kunnen dat het een onrechtstreeks effect is van zink, waarin de Zn-geïnduceerde ROS de oorzaak zijn. ROS kunnen de structuur



en functie van proteïnen beschadigen door additie van carbonylgroepen, fragmentatie en crosslinking met DNA of andere proteïnen [15, 16, 18].

Andere onrechtstreekse toxiciteiten van Zn, via oxidatieve stress, zijn DNA-schades die tot mutaties leiden, een verhoogd risico op kanker, celdood en andere genotoxische gevolgen. Dit kan te wijten zijn aan een verstoring van enzymen die verantwoordelijk zijn voor de replicatie en herstel van DNA of een rechtstreekse aanval van ROS op het DNA [15, 16, 18].

Zn-geïnduceerde ROS kunnen ook lipidenperoxidatie veroorzaken. De membranen rond cellen en organellen bevatten een grote hoeveelheid poly-onverzadigde vetzuren als zijketens. Schade aan deze onverzadigde vetzuren verlaagt de fluiditeit en dus ook de normale functie van de biologische membranen [15, 16].

Toxische Zn-concentraties inhiberen ook de opname van micronutriënten, zoals stikstof (N) en fosfaat (P). Een mogelijk onderliggend mechanisme hiervoor is de rol van zinkionen in de regulatie van genen die voor N- en P-transporters coderen. In planten werd al aangetoond dat zinkionen een belangrijke rol spelen in de transcriptie van genen die voor fosfaattransporters coderen. Het is nog onbekend of de fosfaattransporters in fungi Zn-afhankelijk zijn. Zink heeft ook een cruciale rol in het behouden van de stabiliteit van het membraan. Hierdoor heeft Zn dus een grote invloed op de activiteit van de membraangebonden protonpompende enzymen en protonkanalen. Verlies van de membraanintegriteit door een overmaat aan Zn kan dus leiden tot verstoring van de opname van nutriënten doorheen het plasmamembraan [12, 19].

### **3.3 Fysiologische effecten**

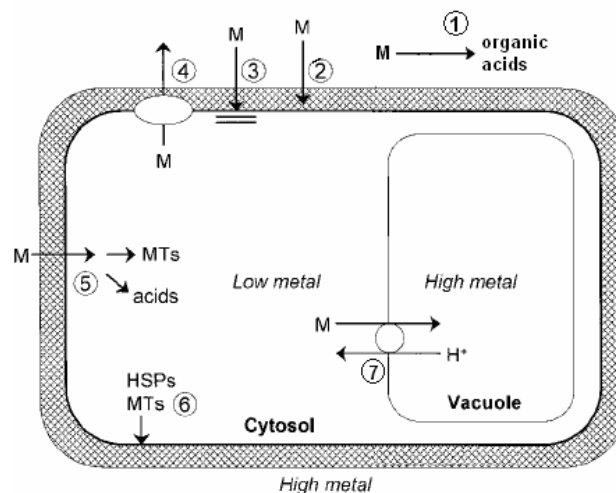
De cellulaire toxiciteiten van Zn en Zn-geïnduceerde oxidatieve stress hebben een invloed op verschillende fysiologische processen, zoals de groei, respiratie en morfologie van het organisme. Onderzoek met fungi en bacteriën heeft aangetoond dat een hoge concentratie aan Zn (10 mM) niet enkel de groeisnelheid vermindert, maar dat het ook een reductie van de overleving van deze micro-organismen kan veroorzaken [7]. Chaoui et al. hebben hetzelfde toxisch effect geobserveerd in bonen (*Phaseolus vulgaris* L.) na blootstelling aan 100  $\mu$ M Zn. Er werd een groeireductie van 28 % en 40 % waargenomen van respectievelijk de stengel en wortels [13].

#### 4 Verdedigingsmechanismen tegen metaalstress

De hierboven opgesomde toxiciteiten van Zn-stress kunnen voorkomen of beperkt worden door verschillende verdedigingsmechanismen in het organisme. Op cellulair niveau zijn er een aantal mechanismen die betrokken kunnen zijn in de detoxificatie van Zn. Deze mechanismen kunnen opgedeeld worden in directe en indirecte verdedigingsmechanismen. De directe mechanismen interageren met het metaal Zn en de indirecte mechanismen treden pas op nadat het metaal zijn toxische effecten heeft uitgeoefend. Dit laatste omvat dus mechanismen die zinkgeïnduceerde schadeprocessen tegengaan [20].

##### 4.1 Directe verdedigingsmechanismen

De directe verdedigingsmechanismen kunnen extra- en intracellulair zijn (figuur 1). Ondanks de extracellulaire verdedigingsmechanismen van de fungi, zoals gesecreteerde chelatoren en celwandbinding van zink, kan het zink nog onder sommige omstandigheden het cytosol binnendringen. Eens in de cel zullen de intracellulaire chelatoren, zoals metallothioneïnen, de vrije Zn-ionen vangen en/of opslaan in verschillende organellen. De zinktransportmechanismen die verantwoordelijk zijn voor de efflux van zink, kunnen ook meer gestimuleerd worden om het teveel aan Zn-ionen in het cytosol te verwijderen [21].



**Figure 1. Mechanismen voor metaaldetoxificatie in de cel [20]. 1. Extracellulaire chelatie door organische zuren. 2. Binding aan celwand. 3. Verminderde influx doorheen het plasmamembraan. 4. Actieve efflux in het apoplast. 5. Chelatie in het cytosol door verscheidene liganden. 6. Herstel en bescherming van het plasmamembraan en proteïnen in stresscondities. 7. Transport en accumulatie van metalen in het vacuole.**

##### 4.1.1 Exclusie

De eerste verdediging tegen Zn-stress van de fungi is exclusie. Bij exclusie behoren alle mechanismen die Zn verhinderen de cel binnen te treden en het actief naar buiten

transporteren van binnengekomen Zn (efflux). Hieronder spelen extracellulaire chelaterende organische zuren een belangrijke rol, zoals citroenzuren en oxaalzuren. Deze zuren kunnen vrijgelaten worden door funguscellen en zorgen voor een verlaagde beschikbaarheid aan vrije Zn-ionen [22].

Een ander belangrijk verdedigingsmechanisme dat bij exclusie hoort, is de celwand. De celwand van de fungus bestaat uit glucan-, chitin- en galactosamine-bevattende polymeren en een aantal proteïnen. Dus, er zijn genoeg potentiële bindingsites voor vrije metaalionen om elektrostatisch te binden aan geladen groepen, zoals vrije carboxyl-, amino-, hydroxyl-, fosfaat- en mercapto-groepen [22]. Opname van Zn-ionen kan ook tegengehouden worden door inhibitie van transportmechanismen (zoals ZRT1 en ZRT 2) in het plasmamembraan via negatieve feedback, in situaties waarin de cellulaire Zn-concentratie te fel stijgt (zie 5 Transportmechanismen van zink en 5.1 ZIP metaalionentransporters) [21].

#### **4.1.2 Intracellulaire chelatie**

Het mechanisme van de toxiciteit van zink is onbekend, maar er wordt gehypothetiseerd dat zink ongewenst kan binden met andere intracellulaire proteïnen, wat tot inactivatie van die proteïnen leidt. Het is dus heel belangrijk dat de intracellulaire concentratie van zink nauw gereguleerd wordt, zodat er voldoende zink is voor celgroei, zonder dat er teveel vrije Zn-ionen in het cytosol accumuleren. Intracellulaire chelatoren en zinktransporters, die voor de opslag van Zn-ionen in organellen of efflux van Zn doorheen het plasmamembraan zorgen, zijn de belangrijkste mechanismen voor de intracellulaire Zn-homeostase en detoxificatie van deze ionen [23]. Naast metallothioneïnen, werd er ook gehypothetiseerd dat chelaterende phytochelatines (PC) belangrijk kunnen zijn voor Zn-detoxificatie in fungi. Deze hypothese werd teniet gedaan door studies waarin ze aantoonde dat PC's geen rol speelden in de detoxificatie van Zn in fungus *Schizosaccharomyces pombe* [21]. Het is wel mogelijk dat de bijdrage van PC als detoxificatiemechanisme soort-afhankelijk is binnen het rijkdom van de fungi en dat PC's in andere soorten een significantere rol hebben.

#### *Metallothioneïnen*

Metallothioneïnen (MT) zijn cysteïnerijke, metaalbindende proteïnen. MT's komen in verschillende eukaryote en prokaryote organismen voor, inclusief de fungi. Ze spelen een rol in de homeostase van essentiële metalen en detoxificatie van niet essentiële metalen. MT's kunnen goed aan Zn-ionen binden door hun vele vrije thiolgroepen. Deze proteïnen zijn dus goede opslagplaatsen en detoxificatiemechanismen voor vrije cytosolische Zn-ionen.

MT's hebben ongeveer 61 aminozuren en ze hebben allemaal ongeveer dezelfde compositie. Het belangrijkste is dat alle MT's 20 cysteïne residuen bevatten, waarvan hun plaatsen in de aminozuursequentie zo goed als onveranderlijk blijven. Het zijn deze cysteïnen die met divalente ionen (zoals  $Zn^{2+}$ ) binden via thiolgroepen. MT kan 7 bivalente metaalionen binden voor elke 20 cysteïnen in zijn complex [24, 25, 20].

#### 4.1.3 Compartmentalisatie

De vacuole is een belangrijke opslagplaats van zink en speelt ook een significante rol in de detoxificatie van  $Zn^{2+}$ . Twee proteïnen, namelijk de zinktransporters Zrc1p en Cot1p, zorgen voor het transport van het teveel aan Zn-ionen van het cytosol naar de vacuole in *Saccharomyces cerevisiae* (zie 5 Transportmechanismen van zink). Studies hebben aangetoond dat deze 2 proteïnen vooral in het membraan van de vacuole gelokaliseerd zijn. Zrc1 en Cotp1 behoren beide tot de familie van de CDF transporters (zie ook 5 Transportmechanismen van zink en 5.2 CDF metaalionentransporters). Er wordt gesuggereerd dat het  $Zn^{2+}/H^+$  antiport mechanismen zijn [21].

#### 4.2 Indirecte verdedigingsmechanismen

De indirecte verdedigingsresponsen treden op nadat er schade is gericht door een overdaad aan Zn. Deze omvatten de stressproteïnen om de gedatureerde eiwitten te herstellen en de anti-oxidatieve verdediging om Zn-geïnduceerde oxidatieve stress tegen te gaan.

##### 4.2.1 Stressproteïnen

“Heat shock proteins” (HSP's) worden geïnduceerd door verschillende stressfactoren, zoals zware metalen, hitte en UV-stralingen. Ze worden ook stressproteïnen genoemd. Deze proteïnen worden in groepen verdeeld volgens hun moleculair gewicht. Hoog moleculair gewicht HSP's omvatten hsp90, hsp70 en hsp60, waarbij hun gewichten respectievelijk 90, 70 en 60 kDa zijn. Men heeft ook laag moleculair gewicht HSP's die een gewicht hebben van 16 tot 24 kDa en ubiquitine. Hsp90, hsp70 en hsp60 worden ook chaperones genoemd, omdat zij proteïnen beschermen onder stressomstandigheden en beschadigde proteïnen terug goed vouwen tot een functionele conformatie. Naast de beschermende functie, spelen HSP's een rol in de normale proteïnevouwing en –assemblage. Proteïnen die onherstelbare schade hebben ondergaan, worden aan ubiquitine gebonden. Ubiquitine helpt de proteïnen naar lysosomen migreren, waar ze afgebroken worden [18, 20].

## 4.2.2 Anti-oxidatieve verdediging

Organismen hebben verschillende anti-oxidatieve verdedigingsmechanismen om het teveel aan reactieve zuurstofvormen (ROS) in de cel beperkt te houden, zodat oxidatieve stress kan voorkomen worden. Er zijn 2 grote groepen anti-oxidatieve verdedigingsmechanismen, namelijk de niet-enzymatische anti-oxidanten en de enzymatische anti-oxidatieve verdediging [18].

### 4.2.2.1 De enzymatische anti-oxidatieve systemen

De enzymatische anti-oxidatieve verdedigingsmechanismen bevatten de superoxidedismutase (SOD), catalase, glutation-S-transferase (GST) en peroxidasen. Deze enzymen metaboliseren reactieve zuurstofvormen (ROS).

#### *Superoxidedismutase*

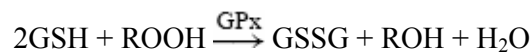
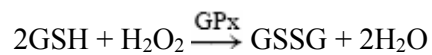
SOD's zorgen voor de reductie van superoxide radicalen in de cel door de volgende reactie te katalyseren:  $2\text{O}_2^{\circ-} + 2\text{H}^+ \xrightarrow{\text{SOD}} \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ . Superoxide radicalen worden dus omgevormd tot minder reactieve waterstofperoxiden en zuurstof door SOD: de redoxeigenschap van het metaal in dit enzym wordt gebruikt om de superoxide radicalen te reduceren. Er zijn 3 verschillende isovormen van SOD's. De koper-zink-bevattende SOD's (CuZnSOD's) zijn vooral in het cytosol gelokaliseerd en in kleine hoeveelheden in de nucleus en tussen het binnen en buiten membraan van de mitochondriën. De mangaan SOD (MnSOD) is de 2<sup>de</sup> groep SOD's die vooral in de mitochondriën te vinden zijn. De 3<sup>de</sup> groep SOD's is de ijzer-bevattende SOD die in kleine hoeveelheden in het cytosol, mitochondriën en perixosomen gelokaliseerd zijn [18, 16].

#### *Catalase*

Catalase is een enzym dat aanwezig is in cellen van planten, dieren en micro-organismen. Dit enzym is vooral in de peroxisomen gelokaliseerd en is zeer efficiënt in het omzetten van waterstofperoxiden in water en moleculaire zuurstof ( $\text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{CAT}} 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ). Catalase is één van de belangrijkste anti-oxidanten om waterstofperoxiden te detoxifiëren. Eén molecuul catalase kan ongeveer 6 miljoen moleculen  $\text{H}_2\text{O}_2$  omzetten in water en zuurstof per minuut [26].

*Peroxidasen*

Peroxidasen zijn enzymen die  $\text{H}_2\text{O}_2$  detoxifiëren. Een voorbeeld van peroxidase is glutathionperoxidase (GPx). De selenium-afhankelijke glutathionperoxidasen (GPx) zorgen voor de reductie van peroxiden, zoals  $\text{H}_2\text{O}_2$ , door 2 elektronen toe te voegen. Hierbij worden selenolen (Se-OH) gevormd. Door het verwijderen van peroxiden kunnen deze moleculen niet meer als potentiële substraten gebruikt worden in de Fentonreactie. Hierdoor wordt de productie van hydroxyl radicalen ( $\bullet\text{OH}$ ) in de Fentonreactie voorkomen. GPx werkt samen met het tripeptide glutathion (GSH). Het substraat voor de katalytische reactie van GPx is  $\text{H}_2\text{O}_2$  of een organische peroxide ROOH. GPx zorgt voor de decompositie van peroxiden tot water en alcohol, terwijl GSH gereduceerd wordt [26]:



Een ander voorbeeld is ascorbaatperoxidase die aan de glutathion-ascorbaatcyclus deelneemt [28].

*Glutathion-S-transferasen*

Glutathion-S-transferasen (GST's) zijn enzymen die glutathion gebruiken in reacties die betrokken zijn in de transformatie van vele stoffen, inclusief carcinogenen, producten van oxidatieve stress en andere xenobiotica. GST's katalyseren de nucleofiele aanval van glutathion (GSH) op elektrofile substraten (RX), waardoor de reactiviteit van de elektrofile macromoleculen vermindert. De reactie gaat als volgt:  $\text{GSH} + \text{R-X} \xrightarrow{\text{GST}} \text{GSR} + \text{HX}$ . Dit enzym zorgt ervoor dat het substraat (RX) in de buurt komt van GSH door beide moleculen te laten binden op het enzym. Nadat GST de sulfhydryl groep in de GSH geactiveerd heeft, kan GSH zijn nucleofiele aanval uitvoeren op het elektrofile substraat R-X. De formatie van een thio-ether tussen de cysteine residuen van GSH en de elektrofiel resulteert vaak in een minder reactieve en meer wateroplosbaar product [26, 27].

**4.2.2.2 De niet-enzymatische anti-oxidatieve systemen**

Naast de enzymatische anti-oxidatieve systemen zijn er ook de niet-enzymatische anti-oxidatieve systemen die voor de detoxificatie van ROS zorgen. Tot deze groep behoren onder andere de anti-oxidanten vitamine C, vitamine E en glutathion [26].

*Vitamine C*

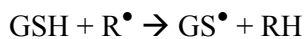
Vitamine C of ascorbaat komt voor in 3 vormen: in een fysiologische pH (pH: 7,2) komt 99,9 % van ascorbaat voor als gereduceerd ascorbaat (AscH<sup>-</sup>). De anti-oxidatieve chemie van ascorbaat vertrekt dus vanuit zijn gereduceerde vorm. AscH<sup>-</sup> wordt geoxideerd door veel ROS en wordt omgevormd tot een zwak reactieve radicaal AscH<sup>•</sup> [26].

*Vitamine E*

Vitamine E is een vetoplosbare vitamine in 8 verschillende vormen kan voorkomen, waarvan  $\alpha$ -tocoferol de actiefste vorm is.  $\alpha$ -Tocoferol is een sterk biologische anti-oxidant, waarvan aangenomen wordt dat het een belangrijk membraangebonden anti-oxidant is in de cel. Zijn voornaamste functie is bescherming tegen lipidenperoxidatie. Tocoferolen neutraliseren ROS door ze te reduceren [26, 28].

*Glutathion*

Het tripeptide glutathion ( $\gamma$ -glutamyl-cysteinyl-glucine) is een belangrijk thiol anti-oxidant dat in hoge concentraties (1-15 mM) in het cytosol, nucleus en mitochondriën voorkomt. De gereduceerde vorm is glutathion (GSH) en de geoxideerde vorm is glutathiondisulfide (GSSG). De reacties van glutathion met radicaal R<sup>•</sup> gaan als volgt:



Na reactie met radicaal R<sup>•</sup> ontstaat een thiylradicaal (GS<sup>•</sup>). Een thiyl radicaal vormt samen met een ander gevormde thiylradicaal een geoxideerde glutathion. Deze GSSG wordt terug gereduceerd tot GSH door glutathionreductase [26].

**5 Transportmechanismen van zink**

Er zijn verscheidene transporters die betrokken zijn in de opname, distributie, efflux en homeostase van Zn. Deze metaaltransporters kunnen een rol spelen in de tolerantie tegen toxisch Zn. Transporters die tot de ‘cation diffusion facilitator’ (CDF) en ZIP (Zrt-, Irt-like Protein) familie horen, spelen een belangrijke rol in het transport van zink in de cel. Ze komen in zoogdieren, bacteriën en fungi voor. De transporters van de ZIP familie spelen een belangrijke rol in de opname van Zn uit de omgeving. Deze transportproteïnen zijn in het plasmamembraan en de tonoplast gelokaliseerd [23, 29, 21].

De transporters van de CDF familie zorgen voor de efflux en compartimentalisatie van Zn-ionen door de metaal-ionen uit de cel te pompen of door ze in organellen, zoals de vacuole, op te slaan. Een beknopte weergave van de zinkhomeostase in *Saccharomyces cerevisiae* is te zien op figuur 2. Op deze figuur wordt maar een beperkt aantal ZIP (ZRT1, ZRT2 en ZRT3) en CDF (ZRC1 en COT1) leden getoond, omdat men van deze transporters zeker weet dat ze een belangrijke rol spelen in de zinkhomeostase en zinkdetoxificatie. Andere CDF leden en ZIP transporters kunnen ook een rol hebben in dit systeem, maar het is nog onbekend of ze daadwerkelijk in gisten voorkomen [23, 29, 21].

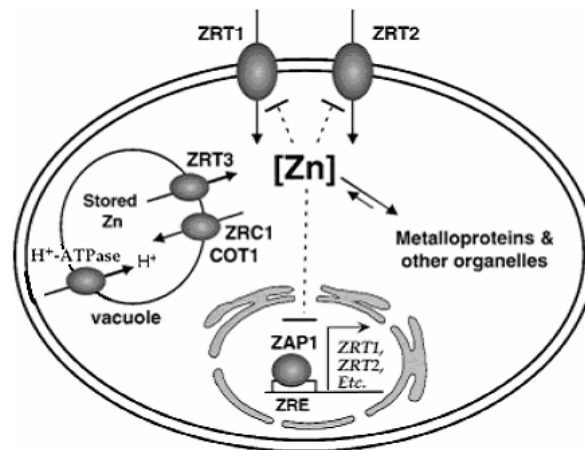


Figure 2. Zinkhomeostase in de fungus *Saccharomyces cerevisiae* [21].

### 5.1 ZIP metaalionentransporters

De ZIP transporters (=Zrt-, Irt-like Proteins) werden naar de 2 eerste geïdentificeerde leden van de familie genoemd, namelijk de Zrt1 (een Zn-influxtransporter) in *Saccharomyces cerevisiae* en de Irt1 (een ijzertransporter) in *Arabidopsis thaliana*. Ongeveer 85 familieleden werden al geïdentificeerd in bacteriën en in alle eukaryoten. De ZIP's worden in 4 subfamilies gegroepeerd op basis van het aantal geconserveerde sequenties: subfamilie I en II, gufA en LIV-1. In subfamilie I vindt men de meeste ZIP proteïnen van de fungi. Er wordt voorspeld dat de ZIP proteïnen 8 transmembranaire domeinen hebben, waarbij de amino- en carboxyluiteinden aan de buitenkant van het plasmamembraan gelegen zijn (figuur 3). De lengte van de verschillende ZIP leden kunnen sterk variëren door de aanwezigheid van de variabele regio tussen de transmembranaire domeinen TM-III en TM-IV. De functie hiervan is onbekend, maar het kan wel een potentiële metaalbindingsplaats zijn. De meest geconserveerde regio's liggen in TM IV-VIII. Deze regio's bevatten veel geconserveerde



histidines die deel kunnen uitmaken van de intramembranaire bindingsplaatsen voor Zn en die dus betrokken zijn in het zinktransport [23, 29].

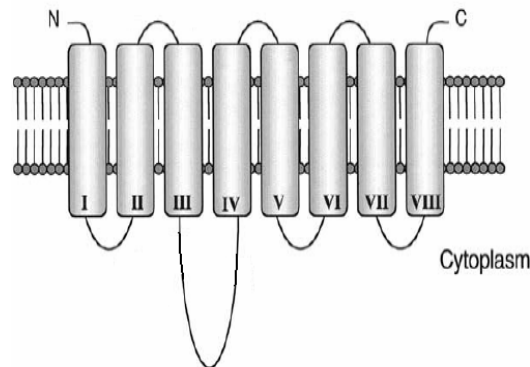


Figure 3. Een ZIP transporter met 8 voorspelde transmembranaire domeinen (I-VIII) [23].

Het transport mechanisme van ZIP proteïnen is nog steeds onduidelijk. Studies hebben aangetoond dat Zn-opname door de humane hZip2 zinktransporter energie-onafhankelijk is, terwijl zinktransporters Zrt1 en Zrt2 in de *Saccharomyces cerevisiae* energie-afhankelijk zijn. Andere mogelijkheden zijn influx van Zn door concentratiegradiënt van het metaalion en door de negatieve membraanpotentiaal in de cel die de opname van kationen bevordert [23, 29].

## 5.2 CDF metaalionentransporters

Transporters van de ‘cation diffusion facilitator’ (CDF) komen voor in schimmels, zoogdieren en planten. Ze zorgen voor de efflux en compartimentalisatie van Zn-ionen. Er wordt voorspeld dat deze proteïnen 6 transmembranaire domeinen hebben en dat ze intracellulaire N- en C-uiteinden bezitten. Deze uiteinden dienen als kationbindingsplaatsen. Eukaryote CDF leden hebben ook histidine-rijke TM IV en TM V domeinen die als zinkbindende regio’s kunnen functioneren (figuur 4). De lengte van de leden kunnen sterk variëren. Ze kunnen van 280 tot 740 aminozuren lang zijn [21].

Het transportmechanisme van de CDF proteïnen is ook nog onduidelijk. Studies van de ZnT-1 proteïne, een CDF proteïne in zoogdieren, toonden aan dat de activiteit van de zinktransporter niet afhankelijk was van ATP. Zn-efflux via CDF-proteïnen is waarschijnlijk een actief mechanisme, omdat de intracellulaire membraanpotentiaal van het plasmamembraan negatief is [23, 29]. Er wordt ook gesuggereerd dat de CDF transporters Zrc1 en Cot1 in het membraan van de vacuole  $Zn^{2+}/H^{+}$  antiport mechanismen zijn, waarbij de lage pH in het lumen van de vacuole de drijvende kracht is voor deze transporters [21].

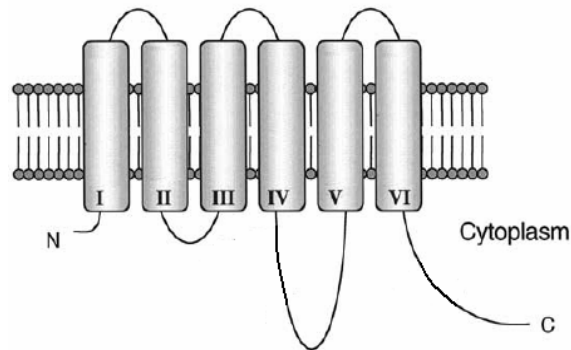


Figure 4. Een CDF transporter met 6 transmembranaire domeinen [23].

## 6 Zinktolerantie

Adaptieve tolerantie in een organismen gebeurt wanneer het organisme, dat een door metalen gecontamineerde site coloniseert, minder sensitief is aan hoge metaalconcentraties dan andere organismen van dezelfde soort die ongecontamineerde sites coloniseren. Deze verandering in sensitiviteit wordt veroorzaakt door selectie van genen die resistentie tegen metalen verlenen [30]. Adaptieve Zn-tolerantie binnen de *Suillus* soort werd eerder al gedemonstreerd [31].

Zn-exclusie mechanismen zijn hoogst waarschijnlijk betrokken in de natuurlijk geselecteerde adaptieve Zn-resistente *Suillus luteus*. Zn-resistente genotypes die behandeld werden met verschillende concentraties Zn, namen minder Zn op dan Zn-sensitieve isolaten [5].

Andere potentiële mechanismen die onlangs geïdentificeerd werden en die een rol kunnen spelen in de tolerantie tegen een overmaat aan metalen in de ECM fungi zijn: extra- en intracellulaire (metallothioneïnen en glutathion) chelaties van de metalen, metaalbinding aan componenten van de celwand, verhoogde efflux van het metaal uit het cytosol en compartimentalisatie. De extracellulaire chelatoren die door de funguscellen gesecreteerd kunnen worden zijn voornamelijk organische moleculen en zuren, zoals oxaalzuur [22]. In zinktolerante *Suillus luteus* isolaten was de expressie van aconitase hoger dan in sensitieve isolaten na blootstelling aan hoge concentraties Zn. Aconitase is een koolstofmetaboliserend enzym. Activatie van dit enzym kan tot de productie van metaalchelaterende organische zuren leiden die een bijdrage kunnen leveren aan zinktolerantie [14]. Tolerantie van de ECM fungus *Pisolithus tinctorius* werd al eerder geobserveerd aan de hand van de aanwezigheid van metallothioneïne-achtige peptiden die  $Zn^{2+}$  chelateren. Glutathion lijkt ook een rol te hebben in de metaaltolerantie [22].

## **7 Ectomycorrhiza fungus *Suillus luteus***

Ongeveer 25000 fungi, inclusief *Suillus luteus*, worden geclassificeerd tot het fylum Basidiomycota. Deze groep onderscheidt zich van de andere fyta door de aanwezigheid van een stokvormig reproductief orgaan, genaamd het basidium. Basidiomyceten zijn belangrijk voor het afbreken van hout van dode bomen en ander organisch plantenmateriaal. Dit fylum bevat non-mycorrhiza en mycorrhiza fungi en plantenparasieten. De fungus *S. luteus* behoort tot de ectomycorrhiza fungi [32].

Basidiomyceten zijn filamentvormige fungi die uit hyfen bestaan. Hyfen worden gevormd uit één of meerdere cellen die omgeven worden door een celwand. Ze kunnen uitgroeien tot een netwerk van filamenten, genoemd het mycelium. In de celwand zitten vooral chitines. Dit zijn polysacharidenpolymeren. Basidiomyceten planten zich seksueel voort via de vorming van een basidiocarp of het vruchtlichaam (de paddenstoel) die uit hyfen bestaat. Onder het hoedje van de paddenstoel, bevinden zich de basidia. Deze zijn gespecialiseerd in het produceren van sporen (basidiosporen). Sommige basidiomyceten kunnen zich ook asexueel voortplanten [33].

### **7.1 Mycorrhiza**

Mycorrhizae zijn mutualistische associaties tussen plantenwortels en fungi. Het woord mycorrhizae betekent “funguswortels”, verwijzend naar de structuren die gevormd worden door de wortels van planten en hyfen van de fungus. Ectomycorrhiza fungi omkapselen de wortels, zonder de wortelcellen te penetreren. Bijna de helft van alle paddestoelvormende basidiomyceten leven als mycorrhizae met eiken-, berken- en dennenbomen [32, 34, 37].

De mutualistische samenleving tussen planten en fungi zorgt ervoor dat de fungus veel voordelen uit deze gastvrije situatie haalt, zoals een constante voorraad aan suikers die gedoneerd wordt door de gastheerplant. In ruil hiervoor, verhoogt de fungus de absorptieoppervlakte van de gastheerwortels voor de opname van water, fosfaten, ammonium en andere mineralen uit de grond die hij doorgeeft aan de plant. De mycorrhiza fungi secreteren groeifactoren, die de wortels stimuleren om te groeien en te vertakken [35]. Mycorrhizae kunnen ook bacteriostatische en fungistatische stoffen produceren die de plant beschermen tegen pathogene bacteriën [36].

### **7.2 Doel van het onderzoek met *Suillus luteus* als studiemodel**

Organismen die blootgesteld worden aan hoge zinkconcentraties ondervinden een sterke selectiedruk. Deze selectiedruk kan tot het ontstaan van zink-tolerante populaties leiden, zoals

bij de *Suillus* populaties in Noord-Limburg. In *Suillus luteus* werd adaptieve Zn-tolerantie geobserveerd [31]. Om meer zicht en kennis te krijgen in het ontstaan van zinktoxiciteiten en adaptieve zinktolerantie wordt in dit onderzoek gebruik gemaakt van *S. luteus* als modelorganisme. Zn-sensitieve en Zn-tolerante isolaten worden in deze studie gebruikt en blootgesteld aan stijgende Zn-concentraties. Om meer inzicht te krijgen in de adaptieve Zn-tolerantiemechanismen zullen verschillende enzymen en genen, die een rol zouden kunnen spelen in Zn-tolerantie, bestudeerd worden.

---

# Hoofdstuk 2: Materialen en methoden

---

## 1 Fungusmateriaal

Er werd met zeven *Suillus luteus* isolaten geëxperimenteerd: drie Zn-sensitieve, twee Zn- en Cd-tolerante en twee Zn-tolerante isolaten. De Zn-sensitieve genotypes (P4, Mm7 en P13) waren afkomstig van Paal (P) en Maasmechelen (Mm), de Zn- en Cd-tolerante (Ds3 en Ls4) van Dilsen-Stokkem (Ds) en Lommel-Sahara (Ls) en de Zn-tolerante (Ds10 en Lm8) van Dilsen-Stokkem en Lommel-Maatheide (Lm).

De isolaten werden in cultuur gehouden in petriplaten met een vast Fries basismedium. Deze werden in een broedstoof op 23°C geplaatst om te groeien. Het Fries basismedium bevatte 1,5 mM  $(\text{NH}_4)_2$ tartraat; 0,4 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,2 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,3 mM NaCl; 20  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,8  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 6  $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 4  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 28 mM D-glucose; 0,8% agar en vitaminen. De vitaminen bevatten 56  $\mu\text{M}$  *myo*-inositol; 0,1  $\mu\text{M}$  biotine; 0,5  $\mu\text{M}$  pyridoxine; 0,3  $\mu\text{M}$  riboflavine; 0,8  $\mu\text{M}$  nicotinamide; 0,7  $\mu\text{M}$  *p*-aminobenzoëzuur; 0,3  $\mu\text{M}$  thiamine en 0,2  $\mu\text{M}$  Ca-panthotenaat. De pH van het medium werd gecorrigeerd naar 4,8. Het Fries medium werd eerst gesteriliseerd door het te autoclaveren, voordat de fungi erin overgebracht werden.

Na incubatie in de broedstoof werden de isolaten overgebracht in vloeibare media onder de flowkast, zodat de fungi homogeen blootgesteld konden worden aan Zn. De vloeibare media bevatten dezelfde nutriënten en vitaminen als het vast Fries basismedium, maar zonder agar. De pH werd ook naar 4,8 gecorrigeerd. De mycelia werden eerst gemixed met een huishoudmixer (Philips® Essence) om kleinere funguspartikels te verkrijgen. Het mycelium werd nadien overgebracht in een erlenmeyer samen met 150 ml vloeibaar Fries medium en op een schudplaat gezet voor incubatie. Het medium in de erlenmeyers werden 2 keer ververs: na 4 en 6 dagen incubatie. Bij de verversing werd telkens het oud vloeibaar Fries medium vervangen door nieuw vloeibaar Fries medium.

### *Zinkbehandelingen*

Na 9 dagen incubatie in vloeibaar Fries medium werden de isolaten blootgesteld aan 20, 200, 500 en 1000  $\mu\text{M}$  Zn. De verschillende zinkcondities werden verkregen door toevoeging van  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  aan het vloeibaar nutriëntenmedium. Eén gram fungusbiomassa werd

overgebracht in een petriplaat samen met 30 ml vloeibaar medium. Dit vloeibaar medium werd met zink behandeld. Na 24 uren Zn-blootstelling in de petriplaten werden de fungi geogst en werd het vers gewicht bepaald. De mycelia werden per 0,5 of 1 gram in zilverpapier gewikkeld, in vloeibaar stikstof ingevroren en nadien op  $-70^{\circ}\text{C}$  bewaard, zodat later de biochemische en moleculaire parameters bepaald konden worden.

## **2 Metaalextracties**

Nadat de stalen gedroogd werden in een lyofilisator, werd het gedroogd fungusmateriaal opgelost in 2 ml  $\text{HNO}_3$  (supra pure). Vervolgens werd met behulp van een verwarmblok de temperatuur verhoogd tot  $60^{\circ}\text{C}$  en nadien gradueel verhoogd tot  $130^{\circ}\text{C}$  om het zuur uit te dampen. De verkregen as (fungus) werd nadien nog eens opgelost in 1 ml  $\text{HNO}_3$ . De temperatuur werd opnieuw opgedreven tot 60 graden en nadien gradueel tot  $130^{\circ}\text{C}$ . Deze laatste oplossing en zuurverdamping werden 2 keer uitgevoerd. Hierna werd de as in 1 ml  $\text{HCl}$  (supra pure) opgelost. De temperatuursverhoging verliep analoog met de temperatuursverhoging bij de oplossing in  $\text{HNO}_3$ . De laatste bekomen as werd opgelost in 300  $\mu\text{l}$  20%  $\text{HCl}$  (supra pure). Deze oplossing werd aangelengd tot 2%  $\text{HCl}$  door 2700  $\mu\text{l}$  millipore water toe te voegen. Van deze oplossingen werd de concentratie aan zink bepaald met behulp van Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES).

## **3 Lipidenperoxidatie bepaling**

Hydroperoxiden, afkomstig van peroxyradicalen en door peroxidatie van vetzuren, zijn de oorzaak van de afbraak van het celmembraan. Malondialdehyde (MDA) is een voorbeeld van membraanire afbraakproducten. Het niveau van de lipidenperoxidatie wordt aan de hand van de gevormde MDA's gemeten met behulp van een fotospectrofotometer (Shimadzu UV-1602).

Het fungusweefsel (ongeveer 0,5 g/staal) werd eerst homogeen gemaakt in 1 ml 0,1 % TCA (trichloorazijnzuur) met mortier en stamper. Hierna werd het fungusweefsel gedurende 10 minuten aan 18949 x g gecentrifugeerd (Jouan<sup>®</sup> MR 22i centrifuge, Saint Herblain, Frankrijk). Vervolgens werd er met het supernatans verder gewerkt: 0,4 ml supernatans werd bij 2 ml 0,5 % TBA (thiobarbituurzuur is mengsel van 0,5% TBA en 20% TCA) gevoegd in proefbuizen. Een blanco met 2 ml 0,5 % TBA en 0,4 ml 0,1 % TCA werd ook aangemaakt. Deze proefbuizen werden 30 minuten bij  $95^{\circ}\text{C}$  in het waterbad gezet. Nadien werden ze

afgekoeld in een ijsbad en opnieuw gecentrifugeerd (10 minuten lang aan 18949 x g). Na het centrifugeren werd het supernatans geanalyseerd met behulp van een lichtspectrometer bij een golflengte van 532 nm en 600 nm. Bij een lipidenperoxidatie reactie wordt er een roodkleurige malonaldehyde-TBA complex gevormd. Dit complex heeft een maximale absorptie bij een golflengte van 532 nm. De hoeveelheid gevormde malonaldehyde-TBA is een maat voor de hoeveelheid opgetreden lipidenperoxidatie. Andere componenten die ook met TBA kunnen binden (TBA-reactieve substanties), zoals suikers en aldehyden, hebben een maximale absorptie bij een golflengte van 600 nm. Hierdoor wordt ook de absorptie bij 600 nm gemeten om de metingen te corrigeren.

#### **4 Spectrofotometrisch bepalen van enzymactiviteiten**

De activiteit van de enzymen superoxidedismutase, glucose-6-fosfaat dehydrogenase, catalase en glutathion-S-transferase werden bepaald met behulp van een spectrofotometer.

##### **4.1 Extractie**

De fungistalen werden homogeen gemaakt met behulp van een mortier en een stamper, nadat aan 0,5 g fungiweefsel 2 ml extractiebuffer (mengsel van 0,1 M Tris HCL, 1 mM ethyleendiamine tetra-acetaat (EDTA) en 1 mM dithiotreitol (DTT), pH: 7,8), onoplosbare polyvinylpyrolidone (PVP) en inert zand toegevoegd werden. Vervolgens werden ze gedurende 10 minuten bij 4°C (Jouan<sup>®</sup> MR 22i centrifuge, Saint Herblain, Frankrijk) aan 18949 x g gecentrifugeerd. Nadien werd er met het supernatans verder gewerkt voor de bepaling van de enzymactiviteiten.

##### **4.2 Spectrofotometrisch bepalen van enzymactiviteiten**

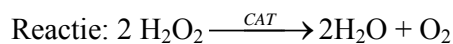
De activiteiten van sommige enzymen (superoxidedismutase en catalase) om ROS te verwijderen, werden aan de hand van een fotospectrometer (Shimadzu UV-1602) bepaald. De activiteit van glucose-6-fosfaat dehydrogenase (G-6P-DH) werd ook gemeten. G-6P-DH is een enzym dat NADP<sup>+</sup> reduceert tot NADPH [38].

Veel biologische componenten absorberen licht. Substraten en reactieproducten van enzymatische omzettingen kunnen bepaalde lichtgolven absorberen in de UV- of zichtbare regio. Volgens de wet van Lambert-Beer ( $E = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$ , met  $E$  = extinctie of absorptie,  $\epsilon_{\lambda}$  = extinctiecoëfficiënt,  $c$  = concentratie en  $d$  = afstand van de afgelegde weg van het licht) is de concentratie van een bepaalde molecuul recht evenredig met de hoeveelheid licht dat het

molecuul absorbeert. Aan de hand van de volgende formule werd de enzymactiviteit berekend: 
$$\frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\Delta E}{\Delta t} \cdot \frac{1}{\epsilon_{\lambda} \cdot d}$$

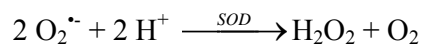
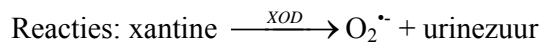
Aan de hand van  $\epsilon_{\lambda}$ , de verandering in absorptie per tijdseenheid ( $\Delta E / \Delta t$ ) en  $d$  kan men de verandering van de concentratie van een substraat of reactieproduct ( $\Delta c$ ) bepalen. Op basis van  $\Delta c$  kan de enzymactiviteit berekend worden. De enzymactiviteit wordt uitgedrukt in Units (U). Eén Unit staat gelijk voor 1  $\mu\text{mol}$ /minuut weggereageerde substraat of gevormde product. In de extracten werd de enzymactiviteit van de volgende enzymen bepaald:

#### *Catalase (CAT)*



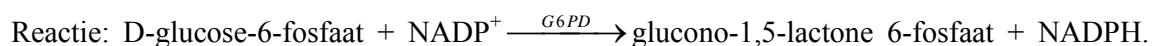
De enzymcapaciteit van catalase om waterstofperoxiden om te zetten tot water en zuurstof, werd bepaald door de  $\text{H}_2\text{O}_2$ -decompositie te volgen bij een golflengte van 240 nm. Hierbij werd een 1,5 ml UV-cuvet gevuld met 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  buffer (pH: 7), 5mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  en 50  $\mu\text{l}$  extract.

#### *Superoxidedismutase (SOD)*



Superoxideradicalen ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ) worden aangemaakt vanuit xantine met behulp van het enzym xantine oxidase (XOD). De gevormde superoxideradicalen zorgen voor de reductie van cytochroom c. De reductie van cytochroom c door  $\text{O}_2^{\cdot -}$  wordt geïnhibeerd door superoxidedismutase (SOD). Deze inhibitie wordt als een maat voor de enzymactiviteit van SOD gebruikt. Het gevormde gereduceerde cytochroom c werd bij een golflengte van 550 nm gevolgd. Hiertoe werd een 1,5 ml plasticen cuvet gevuld met 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  buffer (pH: 7,8); 0,1 mM cytochroom c; 0,5 mM xantine, 1 mM EDTA), 100  $\mu\text{l}$  extract en 20 maal verdund XOD. De enzymactiviteit van SOD wordt uitgedrukt in Units, waarbij 1 Unit overeenkomstig is met 50 % inhibitie van de cytochroom c reductie.

#### *Glucose-6-fosfaat dehydrogenase (G-6P-DH)*



Glucose-6-fosfaat dehydrogenase heeft de capaciteit om D-glucose-6-fosfaat en  $\text{NADP}^+$  om te



vormen tot respectievelijk glucono-1,5-lactone 6-fosfaat en NADPH. De enzymactiviteit van G-6P-DH werd bepaald door het gevormde NADPH te volgen bij een golflengte van 340 nm. Hiertoe werd een 1,5 ml plasticen cuvet gevuld met 0,05 M Tris buffer (pH: 7,6); 0,1 M  $MgCl_2$ ; 0,03 M glucose-6-fosfaat; 0,04 M NADP en 50  $\mu$ l extract.

## **5 RNA-extractie en Real Time PCR**

De genexpressie van verschillende genen onder invloed van toenemende zinkconcentraties werd met behulp van een real-time PCR (ABIprism<sup>®</sup> 7000 Applied Biosystems, Lennik, België) uitgevoerd.

### **5.1 RNA-extractie**

De fungusstalen werden, onder bevroren condities, homogeen gemaakt met een stamper en mortier. Daarna werd het RNA geëxtraheerd met behulp van de Qiagen<sup>®</sup> RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Westburg, Nederland). De RNA-extractie werd volgens de instructies van de firma uitgevoerd. De verkregen extracten werden nadien ingevroren met vloeibaar stikstof en bewaard in -70 °C.

### **5.2 RNA-concentratie bepaling en kwaliteitscontrole**

De concentratie en zuiverheid van het geëxtraheerd RNA werd via spectrometrie met de nanodrop (GeneQuant<sup>®</sup> Pro Classic, Roosendaal, Nederland) gemeten. Dit systeem meet de absorptie van de RNA-stalen bij de golflengten 230, 260 en 280 nm. De bekomen RNA-concentratie (ng/ $\mu$ l) werd automatisch berekend via de formule  $40 \times A_{260}$ . Eén  $OD_{260}$  bij een golflengte van 260 nm komt overeen met 40 ng RNA/ $\mu$ l. De gebruikte reagentia van de RNeasy Mini Kit en bepaalde componenten van de celwand hebben een maximale absorbantie bij een golflengte van 230 nm. Het RNA in de stalen wordt gezien als zuiver RNA en vrij van deze reagentia, wanneer  $A_{260}/A_{230} > 1,8$ . Bovendien zullen eiwitten een maximale absorbantie vertonen bij een golflengte van 280 nm. Het RNA-staal wordt beschouwd als vrij van eiwitten, als  $A_{260}/A_{280} > 2$ .

De integriteit van het RNA werd ook bepaald met de Bio-analyzer (Agilent<sup>®</sup>, California, Verenigde Staten). De bio-analyzer is een soort van elektroforese, waarbij 18S en 28S als duidelijke pieken waar te nemen moeten zijn.

### 5.3 Synthese van cDNA

Door reverse transcriptie werd het RNA omgezet in cDNA (copyDNA). Dit gebeurde met behulp van ‘QuantiTect Reverse Transcription Kit’ (Qiagen, Venlo, Nederland). Alles werd volgens bijgeleverde instructies van de firma uitgevoerd. De reactie werd uitgevoerd met 960 ng RNA per staal op een conventioneel PCR toestel (iCycler thermal Cycler, Biorad, Nazareth, België). Het bekomen 20 µl cDNA werd nadien 10 keer verdund in RNase-vrij water.

### 5.4 Real-Time PCR: kwantitatieve analyse van genexpressie

De verdunde cDNA stalen werden onderworpen aan een Real-Time PCR (ABIprism® 7000 Applied Biosystems, Lennik, België). De Real-Time PCR werd uitgevoerd met ‘Plexor™ One step qRT-PCR System’, volgens de bijgeleverde instructies van de firma. In de stalen werd de expressie van 4 genen, coderend voor glyceraldehyde 3-fosfaat dehydrogenase (GAPDH), mannose-6-fosfaat dehydrogenase, glutation-S-transferase (GST) en thioredoxine nagegaan. Actine werd als huishoudgen gebruikt. In de ‘wells’ van de PCR wellplaten werden de volgende componenten toegevoegd: 20 µl Plexor™ Master Mix (2X) en 5 µl verdund cDNA. Deze wellplaten werden nadien in de Real-Time PCR gestoken. De PCR-cyclus bestond uit de volgende stappen: 2 minuten op 95° C, 5 seconden op 95° C en 35 seconden op 60 °C. De laatste 2 stappen werden 45 maal herhaald. Door n keer de laatste 2 stappen te herhalen, zal het cDNA geamplificeerd worden tot 2<sup>n</sup> exemplaren.

Het genexpressieniveau werd berekend aan de hand van de formule  $2^{-\Delta Ct}$ , waarbij  $\Delta Ct = Ct_{\text{target gen}} - Ct_{\text{huishoudgen}}$ .

**Tabel 1. Sequentie en lengte van de gebruikte primers.**

Doelwitgen	Primer	Sequentie
Actine	forward	5'-GGCCACACGAAGCTCATTATAGAAT-3'
	reverse	5'-CTTGACCCTAAAGTACCCTATCGAG-3'
GAPDH	forward	5'-ATCTATGCAGGGCATCACTATGG-3'
	reverse	5'-CAACGTAGTCTGAGGTCTTACCATAC-3'
Mannose-6-fosfaat dehydrogenase	forward	5'-GTCCAAAAGAACAGTCGCTTTCG-3'
	reverse	5'-GCTGCATATGTCGGTACTGGAAATTAC-3'
GST	forward	5'-TATGCGGACATCCTCGTGGCAA-3'
	reverse	5'-CTCCCTCCATTCCAAGAGCTGA-3'

## **6 Statistische analyse**

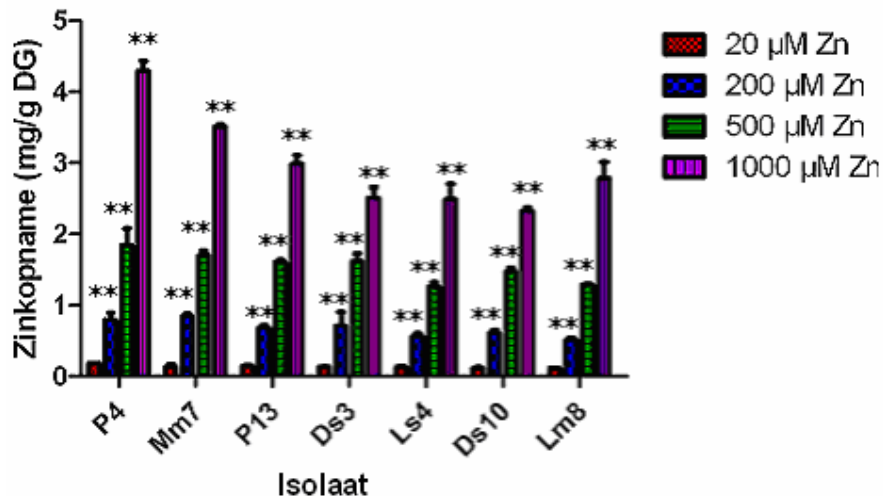
De statistische analyses werden uitgevoerd met de twee-weg ANOVA en Bonferroni of met de Kruskal-Wallisstoets en Dunn test.

# Hoofdstuk 3: Resultaten

In deze studie werd er gebruik gemaakt van 7 *Suillus luteus* isolaten (3 sensitieve isolaten (P4, Mm7 en P13), 2 Zn en Cd tolerante isolaten (Ds3 en Ls4) en 2 Zn tolerante isolaten (Ds10 en Lm8)) die 24 uur lang blootgesteld werden aan 20 (controle), 200, 500 en 1000  $\mu\text{M}$  Zn. De bekomen resultaten worden in dit hoofdstuk besproken.

## 1 Zinkopname

De zinkopname in de verschillende isolaten werd bepaald, omdat de blootstellingsconcentratie niet altijd evenredig is met de zinkconcentratie die opgenomen wordt in de cel. De zinkopnames van de sensitieve en tolerante isolaten worden ook met elkaar vergeleken om na te gaan of de sensitieve isolaten meer of minder Zn opnemen dan de tolerante isolaten. Hierdoor kan er vastgesteld worden of de opnamemechanismen van Zn al dan niet verstoord werden in de Zn-tolerante en/of de Zn-sensitieve isolaten door blootstelling aan het zware metaal.

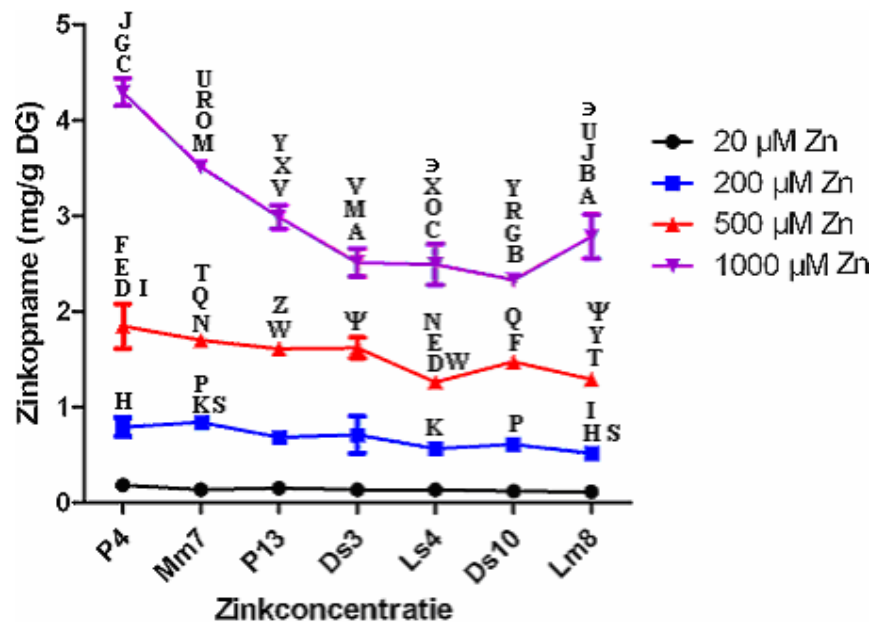


**Figuur 5.** Zinkopname na 24 uur blootstelling aan 20 (controle), 200, 500 en 1000  $\mu\text{M}$  Zn. De Zn-opname wordt weergegeven als (mg zink)/(g DG). De bekomen resultaten zijn het gemiddelde van 3 herhalingen. De S.E. worden weergegeven als verticale lijnen. De significante verschillen t.o.v. de controle: \*\*  $P < 0,001$  (Twee-weg ANOVA en Bonferroni). DG, droog gewicht.

Na blootstelling vertonen alle isolaten hetzelfde profiel: de Zn-opname in de isolaten stijgt significant ten opzichte van de controle, naarmate de behandelingsconcentraties aan Zn groter worden (figuur 5).

De zinkopnames tussen de sensitieve en tolerante isolaten verschillen ook significant van elkaar (figuur 6). De sensitieve isolaten P4, Mm7 en P13 vertonen significant hogere zinkopnames ten opzichte van de tolerante isolaten Ds3, Ls4 en Ds10 na blootstelling aan 200, 500 en/of 1000  $\mu\text{M}$  Zn. De zinkopname van tolerante isolaten kan zelfs tot 45,8% (Ds10 t.o.v. P4) minder zijn dan de sensitieve.

De Zn/Cd-tolerante isolaten (Ds3 en Ls4) en zinktolerante isolaten (Ds10 en Lm8) vertonen ook significante verschillen van elkaar. Ds3 en Ls4 vertonen significant lagere zinkopnames t.o.v. Lm8 1000  $\mu\text{M}$  Zn.



Figuur 6. Zinkopname na 24 uur blootstelling aan 20 (controle), 200, 500 en 1000  $\mu\text{M}$  Zn. De bekomen resultaten zijn het gemiddelde van 3 herhalingen. De standaard fouten (S.E.) worden weergegeven als verticale lijnen. Waarden die aangegeven worden met dezelfde hoofdletters of symbolen vertonen significante verschillen op  $P < 0,05$  (twee-weg ANOVA en Bonferroni). DG, droog gewicht.

## 2 Biomassa bepaling

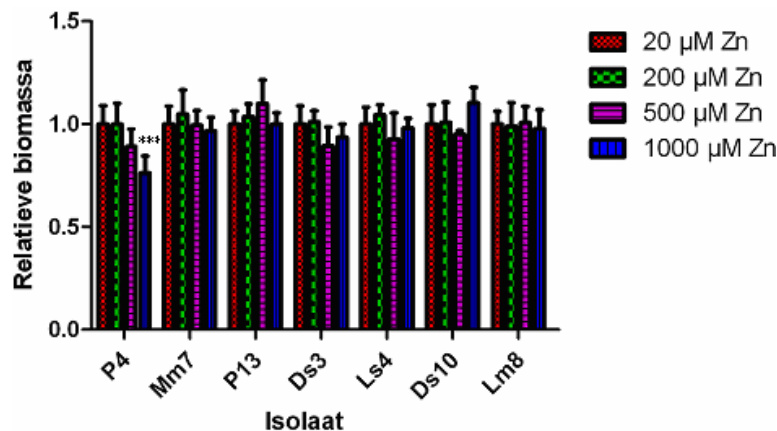
Na blootstelling aan 20, 200, 500 en 1000  $\mu\text{M}$  Zn, werd de relatieve biomassa (ten opzichte van de controle) van de verschillende stalen bepaald om de invloed van Zn op de groei van de fungi weer te geven. De biomassa van de sensitieve en tolerante isolaten werd met elkaar vergeleken om na te gaan of tolerant of sensitief zijn een rol speelt in de zinktoxiciteit.

De Zn-blootstelling heeft in het algemeen geen invloed op de (relatieve) biomassa van de tolerante en sensitieve isolaten ten opzichte van hun respectievelijke controles, behalve in het

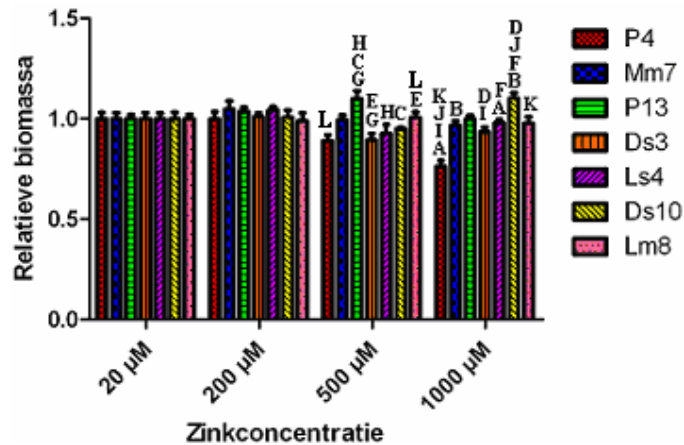
sensitieve isolaat P4 (figuur 7). Dit isolaat vertoont een significant ( $P < 0,001$ ) lagere relatieve biomassa bij blootstelling aan 1000  $\mu\text{M}$  Zn.

Als de sensitieve en tolerante isolaten met elkaar vergeleken worden, kan men waarnemen dat hun relatieve biomassa's van elkaar verschillen. Het sensitieve isolaat P4 vertoont een significant lagere relatieve biomassa bij 1000  $\mu\text{M}$  Zn, vergeleken met de Zn/Cd- en Zn-tolerante isolaten Ds3, Ls4, Ds10 en Lm8 (figuur 8, aangeduid met A, I, J, K en L). Mm7 heeft een significant lagere biomassa ten opzichte van de tolerante Ds10 bij 1000  $\mu\text{M}$  Zn-blootstelling (figuur 8, aangeduid met B). Het sensitieve isolaat P13 heeft een significant grotere biomassa dan de resistente isolaten, na blootstelling aan 500  $\mu\text{M}$  Zn (figuur 8, aangeduid met C, G en H).

De Zn/Cd tolerante (Ds3 en Ls4) isolaten vertonen pas een significant lagere biomassa ten opzichte van de Zn-tolerante isolaten (Ds10 en Lm8) na blootstelling aan hogere Zn-concentraties, namelijk 500 of 1000  $\mu\text{M}$  Zn (figuur 8, aangeduid met D, E en F).



**Figuur 7.** De relatieve biomassa (t.o.v. de controle) van de verschillende isolaten na 24 uur blootstelling aan 20 (controle), 200, 500 en 1000  $\mu\text{M}$  Zn. De bekomen resultaten zijn het gemiddelde van 8 herhalingen. De 'standard errors' (S.E.) zijn weergegeven als verticale lijnen. De significante verschillen t.o.v. de controle: \*\*\*  $P < 0,001$  (Twee-weg ANOVA en Bonferroni).



**Figuur 8.** De relatieve biomassa (t.o.v. de controle) van de verschillende isolaten na 24 uur blootstelling aan 20 (controle), 200, 500 en 1000 µM Zn. De bekomen resultaten zijn het gemiddelde van 8 herhalingen. De 'standard errors' (S.E.) zijn weergegeven als verticale lijnen (Twee-weg ANOVA en Bonferroni). De waarden die aangeduid worden met dezelfde hoofdletters vertonen significante verschillen van elkaar op  $P < 0,05$  (E, F en L),  $P < 0,01$  (B en C) en  $P < 0,001$  (A, D, G, H, I, J en K).

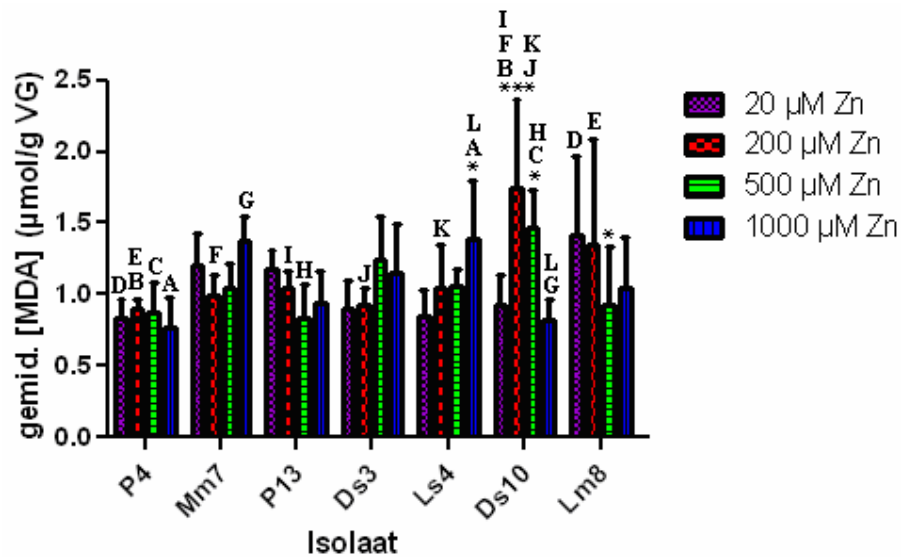
### 3 Lipidenperoxidatie

Malondialdehyde (MDA), een indicatie voor lipidenperoxidatie in cellen, werd gemeten om een beeld te krijgen van de globale stresstoestand en van de mate waarin schade toegebracht werd aan het plasmamembraan van de fungi.

In het algemeen heeft Zn-blootstelling geen invloed op de MDA-inhoud van de cellen in de tolerante en sensitieve isolaten ten opzichte van hun respectievelijke controle. Er zijn echter uitzonderingen, zoals Ls4, Ds10 en Lm8 (figuur 9, aangeduid met \*). Ls4 en Ds10 hebben meer MDA dan de controle en Lm8 minder.

Tussen de sensitieve en tolerante isolaten zijn er wel significante verschillen in MDA na blootstelling aan stijgende Zn-concentraties. Het sensitieve isolaat P4 vertoont een significant lagere MDA-inhoud, vergeleken met de tolerante isolaten Ls4, Ds10 en Lm8 bij 20, 200, 500 en/of 1000 µM Zn (figuur 9, aangeduid met A, B, C, D en E). P13 vertoont ook een lagere MDA ten opzichte van het isolaat Ds10 bij 200 en 500 µM Zn (figuur 9, aangeduid met H en I). De MDA-inhoud van isolaat Mm7 heeft een significant lagere MDA ten opzichte van Ds10 bij 200 µM, maar bij 1000 µM Zn heeft MDA een grotere MDA (figuur 9, aangeduid met F en G).

Als de Zn/Cd tolerante isolaten (Ds3 en Ls4) met de Zn-tolerante (Ds10 en Lm8) vergeleken wordt, dan zijn er significante verschillen merkzaam. Ds3 en Ls4 vertonen een significant lagere MDA ten opzichte van Ds10 en/of Lm8 bij 200 µM Zn (figuur 9, aangeduid met J en K).



Figuur 9. De gemiddelde MDA-concentratie in de verschillende isolaten na 24 uur blootstelling aan 20 (controle), 200, 500 en 1000 µM Zn. De bekomen resultaten zijn het gemiddelde van 3 herhalingen. De 'standard errors' (S.E.) zijn weergegeven als verticale lijnen. De significante verschillen t.o.v. de controle: \*  $P < 0,05$  en \*\*\*  $P < 0,001$  (Twee-weg ANOVA en Bonferroni). De waarden die aangeduid worden met dezelfde hoofdletters vertonen significante verschillen van elkaar op  $P < 0,05$  (E),  $P < 0,01$  (A, C, D, G en H) en  $P < 0,001$  (B, F, H, J en K). VG, vers gewicht.

#### 4 Bepaling van de enzymactiviteiten

De activiteit van verschillende enzymen wordt gemeten om na te gaan of zinkgeïnduceerde oxidatieve stress specifieke anti-oxidatieve verdedigingsmechanismen stimuleert in de tolerante isolaten.

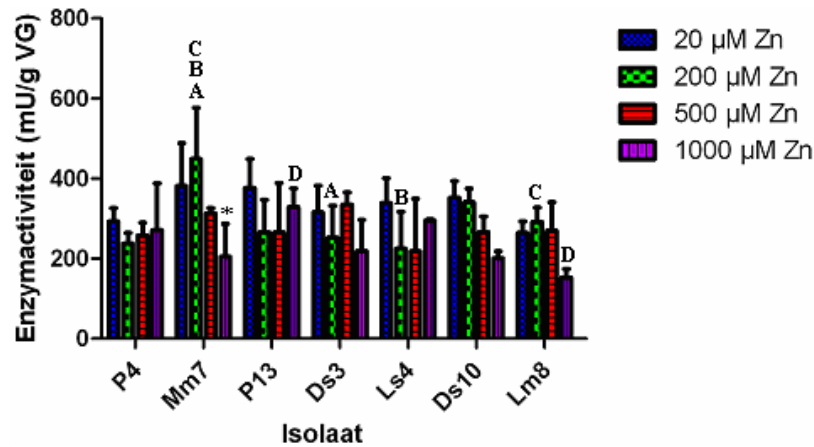
##### *Catalase*

Blootstelling aan de verschillende zinkconcentraties heeft in de isolaten geen invloed (ten opzichte van de controle) op de activiteit van catalase, behalve in het Zn-sensitieve isolaat Mm7. Pas na blootstelling aan 1000 µM Zn, vertoont Mm7 een significant lagere catalase-activiteit ten opzichte van de controle (figuur 10).

Wanneer de sensitieve isolaten (P4, Mm7 en P13) vergeleken worden met de tolerante isolaten (Ds3, Ls4, Ds10 en Lm8), kan men verschillen in de catalase-activiteit waarnemen. Mm7 heeft een grotere activiteit van catalase vergeleken met de Ds3, Ls4, Ds10 en Lm8 bij 200 µM Zn (figuur 10, aangeduid met A, B en C). P13 vertoont een significant grotere enzymactiviteit, vergeleken met Lm8 bij 1000 µM Zn (figuur 10, aangeduid met D).

De enzymactiviteit in de Zn/Cd- en in Zn-tolerante isolaten vertonen geen significante verschillen van elkaar.





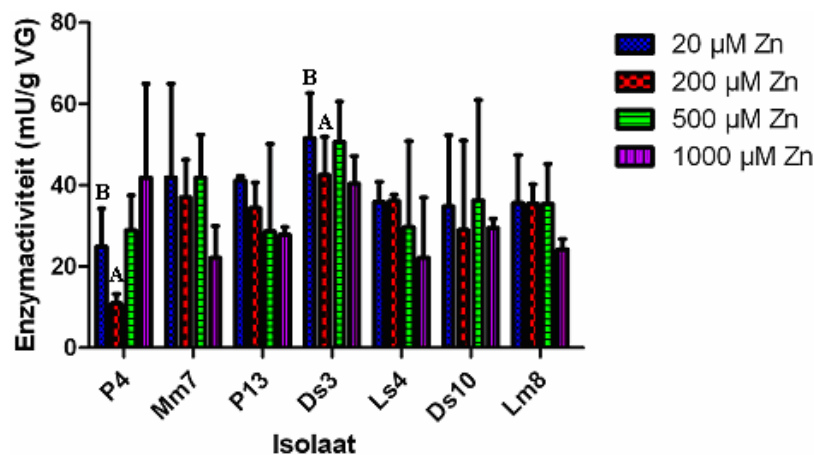
**Figuur 10.** De gemiddelde enzymactiviteit van catalase in de verschillende isolaten na 24 uur blootstelling aan 20 (controle), 200, 500 en 1000 µM Zn. De bekomen resultaten zijn het gemiddelde van 3 herhalingen. De ‘standard errors’ (S.E.) zijn weergegeven als verticale lijnen. De significante verschillen t.o.v. de controle: \*  $P < 0,05$  (Twee-weg ANOVA en Bonferroni). De waarden die aangeduid worden met dezelfde hoofdletters vertonen significante verschillen van elkaar op  $P < 0,05$  (C en D) en  $P < 0,01$  (A en B). VG, vers gewicht.

### *Superoxidedismutase*

Blootstelling aan 200, 500 en 1000 µM Zn heeft geen invloed op de activiteit van SOD (ten opzichte van de overeenkomstige controles) in de tolerante en sensitieve isolaten (figuur 11).

In het algemeen vertonen de sensitieve en tolerante isolaten ook geen significante verschillen van elkaar in de SOD-activiteit, behalve tussen het sensitieve isolaat P4 en de Zn/Cd tolerante isolaat Ds3 bij 20 en 200 µM Zn (figuur 11, aangeduid met A en B).

De enzymactiviteit in de Zn/Cd- en in Zn-tolerante isolaten vertonen geen significante verschillen van elkaar.



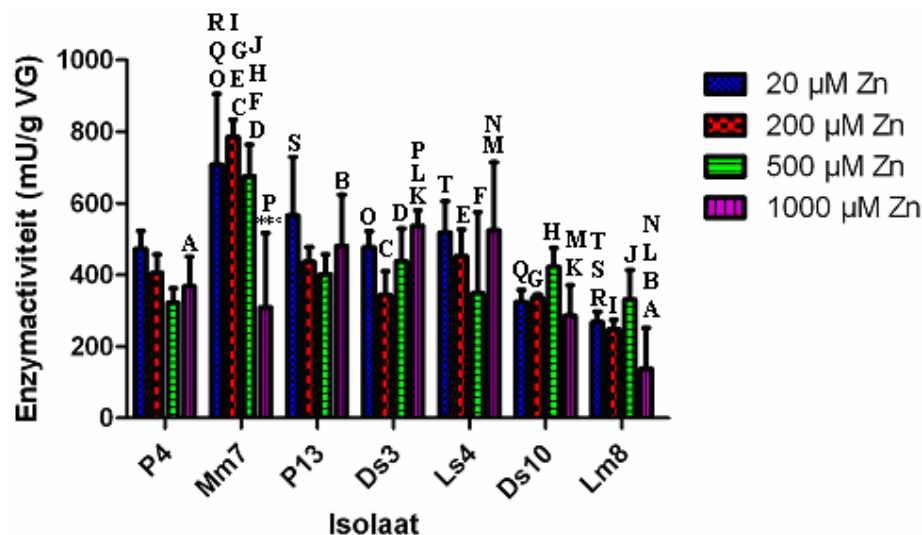
**Figuur 11.** De gemiddelde enzymactiviteit van superoxidedismutase (SOD) in de verschillende isolaten na 24 uur blootstelling aan 20 (controle), 200, 500 en 1000 µM Zn. De bekomen resultaten zijn het gemiddelde van 3 herhalingen. De ‘standard errors’ (S.E.) zijn weergegeven als verticale lijnen. De waarden die aangeduid worden met dezelfde hoofdletters vertonen significante verschillen van elkaar op  $P < 0,05$  (Twee-weg ANOVA en Bonferroni). VG, vers gewicht.

*Glucose-6-fosfaat dehydrogenase*

In het algemeen heeft blootstelling aan hoge zinkconcentraties geen invloed op de enzymactiviteit van glucose-6-fosfaat dehydrogenase, behalve in het Zn-sensitieve Mm7 (figuur 12). Mm7 heeft een significant lagere enzymactiviteit bij 1000  $\mu\text{M}$  Zn, ten opzichte van de controle.

Wanneer de sensitieve isolaten (P4, P13 en Mm7) vergeleken worden met de tolerante isolaten (Ds3, Ls4, Ds10 en Lm8), zijn er significante verschillen in de enzymactiviteit merkbaar. P4 en P13 hebben een significant grotere enzymactiviteit dan Lm 8 bij 1000  $\mu\text{M}$  Zn (figuur 12, aangeduid met A en B) en Mm7 heeft een significant grotere enzymactiviteit dan alle tolerante isolaten bij 200 en 500  $\mu\text{M}$  Zn (figuur 12, aangeduid met C, D, E, F, G, H, I en J).

De Zn/Cd-tolerante isolaten (Ds3 en Ls4) en de Zn-tolerante isolaten (Ds10 en Lm8) verschillen ook van elkaar in de enzymactiviteit. Ds3 en Ls4 vertonen significant grotere enzymactiviteiten ten opzichte van de Ds10 en Lm8 bij 1000  $\mu\text{M}$  Zn (figuur 12, aangeduid met K, L, M en N).



**Figuur 12.** De gemiddelde enzymactiviteit van glucose-6-fosfaat dehydrogenase in de verschillende isolaten na 24 uur blootstelling aan 20 (controle), 200, 500 en 1000  $\mu\text{M}$  Zn. De bekomen resultaten zijn het gemiddelde van 3 herhalingen. De 'standard errors' (S.E.) zijn weergegeven als verticale lijnen. De significante verschillen t.o.v. de controle: \*\*\*  $P < 0,001$  (Twee-weg ANOVA en Bonferroni). De waarden die aangeduid worden met dezelfde hoofdletters vertonen significante verschillen van elkaar op  $P < 0,05$  (A, O, D, P, H, K, M en T),  $P < 0,01$  (E, F en S) of  $P < 0,001$  (C, Q, G, R, I, J, B, L en N). VG, vers gewicht.

## 5 Genexpressie

De genexpressie van een aantal genen werd gemeten om na te gaan of de tolerante isolaten een gewijzigde genexpressie hebben ten opzichte van de sensitieve, als gevolg van de Zn-blootstelling. De gemeten genen (glyceraldehyde fosfaat dehydrogenase (GAPDH), glutation-S-transferase (GST), mannose-6-fosfaat dehydrogenase (M6PDH) en thioredoxine) coderen voor enzymen die een rol spelen in het anti-oxidatieve verdedigingsmechanisme. De statistische analyses van de genexpressies werden uitgevoerd met Kruskal-Wallis toets en Dunns meervoudige vergelijkingstoets.

Na statistische analyses, bleken de genexpressies van de 4 genen in de met zink blootgestelde sensitieve en tolerante isolaten niet significant te zijn ten opzichte van de controle (gegevens worden niet getoond). Enkel het Zn-tolerante isolaat Lm8 bleek een significant lagere GAPDH-expressie te hebben bij 1000  $\mu\text{M}$  Zn.

Wanneer de genexpressies van de 4 genen vergeleken worden tussen de tolerante en sensitieve fungi en tussen de Zn/Cd- en Zn-tolerante isolaten, zijn er ook geen significante verschillen waarneembaar (gegevens worden niet getoond).

---

# Hoofdstuk 4: Discussie

---

## 1 Zinkopname

Zowel bij de sensitieve als bij de tolerante isolaten kon er waargenomen worden dat de interne zinkconcentraties toenamen in functie van de stijgende blootstellingsconcentraties aan zink (fig. 5). Wanneer de sensitieve isolaten vergeleken worden met de tolerante, vertonen de tolerante isolaten duidelijk een lagere intracellulaire zinkaccumulatie. Het verschil werd duidelijker naarmate het externe Zn toenam (fig. 6). Dit kan erop wijzen dat exclusie van zink een potentieel mechanisme is in adaptieve zinktolerantie. De mogelijke exclusiemechanismen zijn binding van Zn aan de celwand, inhibitie van influxtransporters, stimulatie van efflux-pompen in het celmembraan, stimulatie van transporters die voor compartimentalisatie zorgen, verhoogde excreties van organische zuren die zinkionen kunnen chelateren en binding met intracellulaire chelatoren [22, 5]. Op basis van de bekomen resultaten kunnen we niet uitmaken welk mechanisme de meeste bijdrage levert. Het is wel mogelijk dat het een samenwerking is van al die mechanismen. Gelijkaardige resultaten werden eerder in een vorige studie waargenomen [5]. Eerder werd er aangetoond dat de Zn-tolerante *Suillus bovinus* een lagere Zn-influx heeft dan de sensitieve isolaten [39].

De Zn/Cd- en Zn-tolerante isolaten vertoonden ook significante verschillen van elkaar (fig. 6). De Cd/Zn tolerante isolaten hadden een lagere intracellulaire Zn-accumulatie dan de isolaten die enkel tolerant waren tegen Zn. Dit kan erop wijzen dat tolerantie tegen Zn en co-tolerantie tegen Zn en Cd verschillende mechanismen kunnen hebben.

## 2 Biomassa

Hoge concentraties aan zink kunnen de groeisnelheid en overleving van fungi, bacteriën en bonen reduceren [7, 13]. In onze studie hebben de hogere externe en intracellulaire zinkconcentraties geen significante invloed op de relatieve biomassa (ten opzichte van de controle) van de sensitieve en tolerante isolaten, behalve op het sensitieve isolaat P4 bij 1000  $\mu\text{M}$  Zn (fig. 7). Dit kan erop wijzen dat de gebruikte zinkconcentraties te laag waren om een significante verlaging van de biomassa te veroorzaken of dat de blootstellingstijd van 24 uren te kort was. Gelijkaardige resultaten werden in een andere studie ook geobserveerd.

Verscheidende fungi vertoonden geen significante daling in de biomassa na 2 en 3 dagen blootstelling aan 1000  $\mu\text{M}$  Zn [7]. Voor Zn-sensitieve *Suillus bovinus* bleek blootstelling aan 1000  $\mu\text{M}$  Zn voldoende te zijn om toxische effecten van Zn te ondervinden. De membraanintegriteit werd verstoord, waarbij kalium en fosfaten uit de cel lekten en de Zn-opname gereduceerd werd. De verminderde Zn-opname was waarschijnlijk te wijten aan een lagere biomassa [39]. Zelfs blootstelling aan een veel lagere Zn-concentratie, namelijk 76  $\mu\text{M}$ , reduceert de groei van zinksensitieve *Suillus bovinus* [12].

De sensitieve isolaten hadden een lagere (relatieve) biomassa dan de tolerante bij 500 of 1000  $\mu\text{M}$  Zn (fig. 8). Dit kan erop wijzen dat de sensitieve isolaten minder snel groeien dan tolerante fungi in hoge externe Zn-concentraties. Eerder werd ook al vermeld dat sensitieve isolaten meer Zn opnamen dan de tolerante (fig. 6). Dit kan de reden zijn waarom de sensitieve isolaten een lagere biomassa vertonen dan de tolerante, omdat ze meer Zn accumuleren en dus meer Zn-stress kunnen hebben die uiteindelijk tot inhibitie van de groei kan leiden.

Wanneer de Cd/Zn-tolerante isolaten vergeleken worden met de Zn-tolerante, kunnen we een significant lagere relatieve biomassa in de Cd/Zn-tolerante isolaten waarnemen bij 500 en 1000  $\mu\text{M}$  Zn (fig. 8). De Cd/Zn-tolerante fungi toonden eerder al een lagere Zn-opname te hebben dan de Zn-tolerante isolaten (fig. 6). Dit zou indicaties kunnen zijn voor een betere bescherming in de Zn-tolerante isolaten. Eveneens kan dit wijzen op verschillende tolerantiemechanismen in de Cd/Zn- en Zn-tolerantie.

### 3 Lipidenperoxidatie

Toxische Zn-concentraties worden in verband gebracht met de vorming van reactieve zuurstofvormen (ROS) en oxidatieve schade, zoals lipidenperoxidatie. Om de lipidenperoxidatie-status in cellen te bepalen, wordt vaak het gehalte aan malondialdehyde (MDA) gemeten [13, 14].

In onze studie hebben de blootstellingsconcentraties aan Zn in het algemeen geen significante invloed op de MDA-inhoud (ten op zichte van de controle) in zowel de sensitieve, als de tolerante isolaten (figuur 9). Er zijn echter uitzonderingen, namelijk de tolerante isolaten Ls4, Ds10 en Lm8. Blootstelling aan 100  $\mu\text{M}$  Zn bleek al voor een significante hogere MDA-vorming (ten opzichte van de controle) te zorgen in bonen, maar de blootstellingstijd was 96 uren [13]. Het feit dat MDA in onze studie niet significant beïnvloed werd door hoge Zn-concentraties, kan dus te wijten zijn aan een te korte blootstellingstijd (24 uren). Een andere

mogelijkheid is dat de gebruikte concentraties niet toxisch genoeg zijn om lipidenperoxidatie te veroorzaken. Dit laatste is zeer onwaarschijnlijk, aangezien 1000  $\mu\text{M}$  Zn toxisch genoeg is om een verstoring van de membraanintegriteit te veroorzaken in *Suillus bovinus* met het lekken van kalium en fosfaten als gevolg [39]. Het is zeer goed mogelijk dat Zn-geïnduceerde oxidatieve stress en lipidenperoxidatie de oorzaken waren voor deze lekkage. De uitzonderingen Ls4 en Ds10 hebben een grotere MDA-inhoud ten opzichte van de controle bij 200, 500 en/of 1000  $\mu\text{M}$  Zn, terwijl Lm8 een lagere MDA heeft bij 500  $\mu\text{M}$  Zn. Deze isolaten vertoonden ook grote standaard fouten. Deze uitzonderingen kunnen te wijten zijn aan grote individuele variaties binnen *Suillus luteus*. Hoge genetische en functionele diversiteiten komen vaak voor in *Suillus luteus* [44].

Wanneer de sensitieve isolaten vergeleken worden met de tolerante, kan men waarnemen dat de sensitieve isolaten een significant lagere MDA-inhoud hebben dan de tolerante (fig. 9). Dit kan erop wijzen dat de sensitieve isolaten minder Zn-geïnduceerde lipidenperoxidatie vertonen dan de tolerante. Een verklaring hiervoor is dat de Zn-geïnduceerde ROS in de sensitieve isolaten de expressie van anti-oxidatieve genen kan induceren als bescherming tegen oxidatieve stress en lipidenperoxidatie. Reactieve zuurstofvormen hebben namelijk ook een rol in de signaalcascade van de cel. Ze kunnen de genexpressie van verscheidene anti-oxidanten en anti-oxidatieve enzymen, zoals peroxidasen, stimuleren [45]. Een ander mogelijkheid is dat de activiteit van anti-oxidanten en anti-oxidatieve enzymen gestimuleerd worden door Zn-geïnduceerde ROS.

Tussen de Zn/Cd tolerante isolaten (Ds3 en Ls4) en Zn-tolerante (Ds10 en Lm8), waren er ook significante verschillen merkbaar in de MDA-inhoud. Ds3 en Ls4 hadden een lagere MDA-inhoud dan Ds10 bij 200  $\mu\text{M}$  Zn. Dit kan erop wijzen dat de anti-oxidatieve mechanismen om MDA-vorming tegen te gaan in Cd/Zn-tolerante en Zn-tolerante isolaten van elkaar kunnen verschillen. Dit wordt met enige voorzichtigheid gezegd, omdat Ds3 en Ls4 geen significante MDA verschillen toonden met het andere Zn-sensitieve isolaat Lm8.

#### **4 Enzymactiviteiten**

Op basis van de activiteiten van verschillende enzymen die in anti-oxidatieve systemen participeren, kan meer duidelijkheid geven of toxisch Zn oxidatieve stress in onze fungi veroorzaakt en of specifieke anti-oxidatieve enzymen een rol spelen in de zinktolerantie. Verschillende studies brengen hoge zinkconcentraties in verband met oxidatieve stress [13, 40].

Onze studie toonde aan dat hoge externe Zn-concentraties in het algemeen geen significante invloed hebben (t.o.v. de controle) op de catalase-activiteit in sensitieve en tolerante isolaten (fig. 10). Een gelijkaardig resultaat werd eerder ook al geobserveerd bij ratten. De activiteit van catalase om  $H_2O_2$  te detoxifiëren werd niet geïnhibeerd in astrocyten van ratten na 24 uren blootstelling aan 100 en 250  $\mu M$  Zn [40]. Dit kan erop wijzen dat de zinkconcentraties niet hoog genoeg waren om de catalase-activiteit te beïnvloeden, dat de blootstellingstijd te kort was of dat de fungi andere anti-oxidatieve systemen gebruiken om zich tegen mogelijke Zn-geïnduceerde ROS te beschermen.

De activiteit van catalase in de sensitieve en tolerante fungi verschillen wel significant van elkaar (fig. 10). De sensitieve isolaten Mm7 en P13 hebben een significant grotere enzymactiviteit dan de tolerante bij 200 of 1000  $\mu M$  Zn. Dit kan erop wijzen dat adaptieve tolerantie in deze fungi niet te wijten is aan een verhoogde activiteit van catalase.

De catalase-activiteit in de Zn/Cd en Zn-tolerante isolaten verschillen niet significant van elkaar (fig. 10). Dit kan er dus op wijzen dat Zn/Cd co-tolerantie ook niet te wijten is aan een verhoogde catalase-activiteit.

In tegenstelling tot de activiteit van catalase, waren er in de enzymactiviteit van superoxidedismutase (SOD) geen significante verschillen merkbaar tussen de controle zinkconcentraties en de grotere concentraties, tussen de sensitieve en tolerante isolaten en tussen de Zn/Cd- en Zn-tolerante fungi.

Op basis van de resultaten van de enzymactiviteiten van catalase en SOD kunnen we suggereren dat er misschien meer oxidatieve stress is in de sensitieve isolaten, omdat de catalase-activiteit in deze groep groter is. Waarschijnlijk is de zinkgeïnduceerde  $H_2O_2$  vorming belangrijker in deze isolaten en niet de  $O_2^{\bullet}$ -productie, omdat er geen respons was in de SOD-activiteit.

Glucose-6-fosfaat dehydrogenase (G6PDH) is een enzym dat  $NADP^+$  reduceert tot NADPH. Verschillende anti-oxidatieve verdedigingsmechanismen zijn NADPH-afhankelijk, zoals glutathionreductase die het anti-oxidant glutathion in zijn gereduceerde vorm houdt [38, 40]. G6PDH is dus een enzym in het pentose fosfaat 'pathway', een oxidatief mechanisme om energie te genereren in de vorm van NADPH. Onze studie heeft aangetoond dat de gebruikte hoge externe zinkconcentraties in het algemeen geen invloed hebben op de activiteit van glucose-6-fosfaat dehydrogenase (ten opzichte van de controle) (fig.12). Dit kan erop wijzen dat de oxidatieve energieproductie in de cellen niet beïnvloed werd door storing in de NADPH-aanmaak. In een vorige studie met *Heliscus submersus* was er wel een significante stijging van de G6PDH-activiteit merkbaar, maar de blootstellingstijd was wel 8 dagen [41].

De enzymactiviteit van G6PDH in de sensitieve en tolerante isolaten verschillen van elkaar. De sensitieve isolaten hebben significant grotere enzymactiviteiten dan de tolerante. Dit zou eventueel erop kunnen wijzen dat G6PDH geen deel uitmaakt in de Zn-tolerantie mechanismen in deze tolerante fungi en dat sensitieve isolaten meer energie nodig hebben voor hun metabolische en fysiologische processen.

De Zn/Cd tolerante isolaten hadden een grotere G6PDH-activiteit bij 1000  $\mu\text{M}$  Zn dan de Zn-tolerante. Aangezien we eerder gesuggereerd hebben dat G6PDH waarschijnlijk geen rol speelt in de Zn-tolerantie, kan deze variatie in enzymactiviteit te wijten zijn aan een individuele genetische gevoeligheid voor zink.

## 5 Genexpressie

Niet enkel op eiwitniveau, maar ook op het niveau van genexpressie kunnen cellen beïnvloed worden door toxische Zn-concentraties. Zink en Zn-geïnduceerde reactieve zuurstofvormen (ROS) kunnen de genexpressie van anti-oxidatieve verdedigingsmechanismen stimuleren, zoals thioredoxine reductase [14]. Hoge Zn-concentraties in de cel worden ook in verband gebracht met verstoring in de energieproductie door inhibitie van de glycolyse [42].

In onze studie waren er geen significante verschillen merkbaar in de genexpressies van glyceraldehyde fosfaat dehydrogenase (GAPDH), glutation-S-transferase (GST), mannose-6-fosfaat dehydrogenase (M6PDH) en thioredoxine na blootstelling aan de gebruikte zinkconcentraties. Alleen de tolerante Lm8 toonde een significant lagere GAPDH-expressie bij 1000  $\mu\text{M}$  Zn ten opzichte van de controle. Dit laatste kan erop wijzen dat dit tolerant isolaat minder energie verbruikt bij deze hoge Zn-concentratie. Thioredoxine reductase reduceert organische hydroperoxiden en  $\text{H}_2\text{O}_2$  tot onschadelijke producten, waarbij thioredoxine als elektrondonor gebruikt wordt [14]. GAPDH is een enzym dat een zeer belangrijke functie vervult in de glycolyse. GAPDH kan ook als anti-oxidant fungeren door binding met zinkionen aan te gaan. Een verhoging van de expressie van GAPDH werd eerder al geobserveerd in endotheelcellen van koeien die blootgesteld werden aan Zn [42]. M6PDH heeft een functie in de glycolyse. Mannose-6-fosfaat speelt een rol in de digestie van polysachariden en glycoproteïnen [43].

Tussen de sensitieve en tolerante isolaten was er ook geen significant verschil in de genexpressie waarneembaar. Door de enorme variatie in de genexpressie van de individuele fungusstalen en de daarmee gepaard gaande grote standaardafwijkingen, kon er ook geen opmerkelijke trends waargenomen worden. In een eerder uitgevoerde studie was er wel een



verandering in de GST-expressie merkbaar [14]. In deze studie vertoonde het zinktolerante Lm8 isolaat een lagere GST-expressie ten opzichte van het sensitieve P13 isolaat na blootstelling aan 1,5 en 3 mM Zn gedurende 7 dagen. De reden voor het feit dat onze resultaten niet overeenkomen kan het gevolg zijn van de tekorte blootstellingstijd van 24 uren en de lagere gebruikte zinkconcentraties.

Op basis van onze resultaten kunnen we concluderen dat de gebruikte Zn-concentraties geen invloed hebben op de genexpressie van het anti-oxidant thioredoxine, het anti-oxidatieve enzym GST en de enzymen M6PDH en GAPDH die belangrijk zijn in het energie metabolisme. Er kon ook geen link gemaakt worden tussen de genexpressie van deze genen en het zinktolerantiemechanisme, omdat er geen significante verschillen waren in de genexpressie tussen sensitieve en tolerante isolaten.

## **6 Algemene conclusie**

We kunnen concluderen dat de sensitieve isolaten in het algemeen een grotere catalase en G6PDH-activiteit hebben dan de tolerante. Deze grotere enzymactiviteiten kunnen het gevolg zijn van de grotere metaalopname in de sensitieve isolaten. Dit kan erop wijzen dat in de sensitieve isolaten meer Zn-geïnduceerde vorming van  $H_2O_2$  voorkomt en dat de sensitieve fungi meer energie nodig hebben om hun metabolische en fysiologische functies te onderhouden. De sensitieve fungi vertoonden ook een lagere MDA-inhoud te hebben dan de tolerante bij hoge Zn-concentraties. Deze lagere MDA is een indicatie voor een lagere lipidenperoxidatie in de sensitieve fungi, die verklaard kan worden door de grotere anti-oxidatieve enzymactiviteit van catalase. Hieruit kan men ook besluiten dat het negatieve effect van Zn op de biomassa van sensitieve isolaten waarschijnlijk niet veroorzaakt werd door oxidatieve stress. De gebruikte Zn-concentraties hadden ook geen invloed op de genexpressies van glyceraldehyde fosfaat dehydrogenase (GAPDH), glutation-S-transferase (GST), mannose-6-fosfaat dehydrogenase (M6PDH) en thioredoxine.

Op basis van onze resultaten kunnen we algemeen besluiten dat tolerantie tegen Zn waarschijnlijk niet te wijten is aan een verhoogde enzymactiviteit van catalase, superoxidedismutase en glucose-6-fosfaat dehydrogenase en aan een lagere lipidenperoxidatie. Een hogere exclusie van zink is waarschijnlijk de reden voor de Zn-tolerantie. Verder onderzoek is nodig om te bepalen welk exclusie-mechanisme de grootste bijdrage levert aan de tolerantie. Dit kan met behulp van fluorescerende Zn-merkers uitgevoerd worden

---

# Referenties

---

1. Duffus J.H. Heavy metals, a meaningless term? *Pure Appl. Chem.* 2002; 74 (5): 793-807.
2. Nies D.H. Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999; 51: 730-750.
3. Vanhecke W. Zware metalen. Vlaamse milieumaatschappij. 2007. URL: <http://www.vmm.be/lucht/luchtkwaliteit/luchtvervuilende-stoffen/welke/zware-metalen.html/?searchterm=zware%20metalen>
4. Giller K.E, Witter E, Mcgrath S.P. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil. Biol. Bioch.* 1998; 30 (10): 1389-1414.
5. Colpaert JV, Adriaensen K, Muller LAH, Lambaerts M, Faes C, Carleer R, Vangronsveld J. Element profiles and growth in Zn-sensitive and Zn-resistant Suilloid fungi. *Mycorrhiza* 2005; 15: 628-634.
6. Garrow J.S, James W.P.T, Ralph A. Human nutrition and dietetics. 10<sup>th</sup> ed. London: Churchill Livingstone; 2001.
7. Babich H, Stotzky G. Toxicity of zinc to fungus, bacteria and coliphages: influence of chloride ions. *Applied and environmental microbiology* 1978; 36 (6): 906-914.
8. Higdon J. Zinc. 2003. URL: <http://ipi.oregonstate.edu/infocenter/minerals/zinc/>.
9. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Enzymes: basic concepts and kinetics. In: W.H. Freeman and Company. *Biochemistry*. 5th ed. New York: W.H. Freeman and Company; 2003. p.189-225.
10. O'Dell BI. Role of zinc in plasma membrane function. *The journal of nutrition* 2000; 130: 1432S-1436S.
11. Truong-Tran AQ, Ho LH, Chai F, Zalewski PD. Cellular zinc fluxes and the regulation of apoptosis/gene-directed cell death. *The journal of nutrition* 2000; 130:1459S-1466S.
12. Adriaensen K, van der Lelie D, Van Laere A, Vangronsveld J, Colpaert J. A zinc-adapted fungus protects pines from zinc stress. *New phytologist* 2003; 161: 549-555.

13. Chaoui A, Mazhoudi S, Ghorbal MH, El Ferjani E. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science* 1997;127(2):139-147.
14. Muller L.A, Craciun A.R, Ruytinx J, Lambaerts M, Verbruggen N, Vangronsveld J, Colpaert J.V. Gene expression profiling of a Zn-tolerant and a Zn-sensitive *Suillus luteus* isolate exposed to increased external zinc concentrations. *Mycorrhiza* 2007. (In Press)
15. Davies K.J, Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society symposium* 1995; 61: p. 1-31.
16. Ames B.N, Shigenaga M.K, Hagen T.M. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America* 1993; 90 (17): p. 7915-7922.
17. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M.T.D, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry and cell biology* 2007; 39: p. 44-84.
18. Newman M.C, Unger M.A. Molecular effects and biomarkers: stress proteins. In:Lewis publishers. *Fundamentals of ecotoxicology*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Lewis publishers; 2003. p. 111-130.
19. Blaudez D, Botton B, Chalot M. Effects of heavy metals on nitrogen uptake by *Paxillus involutus* and mycorrhizal birch seedlings. *FEMS Microbiology* 2000; 33: p. 61-67.
20. Hall JL. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of botany* 2002; 366 (53): 1-11.
21. MacDiarmid C.W, Gaither L.A en Eide D. Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *The European Molecular Biology Organization Journal* 2000; 19 (12): 2845-2855.
22. Bellion M, Courbot M, Jacob C, Blaudez D, Chalot M. Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *Federation of European Microbiological Societies Microbiol. Lett.* 2006; 254: 173-181.
23. Gaither L.A. en Eide D.J. Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *Biometals* 2001; 14: 251-270.
24. Klaassen CD, Liu J, Choudhuri S. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annual review of pharmacology and toxicology* 1999; 39: 267-294.

25. Miles A.T, Hawksworth G.M, Beattie J.H en Rodilla V. Induction, degradation and biological significance of mammalian metallothioneins. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 2000; 35(1): 35-70.
26. Valko M, Rhodes C.J, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions* 2006; 160: p. 1-40.
27. Eaton DL, Bammler TK. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicological science* 1999; 49: 156-164.
28. McKersie BD. OXIDATIVE STRESS, University of Guelph. 1996. URL: <http://www.plantstress.com/Articles/Oxidative%20Stress.htm#lipid>.
29. Hall J.L, Williams L.E. Transition metal transporters in plants. *Journal of Experimental Botany* 2003; 54:2601-2613.
30. Meharg A.A. The mechanistic basis of interactions between mycorrhizal associations and toxic metal cations. *Mycological Research* 2003; 107: 1253-1265.
31. Colpaert JV, Muller LAH, Lambaerts M, Adriaensen K, Vangronsveld J. Evolutionary adaptation to Zn toxicity in populations of Suilloid fungi. *New Phytologist* 2004;162(2):549-559.
32. Campbell NA, Reece JB. Fungi. In: Addison Wesley. *Biology*. 6<sup>th</sup> ed. San Francisco: Addison Wesley; 2002. p. 616-632.
33. Carlile MJ, Watkinson SC, Gooday GW. The fungi as a major group of organisms. In: Elsevier. *The fungi*. 2<sup>nd</sup> ed. Amsterdam: Elsevier; 2006. p.1-9.
34. Campbell NA, Reece JB. Transport in plants. In: Addison Wesley. *Biology*. 6<sup>th</sup> ed. San Francisco: Addison Wesley; 2002. p. 748-766.
35. Campbell NA, Reece JB. Plant nutrition. In: Addison Wesley. *Biology*. 6<sup>th</sup> ed. San Francisco: Addison Wesley; 2002. p. 767-782.
36. Rillig MC, Mummey DL. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist* 2006; 171: p. 41-53.
37. Brundrett MC. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* 2002; 154: p. 275-304.
38. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. The Calvin cycle and the pentose phosphate pathway. In: W.H. Freeman and Company. *Biochemistry*. 5th ed. New York: W.H. Freeman and Company; 2003. p. 551-576.

39. Adriaensen K, Van Hees M, Vangronsveld J, Colpaert J.V. Altered zinc transport in the ectomycorrhizal fungus *Suillus bovinus* as a mechanism involved in zinc tolerance 2005. (Manuscript in preparation)
40. Bishop G.M, Dringen R, Robinson S.R. Zinc stimulates the production of toxic reactive oxygen species (ROS) and inhibits glutathione reductase in astrocytes. Free Radical Biology and Medicine 2007. Article in press.
41. Azevedo M.M, Carvalho A, Pascoal C, Rodrigues F, Cassio F. Responses of antioxidant defenses to Cu and Zn stress in two aquatic fungi. Science of total environment 2007; 377: p. 233-243.
42. Mounaji K, Vlassi M, Erraiss N.E, Wegnez M, Serrano A, Soukri A. In vitro effect of metal ions on the activity of two amfiban glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases: potential metal binding sites. Comparative biochemistry and physiology part B 2003; 135: p. 241-254.
43. King M.W. Metabolism of major non-glucose sugars, IU School of medicine. 2003. URL: [http://www.med.unibs.it/~marchesi/fruc\\_gal.html#mannose](http://www.med.unibs.it/~marchesi/fruc_gal.html#mannose).
44. Muller L.A.H, Lambaerts M, Vangronsveld J, Colpaert J.V. AFLP-based assessment of the effects of environmental heavy metal pollution on the genetic structure of pioneer populations of *Suillus luteus*. New Phytologist 2004; 164: p. 297-303.
45. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol. Rev. 2002; 82: p. 47-95.

## 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:

### **Adaptieve zinktolerantie mechanismen in het ectomycorrhiza fungus *Suillus luteus***

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,

**Sherwin Vaesen**

Datum: **19.06.2007**