

*Adaptieve Cd tolerantiemechanismen in het micro- organisme *Suillus luteus**

Bruno Reiners

promotor :
Prof. dr. Jan COLPAERT

Inhoudstafel

Voorwoord

Samenvatting

Afkortingen

Hoofdstuk 1: Inleiding.....	1
1. Zware metalen.....	1
2. Cadmium.....	2
3. Toxische effecten	3
3.1 Mechanismen	3
3.2 Cellulaire schade.....	5
3.3 Fysiologische veranderingen	6
4. Verdedigingsmechanismen	7
4.1 Directe verdedigingsmechanismen	7
4.2 Indirecte verdedigingsmechanismen.....	10
5. Doel van het onderzoek en het organisme <i>Suillus luteus</i> als onderzoeksmodel....	14
Hoofdstuk 2: Materiaal en methoden	16
1. Fungimateriaal	16
2. Metaalextractie en dosering	16
3. Bepaling van de enzymactiviteit.....	17
3.1 Extractie	17
3.2 Bepaling van de enzymactiviteit.....	17
5. Lipidenperoxidatie	19
6. Bepalen van de genexpressie	20
6.1 RNA-extractie en concentratiebepaling.....	20
6.2 RNA kwaliteitscontrole	20
6.3 Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR)	21
6.4 Quantitatieve PCR (qPCR)	21
7. Producten	22
8. Statistiek.....	22

Hoofdstuk 3: Resultaten	22
1. Effect op de biomassaproductie	23
2. Effect op de cadmium- en zinkopname	24
2.1 Cadmiumopname	25
2.2 Zinkopname	26
3. Effect op de lipidenperoxidatie	27
4. Effect op de enzymactiviteit	27
4.1 Antioxidatieve enzymen	27
4.2 Enzymen van intermediar metabolisme.....	30
5. Effect op de genexpressie	33
5.1 RNA kwaliteitscontrole	34
5.2 Quantitatieve PCR	34
Hoofdstuk 4: Conclusie en discussie.....	39
1. Effect op de biomassaproductie	39
2. Effect op de cadmium- en zinkopname	40
3. Effect op de lipidenperoxidatie	41
4. Effect op de enzymactiviteit	42
4.1 Antioxidatieve enzymen	42
4.2 Enzymen van het intermediar metabolisme.....	42
5. Effect op de genexpressie	43
6. Algemene conclusie	45
Literatuurlijst.....	46

Afkortingen

CAT	catalasen
cDNA-AFLP	“cDNA-amplified fragment length polymorphism analysis”
DHA	dehydroascorbaat
DTT	dithiotreitol
EDTA	ethyleendiaminetetra-acetaat
GSH	gereduceerd glutathion
GSSG	geoxideerd glutathion
GST	glutathion S-transferases
H ₂ O ₂	waterstofperoxide
HSP	heat shock protein
LOX	lipoxygenase
MDHA	monodehydroascorbaat
MDA	malonaldehyde
MT	metallothioneïnes
NADP ⁺	geoxideerd nicotinamide adenine dinucleotide fosfaat
NADPH	gereduceerd nicotinamide adenine dinucleotide fosfaat
O ₂ ^{•-}	superoxide anion
•OH	hydroxylradicaal
PC	fytochelatines
POD	peroxidasen
PVP	polyvinylpyrolidine
RO [•]	organisch radicaal
ROOH	lipidenperoxiden
ROS	reactieve zuurstofvormen
RT-PCR	reverse transcriptase PCR
SOD	superoxidedismutases
TBA	thiobarbituurzuur
TCA	trichloorazijnzuur
TDF	“transcript derived fragments”
qPCR	quantitative PCR
XOD	xantine oxidase

Voorwoord

In dit voorwoord wil ik alle mensen bedanken die een bijdrage hebben geleverd om deze thesis tot stand te brengen.

Allereerst zou ik graag mijn promotor Prof. Dr Jan Colpaert bedanken die dit thesisonderwerp aanbood op het einde van het derde jaar bachelor biomedische wetenschappen en het mogelijk maakte om dit onderwerp te kunnen uitvoeren in het centrum voor milieukunde. Ook dank ik in het bijzonder mijn begeleidster Joske Ruytinx die mij enthousiast bijstond in het uitvoeren van biologische technieken en die bijzonder veel tijd bestede aan het verbeteren van deze thesis.

Verder wil ik mijn medestudenten in het CMK bedanken, dankzij hen heb ik vele plezierige momenten gekend tijdens de stage. Ook zou ik alle andere personeelsleden van het CMK willen bedanken voor het ondersteunen van de studenten bij hun stage. Daarnaast wil ik hen ook bedanken voor hun aanwezigheid bij de proefpresentaties. Hun opmerkingen hebben mij geholpen om mij voor te bereiden op de thesisverdediging. Naast de medewerkers van het CMK, wil ik alle andere medewerkers van de universiteit Hasselt bedanken voor hun ondersteuning tijdens mijn studie.

Mijn ouders, grootouders en mijn zussen bedank ik voor hun ondersteuning tijdens mijn vier jaren studie. Hun steun heeft mij de energie gegeven om gedurende vier jaar hard te werken. Tenslotte wil ik al de vrienden (zowel binnen als buiten de universiteit) bedanken voor hun steun en de ontspannende momenten tijdens de laatste vier jaar.

Kortom, bedankt om in mij te geloven

Samenvatting

Sommige organismen, die langdurig worden blootgesteld aan zware metalen, kunnen door selectiedruk tolerantiemechanismen ontwikkelen. Daarom wordt in dit onderzoek een vergelijkende studie uitgevoerd tussen 3 sensitieve, 2 Zn/Cd tolerante en 2 Zn tolerante *Suillus luteus* isolaten na 24 uur blootstelling aan 0; 0,5; 1 of 5 ppm cadmium.

Er werd in het algemeen geen verschil van biomassa-productie waargenomen tussen sensitieve en Zn/ Cd tolerante isolaten, Zn tolerante isolaten. Maar er is wel een indicatie dat de cadmiumopname tussen sensitieve en Zn/Cd, Zn tolerante isolaten verschilt. Uit de analyse van de zinkopname blijkt dat er in het algemeen geen verschil optreedt bij de zinkopname tussen sensitieve en tolerante *Suillus luteus* isolaten. De resultaten van de lipidenperoxidatie konden niet geanalyseerd worden omdat de standaardfouten te groot waren. Antioxiderende enzymactiviteit (SOD en CAT) manifesteert zich meer bij Zn tolerante isolaten, dan bij Zn/Cd tolerante isolaten en er is een indicatie dat de energieproductie mogelijk afneemt of stabiel blijft bij zowel Zn/Cd en Zn tolerante isolaten en zo en via deze geadapteerde mechanismen tolerantie hebben ontwikkeld tegen cadmium. Uit de genexpressie van 51Da TDF (ABC transporter) blijkt dat de expressie voornamelijk afneemt bij 1 en 5 ppm Cd blootstelling en waarschijnlijk een mindere rol speelt bij tolerantie. De genexpressie van 74Ac TDF (GST) toont aan (uitgezonderd bij Lm8) er geen veranderingen optreden in de genexpressie. Hieruit blijkt dat GST mogelijk geen of een minimale rol speelt bij tolerantie. De resultaten van 30D TDF (mannose-6-fosfaat dehydrogenase) toont dat de expressie stabiel blijft en soms afneemt bij Cd blootstelling. Dit bevestigt de observaties van de enzymactiviteit, dat de energieproductie verlaagd of stabiel blijft bij alle tolerante isolaten bij Cd blootstelling.

Dit onderzoek bevestigt dat er duidelijk verschil merkbaar is tussen sensitieve en Zn/Cd, Zn tolerante isolaten en verschillende tolerantiemechanismen werden geïdentificeerd. Er kan echter niet altijd een duidelijk verschil aangetoond worden tussen Zn/Cd en Zn tolerante isolaten. Hierdoor kan onder voorbehoud gesteld worden dat Zn/Cd en Zn tolerante isolaten bepaalde tolerantiemechanismen gemeenschappelijk hebben.

Hoofdstuk 1: Inleiding

1. ZWARE METALEN

Tot de groep van de zware metalen behoren de metalen met een relatieve grote dichtheid ($\geq 5 \text{ g/cm}^3$), zoals kwik, koper, zink, lood en cadmium. Deze metalen komen in de natuur voor in gesteente (1).

Hoewel deze metalen altijd in lichte concentraties aanwezig zijn geweest in het milieu, worden de grote hoeveelheden van zware metalen in het leefmilieu voornamelijk veroorzaakt door het vervuilende karakter van het verkeer, de landbouw en de industrie. Cadmium kan ook op een natuurlijke manier (sporadisch via vulkaanuitbarstingen, erosie) in het milieu terecht komen (1). Ten gevolge van de strikte milieuwetgeving in de westerse wereld en het ontstaan van minder milieubelastende productiemethodes de laatste decennia, heeft men de lozing van zware metalen de laatste jaren sterk kunnen terugdringen (1,2).

Het leefmilieu is belast met een historische vervuiling ten gevolge van de zware bevuilende non-ferro industrie ten tijde van de negentiende en begin twintigste eeuw (2). Omdat zware metalen persistent en niet afbreekbaar zijn en omdat de sanering erg kostelijk is, blijft de maatschappij opgezadeld met vervuilde bodems. Doordat zware metalen van deze vervuilde bodems kunnen uitloggen in het grondwater, ontstaat ook de problematiek rond grondwatervervuiling (1-4).

Zoals al vermeld zijn er steeds kleine concentraties zware metalen aanwezig geweest in het milieu. Sommige van deze metalen behoren tot de groep van de essentiële elementen (zoals Cu, Zn, Mn, etc.) en zijn onder andere nodig voor de ontwikkeling en/of reproductie van een organisme (5). Een tekort aan essentiële metalen zorgt voor een verstoring van de voedingsbalans en verstoort op deze wijze het normaal functioneren van metaalhoudende enzymen, de ontwikkeling en/of reproductie van de organismen. Een groot tekort kan zelfs de dood van organismen initiëren. Een te hoge blootstelling aan deze essentiële metalen leidt tot de ontwikkeling van toxische effecten (5,6).

Daarnaast is er de groep van de niet-essentiële metalen (Cd, Pb, Hg, etc.) Deze metalen hebben totaal geen functie voor levende organismen, uitgezonderd voor Cd bij bepaalde aquatische kiezelwieren (7). Zelfs bij zeer lage blootstelling kunnen deze metalen en metaalverbindingen toxische effecten veroorzaken bij organismen (vb. regenwormen), via accumulatie, waardoor cellulaire functies verstoort of beschadigd worden (8).

De veroorzaakte schade is afhankelijk van de blootstelling. Wanneer een bepaalde kritische toxicologische opnamegrens aan zware metalen overschreden wordt, dan kunnen er zich ernstige problemen voordoen. Cadmium kan bijvoorbeeld bij mensen en dieren orgaanfuncties verstoren en beschadigen (1). Lood en kwik zorgen dan weer voor de aantasting van het zenuwstelsel (4). Lood kan daarnaast ook bloedarmoede en miskramen veroorzaken. Sommige van deze zware metalen (zoals Cd) zijn mutageen en carcinogeen (1-4).

2. CADMIUM

Cadmium behoort tot de groep van de zware metalen. Het is een niet-essentieel element dat zich accumuleert in organismen en in het leefmilieu. Cadmium wordt in de aardkorst aangetroffen in combinatie met zink. Het kan via erosie en vulkanische emissies op een natuurlijke manier verspreid worden in het milieu. In het leefmilieu treft men op bepaalde plaatsen hoge concentraties cadmium aan. Ook in Vlaanderen zijn er bepaalde gebieden met hoge cadmiumconcentraties, zoals in Noord-Limburg en in de Antwerpse Kempen. Deze hoge concentraties zijn te wijten aan het vervuilende karakter van de non-ferro industrie ten tijde van de negentiende en begin twintigste eeuw (1,3).

Wanneer cadmium in de bodem terecht komt, bindt het sterk aan organisch materiaal. Zelfs bij lage concentraties heeft cadmium een indirecte invloed op de bodemstructuur (8). De mate van opname van cadmium uit de bodem is afhankelijk van de pH, concentratie organische stof, temperatuur, redoxpotentiaal en de concentratie van andere elementen. Zo wordt bijvoorbeeld de opname van cadmium verhoogt in bodems met een lage zuurtegraad (8-10). Een zure bodem kan Cd makkelijk doen oplossen, waardoor Cd gemakkelijk kan opgenomen worden (10).

Planten nemen cadmium op via hun wortelstelsel en via hun bladeren (atmosferische depositie) (8). Na opname kunnen planten cadmium accumuleren in hun wortels, bladeren en zaden. Deze accumulatie houdt een gevaar in voor de voedselketen. Mens en dier kunnen via de voeding van plantaardig materiaal cadmium opnemen (1-5,6,8).

Naast de voeding, kan de mens ook nog blootgesteld worden via tabaksrook en fijnstof (1). Wanneer cadmium opgenomen wordt in het lichaam, wordt het naar de lever getransporteerd. In de lever treedt er een complexvorming met eiwitten op. Deze complexen gaan accumuleren in de nieren en waar deze complexen geleidelijk aan de filtermechanismen beschadigen (3). Naast nierschade kan cadmium nog andere gezondheidsproblemen veroorzaken, zoals botbreuk, onvruchtbaarheid, kanker, psychologisch en immunologische problemen. Omwille van het feit dat cadmium diverse gezondheidsproblemen induceert, heeft de WHO een kritische toxicologische grens van 1.10^{-5} mg/kg lichaamsgewicht per dag opgesteld (1-4).

3. TOXISCHE EFFECTEN

Door zijn toxisch karakter verstoort cadmium verschillende fysiologische processen. Op cellulair niveau veroorzaakt cadmium membraanschade, verstoort het de activiteit van enzymen en induceert het schade aan biomoleculen (10-16).

3.1 Mechanismen

Cadmium induceert cellulaire schade via oxidatieve stress inductie en via zijn bindingscapaciteit voor biomoleculen (10).

3.1.1 Oxidatieve stress

Aërobe organismen hebben zuurstof nodig om te overleven. Wanneer zuurstof tijdens metabolische processen wordt gereduceerd tot water, ontstaan er reactieve intermediären ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $\bullet OH$). Deze reactieve intermediären noemt men ook wel reactieve zuurstofvormen (ROS) (10-11). Tijdens een normale fysiologische toestand wordt de productie van ROS in toom gehouden door de antioxidatieve verdediging. Wanneer organismen echter worden blootgesteld aan stressfactoren (zoals zware metalen), dan kunnen er meer ROS geproduceerd worden of worden de antioxidatieve

verdedigingsmechanismen geïnhibeerd in vergelijking met normale condities. Hierdoor treedt er een verstoring op tussen pro-oxidanten (ROS) en antioxidanten. Deze verstoring noemt men oxidatieve stress en leidt tot de beschadiging van membraanlipiden, proteïnen en nucleïnezuren. Wanneer oxidatieve stress langdurig optreedt, kan celdood geïnduceerd worden (10-13).

Wanneer de balans tussen pro-oxidanten en antioxidanten echter in evenwicht is, vertonen ROS voordelige fysiologische processen. Zo zijn ROS betrokken bij de oxidatieve burst (bescherming tegen pathogenen), treden ze op als signaalmoleculen voor genexpressie en zijn ze betrokken bij de inductie van apoptose (13).

Cadmium heeft de eigenschap om te interfereren met de antioxidatieve verdediging (12-14). Deze interferentie veroorzaakt een depletie van glutathion en antioxidatieve verdediging via de interactie van cadmium met sulhydrylgroepen. Waarschijnlijk veroorzaakt cadmium geen directe ROS productie via de Fentonreactie. Cadmium kan mogelijk wel lipidenperoxidatie activeren, via de inductie van het enzyme lipoxygenase (LOX) (15-16). Tijdens deze lipidenperoxidatie worden lipidenperoxiden (ROOH) gevormd. Deze zijn zeer onstabiel en reactief en gaan bij aanwezigheid van redoxactieve metalen de Fentonreactie aangaan. Deze reactie veroorzaakt de vorming van reactieve alkoxyradicalen zoals RO^{\bullet} en OH radicalen. Tenslotte kan cadmium interfereren met het elektrontransport. Cadmium veroorzaakt een stijging van reductiereacties, via de stimulatie van lipidenperoxidatie. Hierdoor ontstaan lipidenperoxiden die de Fentonreactie aangaan, waardoor de concentratie aan $O_2^{\bullet-}$ toeneemt (13-16).

3.1.2 Binding aan biomoleculen

Cadmium kan gemakkelijk complexen met proteïnen vormen, omwille van de hoge bindingsaffiniteit van cadmium voor de sulhydryl en carboxylgroepen van proteïnen. Deze complexvormingen verstoren de functionaliteit van receptoren, lipoproteïnen, cellulaire receptoren en structuurproteïnen (17). Cadmium kan ook competitie aangaan met Ca en Zn ionen. Hierdoor kan cadmium Zn en Ca in proteïnen verdringen (17,18).

Daarnaast zijn DNA-en RNA moleculen een belangrijk doelwit voor cadmium. Cadmium induceert schade, door zich te richten op nucleofiele sites. Hierdoor ontstaan DNA-

metaalcomplexen, enkelvoudige breuken in het DNA en kan crosslinking optreden. Gelijkaardige effecten zijn waarneembaar bij RNA moleculen (17,19).

3.2 Cellulaire schade

Cadmium kan schade aan biomoleculen veroorzaken. Schade aan proteïnen leidt tot een verstoring van de enzymactiviteit, schade aan membraanmoleculen leidt tot de verstoring van de membraanstabieleit (10).

3.2.1 Membraanschade

Cadmium kan zowel op een directe, als op een indirecte manier schade aan membranen veroorzaken. De complexvorming tussen cadmium en thiolgroepen van membraanmoleculen veroorzaakt op een directe manier membraaninstabiliteit. Deze instabiliteit verstoort de barrièrefunctie en de stabiliteit van celorganellen.

Cadmium kan indirecte schade toebrengen aan membraanmoleculen, via de activatie van het enzyme lipoxygenase. Deze activering leidt tot de oxygenatie van onverzadigde vetzuren (10,18). De schade (directe) die veroorzaakt wordt door de complexvorming van cadmium met antioxidatieve biomoleculen, veroorzaakt een toename van de ROS concentratie. Deze ROS (vooral $\bullet\text{OH}$) vallen membraanmoleculen aan. Het $\bullet\text{OH}$ radicaal ontrekt een waterstof van het membraanmolecule, waardoor een molecule water en een organische radicaal ontstaat. Dit radicaal reageert met zuurstof, waardoor een peroxyradicaal gevormd wordt. Dit peroxyradicaal start een kettingreactie starten, waarbij opnieuw een waterstof wordt onttrokken van een membraanmolecule (13-16).

3.2.2 Proteïnen

Wanneer de opgenomen concentratie cadmium bepaalde drempelwaardes in de cel overschrijdt, ontstaan er veranderingen in proteïnen. Deze veranderingen kunnen de activiteit van proteïnen activeren of inhiberen (10-11). Cd kan op drie manieren de activiteit inhiberen. Enerzijds kan de complexvorming tussen cadmium en de thiolgroepen de integriteit (structuurverlies) van proteïnen aantasten, waardoor de katalytische activiteit van enzymen verstoord wordt. Anderzijds stimuleert Cd op een

indirecte manier ROS (zie 3.1.1 Oxidatieve stress). Deze ROS kunnen eveneens de integriteit van proteïnen aantasten.

Cadmium kan ook een competitie aangaan met essentiële metalen zoals Ca en Zn. Cadmium kan deze metalen vervangen in metalloproteïnen en de activiteit van Ca afhankelijke proteïnen verstoren (17,18).

3.2.3 Schade aan nucleïnezuren

Cadmium induceert directe schade, door zich te richten op nucleofiele sites van DNA en RNA moleculen. Hierdoor ontstaan DNA-metaalcomplexen, enkelvoudige DNA breuken en kan crosslinking optreden. Cadmium kan mogelijks DNA herstelmechanismen beschadigen. Schade aan RNA verloopt gelijkaardig (10,15).

Via de inductie van oxidatieve stress kan cadmium indirecte schade (aan basen, suikerfosfaten) veroorzaken. Hierdoor ontstaan enkelvoudige en dubbele DNA breuken (10,15).

3.3 Fysiologische veranderingen

Cadmium veroorzaakt veranderingen in de enzymactiviteit en in het intracellulair transport (5,10). Hierdoor ontstaan veranderingen in metabole processen, die een effect hebben op de groei en reproductie (9,10,20). Het effect van cadmium op de biomassa is tijdsafhankelijk, soortafhankelijk, etc. Cadmium zal bij planten interacties aangaan met polysachariden in de celwand, waardoor de celplasticiteit afneemt. Deze verminderde plasticiteit inhibeert de celexpansie en groei (9,20). De biomassaproductie is gerelateerd aan de opname en het transport van nutriënten. De door cadmium ontstane ROS induceren schade aan de componenten die betrokken zijn bij opname en transport (5,20). Cadmium veroorzaakt ook een afname van de respiratie, door de verstoring van het elektronen- en protonentransport in de mitochondriën (10). Een verlaagde respiratie veroorzaakt een verminderde biomassaproductie (10,20).

Bij verschillende taxonomische groepen van fungi, is er aangetoond dat cadmium een nefast effect vertoont op de reproductie. Er is aangetoond bij mycorrhiza schimmels dat de reproductieve groeistadia (sporenvorming+kieming) gevoeliger zijn voor cadmium, dan de vegetatieve groei. Uit studies blijkt dat de effecten van cadmium op de biomassa bij

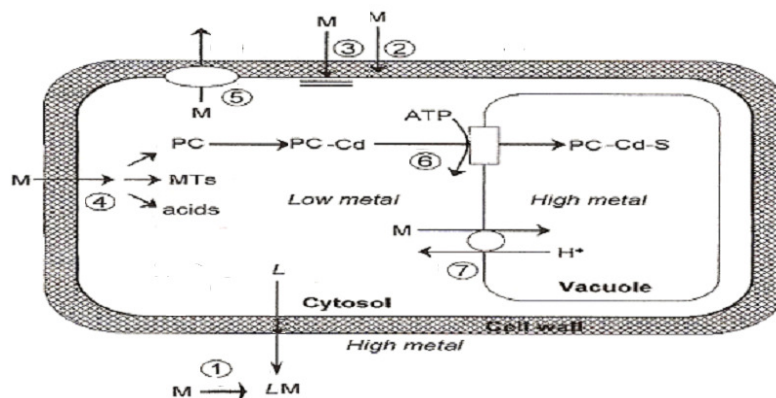
schimmels soortafhankelijk is (20-21). Hoewel de biomassa-productie zelfs bij lage cadmiumblootstelling afneemt, valt het toch op dat sommige soorten al bij lage blootstelling sterke groei-inhibitie vertonen, terwijl andere slechts een sterke groei-inhibitie vertonen bij hoge cadmiumblootstelling (20-21). Uit deze studies blijkt dat er een verschil in biomassa-productie optreedt tussen sensitieve en tolerante isolaten binnen een bepaalde soort (21).

4. VERDEDIGINGSMECHANISMEN

Fungi, planten en dieren hebben diverse verdedigingsmechanismen ontwikkeld om zich te beschermen tegen metaalstress. Deze verdedigingsmechanismen kunnen opgedeeld worden in directe en indirecte verdedigingsmechanismen. Directe verdedigingsmechanismen verdedigen het organisme rechtstreeks tegen cadmium. Dit gebeurt door de opname van cadmium te verhinderen (extracellulaire verdediging) en/of het opgenomen cadmium te verwijderen (intracellulaire verdediging). Indirecte verdedigingsmechanismen beschermen het organisme tegen cadmium geïnduceerde schade (22,23).

4.1 Directe verdedigingsmechanismen

Directe verdedigingsmechanismen kunnen opgedeeld worden in extracellulaire en intracellulaire verdedigingsmechanismen. Extracellulaire verdedigingsmechanismen (extracellulaire chelatie, celwandbinding en verlaagde influx) verhinderen de opname van cadmium, terwijl intracellulaire verdedigingsmechanismen (intracellulaire complexvorming door peptiden en verhoogde efflux en compartimentalisatie) zo snel mogelijk cadmium proberen te verwijderen (23).



Figuur 1.1 Directe verdedigingsmechanismen zoals beschreven in de tekst. Verklaring: 1. extracellulaire chelatie, 2. celwandbinding, 3. verminderde influx, 4. intracellulaire chelatie, 5. verhoogde efflux, 6+7 compartimentalisatie. (6. als complex, 7. als vrij ion) (22).

4.1.1 Extracellulaire chelatie, celwandbinding, verminderde influx en verhoogde efflux

Verschillende organische moleculen (vooral carbonzuren) die niet tot de matrix van de celwand behoren, worden door planten- (via wortels) en schimmelcellen geëxcreteerd (zie punt 1 figuur 1.2). Deze moleculen kunnen cadmium doen neerslaan, waardoor de opname verminderd. Opname experimenten (bij fungi *Paxillus involutus*) hebben aangetoond dat een verhoogde exclusie van oxalaat, de opname van cadmium met 80% vermindert (24). Gelijkaardige observaties werden ook opgemerkt bij planten (25). Dit verdedigingsmechanisme is soortafhankelijk en nog onvoldoende bestudeerd om als een algemeen verdedigingsmechanisme beschouwd te worden (22-23).

De celwand is de plaats waar zware metalen voor het eerst in contact komen met het organisme. De celwand bevat veel potentiële bindingsplaatsen waaraan zware metalen kunnen binden (oa. aan vrije carboxyl, amino, hydroxyl, fosfaat en thiolgroepen in de celwandmatrix) (zie punt 2 figuur 1.2) (22-23). In diverse studies is aangetoond dat celwandbinding de cadmiumopname verlaagd (26). Maar in tegenstelling tot extracellulaire chelatie, is dit verdedigingsmechanisme niet afhankelijk van cellulaire activiteit.

Cadmiumopname kan verminderd worden door de membraire influx transportmechanismen te inhiberen (zie punt 3 figuur 1.2). Gelijktijdig met de inhibitie

van influxmechanismen (mogelijks via Zn transporters), worden de membranaire efflux transportmechanismen geïnduceerd om cadmium te verwijderen (zie punt 5 figuur 1.2) (22-23). Mogelijks zijn ABC-type transporters en P-type ATPases betrokken bij efflux transportmechanismen. Exclusie processen spelen waarschijnlijk een belangrijke rol bij Zn tolerantie en spelen mogelijks een rol bij cadmiumtolerantie (27).

4.1.2 Intracellulaire complexvorming

Via intracellulaire complexvorming tussen cadmium en peptiden kan de cel zich beschermen tegen de aanwezigheid van cadmium (21).

Metallothioneïnes (MT) zijn kleine cysteine bevattende peptiden die zowel in prokaryoten, als in eukaryoten worden teruggevonden. Ze spelen een belangrijke rol bij de opname, transport en regulatie van essentiële metalen en zijn betrokken bij de detoxificatie van toxische metalen (zie punt 4 figuur 1.2) (28). Dit is mogelijk via de interactie van metalen met thiolgroepen van cysteine residu's. Hierbij ontstaan subcellulaire complexen of kristallen (28). Deze kunnen geaccumuleerd worden in de cel. De genexpressie van MT's kan veranderen, wanneer de cel wordt blootgesteld aan cadmium (22). Uit studies blijkt dat MT een rol spelen in de ontwikkeling van tolerantie tegen cadmium. Bij tolerante isolaten is een verhoogde expressie van MT's zichtbaar (29). Deze verhoogde expressie is ook zichtbaar bij ectomycorrhiza associaties met planten (29).

Fytochelatines (PC's) zijn kleine polypeptides die door het enzyme fytochelatine synthase gesynthetiseerd worden. De expressie van dit enzym wordt verhoogd bij metaalstress (22). PC's spelen een belangrijke rol in de detoxificatie van zware metalen zoals cadmium. Net zoals bij MT's worden stabiele complexen gevormd in het cytosol. In tegenstelling tot MT's, worden deze complexen niet geaccumuleerd in het cytosol, maar naar de vacuole getransporteerd via actief transport (22,23). Hoewel dit verdedigingsmechanisme duidelijk zichtbaar is bij planten, is dit echter niet het geval bij schimmels. Bepaalde schimmels (zoals *Paxillus involutus*) produceren geen PC's, terwijl andere (zoals *Candida glabrata*) wel PC's produceren bij verhoogde cadmiumopname

(28). Omwille van deze observaties kunnen PC's niet als een algemeen verdedigingsmechanisme beschouwd worden bij fungi, omdat dit verdedigingsmechanisme naar alle waarschijnlijkheid soortafhankelijk is (22, 30).

Organische zuren en aminozuren kunnen net zoals bij extracellulaire chelatie, organische –en aminozuren protonen leveren om metalen (zoals Cd) op te lossen. Maar ook dit verdedigingsmechanisme is soortafhankelijk (22-23).

4.1.3 Compartmentalisatie

Cadmium kan in de compartimenten opgenomen worden als vrij ion of in een gecomplexeerde vorm. Compartmentalisatie van complexen is afhankelijk van actief transport. Bij planten en *S. cerevisiae* (gist) is aangetoond dat ABC-type transporters hiervoor mede verantwoordelijk zijn (22). Ook bij de compartmentalisatie van vrije Cd²⁺ ionen zijn specifieke transporters nodig, bij fungi zijn P-type ATPasen geïdentificeerd die helpen bij de compartmentalisatie van vrije ionen (22). Compartmentalisatie processen spelen waarschijnlijk een belangrijke rol bij Zn tolerantie en spelen mogelijks een rol bij cadmiumtolerantie (27).

4.2 Indirecte verdedigingsmechanismen

Soms kunnen directe verdedigingsmechanismen ontoereikend zijn. Hierdoor wordt stress geïnduceerd. Indirecte verdedigingsmechanismen beschermen het organismen tegen cadmium geïnduceerde schade (22,23).

4.2.1 Stressproteïnen.

Diverse stresstoestanden (zoals lage/ hoge temperatuur, verhoogde blootstelling aan zware metalen, etc) veroorzaken veranderingen in het expressieniveau van proteïnen die de cel beschermen tegen stress geïnduceerde schade (23, 32-33). Heat shock proteins (HSP's) of stressproteïnen zijn een groep van geconserveerde proteïnen die verhoogd geëxpreseed worden tijdens stresstoestanden. HSP's worden verdeeld in verscheidene families volgens hun homologie en moleculair gewicht (grote moleculaire HSP's, klein moleculaire HSP's en ubiquitine) (32). HSP's spelen een rol bij de vouwing, assamblage en regulatie van proteïnen (32-33). Ten gevolge van stress ontstaan abnormale

conformaties. HSP's die tijdens stresstoestanden verhoogd geëxprimeerd worden, detecteren deze abnormale conformaties en proberen deze te herstellen naar hun normale conformatie. Hierdoor beschermen deze proteïnen de cellulaire componenten tegen stress geïnduceerde schade (24, 31-32).

4.2.2 Antioxidatieve verdediging

Organismen (zoals fungi) bezitten effectieve antioxidatieve verdedigingsmechanismen. Deze verdediging bevat antioxidatieve enzymen (die ROS metaboliseren), enzymen van de ascorbaat-glutathioncyclus en antioxidatieve metabolieten. Mogelijks spelen deze mechanismen een rol bij cadmiumtolerantie (33-36).

- Antioxidatieve enzymen

Cellen bezitten enzymen die ROS omzetten in minder reactieve ROS of tot water. Deze enzymen kan men indelen in 3 klassen, namelijk de superoxidedismutases, catalasen en peroxidasen. Tenslotte worden de glutathion S-transferasen vermeld omdat ze mogelijks ook een rol spelen in de antioxidatieve verdediging (33).

Superoxidedismutases (SOD) zijn metaalenzymen die een reactief zuurstof atoom omzetten in het minder reactieve waterstofperoxide ($2\text{O}_2^{\bullet-} + 2\text{H}^+ \xrightarrow{\text{SOD}} \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$). Bij eukaryoten zijn twee isovormen van dit enzym aangetroffen. MnSOD treft men vooral aan in mitochondriën en peroxisomen. Cu/ZnSOD treft men dan weer hoofdzakelijk aan in het cytosol en in de chloroplasten bij planten (33-34).

Catalasen (CAT) zijn enzymen die vier porfyriene heemgroepen bevatten, waardoor deze kunnen reageren met waterstofperoxide. Dit enzyme katalyseert de omzetting van waterstofperoxide in water en zuurstof. ($\text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{CAT}} 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$). Catalase vindt men terug in de peroxisomen en in de mitochondriën van eukaryote cellen en in aërobe bacteriën (33-34).

Peroxidasen (POD) zijn een groep van enzymen die waterstofperoxide kunnen reduceren tot water via de oxidatie van substraten ($\text{SH}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{POD}} \text{S} + 2\text{H}_2\text{O}$). Naast de reductie van H_2O_2 zijn peroxidasen ook betrokken bij de detoxificatie van peroxides. Men

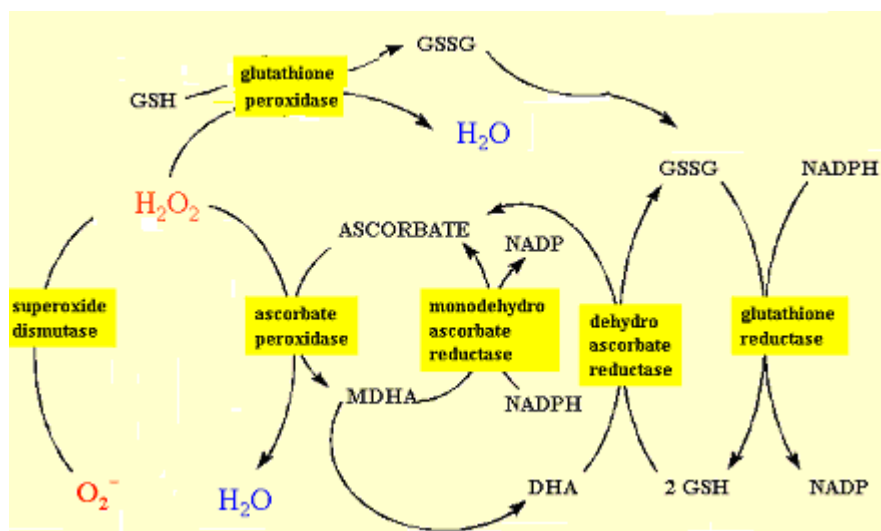
treft deze enzymen aan in verschillende celcompartimenten (celwand, cytosol, etc). Ascorbaatperoxidase bijvoorbeeld is een peroxidase dat een rol vervult in de glutathioncyclus (35-36).

Glutathion S-transferases (GST's) zijn multifunctionele dimerische enzymen die men terug vindt in de mitochondriën en in het cytosol (36). Ze zijn primair betrokken bij de detoxificatie van endogenen en xenobiotica ($\text{GSH} + \text{R-X} \xrightarrow{\text{GST}} \text{GSR} + \text{HX}$), waarbij ze de S conjungatie van thiolgroepen van gereduceerd glutathion (GSH) en elektrofiële componenten van toxische stoffen catalyseren. Hierdoor ontstaan minder toxische en meer hydrofobe moleculen, die verder in het cellulaire mechanisme verwerkt worden. Bij planten is aangetoond dat GST's een belangrijke rol spelen in de antioxidatieve verdediging. Bij oxidatieve stress kan GST zich als glutathionperoxidase gedragen, waardoor lipidenperoxides gereduceerd wordt (35-36).

- Enzymen van de ascorbaat-glutathioncyclus

De ascorbaat-glutathioncyclus speelt een belangrijke rol in de anti-oxidatieve verdediging (37-39). Deze cyclus is een wisselwerking tussen diverse enzymen om waterstofperoxide te verwijderen en om substraten die hiervoor nodig zijn terug beschikbaar te stellen voor de peroxidasen die waterstofperoxide reduceren. Dit anti-oxidatief verdedigingsmechanisme vindt men terug in alle cellulaire compartimenten. Uit studies is gebleken dat deze cyclus door zware metalen (zoals cadmium) verstoort wordt (39).

Waterstofperoxide wordt in deze cyclus tot water gereduceerd door peroxidasen. Vrijgekomen geoxideerde substraten worden terug gereduceerd met behulp van NAD(P)H (zie figuur 2.1) (37-38). NAD(P)H wordt op zijn beurt vrijgezet door enzymen van het intermediair metabolisme (Glucose-6-fosfaat dehydrogenase, malaat dehydrogenase, etc.) (37-39).



Figuur 1.2. Ascorbaat-glutathioncyclus zoals beschreven in de tekst. Afkortingen MDHA (monodehydroascorbaat), DHA (dehydroascorbaat), GSH (gereduceerd glutathion), GSSG (geoxideerd glutathion) (39).

- Anti-oxidatieve metabolieten

Organismen bezitten naast enzymatische verdedigingsmechanismen ook nog anti-oxidatieve metabolieten, vele zijn componenten van de ascorbaat-glutathion cyclus (40-42).

Het tripeptide (γ -glutamyl-cysteïnyl-glucine) glutathion (GSH) is een wateroplosbaar metaboliet, dat werkzaam is als een disulfidreductans. Door zijn reducerend vermogen, beschermt GSH de thiolgroepen van biomoleculen (40-41). Daarnaast is deze metaboliet ook een component in de ascorbaat-glutathioncyclus. Naast oxidatieve verdediging, speelt GSH ook een belangrijke rol in de detoxificatie van endogenen en xenobiotica (35,41). GSH wordt door het enzym glutathion S-transferase als substraat gebruikt bij de S-conjugatie reactie. GSH is daarnaast ook betrokken bij het zwavelmetabolisme en is tevens een precursor van fytochelatines (zie 4.1.2 fytochelatines) (41).

Ascorbaat is een metaboliet dat door planten, fungi en verschillende dieren wordt aangemaakt. Dieren die geen ascorbaat aanmaken (zoals primaten), nemen ascorbaat op via de voeding. Ascorbaat treft men in alle celcompartimenten aan en is werkzaam als een primair en als een secundair metaboliet (39-41). Als primair metaboliet kan het verschillende ROS wegvangen. Als secundair metaboliet is ascorbaat betrokken bij non-

enzymatische regeneratie van α -tocoferol. Uit studies blijkt dat ascorbaat bij hoge metaalconcentraties een pro-oxidatieve werking vertoont, waardoor superoxide radicalen gevormd worden (39). Ascorbaat vervult nog andere functies naast anti-oxidatieve verdediging. Zo is ascorbaat betrokken in de celcyclus, door de overgang van G1 naar de S fase te beïnvloeden. Daarnaast is ascorbaat ook betrokken bij de celverlenging (39-41).

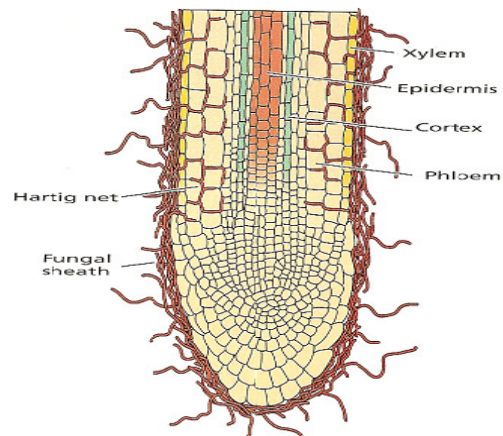
Tocoferolen zijn een familie van antioxidatieve metabolieten, deze familie bestaat uit vier tocoferol isovormen. Het α -tocoferol is de meest actieve isovorm van alle tocoferolen; terwijl de andere isovormen biosynthetische voorlopers zijn. A-tocoferol bezit zoals elke isovorm een hydrofobe zijketen, waardoor ze membranen kunnen penetreren (39). Hierdoor ontstaan wijzigen in de membraanstructuren, waardoor de membraanpermeabiliteit verbeterd wordt. Wanneer α -tocoferolen geïntegreerd zijn in de membranen, beschermen ze membraanmoleculen tegen oxidatieve stress. A-tocoferolen reduceren ROS door de donatie van een waterstofatoom (39,42).

5. DOEL VAN HET ONDERZOEK EN HET ORGANISME SUILLUS LUTEUS ALS ONDERZOEKSMODEL

Sommige organismen, die langdurig worden blootgesteld aan zware metalen, kunnen door de selectiedruk tolerantiemechanismen ontwikkelen (28). Om inzicht te verkrijgen in de processen die leiden tot Cd toxiciteit en tolerantie worden sensitieve en tolerante *Suillus luteus* populaties in dit onderzoek met elkaar vergeleken. Omdat er zowel Zn als Zn/Cd tolerante isolaten van *Suillus luteus* geïdentificeerd zijn, wordt deze fungus als modelorganisme gebruikt in dit onderzoek.

Suillus luteus behoort tot de stam van de basidiomycota, binnen het rijk van de fungi (43). Deze schimmel komt voornamelijk voor in de Noordelijke hemisfeer en heeft geen specifiek bodem nodig om te groeien, maar geeft de voorkeur aan nutriënten arme en zure bodems. Deze schimmel vormt een symbiose (mutualisme) met planten (43). Hierdoor wordt de beschikbaarheid van mineralen en water voor planten verhoogt. In ruil daarvoor krijgt de schimmel koolhydraten van de plant. Deze associatie tussen schimmel en plant noemt men in het geheel een mycorrhiza. De groep van mycorrhiza kan opgedeeld

worden in twee groepen, namelijk de ecto-en de endomycorrhiza. Bij endomycorrhiza dringen de schimmeldraden (hyphae) door in de cortexcellen van de plantenwortel (44).



Figuur 1.3. Wortel geïnfecteerd met een ectomycorrhiza fungi: vorming van een mantel en de vorming van het Hartig net (44).

Bij ectomycorrhiza's vormt het mycelium een mantel rond de wortels. Het mycelium dringt tussen de intracellulaire ruimtes, zonder de corticale cellen te doordringen. Hierdoor wordt een netwerk van hyphae gevormd, namelijk het Hartig net (44).

Hoofdstuk 2: Materiaal en methoden

1. FUNGIMATERIAAL

Zeven verschillende isolaten, namelijk drie sensitieve (P4, Mm7, P13), twee Zn/Cd tolerante (Ds3, Ls4) en twee Zn tolerante (Ds10, Lm8) isolaten werden geënt (onder een laminaire flow (aura vertical S.D.4)) in petrischalen met een vast Fries basismedium (samenstelling: 28 mM glucose, 5.4 mM ammoniumnitraat, 1.5 mM KH_2PO_4 , 0.4 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.3 mM NaCl, 0.2 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4 μM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 3 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 6 μM $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.8 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 56 μM (myo-) inositol, 0.1 μM biotine, 0.5 μM pyridoxine, 0.3 μM riboflavine, 0.8 μM nicotinamide, 0.7 μM *p*-aminobenzoëzuur, 0.3 μM Thiamine.HCL, 0.2 μM Ca-pantothenaat en 0.8% agar). Voor elk isolaat werden vijf petriplaten met fungimateriaal gekweekt.

Na vijf weken werd het fungimateriaal van de zeven isolaten gemixt (5 s mixen, 2 s rust (2X herhaald)) onder een laminaire flow (aura vertical S.D.4) en regelmatig om de vier dagen ververst in vloeibaar Fries basismedium en op een mengtafel (Gerhurdt laboshake) geplaatst.

Wanneer de fungi voldoende gegroeid waren, werden de isolaten blootgesteld (0; 0,5; 1 en 5 ppm cadmium). Per isolaat en conditie werden 8 herhalingen uitgevoerd. Telkens werd 1 g fungimateriaal blootgesteld aan 30 ml cadmium bevattend vloeibaar medium. Na 24 uur werd het fungimateriaal geoogst en werd de massa bepaald. Een verschil in biomassa kan mogelijks een verschil tussen condities en isolaten aantonen. Nadien werden de afgewogen stalen ingevroren in vloeibare stikstof en vervolgens op -70°C bewaard.

2. METAAL-EXTRACTIE EN DOSERING

Voordat de metaal-extractie uitgevoerd kon worden, moesten de stalen allereerst gedroogd worden in een vriesdroger (lyofilisator). Vervolgens werd de massa droge stof van de individuele stalen bepaald. Na de bepaling van de massa droge stof, werd het gedroogde fungimateriaal opgelost in 2 ml HNO_3 (70% suprapur). Gedurende een halve dag rustte de stalen op kamertemperatuur. Nadien werden de stalen uitgedampt op 60°C

en gradueel verhit tot 110°C. Hier op volgend werden de uitgedampte stalen opgelost in 1 ml HNO₃ (70% suprapur) en nadien uitgedampt op 60°C en gradueel verhit tot 110°C. Deze stap werd twee maal uitgevoerd. Vervolgens werden de uitgedampte stalen opgelost in 1 ml HCl (37% suprapur), en nadien uitgedampt op 60°C. Nadien werden de stalen gradueel verhit tot 110°C.

Nadien werden de stalen opgelost in 300 µl HCl (20% suprapur), aangelengd tot 2% HCl en overgebracht in 15 ml falcon tubes. Deze oplossingen werden geanalyseerd met behulp van ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy), waarbij de concentraties aan cadmium en zink werden bepaald.

3. BEPALING VAN DE ENZYMACTIVITEIT

De enzymatische activiteit van 4 enzymen (superoxidedismutase, malaat dehydrogenase, glucose-6-fosfaat dehydrogenase en catalase) werden spectrofotometrisch bepaald.

3.1 Extractie

Stalen ($\pm 0,5$ g) werden gehomogeniseerd in 2 ml extractiebuffer (samenstelling: 0,1 M TRIS HCl, 1 mM ethyleendiamine tetra-acetaat (EDTA) en 1 mM dithiotreitol (DTT); pH: 7,8), samen met een spatelpunt onoplosbare polyvinylpyrolidone (PVP) en zand. Vervolgens werd het gehomogeniseerd materiaal gecentrifugeerd gedurende 10 min. (Jouan MR 22i centrifuge®, aan 18949 x g) bij een temperatuur van 4°C in corex of plasticen centrifugeerbuisen. Het bekomen supernatans werd vervolgens gebruikt bij de bepaling van de enzymactiviteit.

3.2 Bepaling van de enzymactiviteit

Vele substraten en reactieproducten kunnen bij enzymatische omzetting licht absorberen (zichtbare en/of UV-regio). Op basis van de wet van Lambert-Beer kan de enzymactiviteit berekend worden uit de absorptie ($A = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$ waarbij A = de absorptie, ϵ_{λ} = de absorptiecoëfficiënt, c = de concentratie, d = de weglengte). Deze wet stelt namelijk dat in het lineaire gebied de concentratieverandering over de tijd rechtevenredig is met de absorptieverandering over de tijd mits er rekening gehouden wordt met de extinctiecoëfficiënt en de weglengte. Wanneer producten en substraten niet bij dezelfde

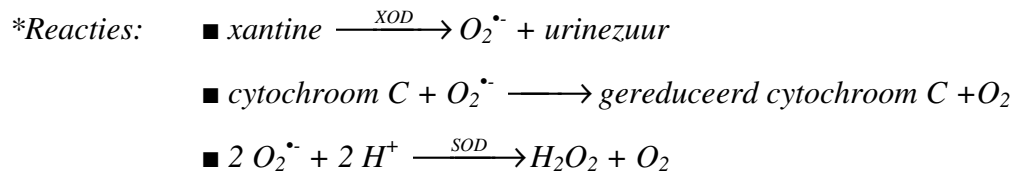
golflengte absorberen tijdens een enzymatische reactie, kan een verandering in absorptie ook gebruikt worden om de enzymactiviteit te bepalen.

$$\frac{\Delta C}{\Delta t} = \frac{\Delta A}{\Delta t} \cdot \frac{1}{\epsilon \cdot d}$$

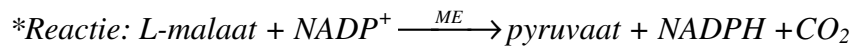
Op basis van de absorptiecoëfficiënt en de gemeten absorptieverandering per tijdseenheid, kan de concentratieverandering en dus ook de capaciteit berekend worden. De capaciteit is gelijk aan de enzymactiviteit onder niet limiterende omstandigheden. De enzymactiviteit wordt uitgedrukt in Units (1U= 1µmol substraat dat per minuut is weggereageerd).

De enzymcapaciteit van volgende enzymen werden spectrofotometrisch (Shimadzu UV-1602) bepaald:

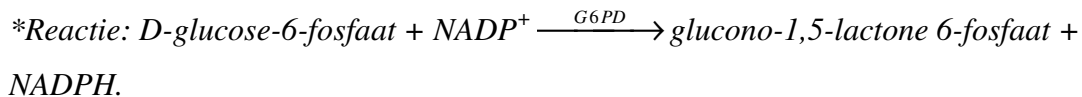
- *Superoxidedismutase (SOD)*



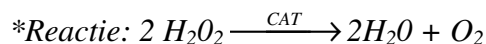
De activiteit van superoxidedismutase (SOD) werd bepaald in een 1,5 ml plastieken cuvet (reactiemengsel: 50 mM KH_2PO_4 buffer (pH: 7,8), 0,1 mM cytochrom c, 0,5 mM xantine, 1 mM EDTA, 100 µl extract en 0,065 U/mg XOD, bij 550 nm). De analyse van de SOD activiteit is gebaseerd op het inhiberend karakter van cytochrom c en werd bepaald met behulp van een blanco staal (reactiemengsel: 50 mM KH_2PO_4 buffer (pH: 7,8); 0,1 mM cytochrom c; 0,5 mM xantine; 1 mM EDTA en 0,065 U/mg XOD, bij 550 nm). Aan dit blanco staal werd dus geen extract toegevoegd. Hierdoor was dus alleen cytochrom c aanwezig, waardoor de gevormde $O_2^{\bullet -}$ radicalen alleen door cytochrom c konden worden omgezet. Bij de stalen echter was er naast cytochrom c ook nog SOD toegevoegd. Hierdoor ontstond er een competitie tussen deze twee om $O_2^{\bullet -}$ om te zetten. Deze competitie leidde tot de inhibitie van de cytochrom c activiteit. Deze inhibitie werd gevolgd in de tijd en is een maat voor de enzymactiviteit van SOD. Deze activiteit werd uitgedrukt in U, waarbij 1 U overeenkomt met een 50% inhibitie van cytochrom c.

- Malaat dehydrogenase (ME)

De capaciteit van het malaat dehydrogenase (ME) om NADPH te vormen, werd bepaald in een 1,5 ml plastieken cuvet (reactiemengsel: 0,015 M Tris buffer (pH: 7,3); 0,036 M MnSO₄; 0,1 M L-malaat; 6 mM NADP en 60 µl extract) bij 340nm. Tijdens deze reactie wordt L-malaat en NADP⁺ omgezet tot pyruvaat en NADPH, waarbij CO₂ vrijkomt.

- Glucose-6-fosfaat dehydrogenase (G6PD)

De capaciteit van het glucose-6-fosfaat dehydrogenase (G6PD) om NADPH te vormen, werd bepaald in een 1,5 ml plastieken cuvet (reactiemengsel: 0,05M Tris buffer;(pH: 7,6); 0,1 M MgCl₂; 0,03 M glucose-6-fosfaat; 7,54 mM NADP (en 50µl extract). Tijdens deze reactie wordt D-glucose-6-fosfaat en NADP⁺ door het enzyme Glucose-6-fosfaat dehydrogenase omgezet tot glucono-1,5-lactone 6-fosfaat en NADPH.

- Catalase (CAT)

De capaciteit van catalase (CAT) om waterstofperoxide om te zetten tot water en zuurstof, werd bepaald in een 1,5 ml UV-cuvet (reactiemengsel: 0,1 M KH₂PO₄ buffer (pH: 7,0), 5 mM H₂O₂ en 50 µl extract), bij 240 nm.

5. LIPIDENPEROXIDATIE

De mate van lipidenperoxidatie werd bepaald door het gehalte aan malondialdehyde (MDA) te meten met behulp van de spectrofotometer (Shimadzu UV-1602). Stalen met fungimateriaal (± 0,5 g) werden gehomogeniseerd met mortier en stamper, na toevoeging van 1 ml trichloorazijnzuur (TCA, 0,1% oplossing). Vervolgens werd het gehomogeniseerd materiaal gecentrifugeerd gedurende 10 min. (Jouan MR 22i centrifuge®, aan 18949 x g) bij een temperatuur van 4°C. Twee proefbuizen werden elk apart gevuld met 2 ml thiobarbituurzuur (TBA, 0,5% oplossing) en 0,5 ml supernatans. Daarnaast werd ook een blanco proefbuis (gevuld met 0,5 ml (0.1% TCA) en 2 ml (0.5% TBA)) aangemaakt. De bekomen proefbuizen werden afgesloten en gedurende 30 min in een warmwaterbad geplaatst, op 95°C. Vervolgens werden de proefbuizen snel afgekoeld

met behulp van ijs en gedurende 10 min. bij 4°C (Jouan MR 22i centrifuge®, aan 18949 x g) gecentrifugeerd. Nadien werd de absorptie gemeten. Deze absorpties werden gemeten bij golflengtes van 532 nm (malonaldehyde-TBA complex) en 600 nm (TBA-reactieve substanties: suikers en andere aldehyden). Op basis van de wet van Lambert-Beer (zie 3.2 bepaling van de enzymactiviteit) werd de concentratie malonaldehyde (MDA) bepaald. De concentratie MDA werd bepaald omdat dit het belangrijkste afvalproduct is, dat bij lipidenperoxidatie ontstaat. Hierdoor is het een maat voor lipidenperoxidatie ten gevolge van oxidatieve stress, zoals bij verhoogde blootstelling aan zware metalen.

6. BEPALEN VAN DE GENEXPRESSIE

6.1 RNA-extractie en concentratiebepaling

De RNA-extractie gebeurt met behulp van de Qiagen® RNeasy Plant Mini Kit (Westburg, Nederland). Bij het uitvoeren van deze procedure worden de instructies van de firma gevolgd. RLT buffer werd in plaats van RLC buffer gebruikt, omwille van de betere “cell disruption” eigenschappen bij fungimateriaal.

Via spectrofotometrie (nanodrop GeneQuant Pro Classic) kan de hoeveelheid RNA (ng/μl) gemeten worden. Deze meting gebeurt met behulp van de formule $40 \times A_{260}$, waarbij een optische dichtheid=1OD bij A260 overeenkomt met een RNA concentratie van 40ng/μl. Daarna kan men via deze procedure ook de zuiverheid van het staal bepalen. Deze zuiverheidsbepaling vindt plaats voor eiwitten, reagentia, metabolieten en celwandproducten. Eiwitten hebben een maximale absorptie bij golflengte 280 nm. Wanneer de ratio van A260/A280 groter is dan 1,8; dan wordt het staal als zuiver beschouwd. De reagentia die men gebruikt bij de RNeasy Mini plant kit en celwandcomponenten hebben een maximaal absorptie bij een golflengte van 230 nm. Wanneer de ratio van A260/A230 groter is dan 1,8, dan wordt het staal als zuiver beschouwd.

6.2 RNA kwaliteitscontrole

Om Reverse transcriptase uit te voeren moet men over RNA van goede kwaliteit beschikken. De kwaliteit van de RNA stalen wordt bepaald met hulp van de Agilent 2100

Bioanalyser. Bij deze analyse wordt een niet traditionele elektroforese uitgevoerd van het ribosomaal RNA 18S en 28S. Een duidelijke aanwezigheid van ribosomaal RNA bevestigt dat het RNA in orde is. Indien dit niet het geval is, dan is het ribosomaal RNA en de rest van het RNA gedegradeerd.

6.3 Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR)

Om RT-PCR uit te voeren, moeten de stalen allereerst op gelijke RNA concentratie gebracht worden. Vervolgens worden de stalen aangelengd tot een totaal volume van 12µl. stap. Nadien volgt de DNA eliminatie stap, waar aan elk staal 2 µl 7x gDNA wipeout buffer wordt toegevoegd. Vervolgens worden de stalen in het PCR toestel geplaatst (2 min. op 42°C). Aan elk staal wordt nadien 1 µl Quantiscript reverse transcriptase, 4 µl Quantiscript RT buffer (5X), 1 µl RT primer mix toegevoegd. Verdere stappen worden uitgevoerd volgens instructies van de fabrikant, Qiagen (QuantiTect).

6.4 Quantitatieve PCR (qPCR)

Bij deze qPCR wordt er gebruik gemaakt van ± 80µg/µl cDNA (volgens de richtlijnen van Promega) (45). De hoeveelheid gevormde cDNA wordt continu over de tijd gevolgd via de afname van de fluorescentie. De qPCR wordt ingezet voor vier TDF's (1630, 51Da, 30D en 74Ac). Deze TDF's zijn afkomstig van een cDNA-AFLP die eerder werd uitgevoerd. TDF's zijn stukjes cDNA afkomstig zijn bepaalde genen. De overeenkomst tussen TDF's en genen werden bepaald via BLAST. De TDF's komen overeen met een referentie gen (1630), de ABC transporter (51Da), het mannose-6-fosfaat dehydrogenase (30D), en het glutathion-S-transferase gen (74Ac). Primerparen die gebruikt worden, werden getest op gelijke efficiëntie tussen verschillende isolaten. Voordat de real time qPCR kan uitgevoerd worden, worden de stalen tien maal verdund met MOPS-EDTA buffer. De uitvoering van real time qPCR kan onmogelijk plaatsvinden zonder toevoeging van 5 µl cDNA aan 20µl mastermix (12,5 µl Plexor Mastermix, 1 µl voor elke primer en 5,5 µl nuclease vrij H₂O) (45). Naast de 62 stalen worden er twee "nontemplate" controles (20 µl mastermix + 5 µl MOPS-EDTA buffer) en één positieve controle (12,5 µl Plexor Mastermix + 7,5 µl nuclease vrij H₂O en 5 µl quantitatieve

controle) toegevoegd aan de 96 well plaat en in het PCR toestel (ABIPrism 7000) geplaatst (45). Vervolgens wordt een PCR-programma ingesteld (46):

- 2 minuten aan 95°C (initiële denaturatie).
- 5 seconden aan 95°C (denaturatie) en vervolgens 35 seconden aan 60°C (annealing+extensie fase). Deze stap wordt 45 maal herhaald.
- Nadien wordt een dissociatie protocol ingevoerd:
 - 15 seconden aan 95°C
 - 20 seconden aan 60°C
 - 15 seconden aan 95°C

Na de PCR run kan men de berekeningen in verband met de genexpressie uitvoeren. Deze berekeningen kunnen alleen uitgevoerd worden als er Ct (“Threshold cycle”)-waardes bekomen worden van zowel de referentie, als het te onderzoeken gen. Deze Ct waarde wordt genormaliseerd naar het referentiegen. De verkregen waarde geeft men weer als ΔCt ($\Delta Ct = Ct - Ct_{(referentie)}$) en verder verwerkt via de formule $2^{-\Delta Ct}$. De 2 staat voor de verdubbeling van PCR-product na elke cyclus.

7. PRODUCTEN

De producten die gebruikt worden bij kweek, metaalextractie en enzymbepaling zijn afkomstig van de firma's Merck (Leuven, België) en Sigma-Aldrich (Bornem, België). De Rneasy Plant Mini Kit wordt geleverd door de firma Qiagen (Westburg, Nederland). qPCR producten worden geleverd door de firma promega (Leiden, Nederland).

8. STATISTIEK

Via de Kolmogorov-Smirnov test wordt gekeken of de data normaal verdeeld zijn. Via de tweeweg ANOVA test wordt getest of de blootstelling, isolaat of de interactie een invloed hebben wanneer data normaal verdeeld zijn. Indien dit het geval is wordt een posttest (Bonferroni) uitgevoerd. De analyse wordt uitgevoerd met het GraphPad Prism software pakket. Niet normaal verdeelde data (genexpressie) werden geanalyseerd met de Kruskal-Wallis test.

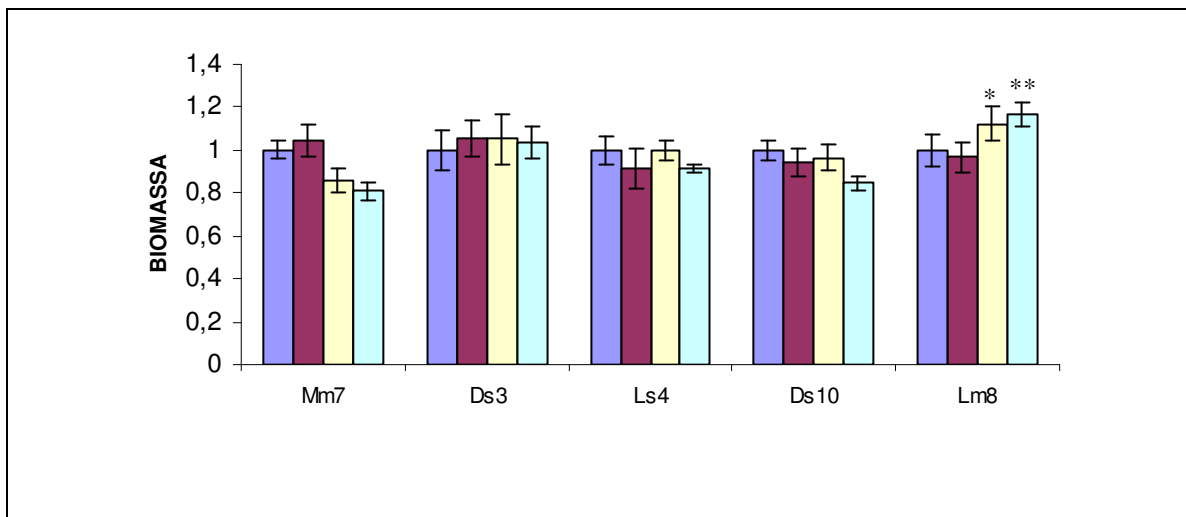
Hoofdstuk 3: Resultaten

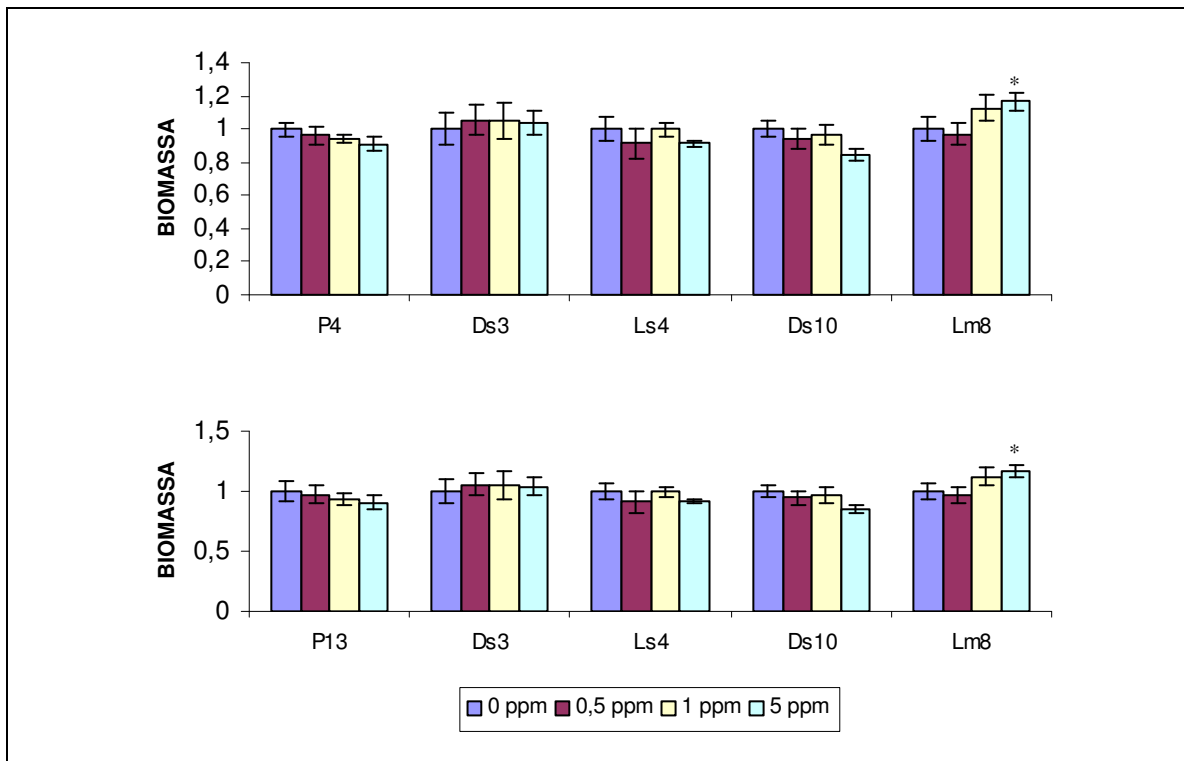
In dit hoofdstuk worden de resultaten van een vergelijkende studie tussen 3 sensitieve, 2 Zn/Cd tolerante en 2 Zn tolerante *Suillus luteus* isolaten besproken na 24 uur blootstelling aan 0; 0,5; 1 of 5 ppm cadmium.

1. EFFECT OP DE BIOMASSA

Om de invloed van Cd op de biomassaproductie bij sensitieve en tolerante *Suillus luteus* isolaten te bepalen, wordt de relatieve biomassa na 24 uur blootstelling bepaald.

Uit de resultaten van dit onderzoek blijkt dat bij 5 ppm Cd blootstelling er een verschil zichtbaar is tussen Lm8 en alle sensitieve isolaten. Bij 1 ppm Cd blootstelling is dit verschil enkel zichtbaar tussen Lm8 en het sensitieve isolaat Mm7 (zie figuur 3.1).



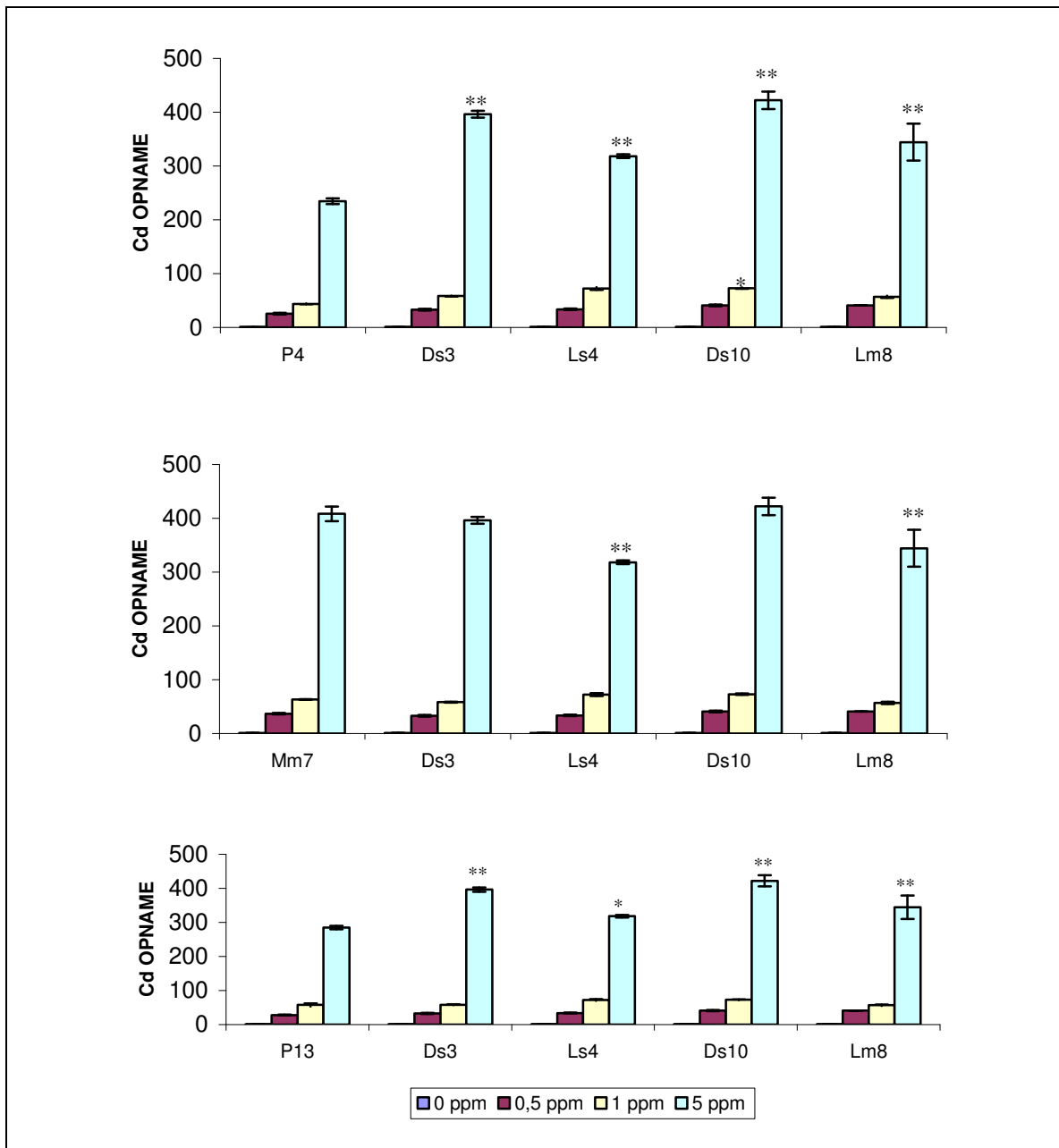


Figuur 3.1. Relatieve biomassa (controle (0 ppm) gelijkgesteld aan 1) geproduceerd door drie sensitieve (P4, Mm7, P13), twee Zn/Cd tolerante (Ds3, Ls4) en twee Zn tolerante (Ds10, Lm8) *Suillus luteus* isolaten na 24 uur blootstelling aan 0; 0,5; 1 en 5 ppm Cd. De bekomen resultaten zijn het gemiddelde \pm S.E. van ten minste 8 herhalingen (*= $P < 0,05$).

2. EFFECT OP DE CADMIUM- EN ZINKOPNAME

Omdat de opname van Cd door organismen niet altijd overeenstemt met de blootstelling, is het noodzakelijk om de opgenomen hoeveelheid cadmium te bepalen. Hierdoor kan mogelijks een verschil in cadmiumopname tussen sensitieve en tolerante isolaten waargenomen worden. Om een eventuele invloed van Cd op de Zn opname te bestuderen tussen sensitieve en tolerante *Suillus luteus* isolaten, werd de opname bij een constante Zn concentratie bepaald.

2.1 Cadmiumopname



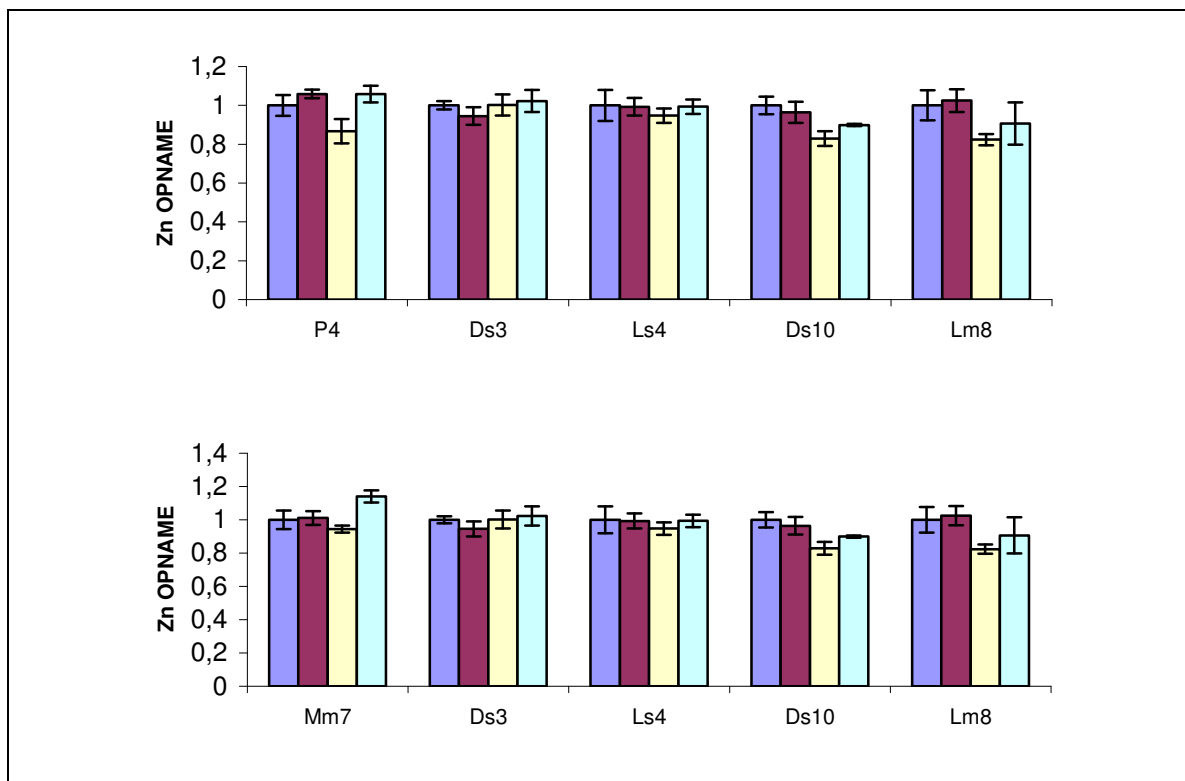
Figuur 3.2. Relatieve cadmiumopname (controle (0 ppm) gelijkgesteld aan 1) door drie sensitieve (P4, Mm7, P13), twee Zn/Cd tolerante (Ds3, Ls4) en twee Zn tolerante (Ds10, Lm8) *Suillus luteus* isolaten na 24 uur blootstelling aan 0; 0,5; 1 en 5 ppm Cd.. De bekomen resultaten zijn het gemiddelde \pm S.E. van ten minste 3 herhalingen (*= $P < 0,05$; **= $P < 0,001$).

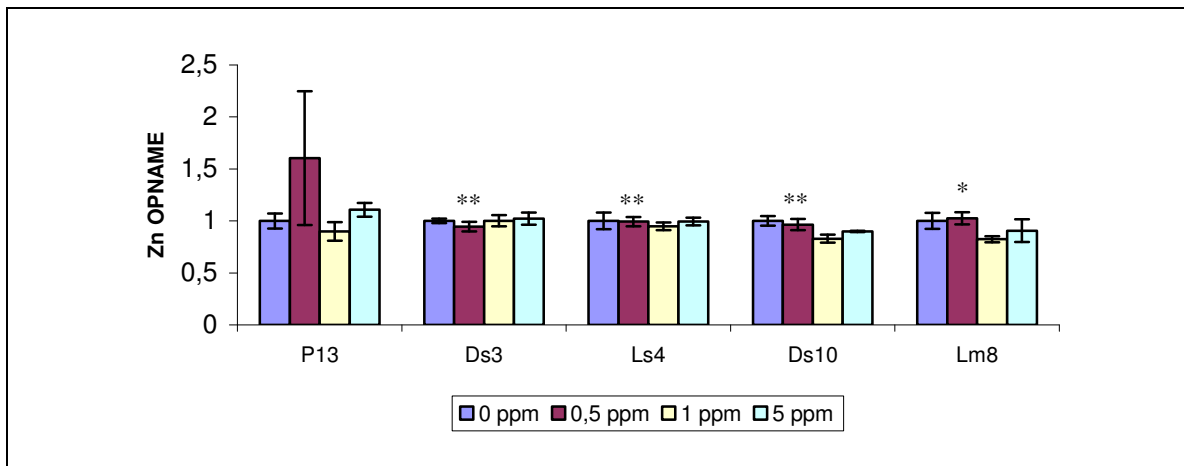
Wanneer cadmiumopname in dit onderzoek bestudeerd wordt, dan blijkt dat de opname bij 5 ppm Cd blootstelling toeneemt bij Zn/Cd tolerante isolaten, vergeleken met de sensitieve isolaten P4 en P13. Deze toename is ook zichtbaar tussen P4, P13 en Zn

tolerante isolaten. De vergelijking tussen het sensitieve isolaat P4 en het Zn tolerante isolaat Ds10 toont ook een verhoogde opname bij 1 ppm Cd blootstelling voor het isolaat Ds10. Een daling van opname is zowel zichtbaar bij Zn/ Cd en Zn tolerante isolaten, wanneer deze vergeleken worden met het sensitieve isolaat Mm7 bij 5 ppm Cd blootstelling. (zie figuur 3.2). Een verschillende respons in Cd opname is dus zichtbaar tussen sensitieve en Zn/Cd, Zn tolerante isolaten.

2.2 Zinkopname

De analyse van de zinkopname toont aan dat er geen significant verschil merkbaar is tussen de sensitieve isolaten (P4 en Mm7) en tolerante isolaten bij 0; 0,5; 1 en 5 ppm Cd blootstelling. Wanneer het sensitieve isolaat Lm8 vergeleken wordt met tolerante isolaten, dan is er een significant daling merkbaar bij alle tolerante isolaten bij 0,5 ppm Cd blootstelling (zie figuur 3.3).





Figuur 3.3. Relatieve zinkopname (controle (0 ppm) gelijkgesteld aan 1) door drie sensitieve (P4, Mm7, P13), twee Zn/Cd tolerante (Ds3, Ls4) en twee Zn tolerante (Ds10, Lm8) *Suillus luteus* isolaten na 24 uur blootstelling aan 0; 0,5; 1 en 5 ppm Cd.. De bekomen resultaten zijn het gemiddelde \pm S.E. van ten minste 3 herhalingen (*= $P < 0,05$; **= $P < 0,01$).

3. EFFECT OP DE LIPIDENPEROXIDATIE

Cadmium induceert oxidatieve stress. Oxidatieve stress kan cellulaire schade veroorzaken, zoals o.a. de oxidatieve afbraak van membraanlipiden. De mate van cellulaire schade door oxidatieve stress wordt bepaald via de meting van de lipidenperoxidatie.

Omdat de standaardfouten bij alle isolaten groot zijn, worden deze resultaten niet verder geanalyseerd.

4. EFFECT OP DE ENZYMACTIVITEIT

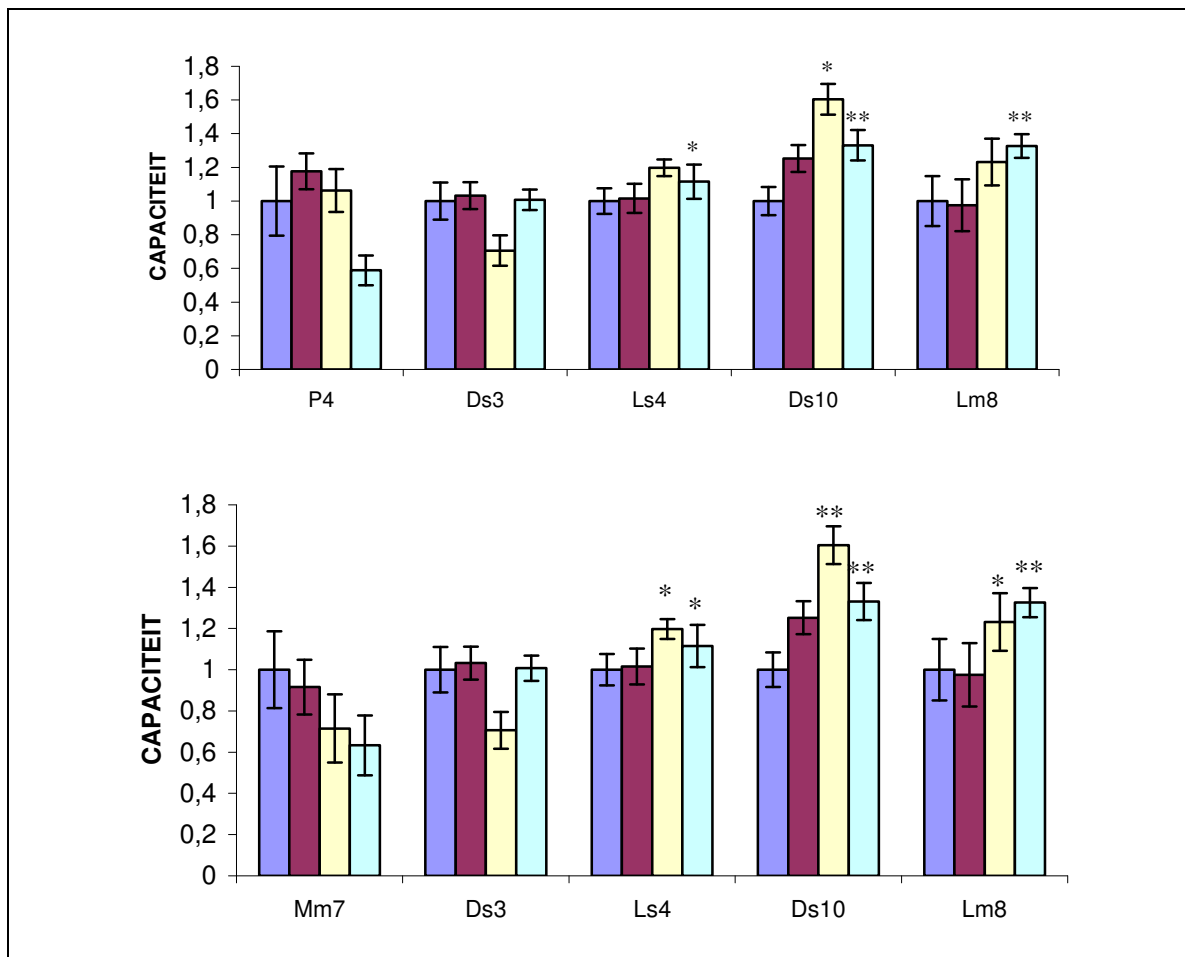
Wanneer de Cd verdedigingsmechanismen ontoereikend zijn, treedt er oxidatieve stress op en zullen er wijzigingen in de antioxidatieve verdediging zichtbaar zijn. Daarom wordt de activiteit van bepaalde antioxidatieve enzymen en enzymen van intermediair metabolisme (die een rol spelen in de ascorbaat-glutathioncyclus) gemeten. Als de antioxidatieve verdediging tussen sensitieve en tolerante isolaten verschilt, dan kan dit wijzen op een ontwikkeld tolerantiemechanisme.

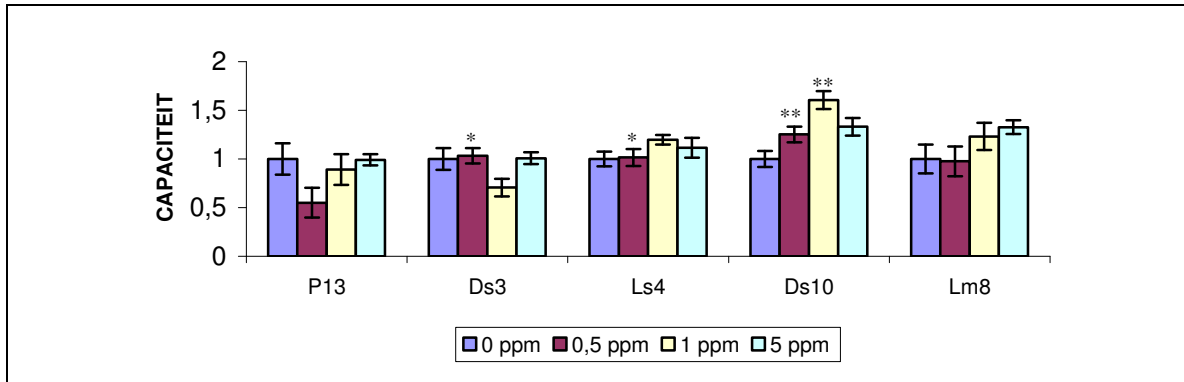
4.1 Antioxidatieve enzymen

Antioxidatieve enzymen kunnen ROS omzetten in minder reactieve ROS (SOD) of tot water (CAT).

4.1.1 Superoxidedismutase

De analyse van de SOD capaciteit tussen sensitieve en tolerante isolaten geeft een verschil in capaciteit weer. Bij 5 ppm Cd blootstelling is een toename van de SOD capaciteit zichtbaar tussen het sensitieve isolaat P4 en het Zn/Cd tolerante isolaat Ls4 en tussen P4 en beide Zn tolerante isolaten. Bij 1 ppm Cd blootstelling is ook een toename van de capaciteit zichtbaar tussen P4 en het Zn tolerante isolaat Ds10. De vergelijking tussen het sensitieve isolaat Mn7 en het Zn/Cd tolerante isolaat Ls4 en tussen P4 en beide Zn tolerante isolaten geeft een stijging van de capaciteit bij 1 ppm en 5 ppm Cd blootstelling weer. Een toename van de enzymactiviteit is ook zichtbaar bij beide Zn/ Cd tolerante isolaten en Zn tolerante isolaat Ds10, wanneer deze vergeleken worden met het sensitieve isolaat P13 bij 0,5 ppm Cd blootsteling. Bij 1 ppm Cd blootstelling is een toename van de capaciteit zichtbaar tussen P13 en Zn tolerante isolaat Ds10 (zie figuur 3.4).

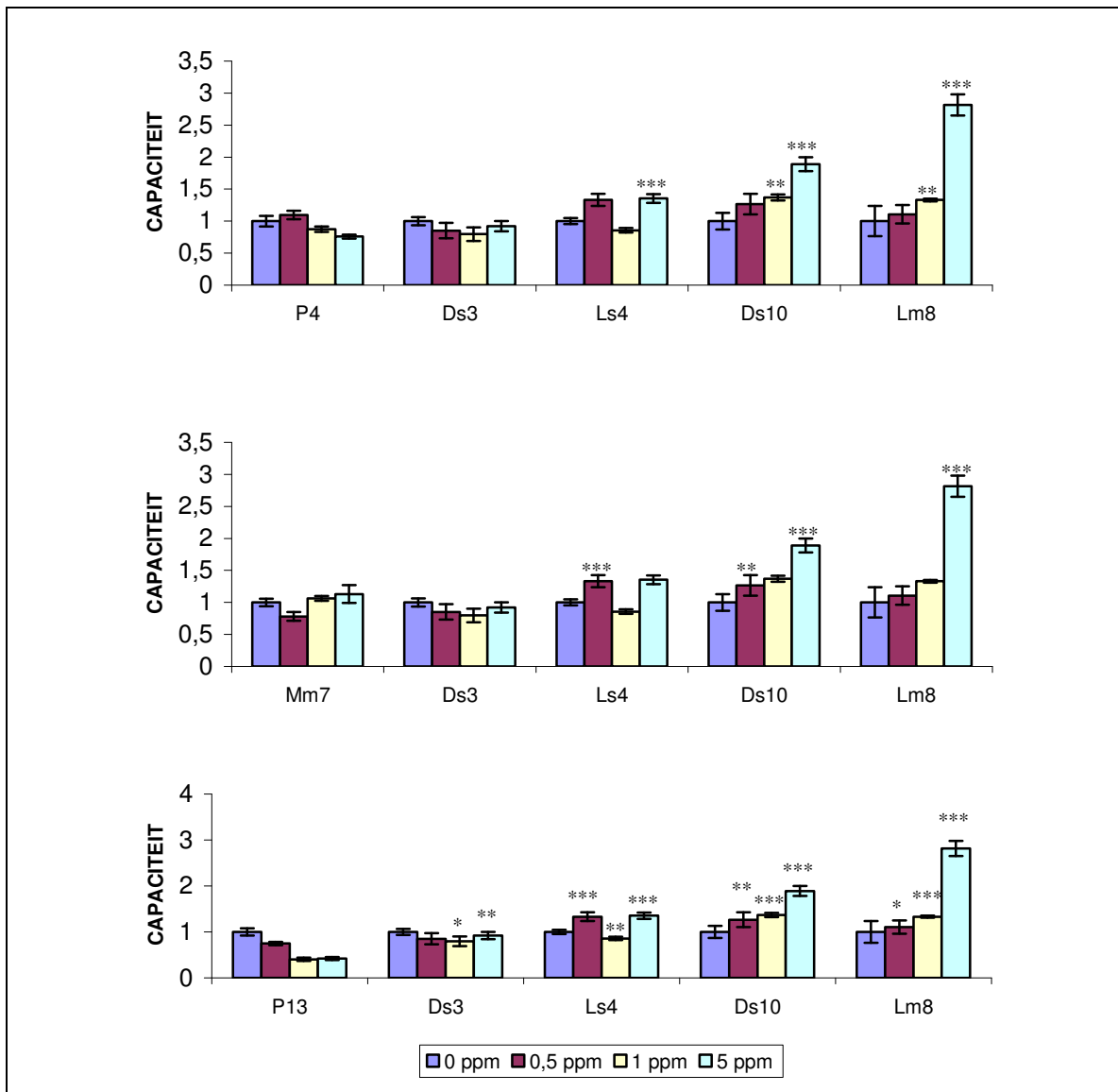




Figuur 3.4. Relatieve enzymcapaciteit van SOD (controle (0 ppm) gelijkgesteld aan 1) van drie sensitieve (P4, Mm7, P13), twee Zn/Cd tolerante (Ds3, Ls4) en twee Zn tolerante (Ds10, Lm8) *Suillus luteus* isolaten na 24 uur blootstelling aan 0; 0,5; 1 en 5 ppm Cd. De bekomen resultaten zijn het gemiddelde \pm S.E. van ten minste 3 herhalingen (*= $P < 0,05$; **= $P < 0,001$).

4.1.2 Catalase

De analyse van de catalase (CAT) capaciteit geeft een verschil in capaciteit weer tussen sensitieve en tolerante isolaten. De vergelijking tussen het sensitieve isolaat P4 en de Zn tolerante isolaten geeft een stijging van de capaciteit weer bij 1 ppm en 5 ppm Cd blootstelling. Een toename van de enzymactiviteit is ook zichtbaar tussen P4 en het Zn/Cd tolerante isolaat Ls4 bij 5 ppm Cd blootstelling. Bij 5 ppm Cd blootstelling is een toename van de CAT capaciteit zichtbaar tussen het sensitieve isolaat Mm7 en de Zn/Cd tolerante isolaat Lm8. Een toename van de capaciteit bij 0,5 en 5 ppm Cd blootstelling is zichtbaar tussen P4 en het Zn tolerante isolaat Ds10. Een toename van de capaciteit bij 5 ppm Cd blootstelling is ook merkbaar tussen Mn7 en het Zn/Cd tolerante isolaat Ls4. Een toename van de capaciteit is zichtbaar bij het Zn/Cd tolerante isolaat Ls4 en de Zn tolerante isolaten bij 0,5; 1 en 5 ppm Cd blootstelling wanneer deze vergeleken worden met het sensitieve isolaat P13. De vergelijking tussen P13 en het Zn/Cd tolerante isolaat Ds3 toont een toename van de capaciteit bij 1 en 5 ppm Cd blootstelling (zie figuur 3.5).



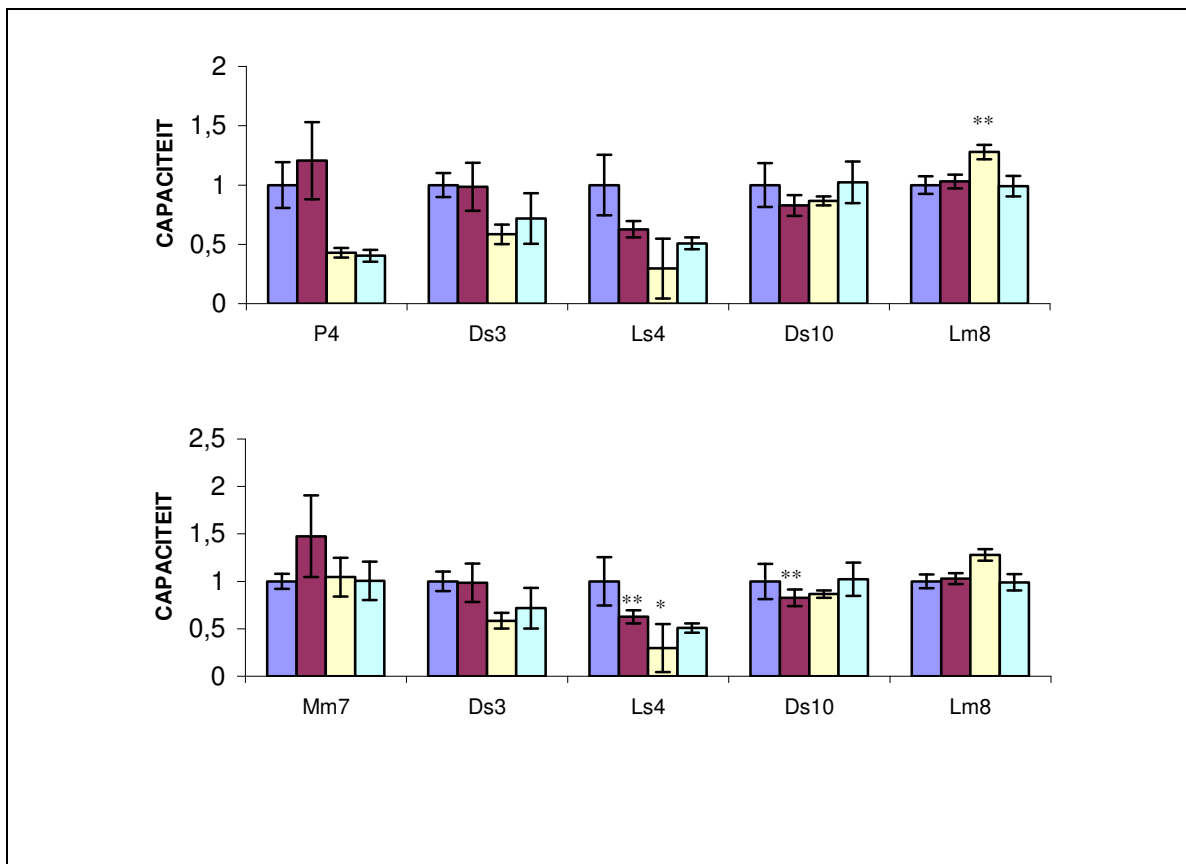
Figuur 3.5. Relatieve enzymcapaciteit van CAT (controle (0 ppm) gelijkgesteld aan 1) van drie sensitieve (P4, Mm7, P13), twee Zn/Cd tolerante (Ds3, Ls4) en twee Zn tolerante (Ds10, Lm8) *Suillus luteus* isolaten na 24 uur blootstelling aan 0; 0,5; 1 en 5 ppm Cd.. De bekomen resultaten zijn het gemiddelde \pm S.E. van ten minste 3 herhalingen (*=P < 0,05; **=P < 0,01; ***= P < 0,001).

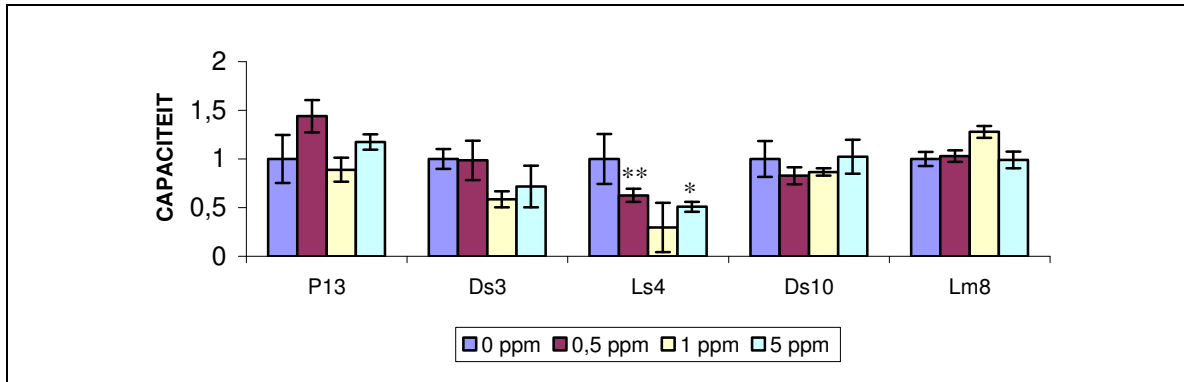
4.2 Enzymen van intermediair metabolisme

De enzymen van de ascorbaat-glutathioncyclus spelen een belangrijke rol bij antioxidatieve stress. Deze enzymen zijn afhankelijk van de NAD(P)H elektronendonor. De enzymen die in deze meting onderzocht werden (ME en G-6P-DH) leveren NAD(P)H, dat vrijgezet wordt via de reductie van NAD(P).

4.2.1 Malaat dehydrogenase

Uit de analyse van het enzym malaat dehydrogenase blijkt dat er enkel tussen het sensitieve isolaat P4 en het Zn tolerante isolaat Lm8 een stijging van de capaciteit waarneembaar is bij een blootstelling aan 1 ppm Cd. De vergelijking tussen het sensitieve isolaat Mm7 en het Ls4 Zn/Cd geeft een daling van de capaciteit weer bij 0,5 en 1 ppm Cd blootstelling. Een afname van de capaciteit bij 0,5 ppm is ook zichtbaar bij het tolerante Zn isolaat Ds10. Wanneer het sensitieve isolaat P13 vergeleken wordt met tolerante isolaten, dan blijkt dat er enkel een significante daling optreedt van de capaciteit bij het tolerante isolaat Ls4 bij 0,5 en 5 ppm Cd blootstelling (zie figuur 3.6).

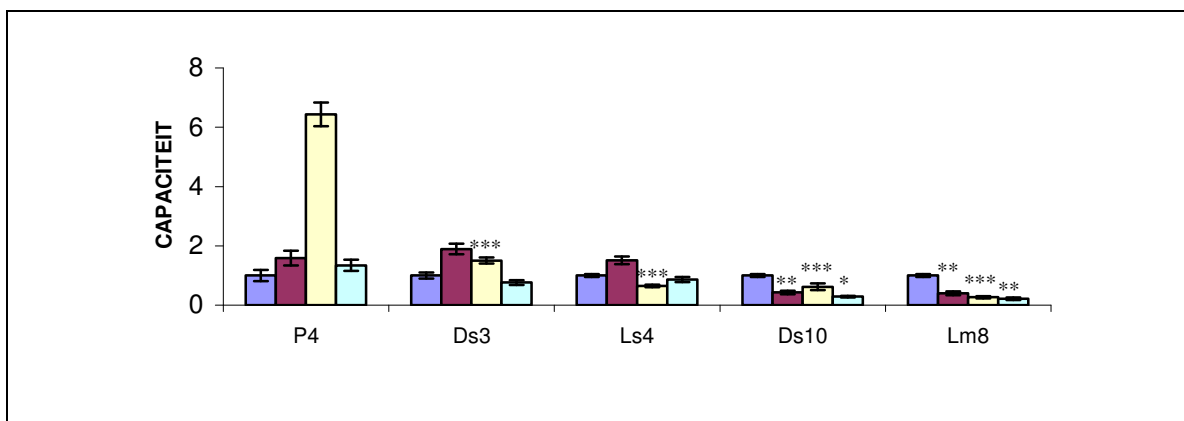


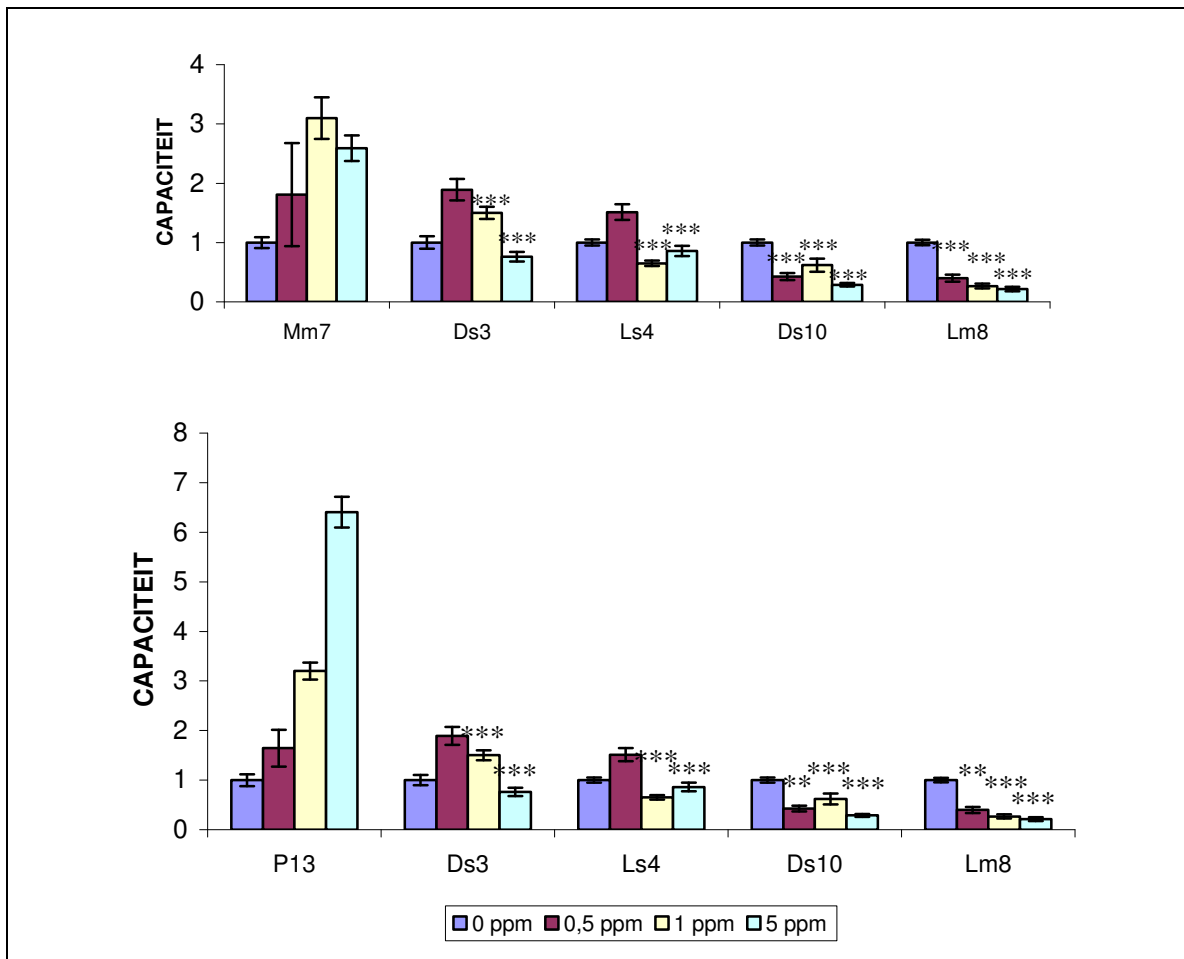


Figuur 3.6. Relatieve enzymcapaciteit van ME (controle (0 ppm) gelijkgesteld aan 1) van drie sensitieve (P4, Mm7, P13), twee Zn/Cd tolerante (Ds3, Ls4) en twee Zn tolerante (Ds10, Lm8) *Suillus luteus* isolaten na 24 uur blootstelling aan 0; 0,5; 1 en 5 ppm Cd.. De bekomen resultaten zijn het gemiddelde \pm S.E. van ten minste 3 herhalingen (*= $P < 0,05$; **= $P < 0,01$).

4.2.1 Glucose-6-fosfaat dehydrogenase

De analyse van de glucose-6-fosfaat dehydrogenase capaciteit tussen sensitieve en tolerante isolaten geeft een verschil in capaciteit weer. Een daling van de capaciteit is zichtbaar tussen het sensitieve isolaat P4 en de Zn/Cd tolerante isolaten bij 1 ppm Cd blootstelling. Een daling van de capaciteit is ook zichtbaar tussen P4 en de Zn tolerante isolaten bij 0,5; 1 en 5 ppm Cd blootstelling. Dezelfde resultaten bekomt men tussen Zn tolerante en sensitieve isolaten Mm7 en P13. De vergelijking tussen de sensitieve isolaten Mm7, P13 en Zn/Cd tolerante isolaten geeft een daling van de capaciteit weer bij Zn/Cd tolerante isolaten bij 1 en 5 ppm Cd blootstelling (zie figuur 3.7).





Figuur 3.7. Relatieve enzymcapaciteit van G-6P-DH (controle (0 ppm) gelijkgesteld aan 1) van drie sensitieve (P4, Mm7, P13), twee Zn/Cd tolerante (Ds3, Ls4) en twee Zn tolerante (Ds10, Lm8) *Suillus luteus* isolaten na 24 uur blootstelling aan 0; 0,5; 1 en 5 ppm Cd.. De bekomen resultaten zijn het gemiddelde \pm S.E. van ten minste 3 herhalingen (*=P < 0,05; **=P < 0,01; ***= P < 0,001).

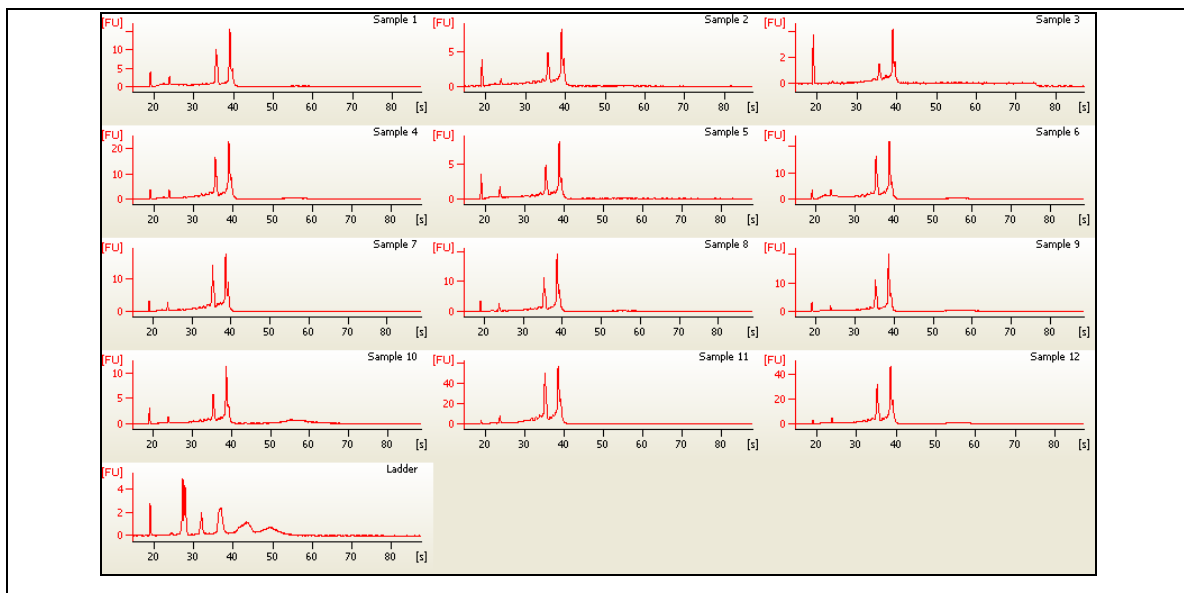
5. EFFECT OP DE GENEXPRESSIE

Genexpressie wordt bepaald via qPCR. In dit onderzoek wordt de genexpressie van 4 TDF's gemeten, namelijk 1630 (referentie), 51Da (ABC transporter), 74Ac (GST) en 30D (mannose -6-fosfaat dehydrogenase). De genexpressie wordt gemeten om een mogelijks verschil in expressieniveau waar te nemen tussen sensitieve en tolerante isolaten bij verschillende blootstellingcondities (0; 0,5; 1 en 5 ppm Cd).

5.1 RNA kwaliteitscontrole

RNA kwaliteitscontrole wordt uitgevoerd om te kijken of het bekomen RNA uit de extracties niet gedenatureerd is. Als het RNA gedenatureerd is, kan RT-PCR en qPCR niet uitgevoerd worden.

De kwaliteitscontrole toont aan dat het RNA in de stalen niet gedenatureerd is. Hierdoor kan RT-PCR uitgevoerd worden. Wanneer het RNA niet gedenatureerd is, dan zijn er pieken zichtbaar bij 35 seconden (18S) en bij 40 seconden (28S) (zie figuur 3.8).

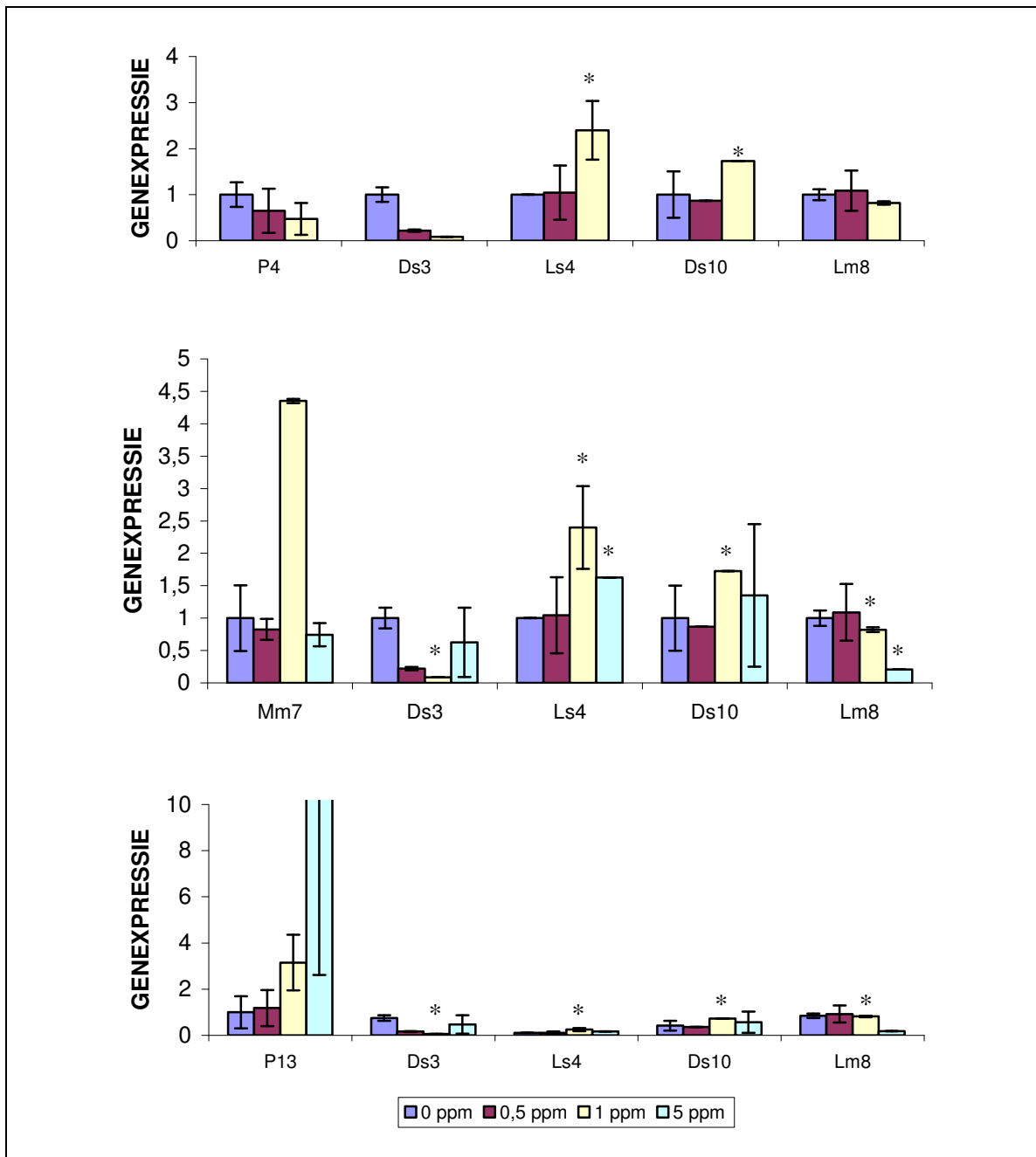


Figuur 3.8 RNA kwaliteitscontrole uitgevoerd met bioanalyser, deze figuur toont de elektroforese resultaten van het 18S (piek bij 35s) en 28S (piek bij 40s) ribosomaal RNA.

5.2 Quantitatieve PCR

Het expressieniveau van 51Da (ABC transporter), 74Ac (GST) en 30D (mannose -6-fosfaat dehydrogenase) wordt bepaald omdat deze mogelijks een rol spelen bij cadmiumtolerantie.

5.2.1 Genexpressie van 51Da (ABC transporter)

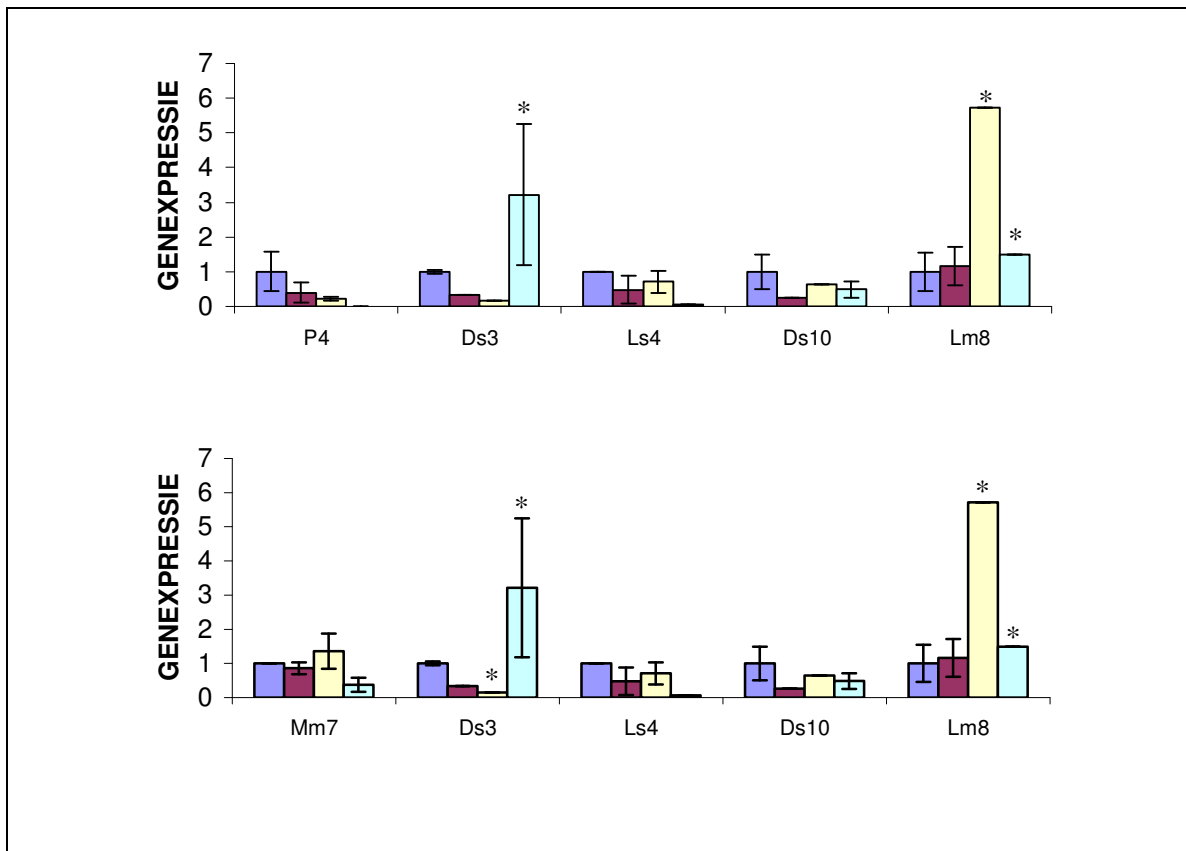


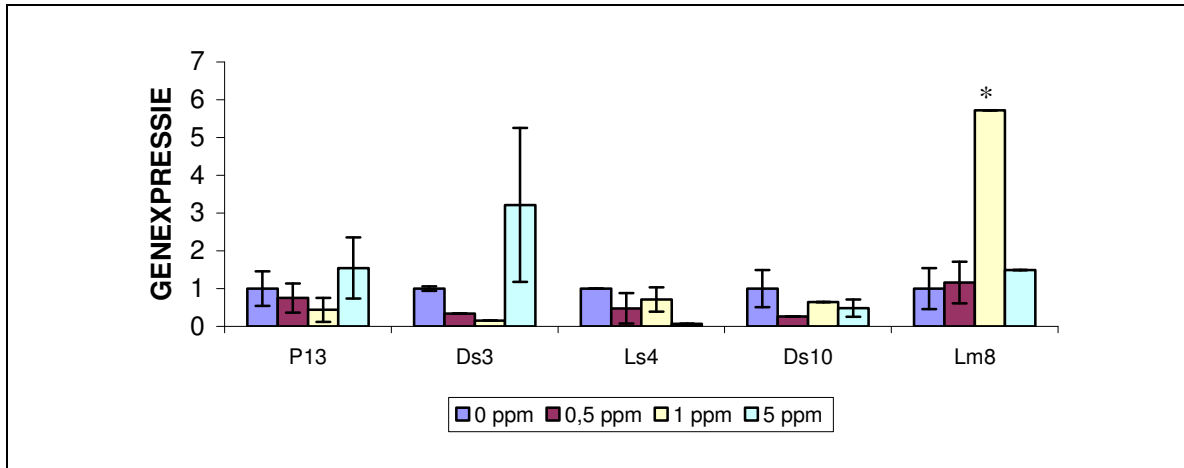
Figuur 3.9. Relatieve genexpressie van 51Da (controle (0 ppm) gelijkgesteld aan 1) van drie sensitieve (P4, Mm7, P13), twee Zn/Cd tolerante (Ds3, Ls4) en twee Zn tolerante (Ds10, Lm8) *Suillus luteus* isolaten na 24 uur blootstelling aan 0, 0,5, 1 en 5 ppm Cd (* = $p < 0,05$).

De analyse van de genexpressie van 51Da TDF (ABC transporter) geeft een toename van de expressie weer bij het Zn/Cd tolerante Ls4 en het Zn tolerante isolaat Ds10, wanneer deze vergeleken worden met het sensitieve isolaat P4 bij 1 ppm Cd blootstelling. Een

daling van de expressie bij 1 ppm Cd blootstelling is zichtbaar tussen het sensitieve isolaat Mm7 en alle Zn/Cd en Zn tolerante isolaten. Bij 5 ppm Cd blootstelling, is ook een daling van de capaciteit merkbaar bij het Zn/Cd tolerante Ls4 en Zn tolerante isolaat Lm8, wanneer deze vergeleken worden met het sensitieve isolaat Mm7. Bij 1 ppm Cd blootstelling toont de vergelijking tussen het sensitieve isolaat P13 en de tolerante isolaten een daling van de expressie aan bij alle Zn/Cd en Zn tolerante isolaten (zie figuur 3.9).

5.2.2 Genexpressie van 74Ac (GST)

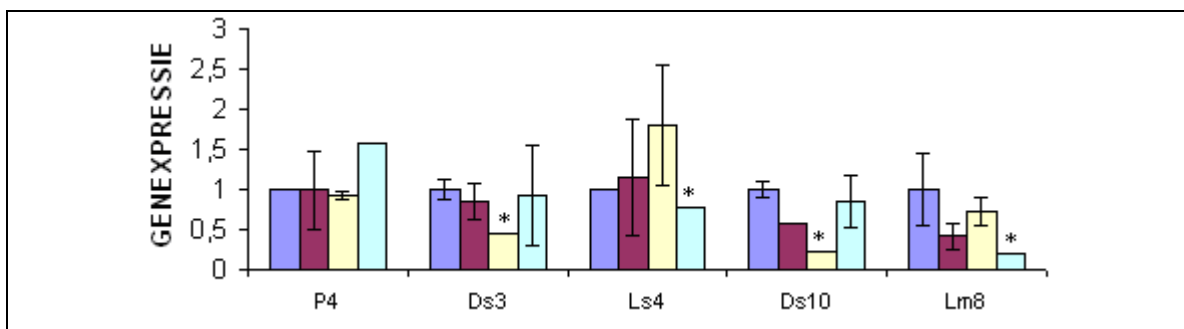


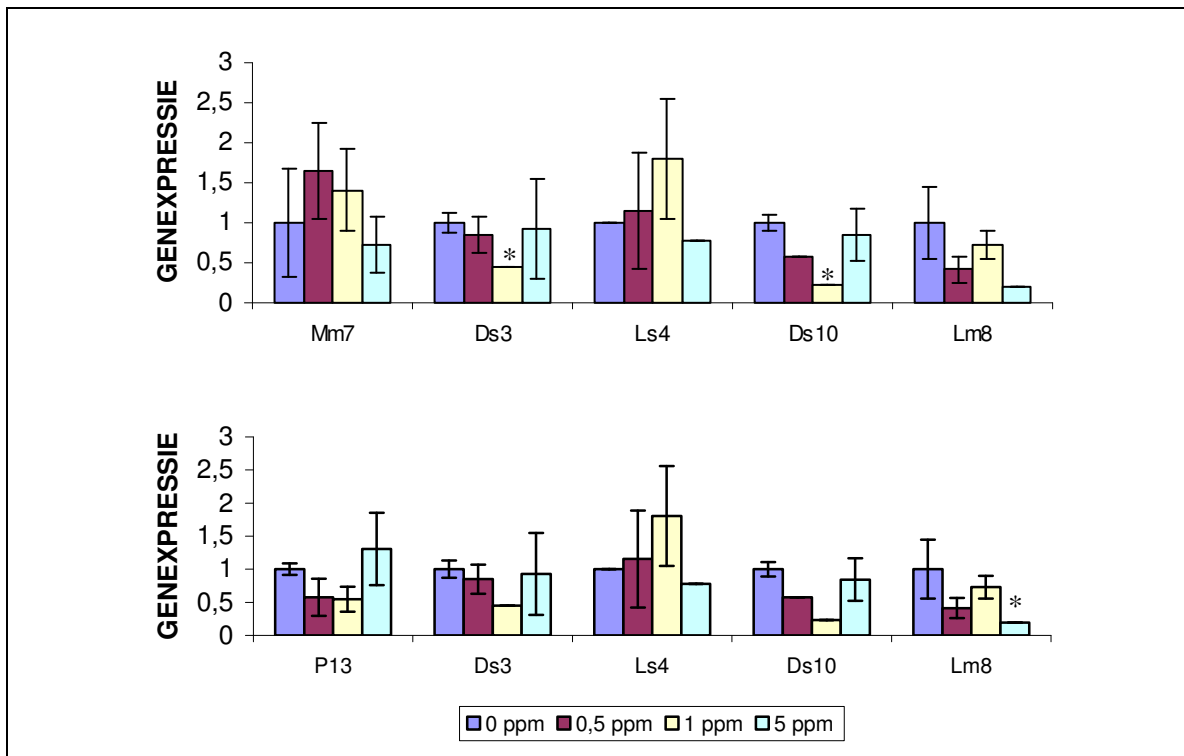


Figuur 3.10. Relatieve genexpressie van 74Ac (controle (0 ppm) gelijkgesteld aan 1) van drie sensitieve (P4, Mm7, P13), twee Zn/Cd tolerante (Ds3, Ls4) en twee Zn tolerante (Ds10, Lm8) *Suillus luteus* isolaten na 24 uur blootstelling aan 0, 0,5, 1 en 5 ppm Cd (* = $p < 0,05$).

De vergelijking tussen sensitieve isolaten P4 en Mm7 en de tolerante isolaten toont aan dat er een significante toename van de expressie plaatsvindt bij het tolerante isolaat Lm8 bij een blootstelling aan 1 en 5 ppm Cd. Bij 5 ppm Cd blootstelling geeft de vergelijking tussen het sensitieve isolaat P4 en het Zn/Cd tolerante isolaat Ds3 een toename van de expressie weer bij het tolerante isolaat. Een daling van de expressie is merkbaar bij het Zn/Cd tolerante isolaat Ds3 bij 1 ppm Cd blootstelling en een stijging is merkbaar bij 5 ppm Cd blootstelling, wanneer deze vergeleken wordt met het sensitieve isolaat Mm7. De vergelijking tussen sensitieve isolaten P13 en de tolerante isolaten toont aan dat er enkel een significante toename van de expressie plaatsvindt bij het tolerante isolaat Lm8 bij een blootstelling aan 1 ppm Cd (zie figuur 3.10).

5.2.3 Genexpressie van 30D (mannose-6-fosfaat dehydrogenase)





Figuur 3.11. Relatieve genexpressie van 30D (controle (0 ppm) gelijkgesteld aan 1) van drie sensitieve (P4, Mm7, P13), twee Zn/Cd tolerante (Ds3, Ls4) en twee Zn tolerante (Ds10, Lm8) *Suillus luteus* isolaten na 24 uur blootstelling aan 0, 0,5, 1 en 5 ppm Cd (* = $p < 0,05$).

De analyse van de genexpressie van 30D TDF (mannose-6-fosfaat dehydrogenase) toont aan dat bij 1 ppm Cd blootstelling een daling van de genexpressie zichtbaar is bij Ds3 (Zn/Cd tolerant) en Ds10 (Zn tolerant), wanneer deze vergeleken worden met het sensitieve isolaat P4. Deze vergelijking toont ook aan dat bij 5 ppm Cd blootstelling er een afname van de expressie plaatsvindt bij Ls4 (Zn/Cd tolerant) en Lm8 (Zn tolerant). De vergelijking tussen het sensitieve isolaat Mn7 en tolerante isolaten toont aan dat er enkel een significante daling van de expressie plaatsvindt bij het Zn/Cd tolerante Ds3 en het Zn tolerante isolaat Ds10 bij een blootstelling aan 1 ppm Cd. De vergelijking tussen het sensitieve isolaat P13 en tolerante isolaten toont echter enkel een significante daling van de expressie plaatsvindt bij het tolerante isolaat Lm8 bij een blootstelling aan 5 ppm Cd (zie figuur 3.11).

Hoofdstuk 4: Conclusie en discussie

In dit onderzoek wordt een vergelijkend onderzoek uitgevoerd tussen sensitieve (P4, Mm7, P13), Zn/Cd (Ds3, Ls4) en Zn (Ds10, Lm8) tolerante *Suillus luteus* isolaten na 24 uur blootstelling aan 0; 0,5; 1 of 5 ppm Cd. Via deze proefopstelling kunnen mogelijke tolerantiemechanismen geïdentificeerd worden. In dit hoofdstuk worden de resultaten van de biomassa, nutriëntenopname, lipidenperoxidatie, enzymactiviteiten en genexpressie besproken.

1. EFFECT OP DE BIOMASSAPRODUCTIE

Cadmium veroorzaakt veranderingen in de enzymactiviteit en in het intracellulair transport (5,10). Deze veranderingen in metabole processen hebben een effect op de groei (9,10,20). Het effect van cadmium op de biomassa is tijdsafhankelijk, soortafhankelijk, etc.(10, 20). Cadmium zal interacties aangaan met polysachariden in de celwand, waardoor de celplasticiteit afneemt. Deze verminderde plasticiteit inhibeert de celexpansie en groei (9,20). Hoewel de biomassaproductie zelfs bij lage cadmiumblootstelling afneemt, blijkt dat sommige soorten al bij lage blootstelling sterke groei-inhibitie vertonen, terwijl andere slechts een sterke groei-inhibitie vertonen bij hoge cadmiumblootstelling (20-21). Tevens blijkt dat er een verschil in biomassaproductie optreedt tussen sensitieve en tolerante isolaten binnen een bepaalde soort (21).

Uit de resultaten van dit onderzoek blijkt dat er in het algemeen geen verschil van biomassaproductie optreedt tussen sensitieve en Zn/ Cd tolerante isolaten. Bij Zn tolerante isolaten treedt er enkel een verschil in biomassaproductie op bij het isolaat Lm8. Hierdoor kan dus besloten worden dat Cd tolerantiemechanismen geen invloed hebben op de biomassaproductie bij 24 uur blootstelling. De verschillen in biomassa die zichtbaar zijn bij het Zn tolerante isolaat Lm8 zijn waarschijnlijk isolaat afhankelijke effecten. Toch wil dit niet zeggen dat er geen toxische schade optreedt bij 0,5; 1 en 5 ppm Cd blootstelling. Waarschijnlijk zijn de effecten op de biomassa pas zichtbaar bij langere blootstelling, overeenstemmend met de resultaten uit de literatuur (10,20). Hierdoor kunnen de resultaten in deze studie geen uitsluitsel geven of er een verschil in

biomassaproductie optreedt tussen sensitieve en tolerante isolaten. Daarom kan er in vervolgstudies bestudeerd worden of er een duidelijk verschil in biomassaproductie merkbaar is tussen sensitieve en tolerante isolaten bij langdurige blootstelling (48, 72 uur), zowel bij hoge als bij lage Cd blootstelling.

2. EFFECT OP DE CADMIUM- EN ZINKOPNAME

Cadmiumopname kan verminderd worden via celwandbinding en door de membraanire influx transportmechanismen te inhiberen (22-23). Gelijktijdig met de inhibitie van influxmechanismen (mogelijks via Zn transporters), worden de membraanire efflux transportmechanismen geïnduceerd om cadmium te verwijderen (22-24). Via intracellulaire complexvorming tussen cadmium en peptiden kan de cel zich ook beschermen tegen de aanwezigheid van cadmium (21,24).

De resultaten in deze studie tonen een verschil in Cd opname tussen sensitieve, Zn/Cd en Zn tolerante isolaten. Maar deze resultaten tonen ook een verschillende respons wanneer zowel Zn/Cd als Zn tolerante isolaten vergeleken worden met sensitieve isolaten. Hierdoor ontstaat de indicatie dat zowel Zn/Cd als Zn tolerante isolaten tolerantiemechanismen ontwikkeld hebben om zich te beschermen tegen de opname van cadmium. De inhibitie van de opname is echter alleen uitgesproken zichtbaar wanneer deze vergeleken worden met het sensitieve isolaat Mm7. Deze resultaten geven echter alleen een verschil in Cd opname weer. Welke mechanismen de meeste bijdrage leveren kan niet uitgemaakt worden. Waarschijnlijk is een samenwerking is van alle die mechanismen mogelijk (21-24). De bevinding in verband met Cd opname in deze studie en andere studies bevestigen een verschil tussen sensitieve en tolerante isolaten, maar echte bewijskracht omtrent de mechanismen een rol spelen bij tolerantie ontbreekt voorlopig. Daarom is het ook interessant om specifiek onderzoek te verrichten naar bepaalde verdedigingsmechanismen zoals celwandbinding, effluxprocessen en is het ook interessant om de kinetica van Cd in en uitstroom met behulp van radio-isotopen te bestuderen. In dit onderzoek werden isolaten maar 24 uur werden blootgesteld. In vervolgstudies kan dan ook het effect bij langdurige blootstelling bestudeerd worden.

Cadmium kan mogelijk via Zn transporters cadmium opnemen worden en via competitie de opname van zink verminderen (10-11). Uit de analyse van de zinkopname (uitgezonderd vergelijking met P13) blijkt dat er geen verschil optreedt bij de zinkopname tussen sensitieve en tolerante *Suillus luteus* isolaten. De verschillen zinkopname die zichtbaar zijn bij het Zn tolerante isolaat P13 bij 5 ppm Cd blootstelling zijn waarschijnlijk isolaat afhankelijke effecten. In deze studie werd er aan de isolaten enkel een Zn concentratie van 3 μM toegediend. Het zou interessant zijn om in vervolgstudies te kijken ook wat de invloed is bij langdurige blootstelling en of er verschil optreedt bij andere Zn condities. Daarnaast kan ook bestudeerd worden wat het interessant om de kinetica van de in en uitstroom van essentiële metalen met behulp van radio-isotopen te bestuderen bij Cd blootstelling.

3. EFFECT OP DE LIPIDENPEROXIDATIE

Cadmium activeert lipidenperoxidatie via de inductie van het enzyme lipoxygenase (LOX) (15-16). Tijdens deze lipidenperoxidatie worden lipidenperoxiden (ROOH) gevormd. Deze reactie veroorzaakt de vorming van reactieve alkoxyradicalen zoals RO^\bullet en OH radicalen. Lipidenperoxiden kunnen ook de Fentonreactie aangaan, waardoor de concentratie aan $\text{O}_2^{\bullet-}$ toeneemt (13-18). Organismen (zoals fungi) bezitten effectieve antioxidatieve verdedigingsmechanismen. Deze verdediging bevat antioxidatieve enzymen (die ROS metaboliseren), enzymen van de ascorbaat-glutathioncyclus en antioxidatieve metabolieten. Mogelijks spelen deze mechanismen een rol bij cadmiumtolerantie (33-36).

Omdat de standaardfouten bij alle isolaten groot zijn, konden de resultaten niet geanalyseerd worden. Waarschijnlijk is er wel een biologische variabiliteit, maar deze verklaart niet alleen de grote standaardfouten. Hoewel de metingen werden uitgevoerd volgens de richtlijnen, zijn de richtlijnen naar alle waarschijnlijkheid niet geschikt voor de toepassing die in deze studie werd uitgevoerd. Daarom is het nodig om in vervolgstudies de meting van lipidenperoxidatie opnieuw te optimaliseren.

4. EFFECT OP DE ENZYMACTIVITEIT

4.1 Antioxidatieve enzymen

Cellen bezitten enzymen die ROS omzetten in minder reactieve ROS of tot water (35,36). Superoxidedismutases (SOD) zijn metaalenzymen die een reactief zuurstof atoom omzetten in het minder reactieve waterstofperoxide, daarnaast zijn er catalases die de omzetting van waterstofperoxide in water en zuurstof (33-34). Er zijn indicaties dat de capaciteit van antioxidantieve enzymen verhoogd zijn bij tolerante isolaten (28,33).

De indicatie dat de capaciteit van antioxidantieve enzymen verhoogd is bij tolerante isolaten, wordt bevestigd in deze studie via de analyse van de SOD en CAT capaciteit. Toch is er een verschil merkbaar tussen Zn/Cd en Zn tolerante isolaten. De resultaten tonen aan dat de verhoging van de antioxidantieve enzymenactiviteit zich meer manifesteert bij Zn tolerante isolaten, dan bij Zn/Cd tolerante isolaten. Uit deze vergelijking valt ook een verschil op tussen Zn/Cd tolerante isolaten onderling. Verhoogde enzymcapaciteit manifesteert zich meer bij Ls4 dan bij Ds3. Op basis van deze gegevens kan gesteld worden dat de antioxidantieve enzymcapaciteit van CAT en SOD verhoogd is bij zowel Zn/Cd, als bij Zn tolerante isolaten, maar dat de mate van capaciteitsverhoging is isolaat afhankelijk. Bijkomende studies moeten bevestigen of gelijkaardige resultaten bekomen worden bij langdurige blootstelling, om te bevestigen of de dit tolerantiemechanisme stand houdt bij langdurige blootstelling. Daarnaast zou het interessant zijn om in de toekomst naast de enzymcapaciteit van CAT en SOD ook andere antioxidantieve verdedigingsmechanismen (zoals antioxidantieve metabolieten, peroxidasen, etc) te bestuderen, om aan te tonen dat de verhoging van de antioxidantieve verdediging een algemeen tolerantiemechanisme is.

4.2 Enzymen van het intermediar metabolisme

De ascorbaat-gluthathioncyclus speelt een belangrijke rol in de antioxidantieve verdediging (37-39). Vrijgekomen geoxideerde substraten in deze cyclus worden terug gereduceerd met behulp van NAD(P)H (37-38). NAD(P)H wordt op zijn beurt vrijgezet door enzymen van het intermediar metabolisme (Glucose-6-fosfaat dehydrogenase, malaat dehydrogenase, etc.) (37-39). Er is een indicatie dat de activiteit van de ascorbaat-gluthathion cyclus verhoogt wordt bij tolerante isolaten bij cadmiumblootstelling,

waardoor ook de activiteit van het intermediair metabolisme toeneemt (37-38). Daarom is het interessant om iets meer te weten over de energieproductie bij zowel sensitieve, als Zn/Cd en Zn tolerante isolaten. Uit deze resultaten kan besloten worden dat er enkel een afname van ME capaciteit plaatsvindt bij het Zn/Cd tolerante isolaat Ls4, wanneer deze vergeleken wordt met de sensitieve isolaten Mm7 en P13. De verschillen die waargenomen worden bij het Zn tolerante isolaat Ds10 en Lm8, zijn waarschijnlijk te wijten aan isolaat afhankelijke effecten. Er is wel duidelijk een afname van de capaciteit zichtbaar tussen sensitieve en Zn/Cd, Zn tolerante isolaten wat betreft G-6-PD capaciteit. Hierdoor is er een indicatie dat de energieproductie mogelijk afneemt of stabiel blijft bij tolerante isolaten bij cadmium blootstelling. Hoewel men verwacht dat de energieproductie zou stijgen bij tolerante isolaten (37-38). Toch is er een mogelijke verklaring voor de verminderde of stabiele energieproductie. Wanneer de energieproductie toeneemt, neemt ook het aantal geproduceerde metabolieten toe. Deze metabolieten kunnen reageren met ROS, waardoor de oxidatieve stress toeneemt (10-15). Door de energieproductie te verlagen of stabiel te houden, beschermt een tolerant isolaat zich tegen cadmium geïnduceerde oxidatieve stress. De resultaten geven echter geen uitsluitsel of de vermindering van de energieproductie een algemeen tolerantiemechanisme is bij alle isolaten, omdat slechts 2 enzymen van het intermediair metabolisme gemeten werden en dat een daling van de ME capaciteit enkel zichtbaar was bij het Zn/Cd tolerante isolaat Ls4. Daarom is het nodig om in vervolgstudies andere metabolische enzymen te testen om te kijken of deze ook afnemen bij Cd blootstelling. Indien dit het geval is kan men de vermindering van de energieproductie als een algemeen tolerantiemechanisme beschouwen. Daarnaast is het ook interessant om de invloed op de enzymactiviteit te bepalen bij langdurige blootstelling om te kijken of de afname van de ME capaciteit misschien ook voordoet bij andere tolerante isolaten.

5. EFFECT OP DE GENEXPRESSIE

RNA kwaliteitscontrole toont aan dat het geëxtraheerd RNA niet gedeneerd is. Tijdens de RT-PCR bleek dat voor bepaalde stalen de RT-PCR mislukte was. Hierdoor bleven er bij sommige condities maar 1 staal over in plaats van 3 stalen. Bij de condities waar 2 of 3 stalen van waren, bleek dat de standaardfouten groot waren, waardoor de

resultaten van de qPCR niet altijd even duidelijk. Waarschijnlijk is er wel een biologische variabiliteit, maar deze verklaart niet alleen de grote standaardfouten. Waarschijnlijk moet er bij vervolgstudies betere RNA extracties gebeuren of moet de procedure opnieuw geoptimaliseerd worden. Hoewel de standaardfouten groot zijn, werden de stalen toch geanalyseerd.

Cadmiumopname kan verminderd worden door de membraire influx transportmechanismen te inhiberen (22). Gelijktijdig met de inhibitie van influxmechanismen (mogelijks via Zn transporters), worden de membraire efflux transportmechanismen geïnduceerd om cadmium te verwijderen (22-23). Mogelijks zijn ABC-type transporters bij efflux transportmechanismen en spelen waarschijnlijk een belangrijke rol bij Zn tolerantie en spelen mogelijks een rol bij cadmiumtolerantie (27).

Bij de genexpressie 51Da TDF (ABC transporter) blijkt dat er verschillende patronen optreden tussen tolerante isolaten, maar dat er geen duidelijk verschil merkbaar is tussen Zn/Cd en Zn tolerante isolaten. Een daling van de expressie is zichtbaar bij 1 en 5 ppm Cd blootstelling. Hierdoor kan vastgesteld worden dat de expressie afneemt bij 1 en 5 ppm Cd blootstelling. Dit wil echter niet zeggen dat de activiteit van de ABC transporters verminderd is. Het is best mogelijk dat de activiteit van de transporter toeneemt, maar dat de expressie afneemt. De analyse van het intermediair metabolisme toont dat er een verminderde energieproductie plaatsvindt bij tolerante isolaten. Mogelijks kan deze verminderde energieproductie een effect hebben op de genexpressie. Verdere studies moeten uitwijzen of deze resultaten ook merkbaar zijn bij de langere blootstelling. Daarnaast is het ook interessant om de kinetica van Cd in en uitstroom met behulp van radio-isotopen te bestuderen.

Uit literatuur blijkt dat GST's, die primair betrokken bij de detoxificatie van endogenen en xenobiotica, ook betrokken zijn bij de antioxidatieve verdediging (35-36). Maar uit deze literatuur blijkt tevens dat dit enzym waarschijnlijk maar een minimale rol speelt bij de antioxidatieve verdediging (36). Daarnaast zijn er nog geen concrete gegevens dat dit mogelijks verhoog of verlaagd geëxprimeerd wordt bij tolerante isolaten. De analyse van de genexpressie van 74Ac TDF (GST) genexpressie toont aan dat er voornamelijk een

toename van de expressie plaatsvindt bij het tolerante Zn isolaat Lm8 bij een blootstelling aan 1 en 5 ppm Cd, wanneer deze vergeleken wordt met sensitieve isolaten. De resultaten tonen algemeen aan (uitgezonderd bij Lm8) dat er geen veranderingen optreedt in de genexpressie. Dit sluit echter niet uit dat de verhoging van de expressie geen isolaat afhankelijk tolerantiemechanisme kan zijn. De toekomst moet uitwijzen of de observaties in deze studies ook in vervolgstudies merkbaar zijn.

Uit literatuurgegevens is er een indicatie dat de expressie van enzymen van het intermediair metabolisme mogelijks verhoogt is bij tolerante isolaten bij cadmiumblootstelling (37-38). Echter uit de resultaten van 30D TDF (mannose-6-fosfaat dehydrogenase) blijkt dat de expressie stabiel blijft en soms afneemt bij Cd blootstelling. Hoewel men verwacht dat de expressie zou stijgen bij tolerante isolaten (37-38). Toch is er een mogelijke verklaring voor de vermindering van de expressie. Wanneer de energieproductie toeneemt (toename van de expressie), neemt ook het aantal geproduceerde metaboliëten toe. Deze metaboliëten kunnen reageren met ROS, waardoor de oxidatieve stress toeneemt (10-15). Door de energieproductie te verlagen of stabiel te houden, beschermt een tolerant isolaat zich tegen cadmium geïnduceerde oxidatieve stress. De resultaten geven echter geen uitsluitsel of de vermindering of de stabiliteit van de energieproductie een algemeen tolerantiemechanisme is bij alle isolaten, omdat slechts de expressie van 1 enzym van het intermediair metabolisme gemeten werd.

6. ALGEMENE CONCLUSIE

Dit onderzoek bevestigt dat er duidelijk verschil merkbaar is tussen sensitieve en Zn/Cd, Zn tolerante isolaten en mogelijke tolerantiemechanismen werden geïdentificeerd. Er kan niet altijd een duidelijk verschil aangetoond worden tussen Zn/Cd en Zn tolerante isolaten. Hierdoor kan onder voorbehoud gesteld worden dat Zn/Cd en Zn tolerante isolaten bepaalde tolerantie gemeenschappelijk bezitten. Dit onderzoek is echter beperkt omdat er echter maar gemeten werd bij 24 uur blootstelling. Daarom moet er in de toekomst vooral gekeken worden wat het effect is bij langdurige blootstelling.

Literatuurlijst

1. Vlaamse milieumaatschappij. Milieurapport Vlaanderen (MIRA): Verspreiding van zware metalen. Erembodegem; 2006.
2. World Health Organization. Environmental Health Criteria: Cadmium. Geneva; 1992.
3. Ministerie van Openbare Werken, Energie, Leefmilieu en Natuur. Actieplan cadmium. Brussel; 2006.
4. World Health Organization, Regional Office for Europe. Air Quality Guidelines - Second Edition: Chapter 6.3 Cadmium. Copenhagen; 2000.
5. Cobbett C. Heavy metals and plants model systems and hyperaccumulators. *New Phytologist* 2003; 159: 289–293.
6. Basta NT, Ryan JA, and R. L. Chaney RL. Trace Element Chemistry in Residual-Treated Soil: Key Concepts and Metal Bioavailability. *J. Environ. Qual* 2005; 34: 49–63.
7. Lane TW, Morrel FM.M. A biological function for cadmium in marine diatoms. *PNAS* 2000; 97: 4627-4631.
8. Liao M, Chen CL, Huang CY. Effect of heavy metals on soil microbial activity and diversity in a reclaimed mining wasteland of red soil area. *J Environ Sci (China)*. 2000; 17: 832-837.
9. Liao M, Xie XM, Effect of heavy metals on substrate utilization pattern, biomass, and activity of microbial communities in a reclaimed mining wasteland of red soil area. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2007 ;66: 217-223.
10. Das P, Samantaray S, Rout GR. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environmental Pollution* 1997; 98: 29-36.
11. Schützendübel A, Polle A. Plant responses to abiotic stress: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* 2002; 53: 1351-1365.
12. Choudhury S, Panda SK. Role of salicylic acid in regulating cadmium induced oxidative stress in *Oryza Sativata* L. roots. *Bulg. J. Plant Physiol* 2004; 30: 95-110.
13. Ikediobi CO, Badisa VL, Ayuk-Takem LT, Latinwo LM, West J. Response of antioxidant enzymes and redox metabolites to cadmium-induced oxidative stress in CRL-1439 normal rat liver cells. *International Journal of Molecular Medicine* 2004; 14: 87-92.
14. Maraghy SA, Gad MZ, Fahim AT, Hamdy MA. Effect of Cadmium and Aluminum Intake on the Antioxidant Status and Lipid Peroxidation in Rat Tissues. *J. Biochem Molecular Toxicology* 2001; 15: 207-214.
15. Unyayar S, Çelik A, Çeki FÖ, Gözel A. Cadmium-induced genotoxicity, cytotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba*. *Mutagenesis* 2006; 21: 77–81.
16. Chien HF, Wang JW, Chuan Chi Lin CC, Kao CH. Cadmium toxicity of rice leaves is mediated through lipid peroxidation. *Plant Growth Regulation* 2001; 33: 205-213.
17. Gad El-Rab SMF, Abdel-Fattah Shoreit A, Fukumori Y. Effects of cadmium stress on growth, Morphology and Protein expression in *Rhodobacter capsulatus* B10. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 2006; 70: 2394-2402.
18. Courbot M, Diez L, Ruotolo R, Chalot M, Leroy P. Cadmium-responsive thiols in ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Applied and Environmental Microbiology* 2004; 70: 7413-7417.
19. Fernández EL, Gustafson A-L, Andersson M, Hellman B, Dencker L. Cadmium-Induced Changes in Apoptotic Gene Expression Levels and DNA Damage in Mouse Embryos Are Blocked by Zinc. *Toxicological Sciences* 2003; 76:162–170.
20. Baldrian P. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology* 2003; 32: 78-91.
21. Wilkolazka AJ, Grazi M, Braha B, Menge S, Schlosser GJ, Kraus GJ. Species-specific Cd-stress response in the white rot basidiomycetes *bortiporus biennis* and *Cerrena unicolor*. *Biometals* 2006; 19: 39-49.
22. Bellion M, Courbot M, Jacob C, Blaudez D, Chalot M. Minireview: Extracellular and cellular mechanism sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 254: 173-181.
23. Hall JL. Review: Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 2002; 53: 1-11.
24. Blaudez D, Batton B, Chalot M. Cadmium uptake and subcellular compartmentation in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Microbiology* 2000; 146: 1109-1117.

25. Ma JF, Ryan PR, Delhaize E. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Science* 2001; 6: 273-278.
26. Meharg AA. The mechanistic basis of interactions between mycorrhizal associations and toxic metal cations. *Mycol Res* 2003; 107: 1253-1265.
27. Courbot M, Diez L, Ruotolo R, Chalot M, Leroy P. Cadmium-responsive thiols in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 7413-7417.
28. Colpeart JV, Vandenkoornhuyse P, Adriaensen K, Vangronsveld J. Genetic variation and heavy metal tolerance in the ectomycorrhizal basidiomycete *Suillus luteus*. *New Phytol* 2000; 47: 367-379.
29. Lafranco L. The fine-tuning of heavy metals in mycorrhizal fungi. *Plant Phytologist* 2007; 174: 3-6.
30. Lee S, Moon JS, Ko TS, Petros D, Goldsbrough PB, Korban SS. Overexpression of Arabidopsis Phytochelatin Synthase Paradoxically Leads to Hypersensitivity to Cadmium Stress. *Plant Physiology* 2003; 131: 656-663.
31. Feder ME. Heat-shock proteins, molecular chaperones and the stress response: Evolutionary and Ecological Physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 1999; 61:243-82.
32. Backor M, Gibalová A, Bud'ová J, Mikes J, Solár P. Cadmium-induced stimulation of stress-protein hsp70 in lichen photobiont *Trebouxia erici*. *Plant Growth Regul* 2006; 50:159-164.
33. Shah K, Kumar RG, Verma S, Dubey RS. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant science* 2001; 161: 1135- 1144.
34. Shaw BP. Effects of mercury and cadmium on the activities of antioxidative enzymes in the seedling of *Phaseolus aureus*. *Bio Plant* 1995; 37: 587-596.
35. Wagner U, Edwards R, Dixon DP, Mauch F. Probing the diversity of Arabidopsis glutathione S-transferase gene family. *Plant Molecular Biology* 2002; 49: 515-532.
36. Eaton DL, Bammler TK. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicological science* 1999; 49: 156-164.
37. Asada K. Ascorbate peroxidase-hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant* 1992; 85: 235-241.
38. Foyer CH, Halliwell B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 1976; 133: 21-25.
39. McKersie BD. OXIDATIVE STRESS, University of Guelph. 1996. URL: www.plantstress.com/Articles/Oxidative%20Stress.htm#lipid.
40. Alscher RG, Hess JL. Glutathione. *Antioxidants in Higher Plants*. Boca Raton (FL): CRC Press;1993: 1-30.
41. Noctor G, Foyer CH, Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant: Physiol Plant Mol Biol* 1998; 49: 249-279.
42. Alscher RG, Hess JL. Vitamine E, α -Tocopherol, *Antioxidants in Higher Plants*. Boca Raton (FL): CRC Press1993: 111-134.
43. Martin F. Mycorrhizal & Plant Resources, Nancy-Université. 2007. URL: <http://mycor.nancy.inra.fr/index.html>.
44. Taiz L, Zeiger E. Mineral nutrition. *Plant Physiology*. Sunderland: Sinauer Associates 2002. p82-83.
45. Plexor. qPCR System(Technical manual: Instructions for use of products), Promega 2007. URL: <http://www.promega.com/tbs/tm262/tm262.pdf>.
46. Plexor. qPCR System(plexor™ Instrument setup and data analysis for the ABI PRISM® 7000 sequence detection system), Promega 2007. URL:<http://www.promega.com/tbs/tm266/tm266.pdf>.

Auteursrechterlijke overeenkomst

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

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

Adaptieve Cd tolerantiemechanismen in het micro-organisme *Suillus luteus*

Richting: **Master in de biomedische wetenschappen**

Jaar: **2007**

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

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

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

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

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

Ik ga akkoord,

Bruno Reiners

Datum: **18.06.2007**