

Invloed van metaalstress op de cellulaire redoxbalans van Arabidopsis thaliana

Liesbeth Lijnen

promotor :
dr. Ann CUYPERS

co-promotor :
Prof. dr. Jaak VANGRONSVELD

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



Inhoudsopgave

| | |
|--|----|
| Lijst met afkortingen | 1 |
| Voorwoord | 1 |
| Samenvatting | 1 |
| 1 Inleiding | 1 |
| 1.1 Cadmium | 1 |
| 1.1.1 Beschrijving en oorsprong | 1 |
| 1.1.2 Toxiciteit | 1 |
| 1.2 Koper | 3 |
| 1.2.1 Beschrijving en oorsprong | 3 |
| 1.2.2 Toxiciteit | 4 |
| 1.3 Oxidatieve stress | 5 |
| 1.3.1 Reactieve zuurstofvormen | 5 |
| 1.3.2 Cellulaire productie van reactieve zuurstofvormen | 6 |
| 1.3.3 Antioxidatieve verdedigingsmechanismen | 8 |
| 1.3.4 Biologische reacties van reactieve zuurstofvormen: Oxidatieve stress | 10 |
| 1.4 Doel van het onderzoek | 12 |
| 2 Materialen en methoden | 13 |
| 2.1 Plantenmateriaal en oogst | 13 |
| 2.2 Genexpressie-analysen | 14 |
| 2.2.1 RNA-extracties | 14 |
| 2.2.2 cDNA aanmaak | 14 |
| 2.2.3 Real-time kwantitatieve PCR | 15 |
| 2.2.4 Microarray | 16 |
| 2.3 MicroRNA bepaling | 17 |
| 2.4 Elementbepaling | 17 |
| 2.5 Enzymactiviteiten glutathion-S-transferase | 17 |
| 2.6 TBA-meting | 18 |
| 2.7 Microscopie | 19 |
| 2.7.1 Lichtmicroscopie | 19 |
| 2.7.2 Elektronenmicroscopie | 19 |
| 2.8 Statistische analyse | 19 |
| 3 Resultaten | 20 |
| 3.1 Genexpressie | 20 |
| 3.1.1 ROS-producerende enzymen | 21 |
| 3.1.2 Antioxidatieve verdediging | 23 |
| 3.1.3 Glutathiongerelateerde genen | 25 |
| 3.1.4 Metabolisme-geassocieerde genen | 27 |
| 3.2 microRNA | 31 |
| 3.3 Metaalbepalingen | 32 |
| 3.4 GST-enzymactiviteiten | 33 |
| 3.5 TBA-metingen | 33 |
| 3.6 Microscopie | 34 |
| 4 Discussie en conclusie | 36 |
| Referenties | 47 |

Lijst met afkortingen

| | |
|-------------------------|---|
| ABA | abscisinezuur |
| <i>AOX1</i> | gen dat codeert voor alternative oxidase 1 |
| <i>APX1, 2</i> | gen dat codeert voor ascorbaatperoxidase 1, 2 |
| <i>CAT1</i> | gen dat codeert voor catalase 1 |
| Cd | het scheikundig element cadmium |
| <i>CSD1, 2</i> | gen dat codeert voor koper-zink SOD 1,2 |
| Cu | het scheikundig element koper |
| <i>FSD1</i> | gen dat codeert voor ijzerSOD 1 |
| GAPDH | glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase |
| <i>GAPC, GAPDH</i> | genen die coderen voor subeenheden van GAPDH |
| GST | glutathion-S-transferase |
| <i>GST2, 6</i> | gen dat codeert voor GST2, 6 uit de phi-klasse |
| <i>GSTU26</i> | gen dat codeert voor GSTU26 uit de tau-klasse |
| GSH | gereduceerd glutathion |
| <i>GSH1</i> | gen dat codeert voor glutamaat cysteine ligase |
| <i>GSH2</i> | gen dat codeert voor glutathion synthase |
| Gpx | glutathion peroxidase |
| GR | glutathion reductase |
| H_2O_2 | waterstofperoxide |
| <i>LOX1, 2</i> | gen dat codeert voor lipoxygenase 1, 2 |
| MDA | malondialdehyde |
| <i>MRP4</i> | gen dat codeert voor het multidrug resistance-related protein 4 |
| <i>MSD1</i> | gen dat codeert voor mangaanSOD |
| MT | metallothioneïne |
| O_2^- | superoxide anion |
| $\cdot OH$ | hydroxylradicaal |
| <i>PAL1, 2</i> | gen dat codeert voor phenylalanine ammonium lyase 1, 2 |
| <i>PCSI</i> | gen dat codeert voor phytochelatin synthase 1 |
| <i>PRX33,34</i> | gen dat codeert voor peroxidase 33, 34 |
| <i>RBOHC, D, E en F</i> | gen dat codeert voor NADPH-oxidase C, D, E en F |
| ROS | reactieve zuurstofvormen |
| $ROO\cdot$ | peroxylradicaal |
| SOD | superoxidedismutase |
| TBA | thiobarbituurzuur |
| TCA | trichloorazijnzuur |

Voorwoord

Een half jaar stage zit erop, de thesis is klaar. Dit was nooit gelukt zonder de steun en hulp van een heel aantal personen.

Allereerst wil ik mijn promotor, dr. Ann Cuypers en copromotor, prof. dr. Jaco Vangronsveld, bedanken. Zij hebben mij de kans gegeven deze stage in het Centrum voor Milieukunde, aan te vatten en ze tot een goed einde te brengen. Bedankt voor de wijze raad en de tijd die jullie hebben vrijgemaakt voor het verbeteren van deze thesis en nog zoveel andere dingen.

Heel in het bijzonder zou ik drs. Karen Smeets willen bedanken. Zonder haar was het onmogelijk geweest om zoveel experimenten uit te voeren en zulke mooie resultaten te behalen. Ging het wat minder goed, of liep er eens iets fout, dan was Karen er altijd om me op te vangen en toverde ze een nieuw idee uit haar onuitputtelijke voorraad! Van het begin, het aanleren van de technieken, tot het einde, het nalezen en nalezen en nalezen van de thesis, stond ze altijd klaar met de glimlach.

Verder wil ik alle mensen in het labo, maar zeker ook mijn stagegenootjes, bedanken voor hun hulp, flexibiliteit en de fijne sfeer waar ze voor gezorgd hebben!

Mijn ouders, broer Pieter-Jan en vriend Frederik verdienen ook een speciale plaats in dit dankwoord. Zij hebben al die jaren altijd voor me klaargestaan, meegeleefd en steeds weer interesse getoond in mijn studie en de stage. Ze hebben me de kans gegeven om deze studie aan te vatten en gedurende deze vier jaar hebben ze me altijd de nodige steun, rust en ruimte gegund wanneer dit nodig was.

En dan als laatste, maar zeker niet minst belangrijke, wil ik mijn vriendinnen die ik tijdens deze studie heb leren kennen, bedanken voor de geweldige tijd die we samen hebben meegemaakt. Al die uren die we gezellig babbelend in het cafetaria hebben doorgebracht, de feestjes, de auto- en busritjes, noem maar op, het was keer op keer enorm leuk en gezellig!

Bedankt iedereen!

Samenvatting

Cadmium en koper behoren tot de groep van de toxische metalen en hebben een negatief effect op het milieu en de menselijke gezondheid. Koper is een essentieel metaal en is in kleine hoeveelheden nodig voor organismen. In grote hoeveelheden wordt het echter toxisch. Cadmium daarentegen is niet-essentieel en is al in lage concentraties toxisch voor organismen. Zowel cadmium als koper veroorzaken oxidatieve stress op cellulair niveau. De wijze waarop ze dit doen is echter verschillend. Koper is, in tegenstelling tot cadmium, een redoxactief element en kan rechtstreeks ROS induceren. Cadmium daarentegen kan enkel oxidatieve stress induceren via indirecte mechanismen zoals een activatie van NADPH oxidasen of via een inductie van lipidenperoxidatie door lipoxygenasen. Reactieve zuurstofvormen, die ontstaan nadat deze metalen worden opgenomen, zijn enerzijds zeer schadelijk voor het organisme, maar kunnen anderzijds eveneens een belangrijke signalisatiefunctie uitoefenen.

In deze thesis is met behulp van *Arabidopsis thaliana* als testorganisme onderzocht hoe en onder welke vorm oxidatieve stress tot stand komt na blootstelling aan realistische Cd- en Cu-concentraties. Hiertoe zijn *Arabidopsis* zaailingen opgekweekt op hydrocultuur en blootgesteld aan verschillende Cd- en Cu-concentraties. Met behulp van een microarrayexperiment is er een screening gebeurd naar de voornaamste pathways die gelinkt zijn aan oxidatieve stress.

Uit dit onderzoek kan besloten worden dat GSH een sleutelmetabool is in de verwerking van metalen in zowel wortel als blaadjes. GSH is een precursor voor fytochelatines en is op die manier belangrijk voor de complexatie van Cd. Na Cu-blootstelling is het gebruik van GSH voor fytochelatinesynthese mogelijk ondergeschikt aan het gebruik voor antioxidatieve verdediging. Ook voor GSH-gerelateerde enzymen en transporters werden transcriptionele veranderingen waargenomen na beide metaalbehandelingen. GSH blijkt dus een belangrijk verdedigingsmechanisme tegen metaaltoxiciteit, zowel voor complexatie, sequestratie en detoxificatie van metalen en in de antioxidatieve verdediging.

Tot slot blijken mitochondriën een belangrijke rol uit te oefenen na metaalstress. Dit werd duidelijk door het uitvoeren van de microarray. Mitochondriën zijn belangrijk voor de signaling van metaalstress. Verder onderzoek moet meer duidelijkheid geven over de rol van mitochondriën in metaalstress.

1 Inleiding

1.1 Cadmium

1.1.1 Beschrijving en oorsprong

Cadmium is een chemisch element dat behoort tot de groep van de toxische metalen. Het komt in relatief lage concentraties voor in de aardkorst. Er is één zeldzaam mineraal dat een tamelijk grote hoeveelheid Cd bevat, namelijk greenockiet waarin Cd onder de vorm van cadmiumsulfide (CdS) voorkomt. Andere natuurlijke bronnen van Cd zijn enerzijds de verwerking van rotsen waardoor Cd voornamelijk in rivieren terechtkomt en anderzijds vulkaanuitbarstingen en bosbranden waardoor het Cd in de lucht terechtkomt (1).

Een zeer belangrijke antropogene bron van Cd is de industrie. Wereldwijd wordt er ruwweg 13000 ton Cd per jaar geproduceerd. Het element kent verscheidene toepassingen. Het wordt gebruikt als pigment en chemische stabilisator. Verder wordt het gebruikt in nikkelcadmium batterijen, metaalcoatings of legeringen (1).

Omdat Cd chemisch gezien zeer gelijkaardig is aan zink (Zn) wordt het als een bijproduct tijdens Zn-ertsverwerking gewonnen. Het Cd dat op deze manier vrijkomt, is vluchtig en kan zich via de lucht verspreiden. Zo komt het, door adsorptie aan organisch materiaal, in de bodem terecht. Verder zijn meststoffen, industriële en agriculturele afvalstoffen en het afvalwater belangrijke bronnen van Cd-vervuiling in de bodem.

Via de bodem kan het Cd opgenomen worden door planten via hun wortels. Planten kunnen naast de bodem ook via de atmosfeer Cd opnemen. Op deze manier komt Cd, via de voedselketen (granen en gewassen), bij dier en mens terecht. Onrechtstreekse opname via het voedsel gebeurt door het eten van bijvoorbeeld orgaanvlees van schapen die door het grazen de planten hebben geconsumeerd. Hiernaast wordt de mens ook nog blootgesteld aan Cd door de inname van gecontamineerd water, inademing van vervuilde lucht of sigarettenrook (1-3).

1.1.2 Toxiciteit

Cd is een niet-essentieel element. Zijn toxiciteit komt er ondermeer door zijn hoge affiniteit voor sulfhydrylgroepen en doordat het moleculen zoals Zn en Ca kan vervangen en dus kan

interfereren met cofactor-gemedieerde metabole processen. Dit fenomeen wordt 'molecular mimicry' genoemd (4). Een ander, indirect, mechanisme is het ontstaan van oxidatieve stress.

Verscheidene dierexperimentele en humane studies tonen de toxiciteit van Cd aan ter hoogte van de nieren, lever, longen, hersenen, testes, etc.

Er zijn drie mogelijke routes waarlangs Cd-resorptie kan plaatsvinden. Deze zijn de longen, het spijsverteringsstelsel en de huid. Na resorptie komt een deel van het Cd in het bloed terecht waar het merendeel een complex vormt met albumine. Het eerste orgaan dat vervolgens bereikt wordt is de lever. Cd induceert op deze plaats de productie van metallothioneïne. Door hepatocyt necrose en apoptose komt het Cd-metallothioneïnecomplex terug in het bloed en kan het de nieren en andere organen bereiken (5).

Het Cd-metallothioneïne complex dat de nier bereikt, wordt gefilterd in de glomerulus en vervolgens gereabsorbeerd in de proximale tubulus. In deze tubuluscellen blijft het complex opgeslagen. Een toegenomen Cd-accumulatie in de nier leidt tot necrose van de tubulaire cellen, en dus nierbeschadiging (5).

Het toxisch effect van Cd op het bot werd duidelijk door ondermeer de Itai-Itai ziekte in Japan. De uitbraak van deze ziekte werd gekenmerkt door een groot aantal gevallen van vrouwen met ernstige renale en skeletale schade die geassocieerd was met het eten van Cd-vervuilde rijst. Het exacte mechanisme van de Cd-effecten op het bot is nog niet gekend. Wel zijn er verschillende mogelijke mechanismen geformuleerd. Indirect zou Cd de hydroxylatie van 25-hydroxycholecalciferol inhiberen, de urinaire excretie van calcium verhogen, de gastrointestinale calciumabsorptie verlagen of de parathyroid hormoon (PTH) stimulatie van adenylyclase verlagen. Het mogelijke directe mechanisme zou de invloed van Cd op de activiteit en het metabolisme van botcellen zijn (6-8).

Naast de effecten op het bot en de nieren heeft Cd ook een carcinogene werking. Recent is aangetoond dat er een associatie bestaat tussen de blootstelling aan Cd in de omgeving en een verhoogd risico op kanker (voornamelijk longkanker) (2). Deze studie, uitgevoerd op de Cadmibelpopulatie in Noord-Limburg, is de eerste die kanker epidemiologisch in verband brengt met Cd bij de gewone bevolking.

De aanwezigheid van Cd in de omgeving (water, bodem, lucht) heeft eveneens schadelijke effecten op planten. Algemeen gesteld veroorzaakt Cd in planten chlorose en krulling van de bladeren. Dit zijn tevens de belangrijkste en makkelijkst zichtbare symptomen van Cd-

toxiciteit. Verder vermindert Cd de groei van de plant, zowel in de wortels als in de bovengrondse delen (9).

In de meeste gevallen komt Cd binnen in de plant via de wortel waardoor deze als eerste schadelijke effecten ondervindt. Ter hoogte van de wortel inhibeert Cd de nitraatreductase-activiteit wat zorgt voor een reductie in de absorptie van nitraat en zijn transport van hieruit. Het Fe(III)reductase wordt eveneens geïnhibeerd ter hoogte van de wortel wat leidt tot Fe(II)deficiëntie en als gevolg een verstoorde fotosynthese. Naast dit effect is ook een verstoord chloroplastmetabolisme waargenomen door de inhibitie van de chlorofylbiosynthese en een verminderde activiteit van enzymen die betrokken zijn in CO₂ fixatie. In de aanwezigheid van Cd neemt de wortel minder mineralen op, aangezien Cd interfereert met de opname, het transport en het gebruik van water en verschillende elementen, waaronder Ca, Mg, P en K. Verder wordt de stomatale opening geïnhibeerd door de sterke interferentie met de mineralen K⁺, Ca²⁺ en abscisinezuur (ABA) in de sluitcellen. Naast deze effecten kan er ook een veranderde plasmamembraanpermeabiliteit zijn met als gevolg een verstoorde waterbalans en zelfs een vermindering in waterhoeveelheid.

Ook de oxidatieve mitochondriale fosforylatie wordt verstoord. Dit gebeurt mogelijk door een stijging in de passieve permeabiliteit voor H⁺ in de binnenste membraan. Tevens reduceert Cd de normale H⁺/K⁺ uitwisseling en de activiteit van het plasmamembraan ATPase significant. Verder wordt de activiteit van verschillende enzymen sterk beïnvloed en zelfs geïnhibeerd (9).

1.2 Koper

1.2.1 Beschrijving en oorsprong

Koper is een roodachtig metaal dat op natuurlijke wijze voorkomt in gesteenten, de ondergrond, water en sedimenten en in kleine hoeveelheden in de lucht. Het is een essentieel element voor alle gekende, levende organismen. Cu is een cofactor voor proteïnen betrokken in een grote verscheidenheid aan biologische reacties zoals fotosynthese, respiratie, weefselvorming, ijzermetabolisme, en verwijdering van vrije radicalen (1).

Cu kan op verschillende manieren in de omgeving terecht komen, ondermeer door verbranding van fossiele brandstoffen, via Cu-verwerkende bedrijven of als ontginningsafval. Cu wordt zeer intensief ontgonnen en gebruikt als metaal of in een legering voor de productie van bedrading, leidingen en andere producten zoals muntstukken. Verder worden Cu-componenten vaak gebruikt in de landbouw om plantziekten te bestrijden of in de

waterzuivering waarbij de gebruikte vorm van Cu CuSO_4 is. Ook op natuurlijke wijze kan Cu in de omgeving terecht komen. Dit gebeurt dan via vulkaanuitbarstingen, bosbranden, het rotten van vegetatie, enz.

Wanneer Cu in de bodem terechtkomt, kan het zich vasthechten aan organisch materiaal en andere componenten (zoals zand en klei), en wordt op deze manier dus niet ver verspreid. Wanneer het echter in water komt, kan de Cu-vervuiling zeer ver verspreiden. Cu breekt niet af in het milieu en accumuleert daarom in planten en dieren. Opname van Cu gebeurt via de lucht, (drink)water, voedselopname en door fysiek contact met de bodem die vervuild is met Cu (1,10).

1.2.2 Toxiciteit

Wanneer Cu in hoge concentraties voorkomt, kunnen er toxische effecten optreden. Deze toxiciteit blijkt vooral uit het feit dat in de omgeving van Cu-fabrieken waar de bodem sterk vervuild is met Cu, slecht een beperkt aantal planten kunnen groeien (1).

In tegenstelling tot Cd is Cu een redoxactief element. Dit betekent dat het element een redoxcyclus doorloopt en verhoogde en weer verlaagde oxidatietrappen bereikt. In de aanwezigheid van biologische reductantia (zoals GSH) kan Cu(II) gereduceerd worden tot Cu(I). Dit Cu(I) kan zorgen voor de vorming van het reactieve hydroxylradicaal door de decompositie van waterstofperoxide (Fenton reactie) (cfr. paragraaf 1.3).

Mensen kunnen blootgesteld worden aan Cu via verschillende routes waarvan de blootstelling via drinkwater, voedsel en inhalatie de voornaamste zijn. Na opname treedt schade op aan celmembranen doordat Cu kan binden aan sulfhydrylgroepen van membraanproteïnen en lipidenperoxidatie kan induceren (via het ontstaan van ROS). Een te hoge concentratie aan Cu kan in het menselijk lichaam leiden tot lever- en nierbeschadiging. De lever is de eerste plaats waar Cu-depositie gebeurt nadat het in het bloed terechtkomt. Hier bestaat er de mogelijkheid tot de vorming van levercirrose. In de nier kan acute tubulaire necrose ontwikkelen. Er zijn tevens tal van neurodegeneratieve aandoeningen geassocieerd met Cu-toxiciteit. De meest voorkomende zijn de ziekte van Alzheimer, de ziekte van Parkinson en amyotrofe laterale sclerose. De oorzaak van deze aandoeningen is mogelijk het ontstaan van reactieve zuurstofvormen (11).

Net zoals bij de mens veroorzaakt Cu in de plant schade aan de celmembranen. Op deze manier worden voornamelijk de chloroplasten, de wortels en de blaadjes beschadigd.

Cu-toxiciteit induceert ook morfologische veranderingen in de plant. Vaak voorkomend is groeireductie, een verdikking van de cuticula van de wortel, schade aan het meristeem en een verminderde wortel(haar)lengte. Een vermindering in wortelhaarproliferatie heeft een sterk effect op nutriëntopname en plantengroei. Cu heeft eveneens een negatief effect op de fotosynthese. Het fotosysteem II bevat bindingsplaatsen voor Cu met als gevolg de inactivatie van de fotosynthese (12, 13).

1.3 Oxidatieve stress

Alle dieren, planten en bacteriën, met uitzondering van enkele anaerobe en aerotolerante organismen, hebben zuurstof (O_2) nodig om te overleven. Ze gebruiken deze O_2 voor hun energiemetabolisme (elektronentransportketens) en respiratie. Ondanks het feit dat aërobe organismen zuurstof nodig hebben, is het een toxisch mutageen gas. Aërobe organismen zijn echter in staat de zuurstofbalans onder controle te houden door de ontwikkeling van antioxidatieve verdedigingsmechanismen (14).

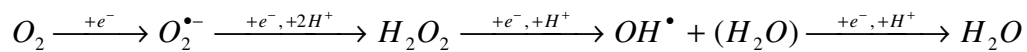
De schadelijke effecten van zuurstof zijn toe te schrijven aan de vorming van reactieve zuurstofvormen (Eng.: Reactive Oxygen Species: ROS). In normale omstandigheden is de vorming en verwijdering van ROS in evenwicht. Een verstoring van de balans tussen reactieve zuurstofvormen en de antioxidatieve verdediging, waarbij de balans meer overhelt naar de ROS, resulteert in oxidatieve stress. De balans kan op verschillende manieren verstoord worden. Allereerst kan er een verhoging in de vorming van reactieve zuurstofvormen optreden. Er kan echter ook een verminderde antioxidatieve verdediging zijn wat eveneens resulteert in een verstoord evenwicht. Daarnaast kan schade ook optreden door het falen van de herstelmechanismen van oxidatieve schade (15).

1.3.1 Reactieve zuurstofvormen

De reactieve zuurstofvormen kunnen ingedeeld worden in twee groepen: zuurstofradicalen en niet-radicalaire afgeleiden van O_2 . De zuurstofradicalen bevatten één of meer ongepaarde elektronen wat wil zeggen dat het elektron een atoomorbitaal op zichzelf bezet. Enkele voorbeelden van zuurstofradicalen zijn het superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) en het hydroxylradicaal

($\bullet OH$). Enkele voorbeelden van niet-radicalaire afgeleiden van O_2 zijn: waterstofperoxide (H_2O_2), hypochloorzuur ($HOCl$) en ozon (O_3).

Moleculair zuurstof, O_2 in de grondtoestand is weinig reactief. De reden hiervoor is de parallelle spin van de twee ongepaarde elektronen. Deze spinrestrictie maakt dat O_2 slechts traag kan reageren met niet-radicalen. Reactieve zuurstofvormen ontstaan op twee manieren, namelijk door de input van energie, waarbij de spinrestrictie wordt opgeheven en ‘singlet oxygen’ gevormd wordt, en door het toevoegen van elektronen (reductie). In vergelijking 1 is de reductie van zuurstof tot water weergegeven. Hierbij worden door de toevoeging van elektronen verschillende reactieve zuurstofvormen gevormd (14).



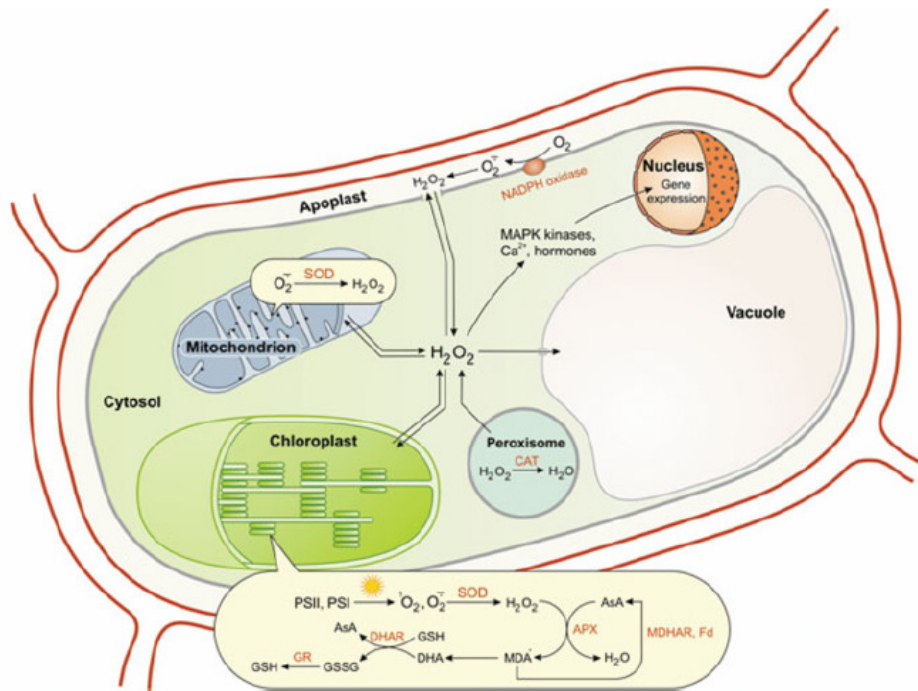
Vergelijking 1: Univalente reductie van zuurstof tot water

Er werd lang gedacht dat reactieve zuurstofvormen enkel schadelijk zijn voor het organisme. Nieuwe inzichten tonen echter aan dat ROS ook nuttig zijn voor het organisme. Ze vervullen een rol als signaalmoleculen waarbij ze betrokken zijn in de controle en regulatie van biologische processen zoals biotische en abiotische stressresponsen, ontwikkeling (groei) en de celcyclus. Verder is de productie van ROS belangrijk in het verdedigingsmechanisme tegen ondermeer pathogenen. (16,17)

1.3.2 Cellulaire productie van reactieve zuurstofvormen

Reactieve zuurstofvormen zijn altijd aanwezig in het organisme. Ze zijn een normaal product van het metabolisme en worden geproduceerd in verschillende cellulaire compartimenten tijdens een verscheidenheid aan processen. In gezonde cellen is er een evenwicht tussen de productie van de zuurstofvormen en de antioxidatieve verdediging. Hun productie is echter verhoogd na stresssituaties of in respons op ontwikkelingssignalen.

Er zijn endogene en exogene bronnen van reactieve zuurstofvormen. De voornaamste endogene bronnen van ROS in een plantencel zijn weergegeven in figuur 1.



Figuur 1: Belangrijkste bronnen van ROS in een plantencel en overzicht van de betrokken antioxidatieve enzymen (figuur overgenomen uit Gechev et al, 2006) (18).

De chloroplast is de plaats waar fotosynthese gebeurt. De productie van reactieve zuurstofvormen gebeurt voornamelijk wanneer de absorptie van lichtenergie door chlorofyl de capaciteit voor zijn gebruik (in de fotosynthese) overschrijdt. Dit gebeurt ondermeer bij hoge lichtintensiteiten. De vorming van $O_2^{\bullet-}$ gebeurt door het lekken van elektronen van de Fe-S centra van fotosysteem I of gereduceerd ferredoxine naar O_2 . De vorming van singlet oxygen gebeurt bij energietransfer van de geëxciteerde triplet toestand van chlorofyl in fotosysteem II naar triplet O_2 .

Fotorespiratie is een complex proces dat sterk samenhangt met fotosynthese. Als de CO_2 fixatie in chloroplasten verhinderd wordt, verhoogt de oxygenase capaciteit van ribulose-1,5-bisfosfaat carboxylase/oxygenase. Het glycolaat dat als een gevolg verhoogd geproduceerd wordt, gaat naar de peroxisomen. Daar wordt het geoxideerd door glycolaat oxidase waarbij H_2O_2 gevormd wordt.

In de peroxisomen kunnen ROS verder ook gevormd worden via vetzuur β -oxidatie en de enzymatische reactie van flavine oxidases en de dismutatie van superoxideradicalen. De superoxidevorming in de peroxisomen is een gevolg van hun normaal metabolisme. Ze worden op twee plaatsen in het peroxisoom geproduceerd: het peroxisomale membraan (via een kleine elektronentransportketen) en in de matrix (via xanthine oxidase) (19).

Mitochondriële respiratie is een proces dat tevens leidt tot de vorming van waterstofperoxide en superoxide als bijproduct van de ATP-productie. De belangrijkste bronnen hier zijn NADH dehydrogenase, het ubiquinon radicaal en complex III. Dit zijn allemaal elektronendragers in de respiratoire keten (reductie van zuurstof tot water). Deze reactie wordt gekatalyseerd door cytochroom oxidase, de laatste elektronenacceptor in de keten. Ondanks het feit dat de mitochondriële elektronentransportketen een zeer efficiënt systeem is, hebben de elektronen toch de neiging om rechtstreeks naar zuurstof over te gaan in plaats van naar de volgende elektronendrager in de keten. Hierdoor wordt superoxide gevormd. Deze mitochondriële reactieve zuurstofvormen zijn belangrijke regulatoren van een aantal cellulaire processen zoals stressadaptatie en geprogrammeerde celdood. Mitochondriële ROS zijn immers belangrijke signaalmoleculen en zorgen voor een gereguleerde crosstalk met verschillende organellen. Zo is er interactie met de chloroplast en de nucleus waar deze ROS een veranderde genexpressie induceren (van onder andere antioxidatieve enzymen zoals GST) (20).

Plasmalemma-gebonden NAD(P)H oxidases en celwand-geassocieerde peroxidasen zijn de belangrijkste enzymen ter hoogte van de apoplast die H_2O_2 en $O_2^{\bullet-}$ produceren. Ze zijn heel belangrijk in de oxidatieve burst in de aanwezigheid van een pathogeen, maar ze zijn eveneens belangrijk in de regulatie van celgroei, ontwikkeling en celdood (18).

De belangrijkste exogene bronnen van ROS zijn: elektromagnetische straling (X-stralen en γ -stralen), toxines die in het milieu geloosd worden (koolstoftetrachloride), componenten van sigarettenrook en uitlaatgassen (21).

1.3.3 Antioxidatieve verdedigingsmechanismen

Organismen hebben tal van antioxidatieve verdedigingsmechanismen ontwikkeld tegen reactieve zuurstofvormen waardoor ze de vorming, verspreiding en regulatie kunnen controleren. Hierdoor zijn ze in staat om de schadelijke effecten van ROS te beperken en om de reactieve zuurstofvormen toe te laten een signaalfunctie uit te oefenen. Zo beschikken ze over een groep proteïnen die biomoleculen beschermen tegen schade en ze herstellen na schade. Een voorbeeld van deze groep zijn de heatshock proteïnen. Daarnaast zijn er drie belangrijke groepen van antioxidatieve verdedigingsmechanismen (21).

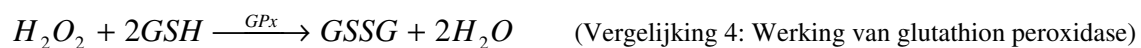
1.3.3.1 Enzymatische verwijdering van ROS

Een eerste groep omvat de enzymen die ROS katalytisch verwijderen. Belangrijke enzymen zijn superoxide dismutase, catalase en peroxidase (14).

Het superoxide dismutase (SOD) katalyseert de dismutatie van $O_2^{\bullet-}$ (vergelijking 2). De SOD's bestaan in verschillende isovormen. Het verschil zit in de betrokken cofactor. Deze cofactor kan Cu/Zn, mangaan of ijzer zijn. Cu-Zn-SOD komt vooral voor in het cytosol en de mitochondriële intermembranaire ruimte. MnSOD komt voornamelijk voor in de mitochondriële matrix van bacteriën, dieren en planten. FeSOD komt enkel voor in bacteriën, algen en de chloroplasten van planten. De reactie die het enzym uitvoert is echter voor alle isovormen gelijk. De reactie maakt gebruik van de redoxeigenschappen van hun metaal (Cu, Mn of Fe).



Catalase en peroxidase verwijderen beide waterstofperoxide. Catalase doet dit via een directe katalysatie (vergelijking 3). Peroxidase echter gebruikt GSH (of andere organische moleculen) als substraat voor de reductie van waterstofperoxide. In dat geval spreekt men van glutathion peroxidase (vergelijking 4).



Catalase komt hoofdzakelijk voor in de peroxisomen in zowel plantenweefsels als dierlijke weefsels. Glutathion peroxidasen bevinden zich voornamelijk in het cytosol en in de mitochondriële matrix van zowel plantencellen als dierlijke cellen (21). Er zijn echter ook nog ascorbaat peroxidasen. Deze bevinden zich in de chloroplast en het cytosol waar ze vitamine C als cosubstraat gebruiken. Ook in de celwand bevinden zich peroxidasen. Voorbeelden hiervan zijn peroxidase 33 en 34. Ze komen voornamelijk tot expressie in de wortel.

1.3.3.2 Vermindering van beschikbaarheid van pro-oxidanten

Een tweede groep omvat de proteïnen die de beschikbaarheid van pro-oxidanten (zoals ijzerionen en Cu-ionen) verminderen. Voorbeelden uit deze groep zijn transferrines, haptoglobines, metallothioneïnen en fytochelatinen. Vermindering van de beschikbaarheid van deze pro-oxidanten is belangrijk omwille van het feit dat Cu en ijzer transitie-metalen zijn en betrokken zijn in de Fenton-reactie en Haber Weiss reactie met als resultaat de vorming van het zeer schadelijke hydroxylradicaal (21).

1.3.3.3 Metabolieten

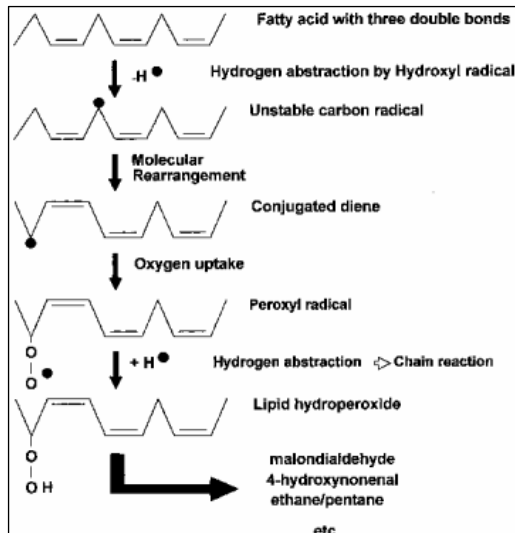
Een derde belangrijke groep is de groep met de metabolieten die ROS quenchen. Tot deze groep behoren onder andere glutathion, α -tocopherol (vitamine E) en ascorbaat (ascorbinezuur; vitamine C). Glutathion en ascorbaat zorgen direct voor het wegreageren van waterstofperoxide. Glutathion kan verder ook op een indirecte wijze zorgen voor het wegreageren van waterstofperoxide. Dit doet het door te zorgen voor de recuperatie van ascorbaat in de ascorbaat-glutathion cyclus. Tocopherolen zorgen vooral voor het wegvangen van peroxyradicalen en helpen de membraan te beschermen tegen lipidenperoxidatie. Dit doen ze door de ketenreactie tijdens lipidenperoxidatie te verbreken (14, 21).

1.3.4 *Biologische reacties van reactieve zuurstofvormen: Oxidatieve stress*

Reactieve zuurstofvormen oefenen hun schadelijke effecten vooral uit ter hoogte van membraanlipiden, proteïnen en het DNA. Als gevolg van deze schadelijke effecten kan er veroudering optreden waarbij de cellen in het organisme niet langer delen. Bovendien kan er in ernstige gevallen sprake zijn van apoptose of necrose. Deze effecten resulteren in tal van ziektebeelden in organismen (21).

1.3.4.1 Oxidatieve schade aan lipiden

De peroxidatie van lipiden omvat drie verschillende stappen. Deze zijn de initiatie, propagatie en terminatie. In figuur 2 wordt het proces van lipidenperoxidatie schematisch weergegeven.



Figuur 2: Weergave van het proces van lipidenperoxidatie (figuur overgenomen uit Young et al, 2001) (22)

Tijdens de initiatiereactie trekt een zuurstofradicaal (hydroxylradicaal) een waterstofatoom aan van een methyleengroep van het lipide. Als er een dubbele binding in het vetzuur aanwezig is, gebeurt de verwijdering van het waterstofatoom nog gemakkelijker omwille van de verzwakte C-H binding naast de dubbele binding. Hierna treedt een moleculaire herschikking op waarbij een geconjugeerd dieen wordt gevormd. Dit kan op zijn beurt reageren met O_2 ter vorming van een peroxyradicaal (ROO^\bullet). Het peroxyradicaal kan een waterstofatoom wegtrekken van een nabijgelegen vetzuur. Hierbij wordt een lipidehydroperoxide en in het andere vetzuur een geconjugeerd dieen gevormd. In de aanwezigheid van metalen (bijvoorbeeld Cu en ijzer) kan dit lipidehydroperoxide opgesplitst worden in een alkoxyradicaal en een nieuw gevormd hydroxylradicaal. Op deze manier kan de reactie exponentieel toenemen. Men spreekt van een autokatalytische kettingreactie. Terminatie gebeurt als het peroxyradicaal reageert met vitamine E (α -tocopherol) en kan ook gebeuren als twee peroxidemoleculen met elkaar reageren. Tijdens het proces van lipidenperoxidatie veranderen de eigenschappen van het membraan. Het gebeurt vaak dat de vetzuurketens breken of crosslinken. Hierbij worden aldehyden, zoals malondialdehyde, en koolwaterstoffen, zoals ethaan, als afbraakproducten gevormd. Deze komen vaak voor als eindproducten in lipidenperoxidatie (22).

1.3.4.2 Oxidatieve schade aan proteïnen

Reactieve zuurstofvormen kunnen proteïnen direct of indirect beschadigen. De gevolgen zijn ondermeer een aminozuurmodificatie, fragmentatie van de peptideketen, aggregatie, een veranderde structuur, veranderde elektrische lading en verhoogde gevoeligheid voor

proteolyse. Resultaat hiervan is een veranderde enzymactiviteit, schade aan membraantransporters en interactie met receptoren. Schade aan DNA-herstellingsenzymen kan voor een verhoogde mutatiefrequentie zorgen (21).

1.3.4.3 Oxidatieve schade aan DNA

Reactieve zuurstofvormen kunnen zorgen voor structurele veranderingen in het DNA. Ze kunnen dit direct of indirect doen door een verhoging in intracellulaire calcium waardoor nucleasen geactiveerd worden die op hun beurt inwerken op het DNA. Reactieve zuurstofvormen zorgen ook voor de verlaagde efficiëntie van DNA polymerase en DNA herstelenzymen door schade toe te brengen aan het proteïne. Het hydroxylradicaal is voornamelijk belangrijk in het aanbrengen van schade aan het DNA zoals DNA-breuken en DNA-crosslinks (23).

1.4 Doel van het onderzoek

In deze masterstage is met behulp van *Arabidopsis thaliana* als testorganisme onderzocht hoe en onder welke vorm oxidatieve stress tot stand komt na blootstelling aan realistische Cd- en Cu-concentraties. Deze toxische metalen zijn verschillend met betrekking tot hun redoxreactieve eigenschappen en ze induceren mogelijk op een andere manier oxidatieve stress. Er is eveneens gekeken naar andere pathways die betrokken zijn in het tot stand komen van metaal toxiciteit.

Om deze doelstelling te bereiken zijn *Arabidopsis* zaailingen opgekweekt op hydrocultuur en blootgesteld aan verschillende Cd- en Cu-concentraties. Met behulp van een microarrayexperiment is er een screening gebeurd naar de voornaamste pathways die gelinkt zijn aan oxidatieve stress. De genen die een significant verschil in genexpressie vertoonden, zijn verder onderzocht naar hun functie in het metabolisme. Hiertoe zijn databanken die informatie bevatten over *Arabidopsis* geraadpleegd. Verder zijn de genen die hieruit zijn voortgevloeid bevestigd met behulp van Real-Time kwantitatieve PCR. Additionele experimenten op verschillende cellulaire niveaus zijn tevens uitgevoerd om meer inzicht te geven in de rol van deze genen en pathways bij metaalstress. Zo zijn eveneens metabolische effecten zoals enzymactiviteiten en lipidenperoxidatie gemeten.

Uiteindelijk zijn de effecten van zowel Cd- als Cu-blootstelling vergeleken en is een specifieke rol voor oxidatieve stress hierin gedefinieerd.

2 Materialen en methoden

2.1 Plantenmateriaal en oogst

Alvorens de *Arabidopsis thaliana* (wild type col-0) zaadjes te zaaien, worden ze gesteriliseerd (24). Na sterilisatie worden de zaadjes overnacht op een filterpapiertje in een afgesloten petrischaaltje in de koelkast gelegd, opdat alle zaadjes ongeveer dezelfde begincondities hebben vooraleer ze aan het kiemproces beginnen.

De zaadjes worden gezaaid in buisjes gevuld met gespoeld en gedroogd Rijnzand. De *Arabidopsis thaliana* zaailingen worden gekweekt door middel van hydrocultuur. Het groeimedium is een 10 keer verdunde Hoaglandoplossing (25) die bestaat uit macronutriënten, micronutriënten en ijzer. De rekken met buisjes worden in een klimaatkast gezet (figuur 3) waar de groeicondities de volgende zijn: 12 uur licht (fotonfluxdensiteit van $165 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ter hoogte van de blaadjes) bij een temperatuur van 22°C , 12 uur donker bij een temperatuur van 18°C en een constante vochtigheidsgraad van 65%.



Figuur 3: Opstelling van de *Arabidopsis thaliana* kweek in de klimaatkast.

Na een week wordt het medium een eerste keer vervangen en wordt tevens zuurstof toegevoegd aan het groeimedium. Hierna wordt het groeimedium om de drie dagen vervangen en tevens ook nog een dag voor de behandeling met Cd of Cu. Wanneer de plantjes drie weken oud zijn, worden ze behandeld met een finale Cd-concentratie van $5\mu\text{M}$ of $10\mu\text{M}$ en een finale Cu-concentratie van $0,5\mu\text{M}$, $2\mu\text{M}$ of $5\mu\text{M}$. Na een blootstelling van 24 uur aan verschillende Cd- en Cu-concentraties kunnen de plantjes geoogst worden. Hierbij wordt

100mg materiaal van de wortels en de blaadjes van de zaailingen afgewogen, in epjes gedaan en meteen in een container met vloeibare stikstof ondergedompeld. Dit blokkeert alle cellulaire processen. Het blad- en wortelmateriaal kan, indien het niet meteen gebruikt wordt, opgeslagen worden in de -80°C diepvriezer.

2.2 Genexpressie-analysen

2.2.1 RNA-extracties

Voor de RNA-extracties wordt gebruik gemaakt van het ingevroren materiaal dat bekomen werd tijdens het oogsten van de kweek. De RNA-extracties gebeuren met behulp van de Qiagen® RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Venlo) die alle producten bevat die nodig zijn voor RNA-extractie. De maximale hoeveelheid startmateriaal is 100mg. Met deze hoeveelheid zal de maximale bindingscapaciteit van de kolom (100µg RNA) en de lysiscapaciteit van de buffer RLT niet overschreden worden. De extractie wordt uitgevoerd zoals beschreven in het protocol van de Qiagen® RNeasy Plant Mini Kit. Het is hierbij belangrijk dat het startmateriaal niet ontdooit en dat de werkplaats en het gebruikte materiaal volledig RNase-vrij is. Na de isolatie van RNA wordt de concentratie van het RNA per staal bepaald. Aan de hand van de 260/280 ratio en 260/230 ratio van het staal kan de zuiverheid van het staal berkend worden. De kwaliteit en integriteit van het RNA kan tevens berekend worden gebruik makend van de Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Diegem). De werking hiervan berust op capillaire gelelektroforese.

2.2.2 cDNA aanmaak

Het geïsoleerde RNA kan gebruikt worden om cDNA te maken. Dit gebeurt door middel van een Polymerase Chain Reaction (PCR) van 1 cyclus, ook wel Reverse Transcription genoemd. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van de QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen, Venlo). De aanmaak van het cDNA wordt uitgevoerd zoals beschreven in het protocol van de QuantiTect® Reverse Transcription Kit. Tijdens de procedure wordt aan het template RNA gDNA Wipeout Buffer toegevoegd om het genomisch DNA – dat zich nog in het staal bevindt – te verwijderen. De gebruikte primers voor de aanmaak van het cDNA zijn oligodT-primers en random hexameren. De RNA transcriptie vindt plaats in het PCR toestel, de Bio-Rad iCycler (Bio-Rad, Nazareth). Om te testen of er contaminatie is met genomisch DNA worden

ook enkele noRT-stalen (1 staal per conditie) meegenomen in de reactie. Deze controlestalen bevatten alle componenten voor de aanmaak van het cDNA, behalve het enzym Quantiscript Reverse Transcriptase.

2.2.3 Real-time kwantitatieve PCR

Het cDNA wordt vervolgens gebruikt in de real-time kwantitatieve PCR (Q-PCR). Hiertoe wordt QuantiTect SYBR Green[®] (Qiagen, Venlo) gebruikt. De primers (tabel 1) voor elk gen worden ontwikkeld met behulp van Primer Express v2.0. Hierbij wordt rekening gehouden met de richtlijnen voor primerdesign uit de QuantiTect SYBR Green gebruiksaanwijzing. Na de ontwikkeling worden de primers tevens aan een BLAST analyse onderworpen om ongewenste (mogelijke) bindingsplaatsen te ontdekken en uit te sluiten. De meest stabiele referentiegenen, nodig voor normalisatie van de Q-PCR, zijn verkregen met behulp van geNorm (26). De gekozen referentiegenen zijn actine2, At4g26410 en At5g08290. In tabel 1 staan de forward en reverse primers weergegeven.

Tabel 1: Forward en reverse primers gebruikt tijdens de Q-PCR.

| Gen | Forward primer | Reverse primer |
|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| <i>GSH1</i> (AT4G23100) | CCCTGGTGAACCTGCCTTCA | CATCAGCACCTCTCATCTCCA |
| <i>GSH2</i> (AT5G27380) | GGACTCGTCGTTGGTGACAA | TCTGGGAATGCAGTTGGTAGC |
| <i>GST2</i> (AT4G02520) | ATCACCAGTTCGACCCAGTG | CTCCTCTTCTGCAACAACGG |
| <i>GST6</i> (AT2G47730) | ATCTCCAGTTCGAGCTCATCC | CTCGAGAGCAGGAATTTGACC |
| <i>GSTU26</i> (AT1G17190) | CCCCAATCCTTCCCTCTGA | TGCCCATACCTTCCATGATG |
| <i>MRP4</i> (AT2G47800) | CCACCGGATTCTACAGTGA | GCAAACAGAGACGGCCTCTC |
| <i>PAL1</i> (AT2G37040) | GCTTCATCCTTCTCGCTTCTG | ACGGGTACGTTGCGCTACA |
| <i>PAL2</i> (AT3G53260) | ACAGTTACGGAGTCACCACCG | CCGGCGTTCAAAAATCTAATG |
| <i>GAPDH</i> (AT3G04120) | TGTCAGACTCGAGAAAGCTGC | CATCCTCGGTGTATCCAAGGA |
| <i>GAPC</i> (AT1G13440) | TGGTGACAACAGGTCAAGCA | TGTAACCCCATTCGTTGTCG |
| <i>RBOHC</i> (AT5G51060) | TCACCAGAGACTGGCACAATAAA | GATGCTCGACCTGAATGCTC |
| <i>RBOHD</i> (AT5G47910) | TATGCATCGGAGAGGCTGCT | TAGAGACAACACGTTCCCGGG |
| <i>RBOHE</i> (AT1G19230) | GTGATGCAAGATCAACCCTGA | GCCTTGCAAAATGTGTTCTCA |
| <i>RBOHF</i> (AT1G64060) | GGTGTCATGAACGAAGTTGCA | AATGAGAGCAGAACGAGCATCA |
| <i>CAT1</i> (AT1G20630) | AAGTGCTTCATCGGGAAGGA | CTTCAACAAAACGCTTCACGA |
| <i>APX1</i> (AT1G07890) | TGCCACAAGGATAGGTCTGG | CCTTCCTTCTCTCCGCTCAA |
| <i>APX2</i> (AT1G07890) | GAGATGTGTTTGGTCGGATGG | CTCGAATCCTGAACGCTCC |
| <i>LOX1</i> (AT1G55020) | TTGGCTAAGGCTTTTGTTCGG | GTGGCAATCACAAACGGTTC |
| <i>LOX2</i> (AT3G45140) | TTTGCTCGCCAGACACTTG | GGGATCACCATAAACGGCC |
| <i>FSD1</i> (AT4G25100) | CTCCCAATGCTGTGAATCCC | TGGTCTTCGGTTCTGGAAGTC |
| <i>CSD1</i> (AT1G08830) | TCCATGCAGACCCTGATGAC | CCTGGAGACCAATGATGCC |
| <i>CSD2</i> (AT2G28190) | GAGCCTTTGTGGTTCACGAG | CACACCACATGCCAATCTCC |
| <i>ACT2</i> (AT3G18780) | CTTGCAACCAAGCAGCATGAA | CCGATCCAGACACTGTACTTCCTT |
| At4g26410 | GAGCTGAAGTGGCTTCCATGAC | GGTCCGACATACCCATGATCC |
| At5g08290 | TTACTGTTTCGGTTGTTCTCCATT | CACTGAATCATGTTCTGAAGCAAGT |

De reactiemix voor de Q-PCR bestaat uit QuantiTect SYBR Green PCR Master mix die de SYBR Green kleurstof bevat, alsook de forward en reverse primer en RNase-vrij water. Vervolgens wordt in elk welletje van de 96-wel-plaat 17µl van de mastermix gepipetteerd en 3µl cDNA dat 10 keer verdund is. De NTC- en noRT-stalen worden ook meegenomen in de Q-PCR. De NTC is noodzakelijk om contaminatie met genomisch DNA op te sporen. De noRT-stalen zijn noodzakelijk om primerdimeren op te sporen.

Vervolgens wordt de 96-wel-plaat in het Q-PCR toestel, de ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Lennik). SYBR Green heeft de eigenschap om te binden aan dubbelstrengig DNA en wanneer het bindt zal het een fluorescent signaal uitsturen. Het fluorescentiesignaal wordt gedetecteerd en deze waarden worden gevisualiseerd en weergegeven als C_T waarden (Threshold Cycle Number). Na verwerking met onder andere normalisatie ten opzichte van de huishoudgenen, kan men een beeld krijgen van de relatieve genexpressie in het staal.

2.2.4 *Microarray*

Het geïsoleerde RNA kan naast het gebruik voor de aanmaak van cDNA ook gebruikt worden om microarrayexperimenten uit te voeren. Hiervoor wordt de Amino Allyl MessageAmpTM II aRNA Amplification Kit van Ambion[®] (Ambion, Lennik) gebruikt. Het RNA van Cd-stalen (4 controlestalen, 4 stalen van 5µM Cd en 4 stalen van 10µM Cd) van het blad wordt hiervoor gebruikt. Ook hier wordt cDNA van alle RNA-stalen gemaakt. De reverse transcriptie gebeurt met een oligo(dT) primer die een T7 promotor bezit. Het reverse transcriptase dat gebruikt wordt is ArrayScriptTM. Na deze stap volgt de synthese van de tweede cDNA streng waarna in vitro transcriptie kan plaatsvinden met T7 RNA polymerase. Tijdens deze stap worden honderden tot duizenden antisenseRNA exemplaren van elk mRNA in het sample geproduceerd. De transcriptie gebeurt op zodanige wijze dat het gemodificeerde nucleotide 5-(3-aminoallyl)-UTP (aaUTP) wordt geïncorporeerd. Dit nucleotide bevat een reactieve primaire aminogroep op de C5 positie van uracil. Hierdoor kan het chemisch gekoppeld worden aan een N-hydroxy-succinimidyl-ester-afgeleide reactieve kleurstof zoals Cy3 en Cy5.

Het aRNA van de verschillend behandelde stalen is nu klaar voor gebruik in een microarray. De gebruikte arrays zijn oligonucleotide arrays. Het design van de array is een loopdesign.

2.3 MicroRNA bepaling

Alvorens de microRNA's bepaald kunnen worden, dienen deze eerst geïsoleerd te worden. Voor deze isolatie wordt gebruik gemaakt van de mirVana™ miRNA Isolation Kit (Ambion, Lennik). Het staal wordt hierbij gelyseerd in een denaturerende lysisbuffer. Na toevoeging van chloroform worden tevens alle andere cellulaire componenten verwijderd. Door toevoeging van een hogere concentratie ethanol, die de bindingseigenschappen van het RNA versterkt, kunnen de microRNA's geïsoleerd worden.

Vervolgens wordt cDNA gemaakt van de microRNA's. Hiervoor wordt de TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit gebruikt. Per gen wordt een mastermix gemaakt die een specifieke looped primer bevat. Volgende miRNA's worden gemeten: miRNA168a, miRNA398a, miRNA398b en miRNA172a dat tevens gebruikt wordt voor de normalisatie.

Na reverse transcriptie wordt een kwantitatieve RT-PCR uitgevoerd en kan de genexpressie bepaald worden. Voor Q-PCR worden de cDNA-producten geamplificeerd gebruik makend van de TaqMan® Universal PCR Master Mix. Hier worden eveneens specifieke primers gebruikt per gen gecombineerd met specifieke TaqMan MGB probes voor de fluorescentiedetectie.

2.4 Elementbepaling

Plantenmateriaal van de verschillende behandelingen wordt na de oogst niet ingevroren maar gewassen en gedroogd. Hiertoe worden de blaadjes gespoeld met gedestilleerd water en de wortelstalen worden gewassen in loodnitraat (op ijs gedurende 5 minuten) en daarna in gedestilleerd water (op ijs gedurende twee keer 5 minuten). De elementen worden daarna bepaald met behulp van 'inductive coupled plasma-atomic emission spectrometry' (ICP-AES) (Perkin-Elmer, 1100B, USA).

2.5 Enzymactiviteiten glutathion-S-transferase

Cd- en Cu-stalen van elke conditie worden vermalen met behulp van een mortier en stamper. In de mortier wordt een kleine hoeveelheid zand, PVP en 2ml extractiebuffer (0.1 M Tris-HCl buffer; pH 7.8) toegevoegd. PVP staat voor polyvinylpyrrolidon, een stof die fenolen bindt en ze op deze manier inactiveert. Het vermalen staal wordt gefilterd en het extract in een Jouan MR 22i centrifuge gebracht (2000g, 10 minuten). Het supernatans wordt opgevangen en

100µl hiervan in een cuvet gedaan. Voorts gebeurt de toevoeging van 25µl 1-chloro-2,4-dinitrobenzeen (1mM), 850µl kaliumfosfaatbuffer (pH 7.5) en 25µl glutathion (1mM). De reactie komt op gang door de toevoeging van het glutathion. Hierna wordt de vorming van S-(2,4-dinitrofenyl)glutathion (DNP-GS) bij een golflengte van 334nm gedurende 1 minuut gemeten in een Shimadzu UV-1601PC UV-visible spectrofotometer (Shimadzu, Deurne). Dit DNP-GS is het product van de S-conjugatie van CDNB aan glutathion.

De niet-enzymatische conjugatie van CDNB moet tevens bepaald worden. Dit gebeurt door de toevoeging van 40µl TCA (2%) en 810µl kaliumfosfaatbuffer zodat het totale volume 1ml blijft (27).

Door het verschil te maken tussen de extinctie van de enzymatische en niet-enzymatische conjugatie kan via de wet van Lambert-Beer de enzymactiviteit van GST berekend worden ($\epsilon_{334} = 9.6\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

2.6 TBA-meting

Het bepalen van lipidenperoxidatie is een manier om de mate van oxidatieve stress te bepalen. Dit wordt gemeten op basis van TBA reactieve producten zoals MDA. 200mg weefsel (blad of wortel) wordt fijngemalen in 3ml trichloorazijnzuur (TCA; 0,1% w/v) door middel van een stamper en mortier. Dit extract gaat dan gedurende 10 minuten in de centrifuge (Jouan MR 22i) bij 2000g. Aan 1ml van het supernatans wordt dan 4ml thiobarbituurzuur (TBA; 0,5% w/v) toegevoegd. Ook wordt een blanco gemaakt die 4ml TBA bevat en 1ml TCA. De stalen gaan dan 30 minuten in een waterbad van 95°C. Na afkoeling in een ijsbad worden ze nog eens 10 minuten gecentrifugeerd. Vervolgens wordt de absorptie van het supernatans gemeten.

2 moleculen TBA reageren met 1 molecule malonadialdehyde (MDA) waarbij een MDA-TBA-complex gevormd wordt. Dit complex kan bij een golflengte van 532nm gedetecteerd worden in de spectrofotometer. Er gebeurt ook een meting bij een golflengte van 600nm. Dit is de niet-specifieke absorptie van onder andere suikers en andere aldehyden die met het complex kunnen interfereren. In de berekeningen maakt men het verschil tussen de absorptie bij 532nm en de absorptie bij 600nm (28).

2.7 Microscopie

Cd veroorzaakt structurele veranderingen ter hoogte van de wortel in *Arabidopsis thaliana*. Met behulp van lichtmicroscopie en elektronenmicroscopie worden deze verschillen bekeken voor de wortels van zaailingen behandeld gedurende 24 uur met 5 μ M Cd en 10 μ M Cd.

2.7.1 Lichtmicroscopie

De coupes voor de lichtmicroscopie worden gemaakt door middel van een FAA fixatie en een saffranine-anilineblauw-kleuring die het lignine kleurt. Ethanol wordt in een oplopende concentratie (gaande van 25% tot 70%) toegevoegd om inkrimping van het weefsel te voorkomen. De coupes worden ingebed in paraffine en gekleurd waarna ze bekeken worden (40x vergroting) met een Nikon Eclipse 80i microscoop (Nikon, Brussel).

2.7.2 Elektronenmicroscopie

De wortelstalen worden eerst gefixeerd met behulp van vacuuminfiltratie. Hierna worden ze gespoeld, gekleurd en ingebed in epoxyhars. Ultradunne coupes worden gemaakt en op een gecoat koper roostertje aangebracht. De coupes kunnen daarna bekeken worden met een Philips EM 208S transmissie elektronenmicroscopie. Hierna worden de beelden gedigitaliseerd met een morada 3.0 TEM camera die gebruik maakt van iTEM FEI software (versie 5.0) (Olympus Imaging Solutions).

2.8 Statistische analyse

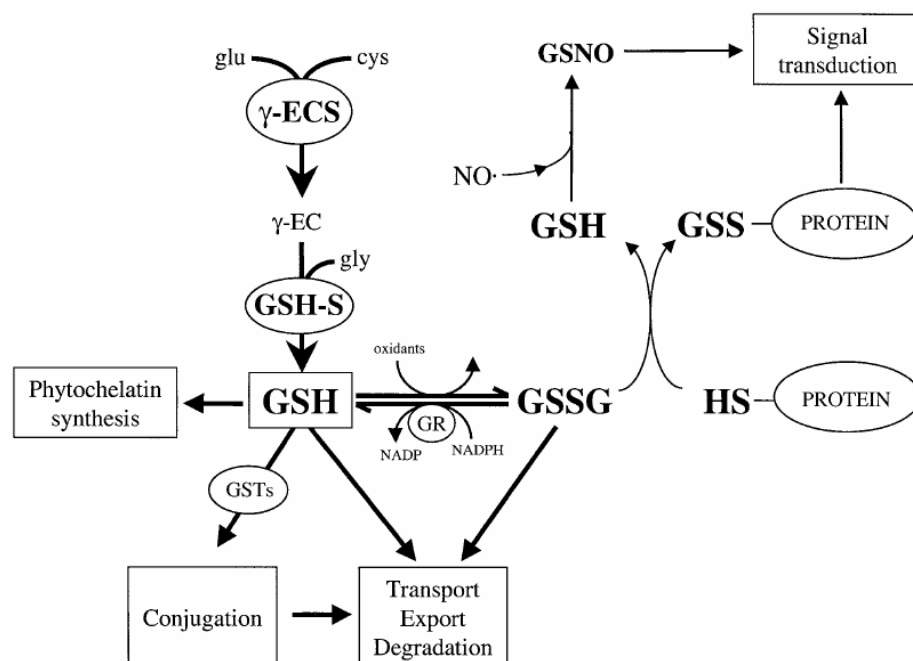
De statistische analyse wordt uitgevoerd met de Kruskal-Wallis test (29). Deze test laat toe de gemiddelden van meer dan twee samples te vergelijken rekening houdend met het feit dat de onderliggende verdeling geen normale verdeling is. De test geeft aan elke waarde van de behandelingsgroepen een ranking waarna de gemiddelde ranking per behandelingsgroep berekend wordt. De nulhypothese wordt aanvaard bij een p-waarde groter dan 0.05.

3 Resultaten

Om te bepalen hoe en onder welke vorm oxidatieve stress tot stand komt in *Arabidopsis thaliana* is een microarray-experimenten uitgevoerd op de wortels van 3 weken oude zaailingen die gedurende 24 uur zijn blootgesteld aan 5 μ M Cd of 10 μ M Cd. De genen die belangrijk bleken uit de microarray zijn bevestigd met behulp van Q-PCR. Deze genen zijn ook gemeten in Cd-behandelde blaadjes en eveneens in Cu-behandelde wortels en blaadjes. Er is tevens gekeken op andere niveaus dan genexpressie. Zo is de genexpressie van GST en de lipidenperoxidatie in het blad bepaald. Als laatste is gekeken naar structurele veranderingen in de wortel en meerbepaald naar de aanwezigheid van lignine in de wortels van de Cd-behandelde wortels.

3.1 Genexpressie

Uit de microarrayexperimenten zijn enkele genen naar voor gekomen die een belangrijke rol blijken te spelen in het mechanisme waarop de oxidatieve stress en antioxidatieve verdediging ontstaat.



Figuur 4: Glutathionbiosynthese en processen in de plantencel waarbij glutathion betrokken is. Glutathion heeft een antioxidant functie, is een precursor van fytochelatines en is een substraat voor glutathion-S-transferasen. γ -EC, γ -glutamylcysteine; γ -ECS, γ -glutamylcysteine synthetase; GR, glutathion reductase; GSH, gereduceerd glutathion; GSSG, glutathion disulfide; GSH-S, glutathion synthetase; GST, glutathion-S-transferase. Figuur overgenomen uit Noctor et al, 2002 (30).

Vooraf gelinkt aan glutathion blijken belangrijk te zijn. In figuur 4 zijn de glutathion biosynthese en de processen in de plantencel waarbij glutathion betrokken is weergegeven. Om de microarrayresultaten te bevestigen, is er een real-time kwantitatieve PCR uitgevoerd op een selectie van genen die belangrijk lijken te zijn in het ontstaan van oxidatieve stress en de gevolgen hiervan na metaalbehandelingen.

3.1.1 ROS-producerende enzymen

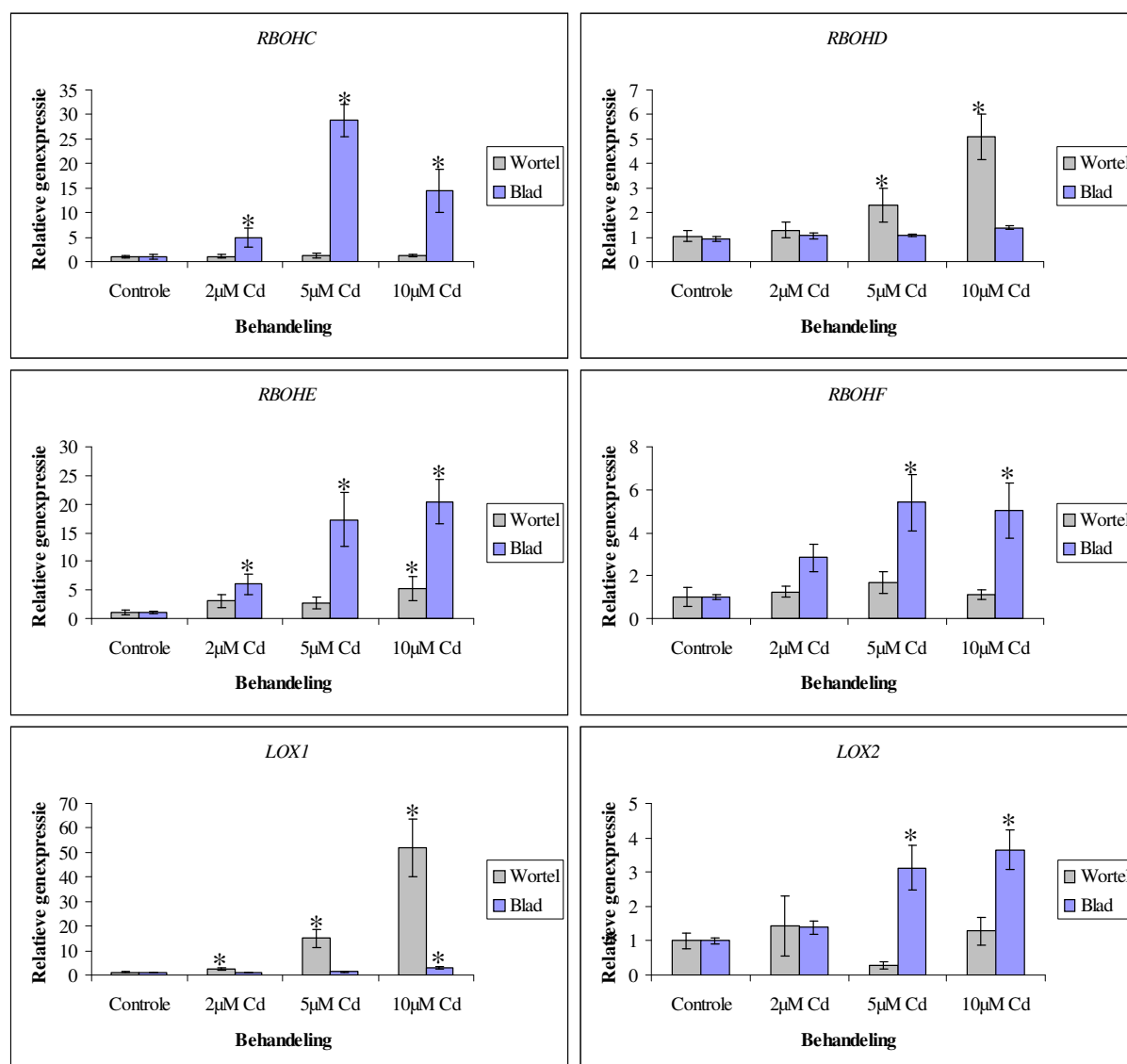
Een eerste groep genen die belangrijk zijn in het ontstaan van oxidatieve stress zijn de ROS-producerende genen (figuren 5 en 6). Zij zorgen voor een productie van reactieve zuurstofintermediären.

RBOHC, *RBOHD*, *RBOHE* en *RBOHF* behoren tot de groep van NADPH oxidasen. Ze zijn gelokaliseerd ter hoogte van het plasmamembraan waar ze de productie van $O_2^{\bullet-}$ katalyseren, gebruik makend van NADPH als elektronendonor. Na blootstelling aan realistische Cd-concentraties stijgt de genexpressie van al deze genen sterk (figuur 5). *RBOHC*, *RBOHE* en *RBOHF* vertonen deze stijging in het blad. De sterkste stijging is er voor *RBOHC* wat met een factor 30 verschilt ten opzichte van de controle bij een Cd-concentratie van $5\mu\text{M}$. Bij een Cd-concentratie van $10\mu\text{M}$ is de expressie van *RBOHE* het sterkst verhoogd (factor 20 ten opzichte van de controle). *RBOHDE* en voornamelijk *RBOHD* vertonen een significante stijging in de wortel.

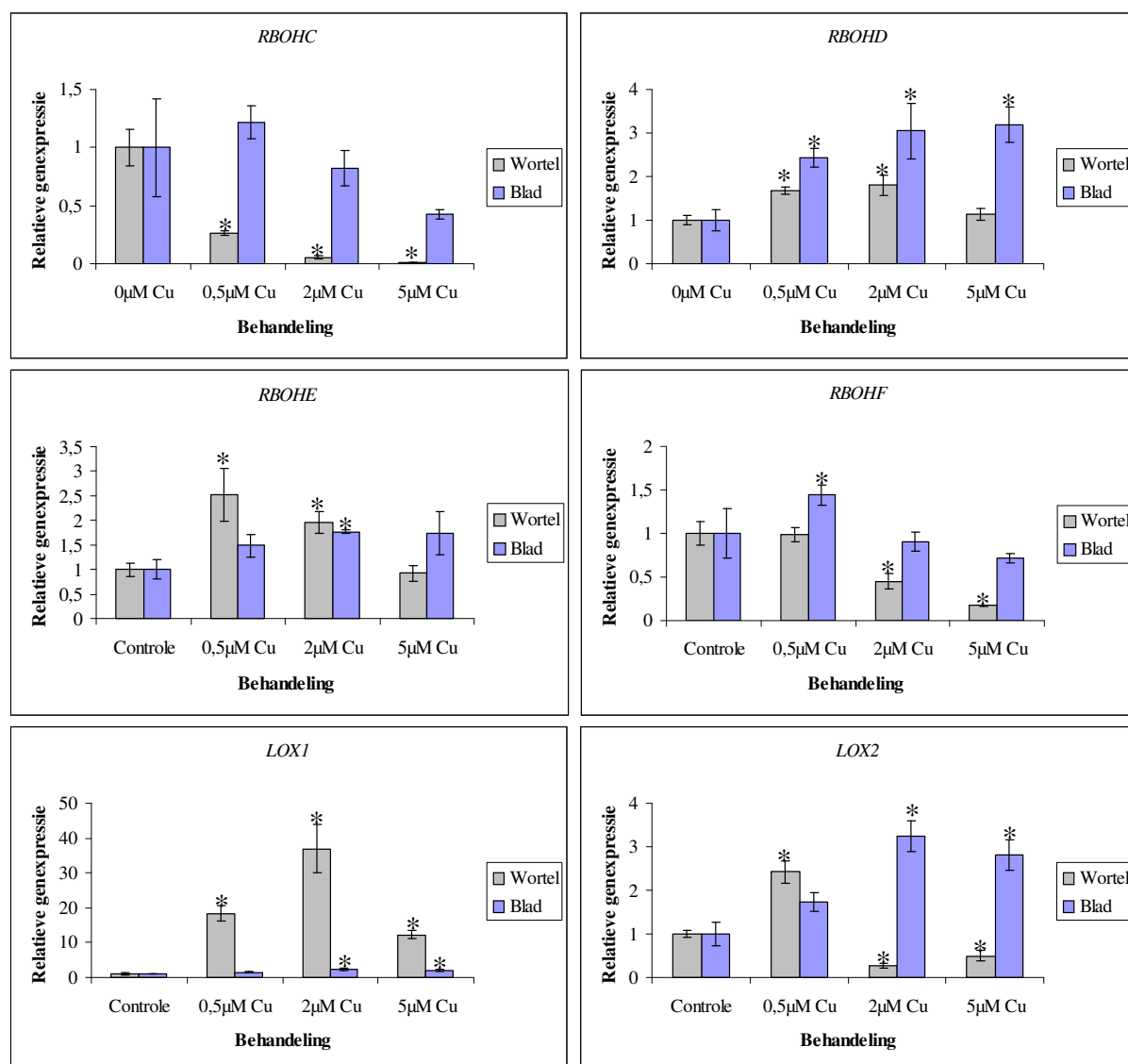
Wat de Cu-blootstelling betreft, is de inhibitie van *RBOHC* en *RBOHF* in de wortel opmerkelijk (figuur 6). *RBOHD* vertoont een verhoogde expressie in het blad (met een factor 4). Bij een lagere Cu-concentratie ($0.5\mu\text{M}$ Cu) is er een stijging van *RBOHE* in de wortel maar dit is niet meer het geval als de concentraties stijgen. De stijging in genexpressie is in de Cu-blootgestelde genen echter niet zo uitgesproken als in de Cd-blootgestelde genen.

Het enzym lipoxygenase kan zorgen voor de vorming van vetzuur hydroperoxides en hieropvolgend peroxidatie. De genexpressie van *LOX1* is opmerkelijk hoog in de wortel bij concentraties vanaf $5\mu\text{M}$ Cd (figuur 5). De genexpressie is immers tot een factor 50 ten opzichte van de controle verhoogd. Bij de hoogste Cd-concentratie bereikt *LOX1* ook een significante stijging in genexpressie in het blad. *LOX2* komt in de blaadjes significant verhoogd tot expressie bij Cd-concentraties vanaf $5\mu\text{M}$ Cd. De stijging is hier echter minder groot dan bij *LOX1*. Er is hier sprake van een stijging tot waarden die 5 keer de controlewaarde bedragen.

De Cu-blootstelling laat dezelfde trend zien. *LOX1* vertoont een significante stijging (meer dan een factor 30) in genexpressie in de wortel voor alle concentraties. Hier is in het blad ook een significante stijging in genexpressie zichtbaar voor de twee hoogste concentraties. Deze stijging is echter niet zo groot als de stijging in de wortel. In het blad is *LOX2* significant verhoogd tot expressie gebracht terwijl het in de wortel geïnhibeerd is. De laagste Cu-concentratie is hierbij een uitzondering.



Figuur 5: Genexpressie van ROS-producerende enzymen in 3 weken oude *Arabidopsis thaliana* zaailingen blootgesteld gedurende 24 uur aan verschillende realistische cadmiumconcentraties. De genexpressie is relatief ten opzichte van de controle uitgedrukt. Per behandeling is een waarde weergegeven die het gemiddelde is van 5 biologische herhalingen. De significantie is bepaald op significantieniveau $p=0.05$. Het symbool * betekent significantie ten opzichte van de controle. *RBOH*, Respiratory Burst Oxidase Homologue (NADPH oxidase); *LOX*, lipoxygenase.



Figuur 6: Genexpressie van ROS-producerende enzymen in 3 weken oude *Arabidopsis thaliana* zaailingen blootgesteld gedurende 24 uur aan verschillende realistische Cu-concentraties. De genexpressie is relatief ten opzichte van de controle uitgedrukt. Per behandeling is een waarde weergegeven die het gemiddelde is van 5 biologische herhalingen. De significantie is bepaald op significantieniveau $p=0.05$. Het symbool * betekent significantie ten opzichte van de controle. *RBOH*, Respiratory Burst Oxidase Homologue (NADPH oxidase); *LOX*, lipoxygenase.

3.1.2 Antioxidatieve verdediging

Om de schadelijke effecten van ROS te beperken en om er voor te zorgen dat ROS een signaalfunctie kunnen uitoefenen, hebben organismen tal van antioxidantieve verdedigingsmechanismen ontwikkeld. Hierdoor kunnen ze de vorming, verspreiding en regulatie van deze ROS controleren. Een belangrijke groep binnen de antioxidantieve verdediging zijn de enzymen betrokken in de enzymatische verwijdering van ROS. Ook deze

groep blijkt, na analyse van de microarray, een belangrijke rol te hebben in de oxidatieve stress gebeuren als gevolg van Cd- en Cu-toevoeging. Figuur 7 geeft de resultaten van de expressie van deze genen weer in het blad en de wortel na blootstelling van 3 weken oude *Arabidopsis thaliana* zaailingen aan verschillende Cd-concentraties. Figuur 8 geeft hetzelfde weer maar dan voor verschillende Cu-concentraties.

De ascorbaatperoxidase zijn één van de belangrijkste antioxidatieve enzymen van planten. Er zijn verschillende isovormen actief in verschillende compartimenten van de plantencel. In het cytosol zijn ascorbaatperoxidase 1 en 2 (*APX1* en *APX2*) belangrijk. In figuur 7 is de relatieve expressie van deze genen weergegeven in de wortel en het blad na blootstelling aan Cd. *APX1* en *APX2* vertonen beide een significante stijging in genexpressie bij 10µM Cd. Bij *APX1* is er een stijging met factor 3 in het blad. *APX2* daarentegen vertoont een stijging met een factor 70 in de wortel. *APX2* lijkt dus, bij een Cd-concentratie van 10µM een belangrijke antioxidatieve verdedigingsrol toegeschreven te zijn in de wortel terwijl *APX1* deze taak op zich neemt in de blaadjes.

Cu inhibeert de genexpressie van *APX1* opmerkelijk in de wortel (figuur 8). Waar *APX1* bij Cd-blootstelling belangrijk blijkt te zijn in het blad, is het dit niet bij Cu-blootstelling. De expressie van *APX2* stijgt in de wortel maar blijft nagenoeg constant in het blad.

Superoxidedismutasen (SODs) zetten superoxide om naar waterstofperoxide. Aangezien fosfolipidemembranen impermeabel zijn voor superoxide, is het cruciaal dat SODs aanwezig zijn in de celcompartimenten van aanmaak. De SODs worden, gebaseerd op hun metaalcofactor, onderverdeeld in 3 groepen. Bovendien zijn deze groepen gelokaliseerd in verschillende celcompartimenten. Cu-Zn SODs – waarvoor *CSD1* en *CSD2* coderen – komen voornamelijk voor in de chloroplast en het cytosol. Ijzer SODs – waarvoor onder andere *FSD1* codeert – komen voor in de chloroplast, mangaanSODs komen vooral voor in de mitochondriën en peroxisomen. Na blootstelling aan Cd daalt de genexpressie van zowel *CSD1* als *CSD2* (figuur 7). Deze inhibitie van genexpressie uit zich voor *CSD1* vooral in de wortel terwijl het zich voor *CSD2* vooral in de blaadjes uit. Bij hogere concentraties is het echter opmerkelijk dat de genexpressie van *CSD1* zich terug lijkt te herstellen wat tot op het niveau van de controle. De *FSD1* genexpressie vertoont een ander patroon. Hier stijgt de genexpressie in de wortel sterk naarmate de concentraties toenemen. De expressie bij een blootstelling aan 10µM is voor dit gen in de wortel zelfs meer dan 8 keer hoger in vergelijking met de controletoeestand. Het ijzer SOD, *FSD1*, blijkt dus een belangrijk antioxidatief verdedigingssysteem in de wortel aangezien zijn expressie hier sterk stijgt.

Cu heeft in de wortel een inhiberend effect op alle SOD's (figuur 7). In de blaadjes heeft het ook een inhiberend effect op *FSD1* maar opmerkelijk is de stijging in expressie van *CSD1* met een factor 5 ten opzichte van de controle.

Catalase zorgt voor de dismutatie van H_2O_2 in H_2O en O_2 in de peroxisomen. Het gen *CAT1* codeert voor een subeenheid van het catalase. Zowel in de wortel als in het blad stijgt de genexpressie van *CAT1* na Cd-blootstelling (figuur 7). De stijging is groter in de wortel (factor 5) dan in het blad (factor 3).

Na Cu-blootstelling wordt *CAT1* verhoogd tot expressie gebracht (meer dan een factor 6). In de wortel is de genexpressie van enkel dit gen significant gestegen.

De voornaamste stijging in genexpressie van ROS-producerende enzymen in de wortel na Cd-blootstelling is er dus voor *RBOHD* en *LOX1*. In het blad is dit voor *RBOHC*, *RBOHE*, *RBOHF* en *LOX2*. Cu induceert in de wortel voornamelijk *LOX1* en *LOX2* en in het blad *RBOHD* en *LOX2*.

De belangrijkste antioxidatieve verdediging, althans wat betreft genexpressie, in de wortel na Cd-blootstelling gaat uit van *FSD1*, *CAT1* en *APX2*. In het blad is *APX1* en *CAT1* belangrijk voor de enzymatische antioxidatieve verdediging. *CSD1* en *CSD2* vertonen een inhibitie in genexpressie in zowel blad als wortel. Cu inhibeert in de wortel alle SOD's en *APX1* maar zorgt voor een gestegen expressie van *CAT1* en *APX2*. In de blaadjes is er een inhibitie van *CSD1* en een upregulatie van *CSD1*.

3.1.3 Glutathiongerelateerde genen

De microarrayanalyse toont aan dat glutathiongerelateerde genen een heel belangrijke rol blijken te spelen na blootstelling van *Arabidopsis thaliana* zaailingen aan realistische Cd- en Cu-concentraties. Deze gerelateerde genen hebben uiteenlopende functies, gaande van synthese van glutathion tot transport van glutathionconjugaties. In figuren 9 en 10 zijn deze genexpressiegegevens van 3 weken oude *Arabidopsis thaliana* zaailingen blootgesteld gedurende 24u aan Cd en Cu weergegeven.

GSH1 en *GSH2* coderen enzymen die noodzakelijk zijn voor de aanmaak van glutathion. Wat betreft de Cd-blootstelling, blijft de genexpressie voor *GSH1* in het blad ongeveer constant (figuur 9). In de wortel is er bij 10 μ M Cd een stijging in expressie tot 6 keer de controlewaarde. *GSH2* expressie wordt in de wortel tot de helft van de controlewaarde

gereduceerd, terwijl in het blad een verdubbeling zichtbaar is in expressie – bij een concentratie van 5µM Cd – vergeleken met de controle.

Bij de glutathion-S-transferasen, na Cd-blootstelling, (figuur 9) schommelen de waarden van genexpressie van *GST6* voor zowel wortel als blad allemaal rond de controle. *GSTU26* vertoont dezelfde trend, al is hier wel sprake van een significante daling in genexpressie, in zowel blad als wortel, bij een concentratie van 5µM Cd. Enkel *GST2* vertoont een sterke stijging in genexpressie. In de wortel is er een stijging tot een factor 25 en in het blad zelfs tot een factor 35.

MRP's (Multi-drug-resistance-related proteins) maken deel uit van de familie van de ATP-binding cassette (ABC) Transporters. De resultaten van de kwantitatieve PCR tonen aan dat de relatieve genexpressie sterk stijgt bij een Cd-concentratie van 5µM Cd (figuur 9). Dit gebeurt zowel in de wortel als in het blad. In het blad is er zelfs een stijging waar te nemen bij een concentratie van 2µM Cd. De genexpressie van *MRP4* in het blad wordt dus sterker beïnvloed dan de genexpressie in de wortel.

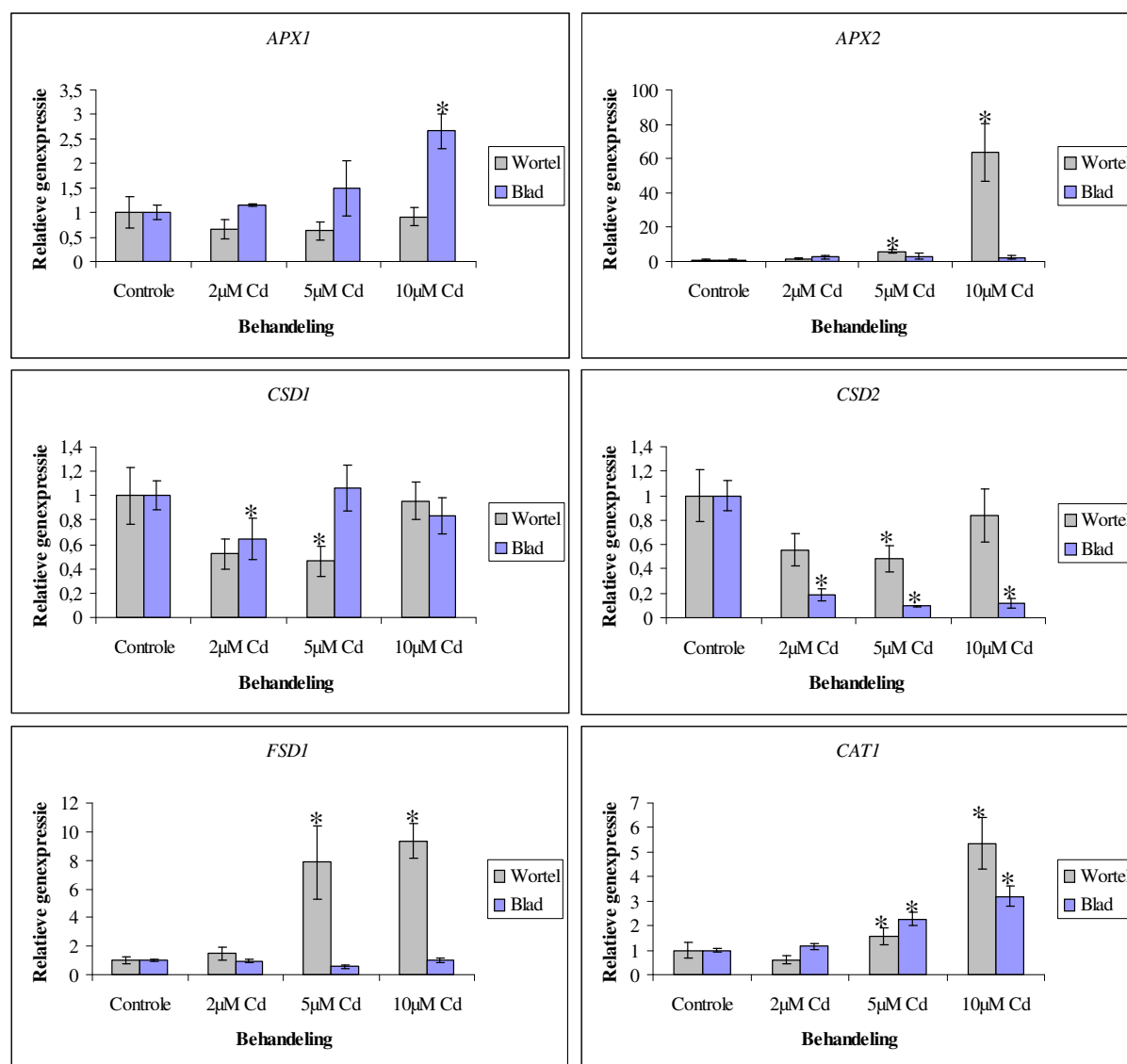
Phenylalanine ammonium lyasen worden in *Arabidopsis thaliana* gecodeerd door 4 genen waaronder *PAL1* en *PAL2*. De genexpressie van zowel *PAL1* als *PAL2* – bij de Cd-behandeling – daalt sterk (figuur 9), meer bepaald met een factor 5 ten opzichte van de controle, in het blad. In de wortel is er ook een dalende trend maar niet zo uitgesproken als in het blad. Hier is er sprake van een halvering in genexpressie ten opzichte van de controle.

De resultaten van de genexpressie na de Cu-behandeling laten andere trends zien (figuur 10). Zowel *GSH1* als *GSH2* vertonen een stijging in genexpressie in blad en wortel maar meer uitgesproken in de wortel (factor 3 ten opzichte van de controle). *GST6* vertoont net zoals bij de Cd-behandeling een schommeling rond de controlewaarde in de wortel. In het blad echter is er sprake van bijna een verdubbeling in genexpressie bij een concentratie van 2µM Cu. *GSTU26* vertoont een sterke daling (meer dan een factor 5) in genexpressie in de wortel. *GST2* ondervindt net zoals bij de Cd-behandeling een sterke stijging in genexpressie maar nu enkel in de wortel. De Cu-behandeling laat voor *PAL1* en *PAL2* andere trends zien dan bij de Cd-behandeling. Hier stijgt de genexpressie in zowel blad als wortel, maar meer uitgesproken in de wortel.

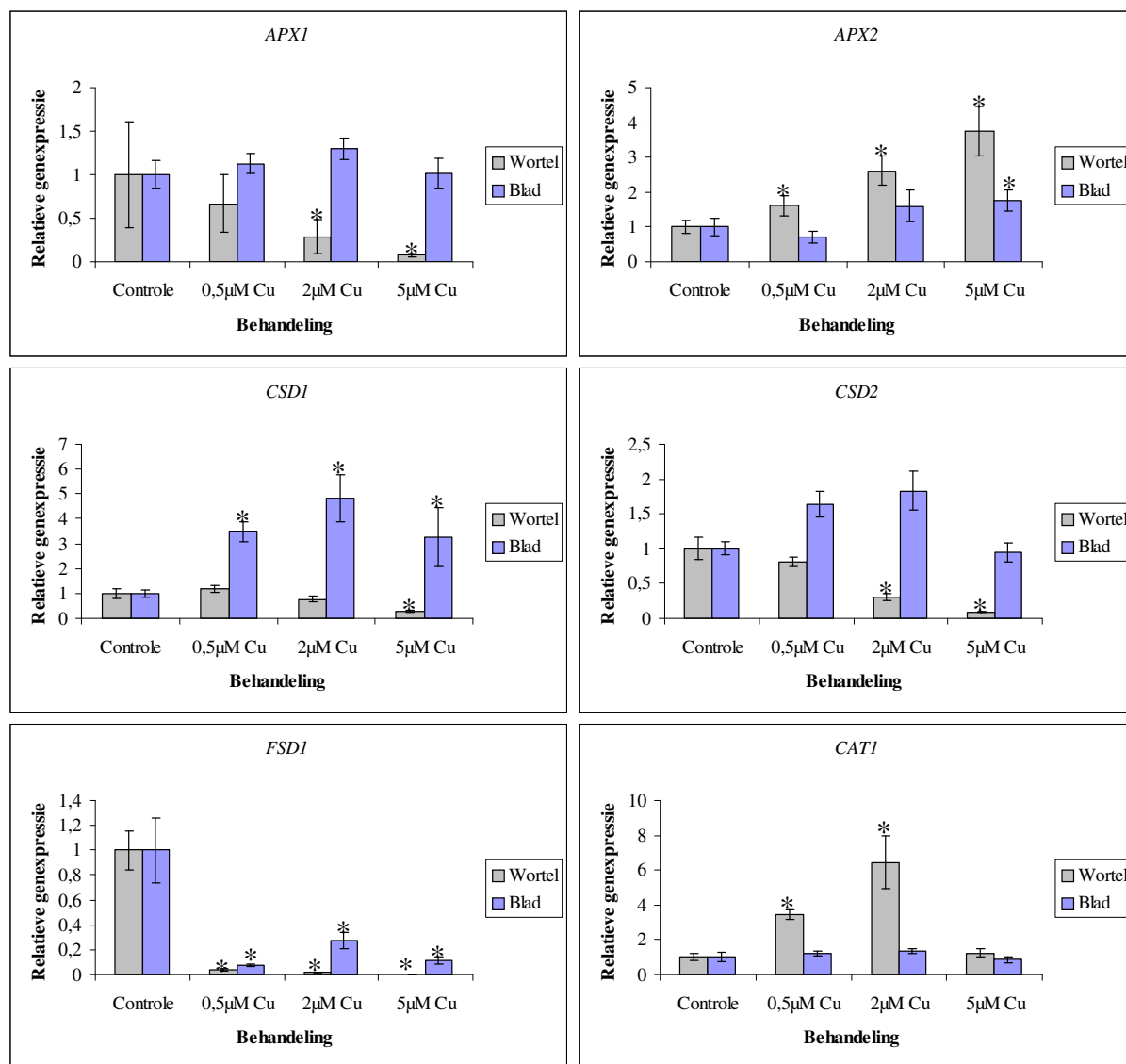
De resultaten van de Cu-behandeling laten voor *MRP4* wel dezelfde trend zien als bij de Cd-behandeling, namelijk een stijging in genexpressie van *MRP4*. In dit geval is er een significante stijging zichtbaar bij een concentratie van 2µM Cu. Wat hier opvalt, is dat het orgaan met de grootste stijging niet het blad is, maar de wortel.

3.1.4 Metabolisme-geassocieerde genen

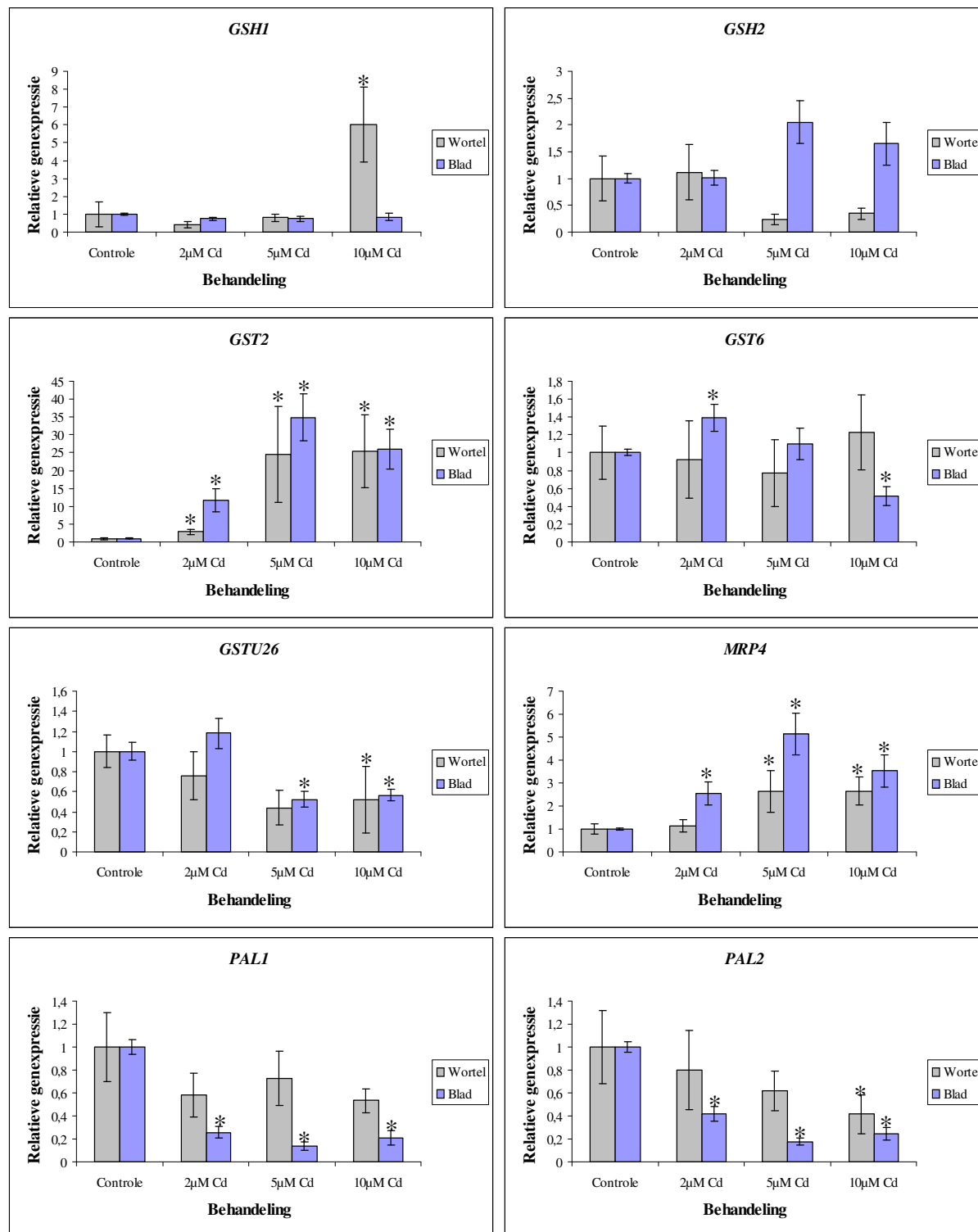
GAPC en *GAPDH* coderen voor subeenheden van GAPDH, een enzym betrokken in de glycolyse. Na Cd- en Cu-blootstelling is er in het blad een verhoogde expressie van *GAPC*. Wat betreft *GAPDH* is er zowel bij Cd- als Cu-blootstelling een inhibitie in genexpressie. Bij Cu is dit enkel in de wortel terwijl het bij Cd in zowel wortel als Cd het geval is (figuur 11).



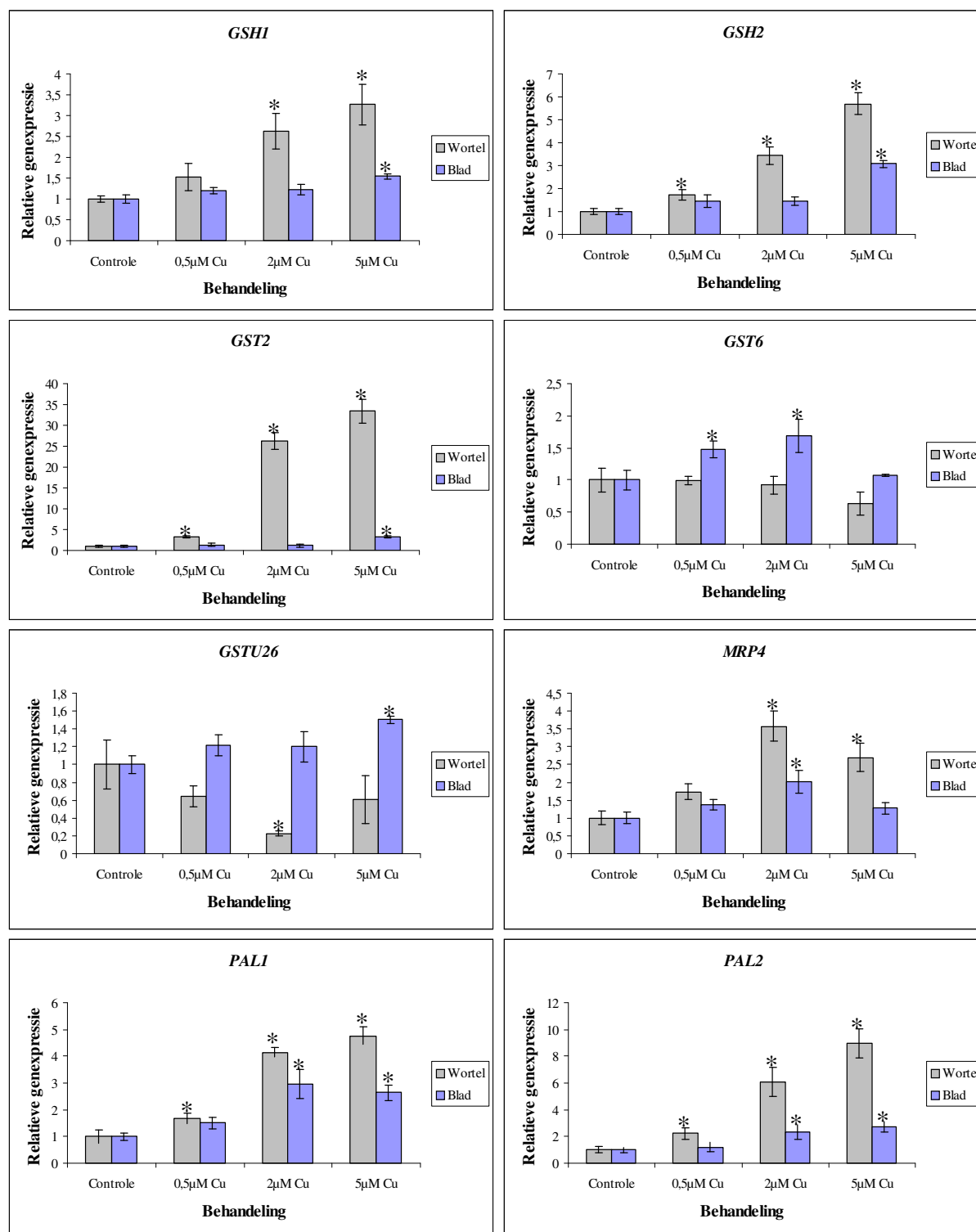
Figuur 7: Genexpressie van antioxidatieve enzymen in 3 weken oude *Arabidopsis thaliana* zaailingen blootgesteld gedurende 24 uur aan verschillende realistische cadmiumconcentraties. De genexpressie is relatief ten opzichte van de controle uitgedrukt. Per behandeling is een waarde weergegeven die het gemiddelde is van 5 biologische herhalingen. De significantie is bepaald op significantieniveau $p=0.05$. Het symbool * betekent significantie ten opzichte van de controle. APX, ascorbaat peroxidase; CSD, Cu-Zn superoxidedismutase; FSD, ijzer superoxidedismutase; CAT, catalase.



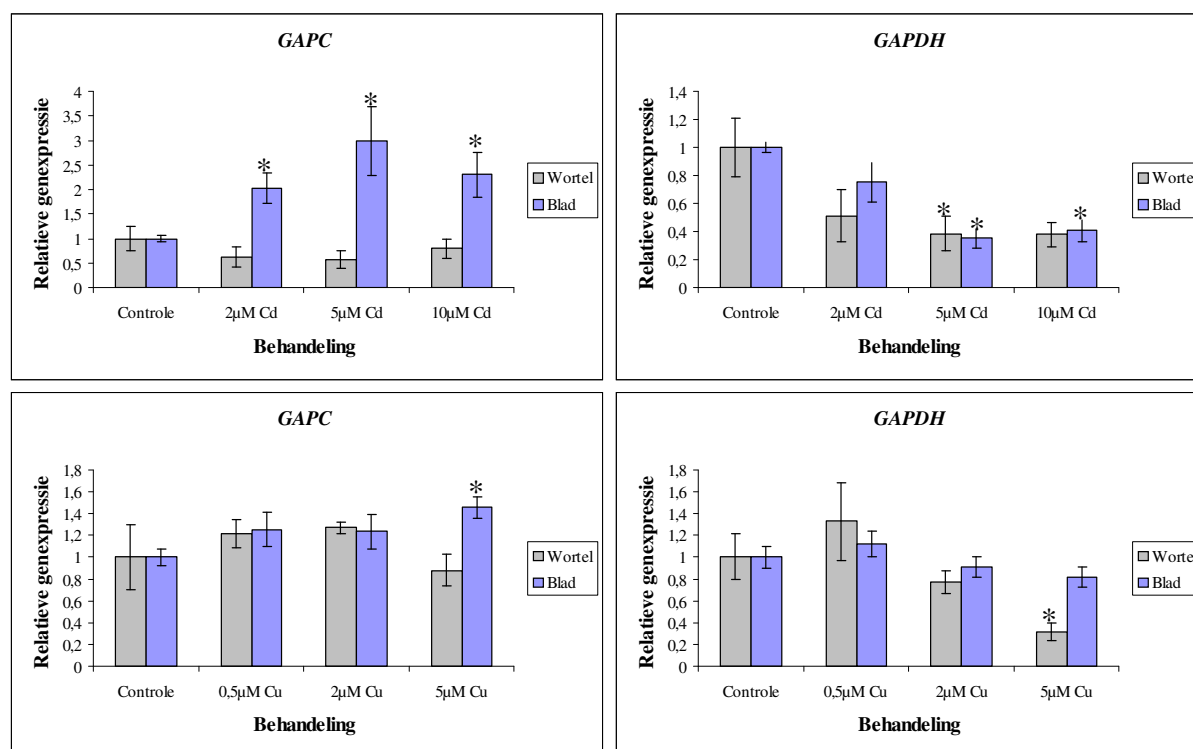
Figuur 8: Genexpressie van antioxidatieve enzymen in 3 weken oude *Arabidopsis thaliana* zaailingen blootgesteld gedurende 24 uur aan verschillende realistische koperconcentraties. De genexpressie is relatief ten opzichte van de controle uitgedrukt. Per behandeling is een waarde weergegeven die het gemiddelde is van 5 biologische herhalingen. De significantie is bepaald op significantieniveau $p=0.05$. Het symbool * betekent significantie ten opzichte van de controle. APX, ascorbaat peroxidase; CSD, koper-zink superoxidisedismutase; FSD, ijzer superoxidisedismutase; CAT, catalase.



Figuur 9: Genexpressie van glutathiongerelateerde genen in 3 weken oude *Arabidopsis thaliana* zaailingen blootgesteld gedurende 24 uur aan verschillende realistische cadmiumconcentraties. De genexpressie is relatief ten opzichte van de controle uitgedrukt. Per behandeling is een waarde weergegeven die het gemiddelde is van 5 biologische herhalingen. De significantie is bepaald op significantieniveau $p=0.05$. Het symbool * betekent significantie ten opzichte van de controle. *GSH1*, glutamate-cysteine ligase; *GSH2*, glutathione synthetase; *GST*, glutathione-S-transferase; *MRP*, Multidrug Resistance Protein; *PAL*, phenylalanine ammonium lysase.



Figuur 10: Genexpressie van glutathiongerelateerde genen in 3 weken oude *Arabidopsis thaliana* zaailingen blootgesteld gedurende 24 uur aan verschillende realistische koperconcentraties. De genexpressie is relatief ten opzichte van de controle uitgedrukt. Per behandeling is een waarde weergegeven die het gemiddelde is van 5 biologische herhalingen. De significantie is bepaald op significantieniveau $p=0.05$. Het symbool * betekent significantie ten opzichte van de controle. *GSH1*, glutamate-cysteine ligase; *GSH2*, glutathione synthetase; *GST*, glutathione-S-transferase; *MRP*, Multidrug Resistance Protein; *PAL*, phenylalanine ammonium lysase.

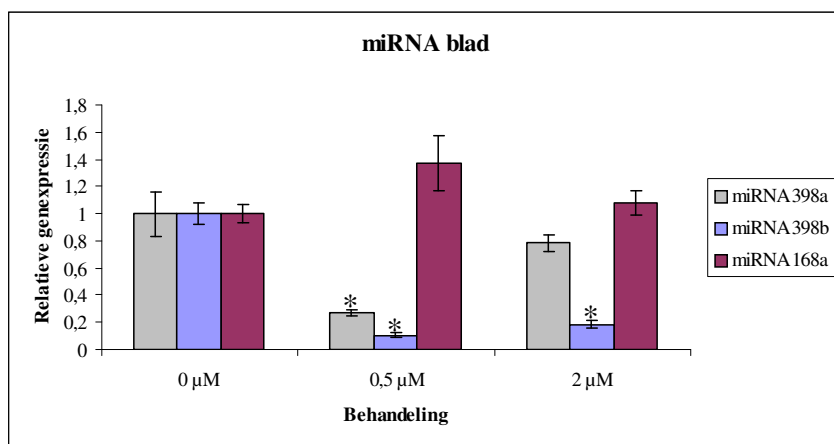


Figuur 11: Genexpressie van *GAPC* en *GAPDH* in 3 weken oude *Arabidopsis thaliana* zaailingen blootgesteld gedurende 24 uur aan verschillende realistische cadmium- en koperconcentraties. De genexpressie is relatief ten opzichte van de controle uitgedrukt. Per behandeling is een waarde weergegeven die het gemiddelde is van 5 biologische herhalingen. De significantie is bepaald op significantieniveau $p=0.05$. Het symbool * betekent significantie ten opzichte van de controle. *GAPC*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C subeenheid (*GAPC-1*); *GAPDH*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPC-2*).

3.2 microRNA

MicroRNA genexpressie is gemeten in de blaadjes van *Arabidopsis thaliana* zaailingen die gedurende 24u zijn blootgesteld aan Cu (figuur 12). De genexpressie van 3 miRNA's is bepaald. MicroRNA 168a heeft als target het mRNA van argonaut1. Dit argonaut 1 is betrokken in miRNA biosynthese. De genexpressie van miRNA168a wordt niet significant beïnvloed.

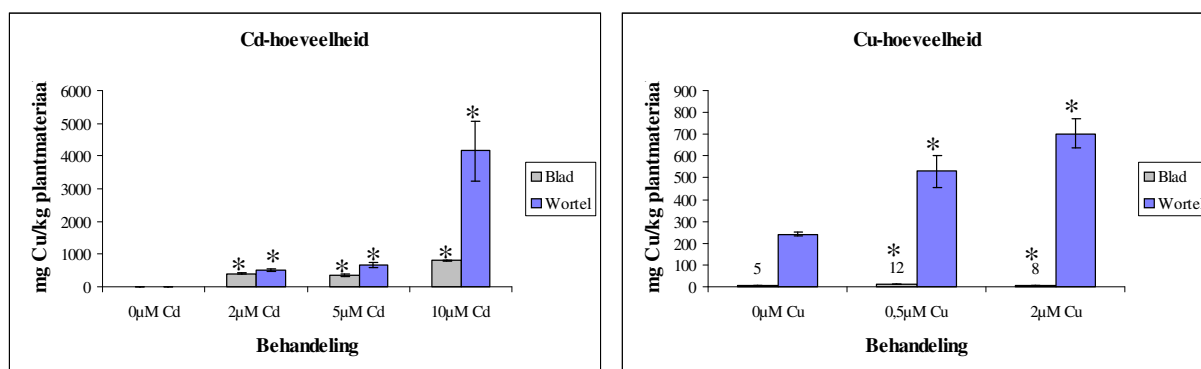
MicroRNA's 398a en hebben als target het mRNA van Cu-Zn SOD's *CSD1* en *CSD2*. De expressie van miRNA 398b daalt significant bij 0.5µM en 2µM Cu. De genexpressie van miRNA398b daalt significant bij 0.5µM Cu.



Figuur 12: Genexpressie van miRNA's relatief ten opzichte van de controle na blootstelling aan realistische koperconcentraties. De genexpressie is uitgedrukt relatief ten opzichte van de controle. Per behandeling is een waarde weergegeven die het gemiddelde is van 3 biologische herhalingen. De significantie is bepaald op significantieniveau $p=0.05$. Het symbool * betekent significantie ten opzichte van de controle.

3.3 Metaalbepalingen

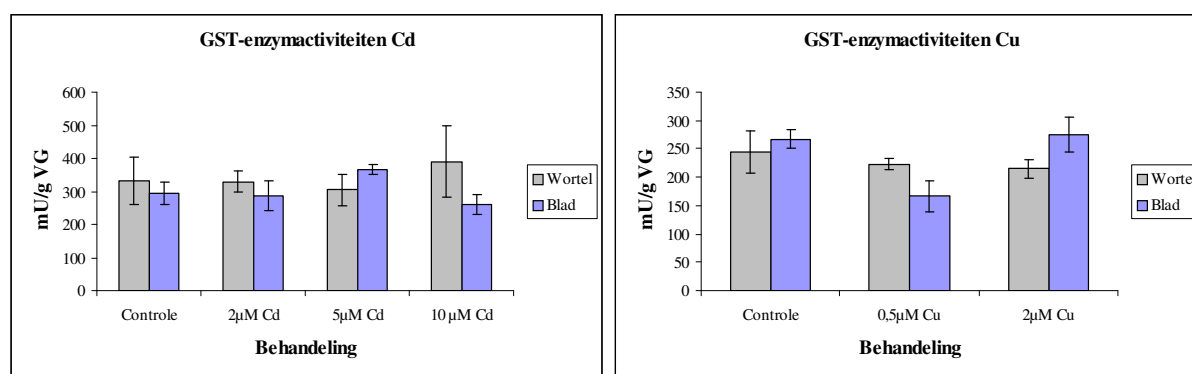
De concentratie van de toxische metalen Cu en Cd is bepaald in plantstalen behandeld met realistische Cd- en Cu-concentraties. De hoeveelheid Cd (figuur 13) stijgt in blad en wortel met toenemende Cd-concentraties in het groeimedium, (in de wortel is de hoeveelheid Cd, vooral bij $10\mu\text{M}$, veel hoger dan in het blad) en hierbij feller in de wortel. De hoeveelheid Cu stijgt eveneens sterk in de wortel van Cu-behandelde stalen. In het blad is er een stijging in Cu-hoeveelheid ten opzichte van de controle.



Figuur 13: Bepaling van hoeveelheid cadmium in plantstalen behandeld met realistische Cd- en Cu-concentraties. De hoeveelheid Cd en Cu wordt uitgedrukt in milligram Cd per kilogram plantenmateriaal. Per behandeling is een waarde weergegeven die het gemiddelde is van 3 biologische herhalingen. De significantie is bepaald op significantieniveau $p=0.05$. Het symbool * betekent significantie ten opzichte van de controle.

3.4 GST-enzymactiviteiten

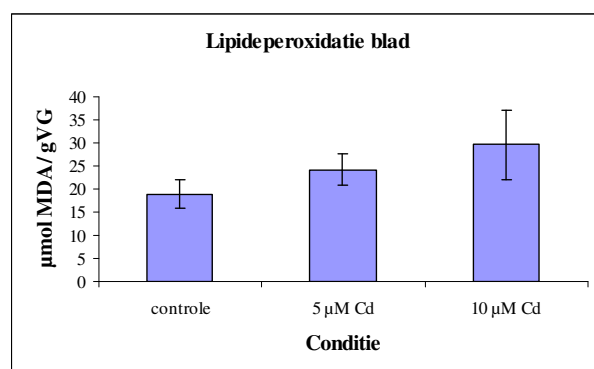
Een verhoging of verlaging in genexpressie betekent niet noodzakelijk een stijging of daling in enzymactiviteit. Er kunnen immers nog posttranscriptionele en posttranslationele modificaties plaatsvinden, al dan niet onder invloed van Cd en Cu. Daarom is in dit onderzoek in beperkte mate ook gekeken naar de enzymactiviteit van GST's. In figuur 14 is de enzymactiviteit weergegeven voor realistische Cd- en Cu-behandelingen. Er is geen significant verschil in enzymactiviteiten bij beide behandelingen in zowel blad als wortel.



Figuur 14: Enzymactiviteiten van glutathion-S-transferasen uitgedrukt in milliUnits per gram vers gewicht (mU/g VG). Per behandeling is een waarde weergegeven die het gemiddelde is van 4 biologische herhalingen. De significantie is bepaald op significantieniveau $p=0.05$. Het symbool * betekent significantie ten opzichte van de controle.

3.5 TBA-metingen

De schade die reactieve zuurstofintermediaren hebben aangericht aan het membraan kunnen gemeten worden door het uitvoeren van TBA-metingen. Figuur 15 geeft de lipideperoxidatie in het blad weer. Er is een stijgende trend in de hoeveelheid Malondialdehyde (MDA) bij stijgende Cd-concentraties.

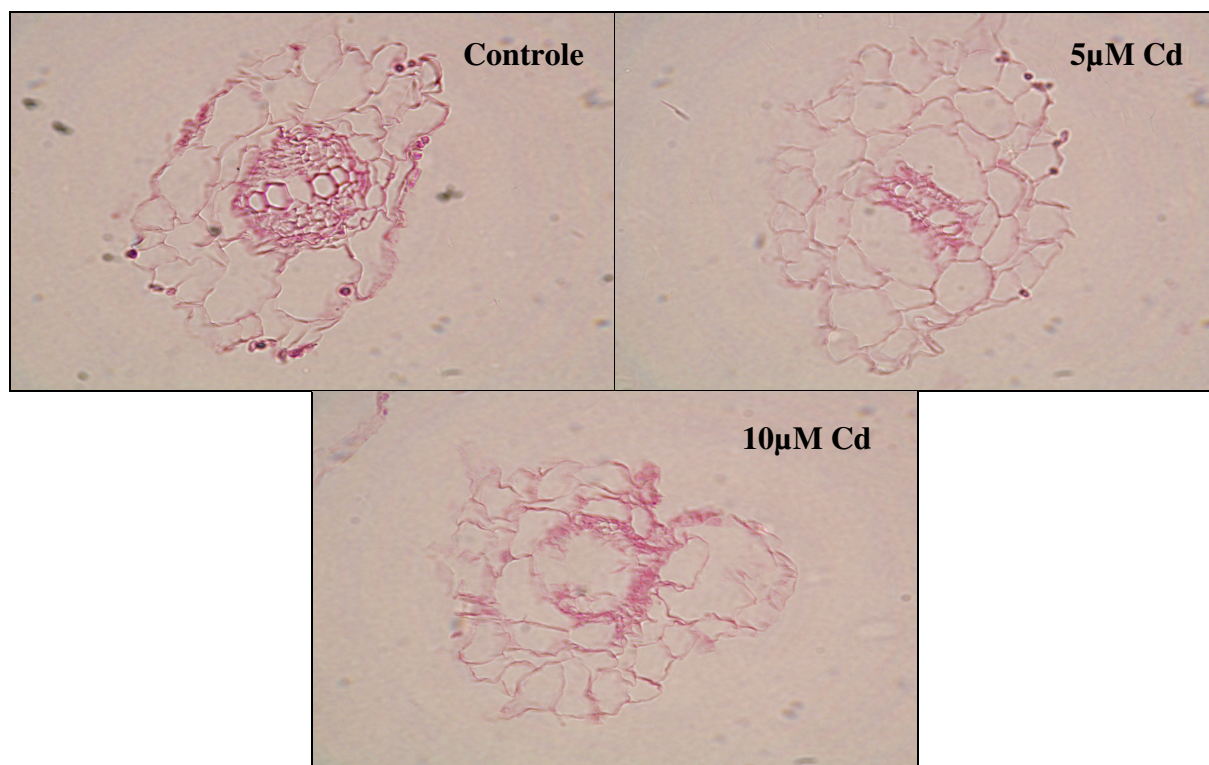


Figuur 15: Lipideperoxidatie in het blad bij stijgende Cd-concentraties uitgedrukt in hoeveelheid MDA per gram vers gewicht. Per behandeling is een waarde weergegeven die het gemiddelde is van 4 biologische herhalingen. De significantie is bepaald op significantieniveau $p=0.05$. Het symbool * betekent significantie ten opzichte van de controle.

3.6 Microscopie

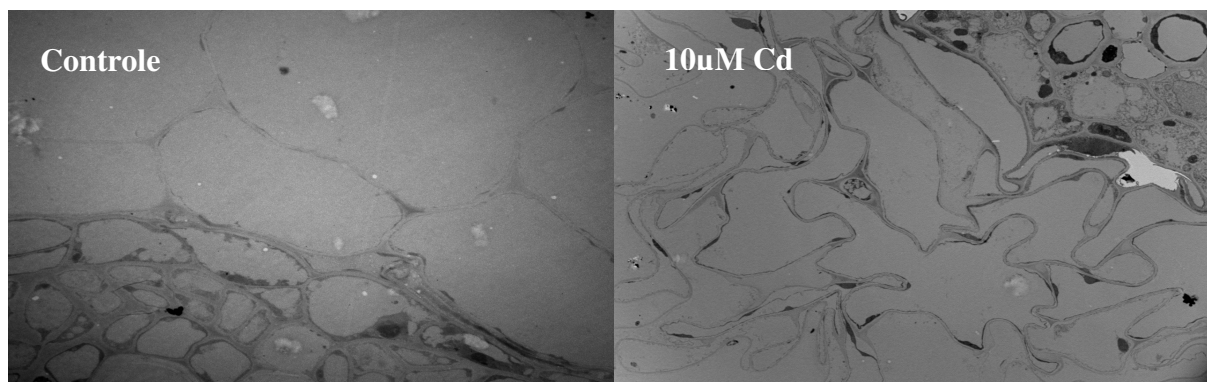
Van Cd-behandelde wortels ($5\mu\text{M}$ Cd en $10\mu\text{M}$ Cd) van 3 weken oude *Arabidopsis thaliana* zaailingen zijn lichtmicroscopische coupes gemaakt met een ligninekleuring en tevens elektronenmicroscopische coupes.

Op de foto's verkregen met behulp van de lichtmicroscop (figuur 16) kan afgeleid worden dat er minder lignificatie optreedt bij stijgende Cd-concentraties. Dit is duidelijk te zien ter hoogte van de vaatbundels.

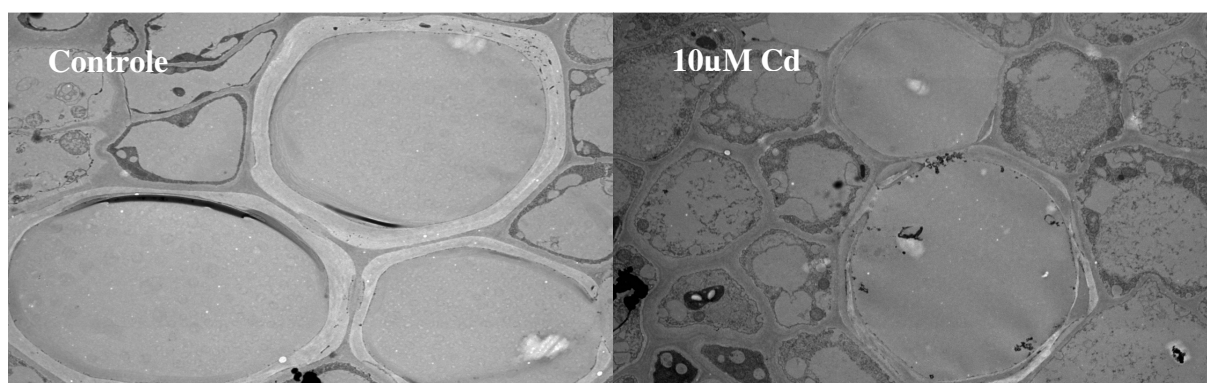


Figuur 16: Lichtmicroscopie-opnamen van wortelcoupes blootgesteld aan realistische cadmiumconcentraties. De coupes zijn behandeld met een kleuring voor lignine. De opnamen zijn gemaakt met een 40x vergroting.

De elektronenmicroscopische opnames (figuur 17) laten zien dat er in de cortex veranderingen optreden wanneer Cd wordt toegediend. Waar in de controlecoupes een regelmatige cortex met grote cortexcellen zichtbaar is, is deze cortex onregelmatiger bij $10\mu\text{M}$. De cellen hebben een veranderde, verschrompelde, structuur. Figuur 18 laat xyleemvaten zien. De xyleemvaten zijn na 24u blootstelling aan $10\mu\text{M}$ Cd verkleind en hebben een minder dikke celwand.



Figuur 17: Elektronenmicroscopie-opnamen van de cortex in wortelcoupes blootgesteld aan realistische cadmiumconcentraties. De opnames zijn gemaakt met een 1200x vergroting.



Figuur 18: Elektronenmicroscopie-opnamen van de xyleemvaten in wortelcoupes blootgesteld aan realistische cadmiumconcentraties. De opnames zijn gemaakt met een 4800x vergroting.

De dikte van de xyleemvatenwand werd tevens berekend (tabel 2). Er is een duidelijke dalende trend waarneembaar in de dikte van de vaten na blootstelling aan realistische Cd-concentraties.

Tabel 2: Dikte van de wand van de xyleemvaten na blootstelling aan realistische Cd-concentraties. De bekomen waarden zijn de gemiddelden van de diktes van de wanden van de xyleemvaten in 5 verschillende coupes van dezelfde behandeling. De significantie is bepaald op significantieniveau $p=0.05$. Het symbool * betekent significantie ten opzichte van de controle.

| Behandeling | Gemiddelde dikte xyleemvat (nm) | Standaarderror (SE) |
|---------------|---------------------------------|---------------------|
| Controle | 1008,43 | $\pm 272,12$ |
| 5 μ M Cd | 645,41 | $\pm 20,82$ |
| 10 μ M Cd | 591,19 | $\pm 16,82$ |

4 Discussie

Het is al meerdere malen aangetoond dat Cd en andere metalen oxidatieve stress veroorzaken (31,32). Hoe deze oxidatieve stress juist tot stand komt is echter niet geweten. Om mogelijke pathways te ontdekken en meer te weten te komen over het ontstaan van oxidatieve stress is door middel van een microarray-experiment een open screening van genen uitgevoerd die een veranderde expressie vertonen na Cd-blootstelling. Uit deze screening zijn enkele oxidatieve stress-gerelateerde genen belangrijk gebleken.

Oxidatieve stress is een onevenwicht tussen de reactieve zuurstofvormen en de antioxidanta in de cel aanwezig. Zowel Cd als Cu veroorzaken dit onevenwicht wanneer organismen worden blootgesteld aan één van deze elementen. Het verschil tussen deze twee toxische metalen is dat Cd, in tegenstelling tot Cu, geen redoxreactieve eigenschappen bezit. In deze studie is het mechanisme dat Cd na opname in *Arabidopsis thaliana* zaailingen induceert en de betrokkenheid van oxidatieve stress hierin verder ontrafeld en vergeleken met Cu-behandelde *Arabidopsis thaliana* zaailingen.

Cd wordt in de wortel opgenomen door transmembranaire carriers die in normale omstandigheden instaan voor de opname van onder andere K, Ca, Mg, Fe en Mn (9). In de aanwezigheid van Cd treedt er een competitie op met deze nutriënten. Wanneer Cd wordt opgenomen zal de wortel als eerste schade ondervinden. Aangezien de wortel als eerste geconfronteerd wordt met hoge metaalconcentraties en de schadelijke effecten, zoals lipidenperoxidatie, hiervan (33). Elektronenmicroscopisch werden ter hoogte van de cortex van de wortel structurele verschillen na Cd-blootstelling waargenomen (figuur 17) wat de impact van dit toxische metaal nog maar eens bevestigt. Deze structurele veranderingen ter hoogte van de cortex werden ook gezien in rijstzaailingen blootgesteld aan chloraat (34).

Een deel van het opgenomen cadmium zal het xyleem bereiken en op deze manier getransporteerd worden naar het blad. Een ander deel blijft gecomplexeerd in de wortel(9).

De hoeveelheden Cd zijn significant gestegen in het blad en de wortel ten opzichte van de controleplanten (figuur 13). In eerder onderzoek met *Arabidopsis thaliana* is reeds aangetoond dat Cd in zijn gecomplexeerde vorm via de xyleemvaten de blaadjes kan bereiken (35). Daarenboven werd in deze studie een inhiberend effect van Cd op de genexpressie van een belangrijk enzym betrokken in de lignine synthese, aangetoond. Phenyl-ammonium lyase, PAL, wordt in *Arabidopsis thaliana* gecodeerd door 4 genen waaronder *PAL1* en *PAL2*. Het

is het eerste enzym in het phenylpropanoid pathway waaruit onder andere lignine, salicylzuur en flavonoiden gevormd worden. Lignine is een polymeer en een structurele component van de celwand. De dikte van de celwand wordt bepaald door depositie van dit lignine en polysacchariden zoals cellulose (36). Cd heeft een inhiberend effect op *PAL1* en *PAL2* (figuur 9) in het blad en er is een sterk dalende trend waarneembaar in de wortel. Aangezien lignine een bindingsplaats voor Cd inhoudt heeft deze dalende trend naast een minder dichte/dikke celwand dus als gevolg dat er minder metaal in de celwand kan gebonden worden. De metingen van de dikte van de xyleemvaten in de wortel bevestigen deze stelling voor de Cd-behandeling. Lichtmicroscopisch werd deze stelling eveneens bevestigd. Deze effecten zouden het transport van Cd naar bovengrondse delen van de plant kunnen vergemakkelijken. Cu wordt opgenomen door Cu-transporters met een hoge affiniteit. Deze transporters behoren tot de Ctr familie. Een voorbeeld van een kopertransporter die tot deze familie behoort de Ctr-related copper transporter (*COPT1*). In normale omstandigheden wordt intracellulair koper gebonden door metallochaperones (copper chaperone, CCH) die het metaal naar de plaats brengen waar het nodig is (37).

In de wortel is de hoeveelheid Cu significant gestegen ten opzichte van de controle (figuur 13). In het blad blijft de hoeveelheid quasi gelijk, al is er een licht stijgende trend zichtbaar. Dit kan wijzen op een goede complexatie van Cu ter hoogte van de wortel en een vermindering van transport van Cu naar de blaadjes. Er is na Cu-blootstelling een stijging in genexpressie van *PAL1* en *PAL2* (figuur 10) wat kan zorgen voor een verhoogde lignine-aanmaak. Een mogelijke hypothese is dat deze verhoging in lignine kan zorgen voor een dikkere en dichtere celwand. De hoeveelheid Cu in de blaadjes, die duidelijk minder is dan de hoeveelheid Cd in de blaadjes, is hiervoor een indicatie. In de plant *Glycine max* is reeds aangetoond dat de lignine-hoeveelheid significant stijgt na 24 uur blootstelling aan Cu (38). Deze hypothese dient in *Arabidopsis thaliana* echter nog verder onderzocht te worden op lichtmicroscopisch en elektronenmicroscopisch niveau.

4.1 Effect van Cd en Cu op de genexpressie van ROS-producerende enzymen en enzymen van de antioxidatieve verdediging

Uit de resultaten van de genexpressie kan afgeleid worden dat zowel Cd als Cu de vorming van ROS verhogen. Dit is in overeenstemming met eerder onderzoek. Cho en Seo (31) hebben aangetoond dat oxidatieve stress in *Arabidopsis thaliana*, blootgesteld aan Cd, te wijten is

aan H_2O_2 accumulatie. Drazkiewicz et al. (32) hebben aangetoond dat een teveel aan Cu in het groeimedium van *Arabidopsis thaliana* oxidatieve stress induceert.

Cd induceert oxidatieve stress op een indirecte manier, ondermeer door een upregulatie van bepaalde NADPH-oxidasen. Cu is eveneens in staat om op een directe manier, via een oxidatie-reductie reactie, ROS te induceren. In de wortels blootgesteld aan Cu werd er geen verhoging in NADPH-oxidase expressie waargenomen, *RBOHC* en *RBOHF* werden zelfs geïnhibeerd (figuur 6). Waar de wortel in direct contact staat met grote hoeveelheden van het toxisch metaal en dus aan ernstige toxiciteit is blootgesteld, is er in het blad sprake van lagere metaalconcentraties. Dit resulteert in een mildere stress (39).

Opvallend is de stijging in genexpressie van enkele NADPH-oxidasen in het blad. Voor Cu is dit voornamelijk *RBOHD* en voor Cd zijn dit *RBOHC*, *RBOHE* en *RBOHF* (figuren 5 en 6). *RBOHD* en *RBOHF* komen tot expressie in de sluitcellen wat de stijging in genexpressie in het blad verklaart. Ze worden transcriptioneel geïnduceerd door ABA wat kan wijzen op een signaalmechanisme vanuit de wortel. Verder onderzoek is nodig om een precies beeld te krijgen van de functies van de verschillende NADPH-oxidasen na metaalstress (40).

Na zowel Cd- als Cu-behandeling is er een stijging in genexpressie van het lipoxygenase *LOX1* in de wortel (figuren 5 en 6). Dit enzym komt in normale omstandigheden voor in het cytoplasma in de wortelcellen (41). In het blad komt in zowel de Cd- als Cu-behandeling *LOX2*, gelokaliseerd in de chloroplast, verhoogd tot expressie. De lipoxygenasen induceren lipidenperoxidatie door de hydroperoxidatie van poly-onverzadigde vetzuren (PUFA's). Omwille van de hogere expressie, kan er dus ook een stijging in lipidenperoxidatie verwacht worden. In de blaadjes is er, zo blijkt uit dit onderzoek, inderdaad een stijgende trend zichtbaar in lipidenperoxidatie na Cd-blootstelling (figuur 15). Voorheen is reeds aangetoond dat de lipidenperoxidatie in de wortel significant stijgt bij zowel Cd- als Cu-behandeling (33).

Om de effecten van deze ROS tegen te gaan, reageren organismen door hun antioxidatieve verdediging te activeren. Een verhoging in zowel de genexpressie als in de activiteit van verschillende antioxidatieve enzymen werd reeds eerder aangetoond in *Arabidopsis thaliana* na Cd en Cu blootstelling (42). Deze toxische metalen kunnen echter, door het verstoren van cellulaire processen of door competitie met cofactoren, ook een daling van antioxidatia veroorzaken met als gevolg eveneens een onevenwicht en dus oxidatieve stress (9). Cu heeft een inhiberend effect op een groot aantal genen in de wortel die betrokken zijn in de antioxidatieve verdediging. Er is een daling waarneembaar in de expressie van de SOD's (*CSD1*, *CSD2*, *FSD1* en *MSD1*) (figuur 6). In eerder onderzoek in tarwe is aangetoond dat

Cu-Zn SOD's gefragmenteerd en als gevolg geïnactiveerd en gedegradeerd worden door $\cdot OH$ (43). Mogelijks doet zich, omwille van de grote toxiciteit van Cu, op genexpressieniveau ook een mechanisme voor dat de expressie van verschillende SOD's inhibeert. Enkel catalase (*CAT1*) stijgt in de wortel. Dit kan er op wijzen dat Cu de vorming van H_2O_2 sterk induceert. Ook in het blad heeft Cu een inhiberend effect, maar enkel op *FSD1*. Hier is er een verhoogde expressie van *CSD1* waarneembaar. Cd zorgt zowel in het blad als in de wortel voor een stijging in genexpressie van meerdere antioxidatieve enzymen (figuur 5). In het blad zijn deze genen *CAT1* en *APX1*. De sterkste stijgingen gebeuren bij concentraties van $5\mu M$ en $10\mu M$ Cd. In de wortel zijn deze genen *APX2*, *FSD1* en *CAT1*. Cd heeft echter ook inhiberende effecten op de genexpressie van sommige enzymen bij bepaalde concentraties (figuur 6). Zowel in het blad als in de wortel is er inhibitie van *CSD1* en *CSD2*. De concentraties waarbij dit gebeurt zijn echter verschillend in blad en wortel. Door dit inhiberend effect kan Cd, net zoals Cu, een bijdrage leveren in het ontstaan van oxidatieve stress.

De effecten op CuZnSOD kunnen ook verklaard worden door miRNA's (figuur 12). De werking van miRNA's en hun effecten op het blad en de wortel na Cd-blootstelling zijn reeds verklaard in een ander gelijklopend onderzoek (44). Hieruit blijkt dat zowel miRNA398a als miRNA398b verhoogd tot expressie komen na de blootstelling aan Cd, en ze de oorzaak zijn van de Cd-geïnduceerde *CSD1* en *CSD2* inhibitie. Onze resultaten tonen, na Cu-blootstelling, een verlaging in miRNA 398a en 398b expressie. Door de verlaagde expressie worden *CSD1* en *CSD2* mRNA minder gedegradeerd wat tot een stijging in genexpressie leidt van deze Cu/Zn SOD's in het blad.

4.2 De rol van glutathion na Cd-en Cu-behandeling in de wortel

Na een screening op genexpressieniveau (microarray) blijken vooral veranderingen in glutathion-afhankelijke genen waarneembaar na Cd-blootstelling. Dit werd nadien bevestigd met behulp van real time PCR (figuren 9 en 10). Wanneer toxische elementen zoals Cd en Cu de wortel bereiken, wordt daar zoveel mogelijk verhinderd dat deze metalen schade toebrengen. Dit kan gebeuren door onder andere immobilisatie ter hoogte van de celwand door extracellulaire koolhydraten zoals callose. Een ander mechanisme is de betrokkenheid van **fytochelatinen (PC)** en metallothioneïnen (MT) die zorgen voor de complexatie van de toxische metalen (9). De synthese van deze PC's begint reeds enkele minuten na Cd- en Cu-

blootstelling. Dit werd aangetoond door Grill et al. (45). Zij hebben verschillende celsuspensieculturen van monocotylen en dicotylen blootgesteld aan metaalionen en de kinetiek van fytochelatine-inductie gevolgd. Het enzym fytochelatine synthase (PCS) katalyseert de polymerisatie van glutathion in de aanwezigheid van toxische metalen. Het gen *PCSI* dat betrokken is in de polymerisatie blijkt uit de microarray verhoogd tot expressie te komen na blootstelling aan Cd-concentraties van 5 μ M en 10 μ M. Dit kan wijzen op een Cd-PC-complexatie in de Cd-behandelde zaailingen.

De synthese van fytochelatinen is een stapsgewijze reactie waarbij een subeenheid van glutathion (γ -Glu-Cys) aan glutathion (γ -Glu-Cys-Gly) zelf gekoppeld wordt. In de biosynthese van glutathion zijn de enzymen gecodeerd door de genen *GSH1* en *GSH2* erg belangrijk. In de eerste stap van de biosynthese van glutathion katalyseert glutamaat cysteine ligase (gecodeerd door *GSH1*) de vorming van het dipeptide gamma-glutamylcysteïne (γ -Glu-Cys) uit cysteine en glutamaat. In de volgende reactie katalyseert glutathion synthase (gecodeerd door *GSH2*) de toevoeging van glycine aan het dipeptide (γ -Glu-Cys-Gly) (46). Na Cd-behandeling is in de genexpressieresultaten van de wortel een stijging zichtbaar in *GSH1* bij 10 μ M Cd terwijl er een dalende trend waarneembaar is in *GSH2* (figuur 9). De stijging in genexpressie van deze *GSH1* bij 10 μ M kan verklaard worden doordat voor de synthese van fytochelatinen het dipeptide γ -Glu-Cys meer nodig is als γ -Glu-Cys-Gly. Daardoor kan reeds snel een tekort optreden aan het enzym glutamaat cysteine ligase dat deze stap katalyseert waardoor de genexpressie van *GSH1* moet stijgen. Er is bovendien door PC-synthese een snelle depletie van glutathion en nood aan bijkomende synthese van glutathion voor de verdediging tegen oxidatieve stress. Mogelijks is de hoeveelheid van het enzym glutathion synthase nog toereikend voor glutathionsynthese en gebeurt er pas op een later tijdstip een stijging in genexpressie voor *GSH2*. In *Arabidopsis thaliana* zaailingen die blootgesteld zijn aan Cd-concentraties van 1 μ M en 10 μ M gedurende 1 week gebeurt er inderdaad een stijging in *GSH2* (47). Een andere hypothese voor de daling in expressie van *GSH2* is de negatieve feedbackloop van GSH op *GSH2* aangezien reeds eerder aangetoond is dat de GSH-hoeveelheid in de wortel stijgt na een blootstelling aan 10 μ M Cd (48).

De synthese van fytochelatinen na Cu-behandeling is enkel gerapporteerd bij toxische koperconcentraties. Dit zijn, in een studie van De Vos et al, de concentraties vanaf 1 μ M Cu (49). Cu is bij lagere concentraties immers een essentieel element voor het organisme. In dit experiment zijn er toxische effecten te zien na een blootstelling vanaf 2 μ M Cu gedurende 24h. Het is ook vanaf deze concentraties dat er een verhoogd *GSH1* en *GSH2* expressieniveau bereikt wordt in de wortel (figuur 10). Een verhoogde fytochelatine synthese na Cu-

blootstelling is eveneens aangetoond in *Silene cucubalus*. Deze planten werden blootgesteld aan 1 en 40 μ M gedurende drie dagen (49). In een studie van Ha et al. (50) is aangetoond dat Cu in *Arabidopsis thaliana* een sterke activator is van PC biosynthese, zowel *in vitro* en *in vivo*. Echter, in mutanten die PC-deficiënt zijn merkten ze weinig sensitiviteit voor Cu op. De conclusie was dat PC-Cu complexen weinig gesequestreerd worden naar de vacuole, dat de complexen transient zijn of dat er een alternatief en meer effectief mechanisme is voor Cu-detoxificatie. In onze studie is de sterke stijging in genexpressie van *GSH1* en *GSH2* noodzakelijk voor de vorming van glutathion voor de antioxidatieve verdediging en het is tevens een indicatie voor een verhoogde aanmaak van fytochelatinen.

Wanneer de toxische metalen gecomplexeerd zijn, kunnen deze complexen gesequestreerd worden in de vacuole (35). Dit voorkomt vrije circulatie van Cd- en Cu-ionen in het cytosol. In het proces van de vacuolaire compartimentalisatie zijn ABC-transporters betrokken en meerbepaald de GS-X pompen. Deze transporters die behoren tot de groep van de '**Multi-drug resistance proteins**' (**MRP**) en staan onder andere in voor het transport van glutathion-xenobiotica conjugaties naar de vacuole. De genexpressieresultaten van *MRP4* tonen een verhoogde expressie van deze transporter na blootstelling aan 5 en 10 μ M Cd (figuur 9). Over de functie van *MRP4* is nog niet veel geweten maar onze resultaten tonen aan dat de transporter een belangrijke rol kan spelen in de vacuolaire sequenstratie van Cd-PC-complexen. Naast deze transporter, blijkt uit de microarrayscreening tevens dat andere MRPs verhoogd tot expressie komen na Cd-blootstelling. Enkele voorbeelden zijn *MRP2* en *MRP3*. Van deze transporters is reeds geweten dat ze een belangrijke functie hebben in de sequestratie van glutathionconjugaties met xenobiotica (51). Ook na Cu-behandeling blijkt *MRP4* een sterke stijging in genexpressie te vertonen. Dit kan wijzen op een belangrijke rol van deze transporter in het transport van de Cu-PC-complexen naar de vacuole. Ook in de wortel kunnen andere transporters zoals *MRP3* en *MRP2* mogelijk een rol spelen. Dit dient echter nog aangetoond te worden.

Naast zijn rol in PC-synthese, heeft glutathion nog andere belangrijke functies in respons op Cd-toxiciteit en Cu-toxiciteit. Glutathion kan immers binden op subeenheden van gedimeriseerde **glutathion S-transferasen (GST)**. Hierna kan glutathion aan elektrofiële xenobiotica, endogene organische componenten of organische hydroperoxiden, gevormd tijdens oxidatieve stress, vasthechten waarna ook deze complexen naar de vacuole getransporteerd worden door GS-X pompen (51). *GST2* en *GST6* coderen voor glutathion S-

transferasen uit de phi-klasse terwijl *GSTU26* codeert voor een glutathion S-transferase uit de tau-klasse. De GST's uit de phi-klasse zijn actief als transferasen en glutathion peroxidasen. De GST's uit de tau-klasse zijn enkel actief als transferasen (52). Uit de microarray blijkt dat de respons van de verschillende GST's op Cd erg divers is, tussen de groepen onderling maar ook binnen de groepen zelf. Dat blijkt ook uit de RT-PCR bevestiging. Cd heeft een negatief inhiberend effect op sommige GST's waardoor andere GST's ter compensatie verhoogd tot expressie gaan komen. Zo is *GSTU26* geïnhibeerd en stijgt *GST2* in expressie (figuur 9). *GST2* blijkt enkel significant geïnduceerd te worden in de wortel en is waarschijnlijk betrokken in de detoxificatie van Cd en de toxische metabolieten die door cadmium gevormd worden als een gevolg van een verstoord plantenmetabolisme. Eerder onderzoek toont aan dat *GST2* membraangebonden is en vooral zorgt voor de detoxificatie van lipidenperoxidatieproducten (52). Een verhoging in lipidenperoxidatie werd eveneens aangetoond na Cd-blootstelling (42). Na Cu-behandeling stijgt de expressie van *GST2* in de wortel, de expressie van *GSTU26* daarentegen wordt geïnhibeerd. Dit kan ook hier wijzen op het wegwerken van lipidenperoxidatie-producten aangezien het reeds is aangetoond dat in *Arabidopsis thaliana* lipidenperoxidatie optreedt na Cu-blootstelling (33)

Nog een andere functie van glutathion is de rol van glutathion als elektronendonor. GSH geeft hierbij elektronen aan bijvoorbeeld H_2O_2 waardoor dit wordt omgezet tot H_2O . GSH wordt tijdens deze reactie omgezet in zijn geoxideerde vorm. Om de antioxidatieve eigenschappen terug te verkrijgen, is het noodzakelijk dat GSH terug omgezet wordt naar zijn gereduceerde vorm. Het enzym glutathion reductase (GR) is hiervoor verantwoordelijk. Uit de microarray blijkt dat dit enzym verhoogd tot expressie komt in Cd-behandelde wortels wat opnieuw wijst op de antioxidatieve rol van GSH na cadmiumbehandeling. Aangezien Cu redoxactief is en rechtstreeks ROS zoals H_2O_2 kan produceren, is het mogelijk dat GSH ook hier de rol van elektronendonor uitoefent (53). Uit eerder onderzoek is echter gebleken dat de genexpressie van *GR* na Cu-behandeling daalt (39) maar de activiteit van GR blijft ongewijzigd (33). Deze resultaten bevestigen eerder onderzoek waaruit reeds gebleken is dat glutathion via de ascorbaat/glutathion cyclus een belangrijke rol speelt in de verdediging na metaalbehandeling bij zowel Cd als Cu (39, 54).

4.3 De rol van glutathion na Cd-en Cu-behandeling in het blad

De GSH-afhankelijke genen die belangrijk bleken te zijn in de wortel, werden ook onderzocht in de blaadjes van Cd- en Cu- behandelde *Arabidopsis thaliana* zaailingen. Zoals reeds eerder aangehaald bereikt slechts een deel van het opgenomen Cd de blaadjes via het xyleem (35). Verder is er ook 'signalling' via plantenhormonen en mogelijks ook H_2O_2 vanuit de wortel naar de blaadjes om de aanwezigheid van een toxisch metaal te signaleren en de gepaste verdediging op gang te zetten (55). De stress in de blaadjes is matig vergeleken met de stress in de wortel.

In de blaadjes is de voornaamste taak antioxidatieve verdediging. Deze verdediging is noodzakelijk voor de plant aangezien ROS geïnduceerd door Cd en Cu de fotosynthese en andere processen zoals de mitochondriële respiratie nadelig kunnen beïnvloeden.

Na transport door de xyleemvaten komt Cd, en waarschijnlijk ook Cu, gecomplexeerd aan in de blaadjes (35, 56). Hier induceren de metalen verschillende regulatie-effecten. Een hypothese is dat Cd en Cu losgekoppeld worden van de fytochelatines die ze naar het blad hebben getransporteerd, en vervolgens opnieuw gecomplexeerd worden in de bladcellen. Er is immers een stijging in genexpressie voor *GSH1* en *GSH2* waarneembaar na Cu-blootstelling (figuur 10). Deze genexpressie is minder hoog dan in de wortel. Een verklaring hiervoor kan zijn dat de metaalconcentraties lager zijn dan in de wortel en er dus minder **fytochelatine**-aanmaak nodig is. Verder is het mogelijk dat er minder GSH nodig is voor de antioxidatieve verdediging omwille van een mildere stress in het blad. De expressie van *GSH1* is blijft na Cd-blootstelling constant en minder hoog dan in de wortel maar de expressie van *GSH2* is gestegen (figuur 9). Een mogelijke hypothese hiervoor is een verhoogd gebruik van GSH voor onder andere antioxidatieve verdediging en fytochelatine-aanmaak. Hierdoor valt de negatieve feedback weg van GSH op *GSH2*.

De PC-metaal complexen worden, zoals in de wortel, getransporteerd naar de vacuole met behulp van **GS-X transporters**. Ook hier is voor zowel Cd als Cu een stijging in *MRP4* waar te nemen die zelfs meer uitgesproken is dan in de wortel (figuren 9 en 10). De **glutathion-S-transferasen** vertonen een ander expressiepatroon in het blad dan in de wortel. Wel is het proces van inhibitie en compensatie door upregulatie ook hier aanwezig. *GSTU26* wordt geïnhibeerd na Cd-blootstelling terwijl *GST2* en *GST6* verhoogd tot expressie komen. Ook hier kan deze stijging van *GST2* wijzen op het wegwerken van schadeproducten, voornamelijk lipidenperoxidatieproducten, aangebracht door Cd. Na Cu-blootstelling stijgt de expressie van

zowel *GST2*, *GST6* als *GSTU26*, dit in tegenstelling tot de wortel waar enkel *GST2* geïnduceerd wordt. Na zowel Cd- als Cu-blootstelling is er een gestegen lipidenperoxidatie (figuur 15)(42) in het blad wat de stijging van *GST2* mee verklaart.

Met deze resultaten dient voorzichtig worden omgegaan. Een stijging in genexpressie betekent immers niet noodzakelijk een stijging in proteïne-expressie of enzymactiviteit. Tal van posttranscriptionele en posttranslationele modificaties kunnen nog plaatsvinden, al dan niet onder invloed van Cu en Cd. Daarom is in dit onderzoek ook, in beperkte mate, naar de enzymactiviteit van GST's gekeken. Er is geen significant verschil waargenomen tussen de verschillende behandelingen. Dit kan een gevolg zijn van de grote verscheidenheid aan GST's en bijhorend hun verschillende respons op de Cd- en Cu-behandeling waardoor compensaties op metabolisch niveau kunnen ontstaan.

4.4 ROS en signalisatie: een mogelijke functie van mitochondriën

In mitochondriën vinden mitochondriële respiratie en andere biochemische pathways, waaronder de TCA cyclus, plaats. Ook in normale omstandigheden worden ROS geproduceerd in de mitochondriën. Zoals eerder aangehaald worden deze ROS in balans gehouden door het antioxidatieve verdedigingsmechanisme. ROS worden echter niet enkel geproduceerd als toxisch neveneffect maar oefenen ook bepaalde functies uit in de cel zoals signalisatie. Zo is er een interactie tussen chloroplasten en mitochondriën, noodzakelijk om de redoxbalans in de cel te behouden (48).

Mitochondriën spelen mogelijk een belangrijke rol in oxidatieve stress geïnduceerd door Cd en Cu. Sweetlove et al hebben reeds aangetoond dat de toevoeging van H_2O_2 , antimycin A en menadione gedurende 16 uur aan celculturen een impact heeft op de proteïnen in de mitochondriën (57). Ze toonden een verhoogde protease-activiteit aan in de mitochondriën en een verlaagde O_2 -consumptie. Uit de microarray-screening van de wortel blijkt dat er een verstoring is in de genexpressie van genen die gerelateerd zijn aan het mitochondriële metabolisme en de mitochondriële verdediging tegen ROS. Enkele voorbeelden van deze mitochondriële genen waarvan de genexpressie veranderd blijkt na Cd-blootstelling zijn *GST1*, *AOX1*, *Prx33*, *Prx34*, *GAPC-1* en *GAPC-2*.

De laatste twee genen coderen voor subeenheden van cytosolisch GAPDH. Dit GAPDH is betrokken in de glycolyse. De activiteit van GAPDH is geïnhibeerd in de aanwezigheid van

H_2O_2 wat doet vermoeden dat dit GAPDH een direct target is van H_2O_2 . Uit de genexpressieresultaten van de Cd-behandeling blijkt dat *GAPC-1* enkel in het blad belangrijk is waar het verhoogd tot expressie komt. *GAPC-2* wordt geïnhibeerd in zowel blad als wortel. Na Cu-blootstelling is er een minder sterke respons. In dit geval is er inhibitie van *GAPC-2* in de wortel en verhoogde expressie van *GAPC-1* in het blad.

Doordat mitochondriën een hoofdrol spelen in de redox homeostase en signaaltransductie (48), kunnen zelfs kleine veranderingen in het mitochondriaal metabolisme leiden tot andere cellulaire verstoringen en/of signalisatie in het aanzetten van verdedigingsmechanismen. In verder onderzoek zal de betrokkenheid van de mitochondriën met betrekking tot oxidatieve stress na metaalbehandeling onderzocht worden.

4.5 Conclusie

Daar waar Cu ook op een directe manier ROS kan induceren en oxidatieve stress kan veroorzaken, doet Cd dit op een indirecte manier. Beide metalen worden door het organisme *Arabidopsis thaliana* na opname waarschijnlijk meteen gecomplexeerd door ondermeer fytochelatinen. Niet alle metaalionen kunnen gecomplexeerd worden waardoor ze ROS kunnen induceren en op die manier cellulaire responsen veroorzaken, hetzij signalisatie, hetzij schade.

Lignine is een structurele component van de celwand. Meer lignine kan aanleiding geven tot meer bindingsplaatsen van de metaalionen. Hierdoor kan het metaal in de wortel vastgehouden worden en kan transport naar bovengrondse delen beperkt worden in de plant. Er is duidelijk een verschil wanneer de planten behandeld worden met Cd in vergelijking met Cu. Na Cd-behandeling is er een daling in genexpressie van genen betrokken in het biosynthese-pathway van lignine en bovendien is er een dalende trend in de dikte van de xyleemvaten. Dit is een indicatie voor meer lignine in de celwand en meer metaaltransport naar het blad. Na Cu-behandeling stijgt de genexpressie van de genen PAL1 en PAL2 wat indiceert dat er meer lignine in de celwand zal zijn. Door de hoeveelheid lignine in de wand te meten en ook microscopisch naar de Cu-behandelde wortels te kijken kan de rol van lignine verder verduidelijkt worden.

Uit dit onderzoek is verder duidelijk naar voor gekomen dat GSH een sleutelmetaboliet is in de verwerking van metalen in zowel wortel als blaadjes. GSH is een precursor voor fytochelatines en is op die manier belangrijk voor de complexatie van Cd. Cu-blootstelling kan in de wortel resulteren in fytochelatinesynthese maar dit mechanisme is waarschijnlijk

niet het belangrijkste complexatiemechanisme. De verhoogde GSH productie na Cu-blootstelling is vooral ook belangrijk als antioxidatief verdedigingsmechanisme. Ook in de blaadjes blijkt GSH na beide metaalbehandelingen een belangrijk verdedigingsmechanisme, zowel voor complexatie, sequestratie en detoxificatie van metalen en in de antioxidatieve verdediging.

Tot slot blijken mitochondriën een belangrijke rol uit te oefenen na metaalstress. Dit werd duidelijk door het uitvoeren van de microarray. Mitochondriën zijn belangrijk voor de signaling van metaalstress. Verder onderzoek moet meer duidelijkheid geven over de rol van mitochondriën in metaalstress.

Signaling is in het gehele organisme belangrijk om metaalstress te signaleren en de gepaste reacties op gang te zetten. Hoewel er aanwijzingen zijn voor de betrokkenheid van hormonen, zoals ABA en salicylzuur (SA) in de metaalrespons, dient hun betrokkenheid specifiek onderzocht te worden zodat de gegevens kunnen geïntegreerd worden in het ontstaan van (oxidatieve) stress na blootstelling aan toxische metalen.

Het is duidelijk dat planten blootgesteld aan lage metaalconcentraties zich kunnen aanpassen aan de veranderende omgeving (adaptatie). Uit deze studie is duidelijk gebleken dat de redox balans hierin een belangrijke rol speelt, maar verder onderzoek moet meer inzicht geven in de volgorde van de gebeurtenissen tussen het blootstellen aan metalen en de cellulaire respons die erop volgt.

Referenties

1. Valko M, Morris H, and Cronin MDT. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry* 2005;12:1161-1208.
2. Nawrot T, Plusquin M, Hogervorst J, Roels HA, Celis H, Thijs L, et al. Environmental exposure to cadmium and risk of cancer: a prospective population-based study. *Lancet Journal Of Oncology* 2006;7:119-126.
3. Newman MC, Unger MA. Molecular effects and biomarkers. *Fundamentals of Ecotoxicology*. 2nd ed. Boca Raton (Florida): Lewis Publishers; 2003. p. 124-126.
4. Waalkes MP. Review: Cadmium carcinogenesis. *Mutation Research* 2003; 533:107–120.
5. Godt J, Scheidig F, Grosse-Siestrup C, Esche V, Brandenburg P, Reich A, et al. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology* 2006; 1:22.
6. Kjellström T. Mechanism and epidemiology of bone effects of cadmium. *Cadmium in the Human Environment: Toxicity and Carcinogenicity* (Nordberg G, Alessio L, Herber R, eds). IARC Scientific Publications 1992;118:301-310.
7. Brzoska MM, Moniuszko-Jakoniuk J, Jurczuk M, Galazyn-Sidorczuk M, Rogalska J. The effect of zinc supply on cadmium-induced changes in the tibia of rats. *Food and Chemical Toxicology* 2001;39(7):729-737.
8. Åkesson A, Bjellerup P, Lundh T, Lidfeldt J, Nerbrand C, Samsioe G, et al. Cadmium-induced effects on bone in a population-based study of women. *Environmental Health Perspectives* 2006;114(6):830-834.
9. Sanita di Toppi L, Gabbrielli R. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 1999;41(2):105-130.
10. Gerberding JL. Toxicological profile for copper: In: Agency for toxic substances & disease registry. 2004. URL: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp132.html>
11. Gaetke LM, Chow CK. Copper toxicity, oxidative stress and antioxidant nutrients. *Toxicology* 2003;189:147-163.
12. Sheldon A, Menzies NW. The effect of copper toxicity on the growth and morphology of Rhodes grass (*Chloris gayana*) in solution culture. *Plant and Soil* 2005;278(1-2):341-349.
13. Chen LM, Chi Lin C, Huei Kao C. Copper toxicity in rice seedlings: Changes in antioxidative enzyme activities, H₂O₂ level, and cell wall peroxidase activity in roots. *Botanical Bulletin of Academia sinica* 2000;41:99-103.
14. Halliwell B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Biology* 2006; 141:312-322.
15. Sigma-Aldrich CO. Oxidative Stress. 2007. URL: http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Life_Science/Cell_Signaling/Scientific_Resources/Pathway_Slides___Charts/Oxidative_Stress.html

16. Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Sciences* 2004;9(10):490-498.
17. Neill S, Desikan R, Hancock J. Hydrogen peroxide signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 2002;5(5):388-395.
18. Gechev TS, Van Breusegem F, Stone JM, Denev I, Laloi C. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bioessays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 2006;28(11):1091-1101.
19. del Rio LA, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, Barroso JB. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology* 2006;141(2):330-335.
20. Pastore D, Trono D, Laus MN, Fonzo ND and Flagella Z. Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress. *Journal of Experimental Botany* 2007; 58(2):195-210.
21. Davies KJ. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society symposium* 1995;61:1-31.
22. Young IS, McEneny J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochemical Society Transactions* 2001;29:358-362.
23. Karithala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *Apmis* 2007;115(2):81-103.
24. Balcells L. A method for sterilising *Arabidopsis* seeds. In: *Arabidopsis: The Complete Guide*. Versie 1.4. Norwich; 1991.
25. Smeets K, Ruytinx J, Van Belleghem F, Semane B, Lin D, Vangronsveld J, et al. Critical evaluation and statistical validation of a hydroponic culture system for *Arabidopsis thaliana*. *Plant physiology and biochemistry* 2007; submitted.
26. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 2002;3(7):1-12.
27. Li ZS, Zhen RG, Rea PA. 1-chloro-2,4-dinitrobenzene-elicited increase in vacuolar glutathione-S-conjugate transport activity. *Plant Physiology* 1995;109:177-185.
28. Dhindsa RS, Plumb-Dhindsa P, Thorpe TA. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of experimental botany* 1981;32(1):93-101.
29. Rosner B. Multisample inference. Crockett C, Vezilich M, Purrington L, Campobasso L, Torri L, editors. *Fundamentals of biostatistics*. 5th edition. Pacific Grove CA: Duxbury; 2000. p.549-555.
30. Noctor G, Gomez L, Vanacker H, Foyer CH. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *Journal of experimental botany* 2002;53(372):1283-1304.
31. Cho UH, Seo NH. Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Science* 2005;168(1):113-120.
32. Drazkiewicz M, Skórzyńska-Polit E, Krupa Z. Copper-induced oxidative stress and antioxidative defence in *Arabidopsis thaliana*. *BioMetals* 2004;17:379-387.

33. Opdenakker K. Oxidatieve stress als modulator in metaaltotoxiciteit. Eindverhandeling tUL School voor Levenswetenschappen, 2006.
34. Borges R, Miguel EC, Dias JM, da Cunha M, Bressan-Smith RE, de Oliveira JG, et al. Ultrastructural, physiological and biochemical analyses of chlorate toxicity on rice seedlings. *Plant Science* 2004;166:1057-1062.
35. Van Belleghem F, Cuypers A, Semane B, Smeets K, Vangronsveld J, d'Haen J, et al. Subcellular localization of cadmium in roots and leaves of *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 2007;173(3):495-508.
36. Minic Z, Jouanin L. Plant glycosidehydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation. *Plant physiology and biochemistry* 2006;44:435-449.
37. Sancenón V, Puig S, Mateu-Andrés I, Dorcey E, Thiele DJ, Peñarrubia L. The *Arabidopsis* copper transporter COPT1 functions in root elongation. *Journal of biological chemistry* 2004;279(15):15348-15355.
38. Lin CC, Chen LM, Liu ZH. Rapid effect of copper on lignin biosynthesis in soybean roots. *Plant Science* 2005;168(3):855-861.
39. Cuypers A, Smeets K, Ruytinx J, Horemans N, Vanhoudt N, Van Sanden Suzy, et al. Oxidative stress as a modulator in Cd en Cu toxicity in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiology* (submitted).
40. Torres MA, Dangl JL. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current Opinion in Plant Biology* 2005;8:397-403.
41. Skorzynska-Polit E, Pawlikowska-Pawlega B, Sczuka E, Drazkiewicz M, Krupa Z. The activity and localization of lipoxygenases in *Arabidopsis thaliana* under cadmium and copper stresses. *Plant Growth Regulation* 2006;48:29-39.
42. Smeets K, Opdenakker K, Remans T, Van Sanden S, Van Belleghem F, Semane B, et al. Oxidative stress related responses at transcriptional and enzymatic level after exposure to Cd or Cu and in a multipollution context. *Physiologia Plantarum* 2007, submitted.
43. Casano LM, Gómez LD, Lascano HR, González CA, Trippi VS. Inactivation and degradation of CuZn-SOD by active oxygen species in wheat chloroplasts exposed to photooxidative stress. *Plant and Cell Physiology* 1997;38(4):433-440.
44. Donckers K. Invloed van cadmiumstress bij *Arabidopsis thaliana*: transcriptionele veranderingen in regulatiemechanismen. Eindverhandeling tUL School voor Levenswetenschappen, 2007.
45. Grill E, Winnacker EL, Zenk MH. Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987;84(2):439-443.
46. Ramos J, Clemente MR, Naya L, Loscos J, Pérez-Rontomé C, Sato S, et al. Phytochelatin Synthases of the Model Legume *Lotus japonicus*. A Small Multigene Family with Differential Response to Cadmium and Alternatively Spliced Variants. *Plant physiology* 2007;143:1110-1118.
47. Semane B, Cuypers A, Smeets K, Van Belleghem F, Horemans N, Schat H, et al. Cadmium responses in *Arabidopsis thaliana*: glutathione metabolism and antioxidative defence system. *Physiologia Plantarum* 2007;129(3):519-528.

48. Foyer CH, Noctor G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum* 2003;119:355-364.
49. De Vos CH, Vonk MJ, Vooijs R, Schat H. Glutathione Depletion Due to Copper-Induced Phytochelatin Synthesis Causes Oxidative Stress in *Silene cucubalus*. *Plant Physiology* 1992;98:853-858.
50. Ha SB, Smith AP, Howden R, Dietrich WM, Bugg S, O'Connell MJ, et al. Phytochelatin Synthase Genes from *Arabidopsis* and the Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *The Plant Cell* 1999;11:1153-1163.
51. Sanchez-Fernandez R, Emyr Davies TG, Coleman JO, Rea PA. The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory. *The journal of biological chemistry* 2001;276(32): 30231–30244.
52. Dixon DP, Laphorn A, Edwards R. Protein family review: Plant glutathione transferases. *Genome biology* 2002;3(3):1-10.
53. Xiang C, Oliver DJ. Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1998;10(9):1539–1550.
54. Gupta M, Cuypers A, Vangronsveld J, Clijsters H. Copper affects the enzymes of the ascorbate-glutathione cycle and its related metabolites in the roots of *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum* 1999;106:262–267.
55. Vranova E, Inzé D, Van Breusegem F. Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 2002;53(372):1227-1236.
56. Polette LA, Gardea-Torresdey JL, Chianelli RR, George GN, Pickering IJ, Arenas J. XAS and microscopy studies of the uptake and bio-transformation of copper in *Larrea tridentata* (creosote bush). *Microchemical Journal* 1998;65:227-236.
57. Sweetlove LJ, Heazlewood JL, Herald V, Holtzapffel R, Day DA, Leaver CJ, et al. The impact of oxidative stress on *Arabidopsis* mitochondria. *The Plant Journal* 2002;32(6):891-904.

Auteursrechterlijke overeenkomst

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

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

Invloed van metaalstress op de cellulaire redoxbalans van Arabidopsis thaliana

Richting: **Master in de biomedische wetenschappen**

Jaar: **2007**

in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

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

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

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

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

Ik ga akkoord,

Liesbeth Lijnen

Datum: **18.06.2007**