

2017 • 2018  
Faculteit Industriële ingenieurswetenschappen  
master in de industriële wetenschappen: biochemie

## Masterthesis

De rol van calciumtransporters in uraniumopname bij *Arabidopsis thaliana*

PROMOTOR :

dr. ir. Kristel SNIEGOWSKI

PROMOTOR :

dr. Eline SAENEN

BEGELEIDER :

ing. Orpha BAILLIEN

Karen Wuyts

Scriptie ingediend tot het behalen van de graad van master in de industriële wetenschappen: biochemie

Gezamenlijke opleiding UHasselt en KU Leuven



2017 • 2018

Faculteit Industriële ingenieurswetenschappen  
master in de industriële wetenschappen: biochemie

## Masterthesis

De rol van calciumtransporters in uraniumopname bij *Arabidopsis thaliana*

**PROMOTOR :**

dr. ir. Kristel SNIEGOWSKI

**PROMOTOR :**

dr. Eline SAENEN

**BEGELEIDER :**

ing. Orpha BAILLIEN

**Karen Wuyts**

Scriptie ingediend tot het behalen van de graad van master in de industriële wetenschappen: biochemie



**KU LEUVEN**



# Woord vooraf

---

Na 3 jaar bloed, zweet en tranen is het einde in zicht. Ik kan eindelijk zeggen dat ik mijn studie als biochemisch ingenieur afrond. 3 jaar geleden begon ik vol goede moed aan deze studie. Alhoewel alles niet altijd via een leien dakje verliep, kan ik u met trots deze prachtige masterproef voorstellen.

Als eerste wil ik dr. Eline Saenen bedanken. Eline, een welgemeende dankjewel dat je me de kans hebt gegeven om binnen jullie onderzoeksgroep de eerste stappen te mogen zetten in het onderzoek. Het is een eer om hier dan ook mijn masterproef te mogen schrijven. Niet alleen uw kennis, maar ook uw hulpvaardigheid, jovialiteit, bescheidenheid en optimisme zorgen ervoor dat ik naar je opkijk. Ik had me geen betere promotor kunnen inbeelden. Jij bent echt voor dit vak gemaakt en ik ben ervan overtuigd dat je met veel succes nog vele studenten gaat opleiden.

Hiernaast wil ik prof. dr. Nele Horemans bedanken dat ze haar labo openstelt en studenten op interessante onderwerpen aan het werk zet. Ook ing. Orpha, mijn schoolpromotor, mag hier niet ontbreken. Bedankt dat ik bij jou terecht kon voor vragen en bedankt voor het nalezen van mijn thesis.

Ook wil ik iedereen met een warm hart bedanken die mij in het labo geholpen hebben. Bedankt Robin, May, Axel, Jean bij het zaaien en het oogsten van de plantjes. Alleen zou dit uren duren. Ook bedankt voor het aanleren van de technieken en methoden die uitgevoerd werden en me toch gerust te stellen wanneer er alweer een hydrocultuur mislukte. Mijn stressniveau lag op sommige momenten hoger dan dat van de plantjes. De collegialiteit die hier aanwezig is, is iets om te koesteren. Dit maakte dat ik me onmiddellijk opgenomen voelde in de groep en dat ik telkens met veel plezier naar de stage kwam.

Via deze gelegenheid wil ik mijn familie en vrienden bedanken. Jullie moesten soms geduld hebben en ik was regelmatig afwezig op gelegenheden aangezien het schoolwerk zich soms torenhoog begon op te stapelen. Bedankt lieve mama dat je me de kans hebt gegeven om toch nog verder te kunnen studeren.

Tot slot wil ik mijn medestudenten bedanken die deze 3 studie jaren samen met mij lief en leed hebben doorgebracht. Jullie hielpen me telkens vooruit en hebben me mee helpen maken tot wie ik nu ben: iemand die met meer kennis en zelfvertrouwen in het leven staat en trots is op wat ze bereikt heeft.

---

---

# Inhoudsopgave

---

Woord vooraf.....	1
Lijst van tabellen.....	5
Lijst van figuren.....	7
Verklarende symbolen- en woordenlijst .....	11
Abstract.....	15
Abstract in English .....	17
1 Inleiding.....	19
Situering.....	19
Probleemstelling.....	19
Doelstelling.....	20
Methode van aanpak.....	20
2 Literatuurstudie.....	23
2.1 Radioactiviteit .....	23
2.2 Uranium.....	25
2.2.1 Eigenschappen van uranium .....	25
2.2.2 Voorkomen van uranium.....	26
2.2.3 Opname en effect van uranium door organismen.....	26
2.3 Oxidatieve stress.....	28
2.3.1 Algemeen.....	28
2.3.2 Biochemische eigenschappen van ROS.....	28
2.3.3 Verdedigingsmechanismen van plantencellen: ROS-afbraak.....	29
2.4 Calcium en metaal toxiciteit.....	32
3 Materiaal en methode .....	33
3.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> hydrocultuur .....	33
3.1.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	33
3.1.2 Hydrocultuur .....	33
3.2 Calcium- en uraniumbepaling.....	35
3.3 Genexpressie .....	35
3.3.1 RNA-extractie.....	36
3.3.2 RNA-kwantiteit en -kwaliteit .....	37
3.3.3 RNA-opzuivering en cDNA-aanmaak.....	38

---

3.3.4	Real-Time PCR (qPCR) .....	39
3.4	Bepaling enzymcapaciteit.....	41
3.4.1	Algemeen.....	41
3.4.2	Analyse enzymcapaciteit.....	41
3.5	Statistische analyse .....	45
4	Resultaten .....	47
4.1	Uraniumblootstelling bij verschillende calciumconcentraties .....	47
4.1.1	Effecten op groei .....	47
4.1.2	Opname en translocatie van uranium en calcium .....	49
4.1.3	Oxidatieve stress respons .....	50
4.2.	Uraniumblootstelling bij aan- en afwezigheid van lanthaan(III)chloride.....	55
4.2.1	Effecten op groei.....	56
4.2.2	Oxidatieve stress respons .....	57
5	Discussie .....	61
5.1	Invloed van calcium op <i>A. thaliana</i> planten .....	61
5.2	Opname en translocatie van uranium en calcium .....	62
5.3	De invloed van calcium op uraniumtoxiciteit .....	63
6	Besluit.....	65
7	Bibliografie .....	67
8	Bijlagen.....	71

---

# Lijst van tabellen

---

Tabel 1: Natuurlijk voorkomen van uranium . ..... 26

Tabel 2: Sequentie van forward en reverse primers die gebruikt worden bij genexpressie.... 40

Tabel 3: Transferfactor voor uranium en calcium ten opzichte van verschillende uranium- en calciumconcentraties..... 50

Tabel 4: Relatieve genexpressie van de controleplanten ten opzichte van N Ca voor stalen op wortel- en bladniveau..... 72

---



---

# Lijst van figuren

---

- Figuur 1: Radioactieve vervalreeks waarbij onstabiel uranium-238 vervalt tot uiteindelijk een stabiel lood-206 atoom. Gedurende deze desintegratiereeks worden zowel alfa-, bèta- als gammadeeltjes vrijgegeven die elk een ander doordringend vermogen hebben [18]. ..... 25
- Figuur 2: Ontstaan van ROS bij metabole processen door reductie van zuurstofgas naar water ..... 29
- Figuur 3: Haber-Weiss en fentonreactie ..... 29
- Figuur 4: De ascorbaat-glutathion cyclus. Afkortingen: APX, ascorbaat peroxidase, AsA, ascorbinezuur; DHA, dehydroascorbaat; DHAR, dehydroascorbaat reductase; GSH, glutathione; GSSG, geoxideerd glutathione; GR, glutathione reductase; MDHA, monodehydroascorbaat; MDHAR, monodehydroascorbaat reductase; NADP, nicotinamideadeninedinucleotidofosfaat; NADPH, gereduceerd nicotinamideadeninedinucleotidofosfaat..... 31
- Figuur 5: (a) Een grote hoeveelheid Arabidopsis zaadjes groeiende op een klein oppervlak. (b) De rozet van een 4 weken oude Arabidopsis plant. (c) Een 5 weken oude Arabidopsis plant waarbij bloei waarneembaar is ..... 33
- Figuur 6: (A) Schematische voorstelling van het maken van zaadbedden. Van een 1,5 mL microtubes wordt de bodem en dop afgeknipt. De microtubes wordt op een papieren tape gefixeerd en met "een bubbel" gevuld met Hoagland LP die 0,6% agar bevat. (B) Een hydrocultuurbakje gevuld met gedestilleerd water waarop een deksel met zaadbedden wordt geplaatst..... 34
- Figuur 7: Schematische voorstelling voor een RNA-extractie met behulp van RNeasy minikit (Qiagen). ..... 36
- Figuur 8: (A) Een elektroferogram van een RNA-ladder waarin de verschillende pieken overeenkomen met verschillende lengtes RNA. (B) Een elektroferogram van een succesvol gerund plantenstaal waarin de twee grote pieken het ribosomaal RNA van respectievelijk 18 S en 28 S voorstellen..... 38
- Figuur 9: Schematische voorstelling van RNA-opzuivering met behulp van TURBO DNA-free™ Kit ..... 38
-

Figuur 10: Relatieve gemiddelde versgewichten (%) ten opzichte van verschillende uranium- en calciumconcentraties voor (A) wortels en (B) blaadjes. De data zijn het gemiddelde van minimaal 60 herhalingen + standaarderror. Relatieve gewichten worden genomen ten opzichte van controleplanten (0  $\mu\text{M}$  U) bij overeenstemmende calciumconcentratie. Binnen dezelfde calciumconcentratie wordt een significant verschil aangeduid met een andere letter ( $p < 0,05$ ). Binnen dezelfde uraniumconcentratie wordt een significant verschil aangeduid met \* ( $p < 0,05$ ).  
..... 48

Figuur 11: Relatieve gemiddelde drooggewichten (%) ten opzichte van verschillende uranium- en calciumconcentraties voor (A) wortels en (B) blaadjes. De data zijn het gemiddelde van 4 herhalingen + standaarderror. Relatieve % drooggewichten worden genomen ten opzichte van controleplanten (0  $\mu\text{M}$  U) bij overeenstemmende calciumconcentratie. Binnen dezelfde calciumconcentratie wordt een significant verschil aangeduid met aan andere letter ( $p < 0,05$ ). Binnen dezelfde uraniumconcentratie wordt een significant verschil aangeduid met \* ( $p < 0,05$ ).  
..... 48

Figuur 12: (A) en (B) concentratie uranium ( $\mu\text{g}$  per gram drooggewicht) voor (A) wortels en (B) blaadjes. C en D: concentratie calcium (mg per gram drooggewicht) voor (C) wortels en (B) blaadjes. De data zijn het gemiddelde van 4 herhalingen + standaarderror. Binnen dezelfde calciumconcentratie wordt een significant verschil aangeduid met aan andere letter ( $p < 0,05$ ). Binnen dezelfde uraniumconcentratie wordt een significant verschil aangeduid met \* ( $p < 0,05$ ).  
..... 50

Figuur 13: Relatieve genexpressie ten opzichte van verschillende uranium- en calciumconcentraties voor de wortels. De data zijn het gemiddelde van minimum 3 herhalingen + standaarderror. Relatieve genexpressie wordt genomen ten opzichte van controleplanten (0  $\mu\text{M}$  U) bij overeenstemmende calciumconcentratie. Binnen dezelfde calciumconcentratie wordt een significant verschil aangeduid met aan andere letter ( $p < 0,05$ ). Binnen dezelfde uraniumconcentratie wordt een significant verschil aangeduid door \* ( $p < 0,05$ ).  
..... 52

Figuur 14: Relatieve genexpressie ten opzichte van verschillende uranium- en calciumconcentraties voor de blaadjes. De data zijn het gemiddelde van minimum 3 herhalingen + standaarderror. Relatieve genexpressie wordt genomen ten opzichte van controleplanten (0  $\mu\text{M}$  U) bij overeenstemmende calciumconcentratie. Binnen dezelfde calciumconcentratie wordt een significant verschil aangeduid met aan andere letter ( $p < 0,05$ ). Binnen dezelfde uraniumconcentratie wordt een significant verschil aangeduid door \* ( $p < 0,05$ ).  
..... 53

Figuur 15: Relatieve enzymcapaciteit (%) ten opzichte van verschillende uranium- en calciumconcentraties voor (A) CAT; (B) SPOD; (C) SOD; (D) GPOD en (E) GR. De data zijn het

---

gemiddelde van minimum 3 herhalingen + standaarderror. Relatieve capaciteiten worden genomen ten opzichte van controleplanten (0  $\mu\text{M}$  U) bij overeenstemmende calciumconcentratie. Binnen dezelfde calciumconcentratie wordt een significant verschil aangeduid met een andere letter ( $p < 0.05$ ). Binnen dezelfde uraniumconcentratie wordt een significant verschil aangeduid met \* ( $p < 0.05$ ). ..... 55

Figuur 16: Relatieve gemiddelde versgewichten (%) ten opzichte van verschillende uraniumconcentraties in aan- en afwezigheid van  $\text{LaCl}_3$  voor (A) wortels en (B) blaadjes van minimaal 76 herhalingen + standaarderror. Relatieve gewichten worden genomen ten opzichte van controleplanten (0  $\mu\text{M}$  U) bij overeenstemmende  $\text{LaCl}_3$ -concentratie. Binnen dezelfde  $\text{LaCl}_3$ -concentratie wordt een significant verschil aangeduid met een andere letter ( $p < 0.05$ ). Binnen dezelfde uraniumconcentratie wordt een significant verschil aangeduid met \* ( $p < 0.05$ ). ..... 56

Figuur 17: Relatieve gemiddelde drooggewichten (%) ten opzichte van verschillende uranium- en  $\text{LaCl}_3$ -concentraties voor (A) wortels en (B) blaadjes van 4 herhalingen. Relatieve % drooggewichten worden genomen ten opzichte van controleplanten (0  $\mu\text{M}$  U) bij overeenstemmende  $\text{LaCl}_3$ -concentratie. Binnen dezelfde  $\text{LaCl}_3$ -concentratie wordt een significant verschil aangeduid met een andere letter ( $p < 0,05$ ). Binnen dezelfde uraniumconcentratie wordt een significant verschil aangeduid met \* ( $p < 0,05$ )..... 57

Figuur 18: Resultaat van de Bioanalyser. Op de gel is duidelijk te zien dat de stalen 32, 33, 192, 223 en 224 een "smeer" bevatten wat duidt op gefragmenteerd RNA bevatten. .... 58

Figuur 19: Relatieve enzymcapaciteit (%) ten opzichte van verschillende uraniumconcentraties bij 0 of 5 mM  $\text{LaCl}_3$  voor (A) CAT; (B) SPOD; (C) SOD; (D) GPOD en (E) GR bij minimaal 3 herhalingen en bij SOD 50  $\mu\text{M}$  U, 5 mM  $\text{LaCl}_3$  2 herhalingen. Relatieve capaciteiten worden genomen ten opzichte van controleplanten (0  $\mu\text{M}$  U) bij 0 of 5 mM  $\text{LaCl}_3$ . Binnen dezelfde  $\text{LaCl}_3$ -concentratie wordt een significant verschil aangeduid met een andere letter ( $p < 0.05$ ). Binnen dezelfde uraniumconcentratie wordt een significant verschil aangeduid met \* ( $p < 0.05$ ). ..... 59

Figuur 20: Relatieve genexpressie ten opzichte van verschillende uranium- en calciumconcentraties voor de (A) en (C) wortels en (C) en (D) blaadjes. De data zijn het gemiddelde van 4 herhalingen + standaarderror. Relatieve genexpressie wordt genomen ten opzichte van controleplanten (0  $\mu\text{M}$  U) bij overeenstemmende calciumconcentratie. Binnen dezelfde calciumconcentratie wordt een significant verschil aangeduid met een andere letter ( $p < 0.05$ ). Binnen dezelfde uraniumconcentratie wordt een significant verschil aangeduid door \* ( $p < 0,05$ ). ..... 72

---

---

# Verklarende symbolen- en woordenlijst

---

$^1\text{O}_2$	singlet zuurstof
A	massagetal
APX	ascorbaat peroxidase
AsA	ascorbinezuur
BIS	Biosfeer Impact Studies
Ca	calcium
CAT	katalase
cDNA	kopie-deoxyribonucleïnezuur
$\text{Cu}^+$	koperion
Ct-waarde	drempelwaarde
CEA	commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives
DHA	dehydroascorbaat
DHAR	dehydroascorbaat reductase
$e^-$	elektron
$e^+$	positron
$\text{Fe}^{2+}$	Ijzerion
g	gravitatie kracht
GPX	guaiacol peroxidase
GPOD	glutathion peroxidase
GR	glutathion reductase
GSH	glutathion
GSSG	geoxideerde glutathion
$\text{H}_2\text{O}$	water
$\text{H}_2\text{O}_2$	waterstofperoxide
H Ca	hoge calciumconcentratie
HCl	zoutzuur
He	heliumkern
HP	hoge fosfaatconcentratie
ICP- MS	inductief gekoppeld plasma massaspectrometrie (ICP-MS)

---

L Ca	lage calciumconcentratie
LaCl <sub>3</sub>	lanthaan(III)chloride
LP	lage fosfaatconcentratie
MDHA	monodehydroascorbaat
MDHAR	monodehydroascorbaat reductase
mRNA	boodschapper-RNA
N	atoom
NaOH	natriumhydroxide
N Ca	normale calciumconcentratie
NADP	nicotinamideadeninedinucleotidfosfaat
NADPH + H <sup>+</sup>	gereduceerd nicotinamideadeninedinucleotidfosfaat
N*	geëxciteerd atoom
nt	nano Tesla
O <sub>2</sub>	zuurstofgas
O <sup>2-</sup>	oxide ion
O <sub>2</sub> • <sup>-</sup>	superoxideradicaal
OH•	hydroxylradicaal
HO <sub>2</sub> •	hydroperoxideradicaal
qPCR	real-time polymerase kettingreactie
R•	vetzuurradicaal
RNA	ribonucleïnezuur
RIN	RNA integriteitsnummer
Rpm	Rotaties per minuut
RO•	alkoxyl radicaal
ROO•	peroxyl radicaal
ROOR	peroxide
POX	peroxidasen
ROS	reactieve zuurstofsoorten
S	subeenheid
SCK•CEN	studiecentrum voor kernenergie
SOD	superoxide dismutase

---

SPX	syringaldazine peroxidase
TRIS	tris(hydroxymetyl)-aminoethane
U	uranium
UV	ultraviolet
$\nu$	neutrino
$\bar{\nu}$	antineutrino
XOD	xanthine oxidase
Z	atoomnummer



---

# Abstract

---

Biosfeer Impact Studies is een onderzoeksgroep van het SCK•CEN in Mol waarbij één van de onderzoeklijnen gericht is op onderzoek naar de effecten van radionucliden op planten. Uranium is een natuurlijk voorkomend radionuclide en zwaar metaal. Hoewel uranium een niet-essentieel element is, wordt het net zoals essentiële nutriënten door planten opgenomen. Er is al heel wat onderzoek gedaan naar de toxische effecten van uranium op planten, maar er is slechts weinig geweten over de opnameroute van uranium, wat van belang is voor het maken van risicoanalyses.

Dit onderzoek bestudeert de mogelijke opnameroute van uranium via de calciumkanalen. Hiervoor worden 18-dagen oude *Arabidopsis thaliana* planten 3 dagen blootgesteld aan (i) 0, 25 of 50  $\mu\text{M}$  uranium in combinatie met 30, 300 of 3000  $\mu\text{M}$  calcium en (ii) 0, 25 of 50  $\mu\text{M}$  uranium in combinatie met 0 of 5 mM lanthaan(III)chloride ( $\text{LaCl}_3$ ), i.e. een calciumkanaalinhibitor. De resultaten van het  $\text{LaCl}_3$ -experiment doen vermoeden dat een te hoge  $\text{LaCl}_3$ -concentratie gebruikt werd waardoor hier geen eenduidige conclusie getrokken kan worden.

De resultaten doen vermoeden dat in *A. thaliana* uranium niet via calciumkanalen opgenomen wordt vermits er geen significant verschil in uraniumconcentratie gevonden werd bij de verschillende calciumconcentraties. Daarnaast lijkt calcium wel een invloed te hebben op de uraniumtoxiciteit waarbij *A. thaliana* gevoeliger is voor uranium bij lage calciumconcentratie. Er is meer onderzoek nodig om de invloed van calcium op de uraniumtoxiciteit in kaart te brengen.

---

---

# Abstract in English

---

Biosphere Impact Studies is a research group at SCK•CEN in Mol where one of the research lines is focused on investigating the effects of radionuclides on plants. Uranium is a naturally occurring radionuclide and heavy metal. Although uranium is a non-essential element, it is readily taken up by plants just like essential nutrients. A lot of research has been done on the toxic effects of uranium on plants. However, little is known about the uranium uptake mechanisms, which is important for making risk assessments.

This research focusses on the possible uptake of uranium via calcium channels. For this purpose, 18-day-old *Arabidopsis thaliana* plants are exposed for 3 days to (i) 0, 25 or 50  $\mu\text{M}$  uranium in combination with 30, 300 and 3000  $\mu\text{M}$  calcium and (ii) 0, 25 or 50  $\mu\text{M}$  uranium in combination with 0 or 5 mM lanthanum(III)chloride ( $\text{LaCl}_3$ ), i.e. a calcium channel inhibitor. The results of the  $\text{LaCl}_3$  experiment suggest that the  $\text{LaCl}_3$  concentration used was too high. Therefore, no clear conclusion can be made based on the results of this experiment.

The results suggest that in *A. thaliana* uranium is not absorbed via calcium channels since no significant differences in uranium concentrations were found at the different calcium concentrations. In addition, calcium seems to have an influence on the uranium toxicity in which *A. thaliana* is more sensitive to uranium at low calcium concentrations. Based on the current results, it seems that more research is needed to further investigate the influence of calcium on uranium toxicity.

---

---

# 1 Inleiding

---

## Situering

Het Studiecentrum voor Kernenergie (SCK•CEN) is een Belgische nucleaire onderzoeksinstelling gevestigd in Mol die meer dan 700 werknemers tewerkstelt en samenwerkt met onderzoekspartners op internationaal niveau. Een goed evenwicht tussen wetenschappers, ingenieurs, ondersteunend personeel en hightech infrastructuur zorgt voor het dagelijks streven naar de ontwikkeling van innoverende technologieën. Deze bieden een antwoord op maatschappelijke vragen en noden op gebied van kernenergie en ioniserende straling. Binnen SCK•CEN beheert de *Academy for Nuclear Science and Technology* (SCK•CEN Academy) de opleidings- en trainingsactiviteiten. Jonge wetenschappers worden hier begeleid, opgeleid, getraind en gemotiveerd om hun kritische intellectuele capaciteiten te ontwikkelen op gebied van nucleaire doeleinden [1].

Deze masterproef vond plaats binnen de onderzoeksgroep Biosfeer Impact Studies (BIS). Binnen BIS is één van de onderzoekslijnen gericht op onderzoek naar de effecten van straling en radionucliden op planten. Zo doet BIS onderzoek naar de effecten van uranium op planten. Uranium is geen essentieel element maar wordt, net zoals essentiële nutriënten, door planten opgenomen. Het is al geweten dat er oxidatieve stress in plantencellen kan ontstaan eenmaal uranium is opgenomen. Bij oxidatieve stress ontstaat een verhoogde productie aan reactieve zuurstofsoorten (ROS) in plantencellen. Deze ROS kunnen leiden tot DNA-schade, apoptose (geprogrammeerde celdood) en necrose (celdood) van plantencellen. Om deze schade te beperken, hebben planten verdedigingsmechanismen ingebouwd om deze ROS te detoxificeren. Deze verdediging bestaat uit antioxidatieve enzymen en antioxidatieve metaboliëten [2],[3].

## Probleemstelling

Uranium is een natuurlijk voorkomend radionuclide en zwaar metaal, dat in lage concentratie aanwezig is in zowel de atmosfeer, waterige omgevingen en bodems. Antropogene activiteiten (vb. metaalontginning, fosfaatindustrie,...) kunnen leiden tot lokale verhogingen van uraniumconcentraties wat ecologische problemen kan veroorzaken (vb. bodemverontreiniging, verminderde groei van planten,...) [4]–[6].

Hoewel er al heel wat onderzoek gedaan is naar de effecten van uranium op planten, is het nog onduidelijk hoe uranium door de planten opgenomen wordt. Hier schuilt dus een groot kennistekort. Op basis van eerdere onderzoeken veronderstelt men dat calcium- en ijzerkanalen mogelijke uraniumopnameroutes zijn [7],[8]. In deze masterproef wordt dan ook de opnameroute van uranium doorheen calciumkanalen ter hoogte van de wortels bij *Arabidopsis thaliana* planten bestudeerd. In het *Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives* (CEA, Frankrijk) loopt een gelijkaardig onderzoek dat de opnameroute doorheen ijzerkanalen bestudeerd [9]. Om goede risicoanalyses te kunnen maken, is het noodzakelijk

---

om de uraniumopname door de wortels en de translocatie naar de blaadjes te kunnen inschatten.

## Doelstelling

Het doel van dit onderzoek is om meer inzicht te krijgen in de uranium opnamemechanismen. Meer specifiek zal er gekeken worden naar de calciumkanalen als mogelijke opnameroute voor uranium. De hypothese van dit onderzoek is dan ook als volgt: uranium wordt opgenomen via specifieke transporters die betrokken zijn in nutriënten opnamen, meer bepaald de calciumtransporters.

In een eerste fase van het onderzoek wordt *A. thaliana* blootgesteld aan uranium bij verschillende calciumconcentraties. Hierdoor kan de competitie tussen uranium en calcium ter hoogte van de calciumkanalen bestudeerd worden. Indien uranium doorheen calciumkanalen migreert, wordt bij hoge calciumconcentratie in het groeimedium een lage uraniumopname verwacht. Deze eerste fase zal al een sterke indicatie geven over de uraniumopname doorheen calciumkanalen.

In een tweede fase van het onderzoek wordt een calciumkanaalinhibitor, i.e. lanthaan(III)chloride ( $\text{LaCl}_3$ ) toegevoegd. Door de calciumkanalen te inhiberen wordt een verlaagde uraniumopname verwacht. Door deze fase van het onderzoek zal nog meer inzicht verkregen worden over de uraniumopname doorheen de calciumkanalen.

Uiteindelijk zullen de resultaten van beide fasen met elkaar vergeleken worden, wat meer inzicht zal geven over de uraniumopname doorheen calciumkanalen.

## Methode van aanpak

In dit onderzoek wordt gebruik gemaakt van de plant *A. thaliana*, ook wel zandraket genoemd. Deze plant is een modelorganisme in de plantenbiologie omdat het een volledig gesequeneerd en geannoteerd genoom heeft, het een korte groeicyclus heeft en omdat het relatief gemakkelijk op te kweken is op een beperkte oppervlakte [10],[11].

Voor de experimenten worden de planten gegroeid op een hydrocultuursysteem. Gedurende 18 dagen gebeurt dit onder controlecondities zonder blootstelling aan stress. Op dag 18 worden de *A. thaliana* planten gedurende 3 dagen blootgesteld aan hun stressfactor door deze toe te dienen aan de voedingsoplossing van de planten. In de eerste fase van het onderzoek is deze stressfactor 0, 25 en 50  $\mu\text{M}$  uranium in combinatie met verschillende calciumconcentraties. In de tweede fase van het onderzoek is dat 0, 25 en 50  $\mu\text{M}$  uranium in combinatie met een calciumkanaalinhibitor ( $\text{LaCl}_3$ ). Na 3 dagen blootstelling aan de verschillende stresscondities worden de blaadjes en wortels van *A. thaliana* geoogst en voorbereid voor verdere analyse.

---

Bij de eerste analyse wordt de totale calcium- en uraniumconcentratie in plantencellen van *A. thaliana* bepaald op zowel blad- als wortelniveau. Nadat de plantenstalen gedroogd zijn gedurende 1 week op 70°C, worden ze verast in een moffeloven. Vervolgens wordt de as opgelost in zoutzuur (HCl) en worden de stalen gefiltreerd. De stalen zijn klaar voor analyse in een extern labo. In de eerste fase van het onderzoek wordt er bij verlaagde calciumconcentratie in de voedingsoplossing een verhoogde uraniumconcentratie verwacht in de plantenstalen indien beide elementen in competitie treden ter hoogte van de calciumkanalen.

Volgende analyses worden uitgevoerd om een indicatie te krijgen van de hoeveelheid oxidatieve stress:

- De capaciteit van antioxidatieve enzymen. Van volgende enzymen worden de enzymcapaciteiten bepaald met behulp van spectrofotometrie: glutathion reductase (GR), superoxide dismutase (SOD), syringaldazine peroxidase (SPOD), guaiacol peroxidase (GPOD) en katalase (CAT). Deze enzymen zijn gerelateerd aan het antioxidatieve verdedigingsmechanisme om de concentratie van ROS te verlagen. Dit beperkt de schade aan plantencellen. Hoge activiteit van deze enzymen wijst mogelijk op grote hoeveelheid oxidatieve stress.
- Genexpressie met behulp van kwantitatieve real-time PCR (qPCR). Hiervoor wordt ribonucleïnezuur (RNA) eerst geëxtraheerd uit de blad- en wortelstalen en wordt de kwaliteit en kwantiteit van het RNA bepaald. Nadat het RNA via reverse transcriptase is omgezet in kopie-deoxyribonucleïnezuur (cDNA), worden geselecteerde genen via qPCR geamplificeerd, waarbij de amplificatie van het cDNA gevolgd wordt in functie van de tijd. Door de cyclus waarin een vooropgestelde drempelwaarde (Ct-waarde) bereikt wordt van de controleplanten te vergelijken met die van de blootstelde planten, wordt meer informatie verkregen over het stressniveau in de planten.





## 2 Literatuurstudie

---

In dit eindwerk wordt de rol van calciumtransporters in uraniumopname bij *Arabidopsis thaliana* planten bestudeerd. Uranium is een zwak radionuclide omwille van zijn kleine spijtbaarheid. Dit wordt gekenmerkt door een radioactieve vervalreeks waarbij  $\alpha$ -,  $\beta$ - en  $\gamma$ -deeltjes vrijkomen. Deze literatuurstudie start dan ook met de definiëring van radioactiviteit. Hierna worden de eigenschappen, het voorkomen en de effecten van uranium kort besproken. Eenmaal uranium door planten is opgenomen, ontstaat een verhoogde ROS-productie wat kan leiden tot oxidatieve stress in plantencellen. Het derde deel beschrijft de belangrijkste eigenschappen van ROS en de verdedigingsmechanismen van de planten tegen oxidatieve stress. Tot slot wordt in het vierde deel het verband tussen calcium en de metaal toxiciteit bij planten toegelicht.

### 2.1 Radioactiviteit

Atomen zijn de bouwsteen van alle materie. Ze bestaan uit een dichte kern omringd door een negatief geladen elektronenwolk die de scheikundige eigenschappen van het element bepaalt. De kern bevat zowel positief geladen protonen als neutraal geladen neutronen. De som van de protonen en neutronen is het massagetal ( $A$ ) van het atoom. Het atoomnummer ( $Z$ ) geeft het aantal protonen weer en bepaalt de naam van het element. Indien een atoom hetzelfde aantal protonen en elektronen, maar een verschillend aantal neutronen bevat, spreekt men van een isotoop. Wanneer de verhouding van het aantal protonen en neutronen uit evenwicht is, is de kern onstabiel wat resulteert in het uiteenvallen van de kern. Men spreekt in dit geval van een radioactieve kern waarbij het uiteenvallen van de kern wordt geassocieerd met het vrijgeven van stralingsenergie, het zogenaamde radioactief verval. Dit verval wordt gekenmerkt door een halveringstijd, i.e. de tijd waarin de helft van een radionuclide uiteenvalt. Gedurende een desintegratiereeks of radioactieve vervalreeks wordt stralingsenergie afgegeven. Er wordt onderscheid gemaakt in drie soorten stralingen namelijk alfa-, bèta- en gammastraling [12],[13].

Alfaverval wordt gekenmerkt door het vrijzetten van een  $\alpha$ -deeltje, bestaande uit twee protonen en twee neutronen, wat overeenkomt met een heliumkern (He). Bij het verlaten van een  $\alpha$ -deeltje uit een atoom ( $N$ ) verlaagt het atoomnummer met twee eenheden en het massagetal met vier eenheden (vergelijking (1)). Een  $\alpha$ -deeltje heeft een relatief grote energie-inhoud en is relatief zwaar en groot ten opzichte van een  $\beta$ - en  $\gamma$ -deeltje. Hierdoor heeft het een groot ioniserend vermogen. Dit wil zeggen dat wanneer een  $\alpha$ -deeltje wordt vrijgezet en het botst tegen elektronen van andere atomen het een deel van zijn energie hieraan zal afgeven waardoor een elektron van een atoom wordt weggeschoten. Wanneer het  $\alpha$ -deeltje al zijn energie heeft afgegeven, komt het tot stilstand. Een  $\alpha$ -deeltje dringt niet diep door in de materie en kan tegen gehouden worden door enkele centimeters lucht of een blad papier. Uitwendige bestraling aan  $\alpha$ -deeltjes houdt dus weinig risico's in. Eenmaal een  $\alpha$ -bron in een

organisme terecht komt, brengt het veel schade aan aangezien er dan veel energie op één plaats wordt afgegeven [12],[13].



Bij bètaverval verlaat een  $\beta$ -deeltje de kern. Dit kan een elektron ( $e^-$ ) of een positron ( $e^+$ ) zijn. Vergeleken met een  $\alpha$ -deeltje bevat het een kleinere massa en een kleinere lading. Hierdoor wordt een  $\beta$ -deeltje gekenmerkt door een groter doordringend vermogen dan een  $\alpha$ -deeltje. Desondanks het groter doordringend vermogen, kan een  $\beta$ -deeltje gestopt worden door enkele meters lucht, enkele centimeters water of een metalen plaatje van enkele millimeters dik. Omdat een  $\beta$ -deeltje ten gevolge van zijn groter doordringbaar vermogen schade veroorzaakt over een groter oppervlak, zal bij dezelfde energie-inhoud de schade per oppervlak kleiner zijn vergeleken met een  $\alpha$ -deeltje [12]. In vergelijking (2) bevat de kern van een atoom te veel neutronen ten opzichte van het aantal protonen. Hierdoor wordt een neutron omgezet naar een proton waarbij een elektron en een antineutrino ( $\bar{\nu}$ ) de kern verlaten. Dit heeft tot gevolg dat het atoomnummer met één eenheid stijgt, maar het massagetal gelijk blijft [13].



In vergelijking (3) bevat een atoom te weinig neutronen ten opzichte van het aantal protonen. Er wordt een proton omgezet in een neutron waardoor er een positron en een neutrino ( $\nu$ ) worden vrijgezet. Hierdoor daalt het atoomnummer na het verval met één eenheid terwijl het massagetal hetzelfde blijft [13].



Tot slot duidt gammaverval op het vrijkomen van een  $\gamma$ -deeltje, wat een energetisch deeltje is zonder elektrische lading, ook wel elektromagnetische straling genoemd. In vergelijking (4) vervalst een geëxciteerd atoom ( $N^*$ ). Er treedt geen verandering van atoomnummer of massagetal op aangezien er enkel energie onder de vorm van een foton wordt vrijgegeven. Hierdoor vervalst het atoom terug naar de grondtoestand. In tegenstelling tot  $\alpha$ - en  $\beta$ -deeltjes hebben een  $\gamma$ -deeltjes een zeer groot doordringbaar vermogen. Hierdoor kan het schade aanrichten over een groot volume.  $\Gamma$ -deeltjes worden slechts door een loden plaatje van enkele centimeters dik gestopt en kunnen doorheen organismen migreren [12],[13].



## 2.2 Uranium

### 2.2.1 Eigenschappen van uranium

Uranium (U) is één van de meest voorkomende zware metalen in de natuur. Het heeft een wit-zilveren kleur en is meer voorkomend dan zilver en goud [5]. Met een atoomgewicht van  $238.0289 \text{ g mol}^{-1}$  en een atoomnummer van 92 behoort het tot de groep van de metalen, meer bepaald tot de groep van de actiniden. Tot deze groep behoren atomen met een atoomnummer van 89 tot 103 die worden gekenmerkt door een radioactief verval. Alle elementen die hiertoe behoren zullen uiteindelijk vervallen naar lood. Actiniden complexeren gemakkelijk met mineralen en organische componenten in een waterige oplossing. Hierdoor eisen biologische eigenschappen zoals mobiliteit, biologische beschikbaarheid en toxiciteit de laatste jaren hun toenemende belangstelling op [6],[14],[15].

Uranium kan 4 valenties aannemen, i.e.  $\text{U}^{3+}$  (+III),  $\text{U}^{4+}$  (+VI),  $\text{UO}_2^+$  (+V) en  $\text{UO}_2^{2+}$  (+VI). De 3 meest voorkomende isotopen zijn  $^{238}\text{U}$  (99,27%),  $^{235}\text{U}$  (0,72%) en  $^{234}\text{U}$  (0,0055%) met een halfwaardetijd van respectievelijk  $4,47 \times 10^9$ ;  $7,04 \times 10^8$  en  $2,46 \times 10^5$  jaar. Omwille van zijn kleine splijtbaarheid en bijgevolg grote halfwaardetijd is uranium weinig radiotoxisch (slechts een specifieke activiteit van  $12436 \text{ Bq g}^{-1}$ ), maar brengt voornamelijk de chemische toxiciteit met zich mee [5], [15]–[17].

Figuur 1 geeft de radioactieve vervalreeks van uranium weer waarbij uranium-238 (met 92 protonen en 146 neutronen) een groot onstabiel atoom is. Indien bij het onstabiele uranium 2 protonen en 2 neutronen de kern verlaten onder de vorm van een  $\alpha$ -deeltje wordt het atoom stabiel. Hierdoor vervalt uranium-238 naar thorium-234 (bevat 90 protonen en 144 neutronen). Thorium-234 is op zijn beurt ook onstabiel waardoor het verder vervalt in protactinium-234 door hoogenergetische elektronen uit te zenden onder de vorm van een  $\beta$ -deeltjes (bèta-verval). Ook dit atoom is onstabiel en vervalt op zijn beurt totdat uiteindelijk een stabiel atoom, lood-206 wordt gevormd [12],[16].



Figuur 1: Radioactieve vervalreeks waarbij onstabiel uranium-238 vervalt tot uiteindelijk een stabiel lood-206 atoom. Gedurende deze desintegratiereeks worden zowel alfa-, bèta- als gammadeeltjes vrijgegeven die elk een ander doordringend vermogen hebben [18].

## 2.2.2 Voorkomen van uranium

Uranium is wereldwijd verspreid in de natuur met in de aardkorst een gemiddelde concentratie van  $2 \text{ mg kg}^{-1}$ . Lokaal kunnen uraniumconcentraties sterk verschillen afhankelijk van vb. het soort gesteente. In fosfaaterts, bruinkool en monazietzand worden verhoogde uraniumconcentraties waargenomen [5]. In België wordt een verhoogde concentratie waargenomen in de Ardennen ten gevolge van de natuurlijke geologische formatie [12]. Levende organismen komen voornamelijk in contact met uranium afkomstig uit de bodem, water, voedsel en de atmosfeer (Tabel 1) [19]. Naast het natuurlijk voorkomen van uranium, leiden antropogene activiteiten zoals mijnbouw voor fosfaten en zware metalen tot verhoogde uraniumblootstelling. Tot slot zorgt het produceren en testen van kernwapens voor een verhoogde uraniumconcentratie in de omgeving [5], [15]–[17]. Door contact met uranium in de omgeving zijn schadelijke gevolgen op organismen niet te onderschatten (zie 2.2.3).

Tabel 1: Natuurlijk voorkomen van uranium [19].

	Hoeveelheid	Eenheid
Gemiddelde concentratie	2	$\text{mg kg}^{-1}$
Bodem	0.1-2	$\text{mg kg}^{-1}$
Water	0.1-5	$\mu\text{g L}^{-1}$
Voedsel	0.01-2	$\mu\text{g kg}^{-1}$
Atmosfeer	0.01-0.2	$\text{ng m}^{-3}$

## 2.2.3 Opname en effect van uranium door organismen

### *Opname en effect op mens en dier*

Hoewel uranium een niet-essentieel element is, bevat het menselijk lichaam gemiddeld  $100 \mu\text{g}$  uranium. Dit is hoofdzakelijk afkomstig is van uraniumhoudende stofdeeltjes vanuit de atmosfeer, voedsel- en waterconsumptie of direct contact met uranium via wonden [20]. Uranium kent voornamelijk alfaverval, waardoor het door de huid wordt tegengehouden en plaatselijk schade kan veroorzaken. Hierdoor is externe blootstelling aan uranium van minder belang [12],[13]. Eenmaal uranium zich in het lichaam bevindt, kan het schade veroorzaken. Wanneer uranium via de longen wordt opgenomen, kunnen oplosbare partikels kleiner dan  $5 \mu\text{m}$  via de longalveoli de bloedbaan bereiken. Hierdoor kan schade over het hele lichaam worden aangericht. Minder oplosbare uraniumzouten en -oxides blijven voor enkele weken tot enkele jaren in de longen aanwezig waar ze plaatselijk schade kunnen veroorzaken. Uraniumopname via voedsel- en waterconsumptie ligt rond  $1,5 \mu\text{g dag}^{-1}$ . De hoofdzakelijke voedselbronnen zijn groenten, granen en zouten. Wanneer uranium in het bloed terecht komt, wordt 90% van het totaal opgenomen uranium binnen 24 uur via de urine uitgescheiden. De daaropvolgende weken wordt de overgrote meerderheid van het resterend uranium uitgescheiden zodat slechts een klein percentage in het lichaam aanwezig blijft. Dit resulteert in een tijdelijke accumulatie van uranium in de nieren wat schade aan de niertubuli kan veroorzaken. Aangezien uranium een lage specifieke activiteit heeft, is het zeer

onwaarschijnlijk dat blootstelling aan uranium gezondheidsrisico's zoals kanker veroorzaakt door radioactief verval. Op proefdieren werd aangetoond dat hoge dosissen uranium aanwezig moeten zijn om kankers zoals longkanker, botkanker, levertumoren of leukemie te veroorzaken [16]. Chemische toxiciteit veroorzaakt voornamelijk algemene gezondheidsproblemen zoals nier-, lever-, long- of hematopoëtische schade. Bij 50 % van de mannen leidt opname van 14 mg uranium per kilogram lichaamsgewicht tot de dood [5],[20].

### *Opname en effect op planten*

Net zoals voor mensen en dieren is uranium ook een niet-essentieel element voor planten. Toch wordt het gemakkelijk opgenomen door planten. De opname van wateroplosbaar uranium in de bodem gebeurt hoofdzakelijk via de wortels, en minder via de lucht [17]. Ten gevolge van een lage transfer van de wortels naar de bladeren, vindt er een significante uraniumaccumulatie plaats in de wortels [2], [6], [21], [22]. De opname van uranium is enerzijds afhankelijk van het type bodem en anderzijds van de capaciteit van de plant om biologisch beschikbare uranium te absorberen. De belangrijkste bodemparameters die een rol spelen bij de overdracht van radionucliden naar planten zijn de pH, de capaciteit van de bodem om kationen uit te wisselen en het gehalte aan organische stof in de bodem [17].

Planten nemen essentiële metalen op via kanalen en transporters die in de wortel aanwezig zijn. Omdat essentiële metalen in te hoge concentraties toxisch kunnen zijn, wordt de opname en distributie hiervan geregeld. Niet-essentiële elementen kunnen ook opgenomen worden via deze kanalen en transporters indien er chemische verwantschap is met essentiële nutriënten. De opgenomen metalen kunnen worden ingebouwd in de biomassa van planten. Zo kan uranium calcium en magnesium gaan vervangen wat kan leiden tot veranderingen in celmembranen en inactivatie van enzymen [17].

De laatste jaren is er al heel wat onderzoek verricht naar de toxische effecten van uranium op planten. Zo toonde Vanhoudt *et al.* (2008) aan dat 4 dagen blootstelling van *A. thaliana* planten aan 100  $\mu\text{M}$  uranium een verminderde groei van de bladeren en de wortels opleverde [2],[23]. Hiernaast is aangetoond dat uranium oxidatieve stress kan veroorzaken in planten wat leidt tot een verstoring van de cellulaire redoxbalans waarbij DNA-schade, necrose en apoptose kunnen optreden. Om de redoxbalans in evenwicht te houden resulteert dit in een verhoogde aanwezigheid van anti-oxidatieve verdedigingsmechanismen (zie 2.3.3) [24], [25], [26].

## 2.3 Oxidatieve stress

### 2.3.1 Algemeen

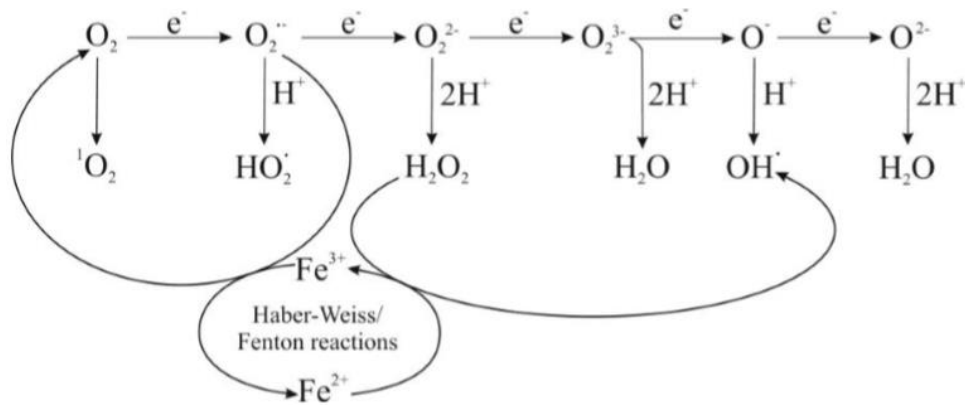
Levende organismen worden dagelijks blootgesteld aan biotische en abiotische stress zoals luchtverontreiniging, droogte, voedselschaarste, aanwezigheid van zware metalen etc. Deze stressfactoren induceren een verhoogde ROS-productie. De voornaamste celcompartimenten waarin ROS-productie plaatsvindt zijn de chloroplasten, mitochondriën en peroxisomen. Hiernaast treedt een verminderde ROS-productie op in andere celorganellen zoals het cytoplasma, endoplasmatisch reticulum, plasmamembranen en de apoplasten [10], [27], [28].

In normale metabole celprocessen worden ROS in lage concentraties als normaal bijproduct gesynthetiseerd in zo goed als alle celcompartimenten. Hierbij zijn ROS signaalmoleculen die een belangrijke rol spelen in de regulatie van de groei en ontwikkeling van plantencellen. Onder stresscondities kan er een onevenwicht ontstaan tussen de aanmaak en afbraak van ROS. Men spreekt dan van oxidatieve stress met een verhoogde aanwezigheid van ROS tot gevolg. ROS zijn cytotoxisch voor planten aangezien ze vrijwel alle macromoleculen, voornamelijk deze met dubbele bindingen, kunnen aanvallen. Dit kan DNA-schade, necrose en apoptose van plantencellen veroorzaken. Om deze schade te beperken hebben planten verdedigingsmechanismen ingebouwd (zie 2.3.3) [10], [29].

### 2.3.2 Biochemische eigenschappen van ROS

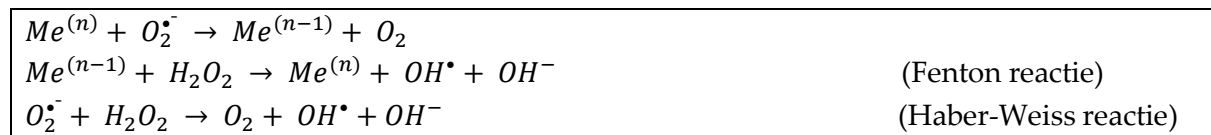
ROS ontstaan bij metabole processen door reductie van zuurstofgas ( $O_2$ ) naar water ( $H_2O$ ) (Figuur 2). Men vermoedt dat 1 à 2% van het opgenomen  $O_2$  wordt omgezet in ROS. Ze omvatten zowel radicaal- als niet-radicaalvormende zuurstofvormen. Belangrijke radicaalvormende ROS zijn het superoxideradicaal ( $O_2^{\bullet}$ ), hydroxylradicaal ( $OH^{\bullet}$ ) en hydroperoxideradicaal ( $HO_2^{\bullet}$ ). Belangrijke niet-radicaalvormende ROS zijn waterstofperoxide ( $H_2O_2$ ) en singlet zuurstof ( $^1O_2$ ).

In de aanwezigheid van  $Cu^+$  en  $Fe^{2+}$  kan  $H_2O_2$  worden omgezet door de Haber-Weiss en Fenton reactie naar  $OH^{\bullet}$  (Figuur 2). Vermits er geen verdedigingsmechanismen bestaan tegen dit radicaal, wordt de vorming ervan sterk gecontroleerd. Het  $OH^{\bullet}$  radicaal is één van de meest reactieve radicalen omdat het in staat is om radicale kettingreacties in gang te zetten, bestaande uit een initiatie-, propagatie- en terminatiefase. Hierdoor worden organische radicalen zoals vetzuurradicalen ( $R^{\bullet}$ ), alkoxyradicalen ( $RO^{\bullet}$ ), peroxyradicalen ( $ROO^{\bullet}$ ) en peroxiden ( $ROOR$ ) gevormd. De  $RO^{\bullet}$  zijn even schadelijk als  $OH^{\bullet}$  wat leidt tot een exponentiële toename van de schade [27], [28].



Figuur 2: Ontstaan van ROS bij metabole processen door reductie van zuurstofgas naar water [27].

O<sub>2</sub> wordt via reductie tijdens metabole processen omgezet in H<sub>2</sub>O. Tijdens deze omzetting worden er verschillende ROS geproduceerd. O<sub>2</sub> kan een elektron opnemen wat zorgt voor reductie van O<sub>2</sub> naar O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Vervolgens ontstaat een cascade aan reducties waarbij elke reductie wordt gekenmerkt door opname van een elektron. Deze reductie gaat door totdat het oxide ion (O<sup>2-</sup>) is gevormd. Dit O<sup>2-</sup> wordt bij lage pH geprotoneerd waardoor H<sub>2</sub>O ontstaat. Hiernaast kan bij lage pH protonering van de gevormde tussenproducten ontstaan waardoor H<sub>2</sub>O of ROS gevormd worden. In de aanwezigheid van metalen (vb. Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>+</sup>) kan de toxiciteit van O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versterkt worden door de tussenkomst van Haber-Weiss/Fenton reacties (Figuur 3) [27].



Figuur 3: Haber-Weiss en fentonreactie

### 2.3.3 Verdedigingsmechanismen van plantencellen: ROS-afbraak

Planten hebben verdedigingsmechanismen ingebouwd om zichzelf te beschermen tegen oxidatieve stress. De eerste verdedigingsmechanismen zijn het voorkomen dat ROS worden geproduceerd. Daarom streven planten naar systemen die een minimaal elektronentransport benutten. Daarnaast bezitten planten alternatieve oxidatieprocessen die ROS-productie voorkomen. Eenmaal ROS zijn aangemaakt, treden de tweede verdedigingsmechanismen in werking waarbij cellen de schade proberen te beperken. Er kan een stimulatie van genexpressie ontstaan, met een verhoogde productie van antioxidanta tot gevolg. Deze zorgen voor een verhoogde ROS-afbraak. De derde en laatste mechanismen bestaan uit het herstel van beschadigde weefsels [30].

Plantencellen bevatten een breed gamma enzymatische en niet-enzymatische antioxidantensystemen [27]. De belangrijkste enzymatische verdedigingsmechanismen in planten zijn deze van het superoxide dismutase (SOD), katalase (CAT) en ascorbaatperoxidase



(APX). Evenwicht tussen deze drie antioxidantia is van belang voor een steady-state van de ROS-concentratie [31]. Daarnaast spelen ook glutathion peroxidase (GPOD), glutathion reductase (GR), guaiacol peroxidase (GPOD) en syringaldazine peroxidase (SPOD) een belangrijk rol in het verwijderen van ROS. Tenslotte bevatten planten ook niet-enzymatische verdedigingsmechanismen waaronder ascorbinezuur (AsA) en glutathion (GSH) [3],[30].

### *Enzymatische verdedigingsmechanismen*

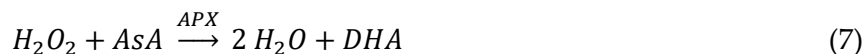
SOD is aanwezig in alle aerobe organismen waar het zorgt voor de eerstelijns verdedigingsmechanismen tegen ROS. Dit enzym katalyseert het wegvangen van twee  $O_2^{\bullet-}$  tot  $H_2O_2$  en  $O_2$  (vergelijking (5)). SOD behoort tot de klasse van de metallo-enzymen en wordt geklasseerd in verschillende iso-enzymen op basis van hun metaal cofactor, i.e. Fe-SOD, Mn-SOD en Cu/Zn-SOD. Deze iso-enzymen katalyseren dezelfde reactie maar zijn op verschillende locaties in de cel aanwezig [10], [27].



CAT komt voor bij alle aerobe eukaryoten en zorgt voor het enzymatisch verwijderen van 2  $H_2O_2$  moleculen door dit om te zetten in 2 moleculen  $H_2O$  en één molecule  $O_2$  (vergelijking (6)). CAT is een onmisbaar enzym voor de ROS-detoxificatie vanwege zijn hoge katalytische activiteit. CAT bevat een katalytische activiteit waarbij 6 miljoen moleculen  $H_2O_2$  per minuut worden omgezet in  $H_2O$  en  $O_2$ . In *Arabidopsis* zijn er 3 iso-vormen te onderscheiden, i.e. CAT-1, CAT-2 en CAT-3. Deze iso-enzymen worden verschillend tot expressie gebracht waardoor ze onafhankelijk van elkaar gereguleerd worden [10], [27].



Peroxidases zijn enzymen die  $H_2O_2$  verwijderen en hierbij een cosubstraat oxideren. Zo maakt APX gebruik van ascorbinezuur als een waterstofdonor om  $H_2O_2$  te reduceren naar 2 moleculen  $H_2O$  en dehydroascorbaat (DHA) (vergelijking (7)). APX heeft een hogere affiniteit voor  $H_2O_2$  dan CAT waardoor het een cruciale rol speelt in het scherpstellen van ROS-concentratie. Dit draagt bij in het ROS-beheer in stresscondities [10], [27].



GPOD maakt gebruik van GSH als elektronendonor voor de katalytische reactie waarbij  $H_2O_2$  wordt gereduceerd tot 2 moleculen  $H_2O$  ter vorming het geoxideerde glutathion (GSSG). GSSG bevat twee moleculen glutathion die via een disulfidebrug met elkaar zijn verbonden (vergelijking (8)) [10], [27].



GSSG kan op zijn beurt terug worden gereduceerd naar GSH door de katalytische reactie van GR (vergelijking (9)). Hierbij worden elektronen gebruikt die direct afkomstig zijn uit de fotosynthese of afkomstig van NAD(P)H [10], [27].

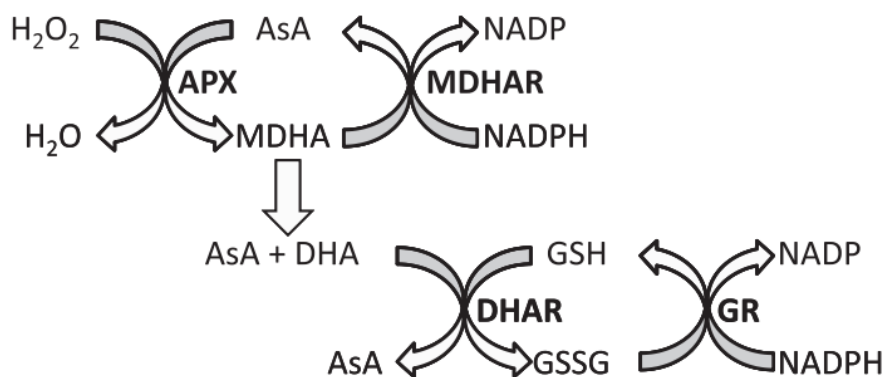


Andere peroxidasen zijn GPOD en SPOD. Dit zijn niet-specifieke-donor peroxidasen. Ze maken gebruik van meerdere aromatische elektronendonoren die zorgen voor de reductie van  $H_2O_2$  naar  $H_2O$ . Naast hun rol als katalysator bevindt de belangrijkste rol zich ter hoogte van de lignine-biosynthese (i.e. een celwandcomponent) en als verdedigingsmechanismen tegen pathogenen [10], [27].

### *Niet-enzymatische verdedigingsmechanismen*

Naast de enzymatische verdedigingsmechanismen zijn er ook niet-enzymatische verdedigingsmechanismen aanwezig in plantencellen die zorgen voor ROS-detoxificatie. AsA is het belangrijkste niet-enzymatische antioxidant aangezien het door zijn aromatische structuur veel elektronen kan afgeven. Naast zijn rol in de APX-reactie (vergelijking (7)) kan AsA ook direct reageren met  $O_2^{\bullet-}$ ,  $OH^{\bullet}$  en  $^1O_2$ . GSH zorgt voor de afbraak van  $H_2O_2$  en speelt een rol bij vele andere niet-enzymatische ROS-afbraakreacties [10], [27].

De centrale rol van GSH is echter de regeneratie van AsA via de ascorbaat-glutathion cyclus (Figuur 4) die van belang is bij de afbraak van  $H_2O_2$ . De cyclus treedt op in bijna alle cellen waarbij APX een hoge affiniteit heeft voor  $H_2O_2$ . Hierbij worden 2 moleculen ascorbaat gebruikt om  $H_2O_2$  weg te vangen, waarbij monodehydroascorbaat (MDHA) wordt gevormd. MDHA zal spontaan omgezet worden naar dehydroascorbaat (DHA). Vervolgens wordt GSH gebruikt om DHA te reduceren tot AsA via DHA-reductase (DHAR). Hier is dus de reductie naar AsA gekoppeld aan de oxidatie van GSH. Tenslotte kan GSSG gereduceerd worden tot GSH via GR [32].



Figuur 4: De ascorbaat-glutathion cyclus. Afkortingen: APX, ascorbaat peroxidase; AsA, ascorbinezuur; DHA, dehydroascorbaat; DHAR, dehydroascorbaat reductase; GSH, glutathione; GSSG, geoxideerd glutathione; GR, glutathione reductase; MDHA, monodehydroascorbaat; MDHAR, monodehydroascorbaat reductase; NADP, nicotinamideadeninedinucleotidofosfaat; NADPH, gereduceerd nicotinamideadeninedinucleotidofosfaat [33].

## 2.4 Calcium en metaaltoxiciteit

Calcium (Ca) is een essentieel element voor planten. Het is een belangrijk bestanddeel in de celwand en speelt een cruciale rol als intracellulaire boodschapper. Calcium wordt hoofdzakelijk via de wortels doorheen calciumkanalen opgenomen onder de vorm van het oplosbaar  $\text{Ca}^{2+}$ -kation. Calciumkanalen zijn permeabel voor meerdere tweewaardige ionen, waaronder  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  en  $\text{Mg}^{2+}$  [34], [35].

Studies hebben aangetoond dat een verhoogde calciumtoevoer zorgt voor een verhoogde afweer tegen stress ten gevolge van een activatie en/of regulatie van antioxidanta [29],[36]. He *et al.* (2004) toonde aan dat een verhoogde concentratie van  $\text{Ca}^{2+}$  of  $\text{La}^{3+}$  leidde tot een verbeterde cadmium-tolerantie in *L. sativa* [37]. Amor *et al.* (2009) toonde aan dat 20 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  toegevoegd aan zaden van *Cakile maritima*, zorgt voor een verhoogde enzymactiviteit van stress gerelateerde antioxidanta (SOD, POX, GR en DHAR). Dit heeft een verminderde ROS productie tot gevolg wat leidt tot een hogere zouttolerantie bij *Cakile maritima* [38]. Daarnaast toont Huang (2017) aan dat calcium een invloed heeft op cadmiumopname en -translocatie, waarbij zowel een hogere als lagere cadmiumopname gerapporteerd wordt, afhankelijk van de plantensoort [7].

Eerder onderzoek binnen BIS heeft aangetoond dat een verhoogde calciumconcentratie leidt tot minder toxische effecten van uranium op *Lemna minor* planten (Horemans *et al.*, persoonlijke communicatie). Dit kan mogelijks verklaard worden door competitie tussen calcium en uranium voor dezelfde transporters. Daarom wordt de uraniumopname in *A. thaliana* bestudeerd bij verschillende calciumconcentraties. Daarnaast toont onderzoek aan dat calciumkanalen geïnhibeerd kunnen worden door trivalente ionen zoals  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$  of  $\text{Al}^{3+}$  [31]. Daarom wordt de uraniumopname in een tweede fase van het project bestudeerd in de aan- en afwezigheid van  $\text{LaCl}_3$ . Hierdoor zal er meer inzicht verkregen worden in de uraniumopnamemechanismen door calciumkanalen.

## 3 Materiaal en methode

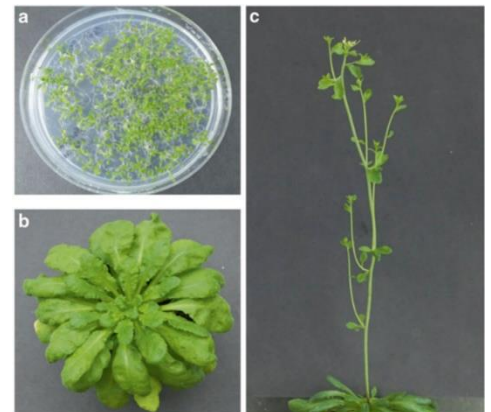
---

Dit hoofdstuk beschrijft de gebruikte materialen en methoden waarmee de experimenten zijn uitgevoerd. Het eerste deel behandelt de beschrijving van *Arabidopsis thaliana* en de opzet van de hydrocultuur. Vervolgens beschrijft het tweede deel de calcium- en uraniumbepaling. Daarnaast beschrijft het derde deel de materialen en methoden die nodig zijn om oxidatieve stress op moleculair niveau te bepalen. Voor deze bepaling wordt boodschapper-RNA (mRNA) eerst geëxtraheerd uit de cel, vervolgens wordt de kwaliteit en kwantiteit van dit geëxtraheerde mRNA bepaald. Hierna wordt mRNA opgezuiverd om contaminatie te voorkomen en wordt cDNA aangemaakt waarna tot slot via qPCR de expressie van de genen bepaald worden. Tot slot beschrijft het vierde deel hoe oxidatieve stress op biochemisch niveau wordt bepaald door de enzymcapaciteit van antioxidatieve enzymen te bepalen.

### 3.1 *Arabidopsis thaliana* hydrocultuur

#### 3.1.1 *Arabidopsis thaliana*

*Arabidopsis thaliana* of zandraket (Figuur 5) behoort tot de familie van de Brassicaceae (kruisbloemenfamilie). Het is een tweezaadlobbige modelplant voor de plantenbiologie. *A. thaliana* heeft een korte generatietijd ( $\pm 6$  weken) en is relatief gemakkelijk op te kweken. Hiernaast bevat het een klein (125 miljoen baseparen), volledig gesequeneerd en geannoteerd genoom wat moleculair onderzoek vergemakkelijkt [10],[11].



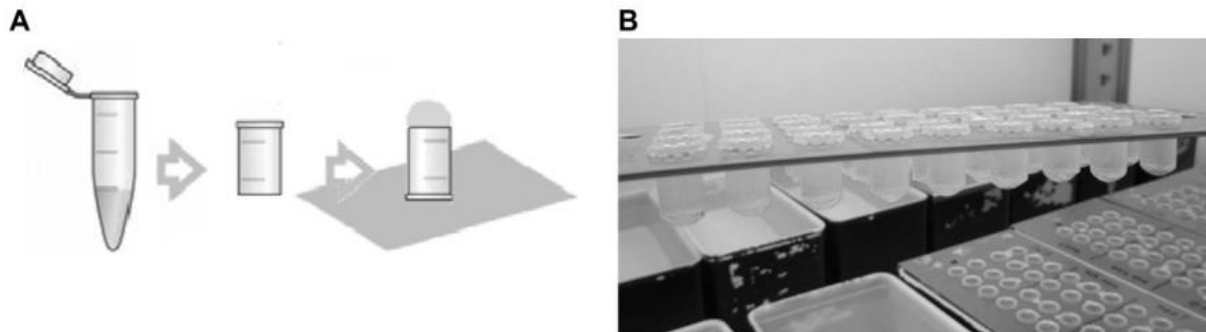
Figuur 5: (a) Een grote hoeveelheid *Arabidopsis* zaadjes groeiende op een klein oppervlak. (b) De rozet van een 4 weken oude *Arabidopsis* plant. (c) Een 5 weken oude *Arabidopsis* plant waarbij bloei waarneembaar is [11].

#### 3.1.2 Hydrocultuur

Tijdens de experimenten wordt *A. thaliana* gekweekt op hydrocultuur. Dit heeft als voordeel dat er een grote mate van controle is voor het opkweken van de planten wat leidt tot een goede herhaalbaarheid. Daarnaast zijn zowel de blaadjes als de wortels beschikbaar van de planten, waardoor de respons in beide delen bestudeerd kan worden.

### **Bereiding zaadbedden**

Voor het opgroeien van *A. thaliana* planten worden zaadbedden gemaakt. Deze bestaan uit 1,5 mL microtubes waarvan de bodem en dop werd afgeknipt. De microtubes worden gevuld met een Hoagland voedingsoplossing met een lage fosfaatconcentratie (LP) (Bijlage 1) waaraan 6 g L<sup>-1</sup> agar (Agar N°2) werd toegevoegd (Figuur 6 A). De Hoagland LP wordt gebruikt omdat uranium complexen kan vormen met de fosfaten waardoor de biobeschikbaarheid van uranium daalt. Wanneer de voedingsoplossing met agar gestold is, worden de zaadbedden in een deksel geplaatst waarbij er 36 microtubes per deksel geplaatst worden. Dit wordt nadien op de hydrocultuur container overgebracht die gevuld is met gedestilleerd water (Figuur 6 B).



Figuur 6: (A) Schematische voorstelling van het maken van zaadbedden. Van een 1,5 mL microtubes wordt de bodem en dop afgeknipt. De microtubes wordt op een papieren tape gefixeerd en met “een bubbel” gevuld met Hoagland LP die 0,6% agar bevat. (B) Een hydrocultuurbakje gevuld met gedestilleerd water waarop een deksel met zaadbedden wordt geplaatst [29].

### ***Arabidopsis thaliana* kweek**

Voordat *A. thaliana* zaden (Colombia ecotype) worden gezaaid, worden ze gedurende 3 dagen op vochtig filterpapier bij 4°C in een donkere kamer gezet. Bij de lage temperatuur gaan de zaden water opnemen waardoor ze homogener kiemen. Vervolgens worden er twee zaden per zaadbed aangebracht. Het geheel wordt in een klimaatkast (Microclima 1000E, Sniijders Scientific B.V.) geplaatst met 14u licht per dag (intensiteit van 150-170  $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ), dag/nachttemperatuur van 22°C/18°C en bij een constante vochtigheid van 65%. Na 1 week worden de planten uitgedund zodat de best gekiemde plant per zaadbed over blijft. Na 1 week wordt ook het gedestilleerd water vervangen door een Hoagland oplossing met 0,1 mM fosfaat (HP) (Bijlage 1). Deze Hoagland HP wordt elke 3 à 4 dagen ververs. Om de wortels van zuurstof te voorzien, wordt de voedingsoplossing belucht d.m.v. een peristaltische pomp.

Wanneer de planten 18 dagen oud zijn, worden ze 3 dagen blootgesteld aan hun stressfactor. In de eerste fase van het onderzoek is deze stressfactor 0, 25 en 50  $\mu\text{M}$  uranium ( $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (SPI chemicals, USA)) in combinatie met verschillende calciumconcentraties. De calciumconcentratie in Hoagland medium bedraagt 300  $\mu\text{M}$ . Deze wordt beschouwd als normale calciumconcentratie (aangeduid met N Ca). Vermits dit experiment een eerste test is om de invloed van calcium op de uraniumopname te bestuderen, werd ervoor gekozen om een calciumconcentratie van 10 maal lager en 10 maal hoger te gebruiken, dus respectievelijk 30  $\mu\text{M}$  (L Ca) en 3 mM (H Ca) calcium. In de tweede fase van het onderzoek is dat 0, 25 en 50  $\mu\text{M}$  uranium met 300  $\mu\text{M}$  calcium in combinatie 0 en 5 mM  $\text{LaCl}_3$ , i.e. een calciumkanaalinhibitor.

De besmetting vindt plaats door eerst de juiste hoeveelheid uranium in de hydrocultuurbakjes te pipetteren. Vervolgens wordt 1,35 L Hoagland LP toegevoegd (met L, N of H Ca-niveau) en wordt het geheel op pH 5,7 gebracht (i.e. pH van Hoagland LP met normale calciumconcentratie en 0  $\mu$ M U) met natriumhydroxide (NaOH) en HCl. Na 3 dagen blootstelling worden de blaadjes en wortels van *A. thaliana* geoogst, i.e. gewogen, ingevroren in vloeibare stikstof en bewaard bij -80°C voor verdere analyse. Ook worden er blad- en wortelstalen genomen voor de calcium- en uraniumbepaling.

## 3.2 Calcium- en uraniumbepaling

De uranium- en calciumconcentratie in de plantenstalen worden bepaald met inductief gekoppeld plasma massaspectrometrie (ICP-MS). Om calcium en uranium uitwendig te verwijderen, worden de wortels tweemaal gewassen gedurende 10 minuten in 0,1 N Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> en nadien éénmaal gedurende 10 minuten in gedestilleerd water. Daarna worden de blad- en wortelstalen gewogen en gedurende minimaal 1 week op 70°C gedroogd in een droogoven (Memmert). De gedroogde stalen worden gecalcineerd in een moffeloven (Carbolite Eurotherm 2416CC) op 550°C. Na afkoeling tot kamertemperatuur wordt het plantenmateriaal opgelost in 1 mL 1 M HCl (VWR) en vervolgens tienmaal verdund met gedestilleerd water. Na filtratie door een 0,45  $\mu$ m filter (Acrosdisc® Syringe filter) worden de calcium- en uraniumconcentraties (U-238) bepaald in een extern labo (KU Leuven, bodem- en waterbeheer) met behulp van ICP-MS. Op basis van de uranium- en calciumconcentraties in de wortels en blaadjes worden transferfactoren berekend. De transferfactor wordt berekend door de concentratie in de blaadjes te delen door de concentratie in de wortels en wordt gedefinieerd als de hoeveelheid van het element dat via de wortels naar de blaadjes wordt getransporteerd.

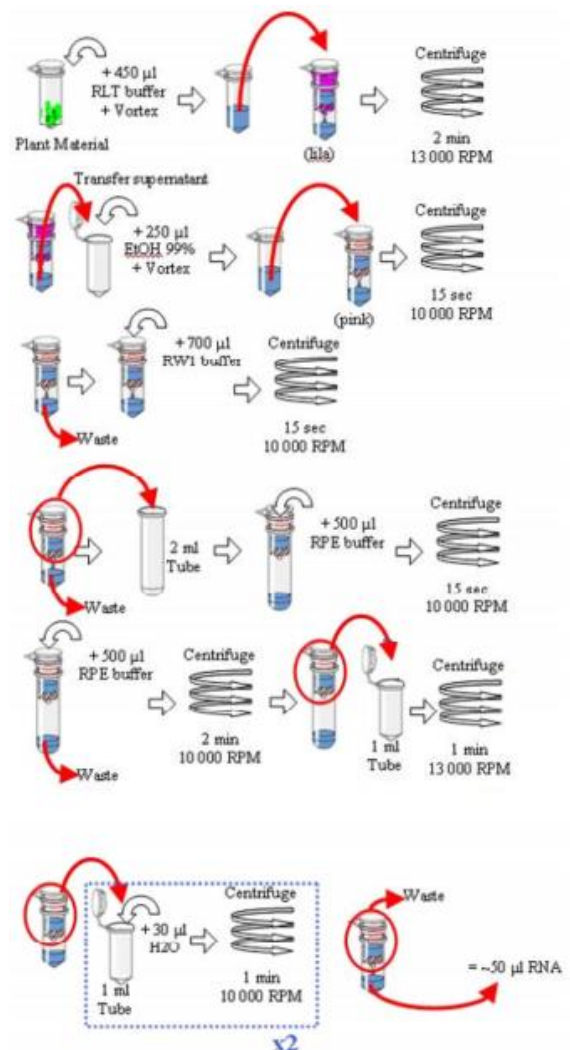
## 3.3 Genexpressie

Op de blad- en wortelstalen van *A. thaliana* wordt de genexpressie geanalyseerd met behulp van qPCR. Via genexpressie wordt de mate waarmee het DNA van een gen wordt gekopieerd naar mRNA) bepaald (i.e. transcriptie). Hiervoor wordt RNA eerst geëxtraheerd uit de blad- en wortelstalen en wordt de kwaliteit en kwantiteit van het RNA bepaald. Nadat het RNA via reverse transcriptase is omgezet in cDNA, worden geselecteerde genen (Tabel 2) via qPCR geamplificeerd, waarbij de amplificatie van het cDNA wordt gevolgd in functie van de tijd. Door het cyclusnummer waarin een vooropgestelde drempelwaarde bereikt wordt (Ct-waarde) van de controleplanten (niet-blootgestelde planten) te vergelijken met die van de blootgestelde planten, kan de expressie van de genen bestudeerd worden. Dit geeft meer informatie over het stressniveau in de planten.

### 3.3.1 RNA-extractie

Aan diepgevroren blad- en wortelstalen worden enkele chroomstalen balletjes (2 mm diameter, Zirconia) toegevoegd. Vervolgens worden de stalen in een vooraf op stikstof gekoelde adaptor gezet waarna de adaptors in de vermaalmolen (Retsch MM 400) worden geplaatst en het plantenstaal wordt vermalen (3,5 min., 30 Hertz) [39].

Het RNA wordt geëxtraheerd met behulp van de RNeasy minikit (Qiagen). Zoals schematisch weergegeven in Figuur 7 wordt aan het vermalen en diepgevroren staal 450  $\mu$ L RLT-buffer toegevoegd en wordt er gemixt (IKA Vortex 1). Hierdoor worden de aanwezige RNasen gedeactiveerd. De vloeistof wordt overgebracht op de lila filter. Tijdens centrifugatie (2 min., 13000 rpm) worden de aanwezige componenten door de ruwe structuur van de filter extra verkleind. Het supernatant wordt overgebracht in een 1,5 mL microtube gevuld met 250  $\mu$ L 99% ethanol (Sigma). Dit zorgt ervoor dat er goede bindingsomstandigheden gecreëerd worden waardoor het RNA in de volgende stap met een hogere affiniteit bindt met de filter. Na mixen wordt het geheel overgebracht op de roze harsfilter. Door centrifugatie (15 s, 10 000 rpm) zal RNA binden op de filter en worden onzuiverheden weggevoerd met behulp van RW1-buffer en tweemaal met RPE-buffer. Om de laatste onzuiverheden te verwijderen, wordt er gecentrifugeerd (1 min., 13 000 rpm) zonder buffer. Tenslotte wordt het RNA van de filter geëluëerd door 60  $\mu$ L RNase vrij water op de roze filter te pipetteren gevolgd door centrifugatie (1 min. 10 000 rpm). Het geëxtraheerde RNA wordt bewaard bij -80 °C om RNA-degradatie te vermijden [40].



Figuur 7: Schematische voorstelling voor een RNA-extractie met behulp van RNeasy minikit

### 3.3.2 RNA-kwantiteit en -kwaliteit

De RNA-concentratie wordt bepaald met behulp van de Nanodrop® ND-1000 Spectrofotometer (Isogen Life Science). RNA wordt gemeten bij een golflengte van 260 nm. Eerst wordt de intensiteit van een blanco gemeten (i.e. RNase vrij water) als referentie. Vervolgens wordt de intensiteit van 1 µL RNA-extract gemeten waarna de concentratie wordt bepaald. Om tot de concentratie van het staal te komen wordt eerst de absorbantie van het staal berekend. Dit wordt berekend door de lichtintensiteit van de blanco in verband te brengen met deze van het staal volgens vergelijking (10) [41].

$$Absorbantie = -\log\left(\frac{Intensiteit_{staal}}{Intensiteit_{blanco}}\right) \quad (10)$$

Wanneer de absorbantie van het staal gekend is, kan via de wet van Lambert-Beer de staalconcentratie bepaald worden via vergelijking (11). Hierbij is  $\epsilon$  de extinctiecoëfficiënt in  $L \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (i.e. een golflengteafhankelijke molaire absorptiecoëfficiënt),  $b$  de afgelegde weg in cm en  $c$  de concentratie in molariteit [41].

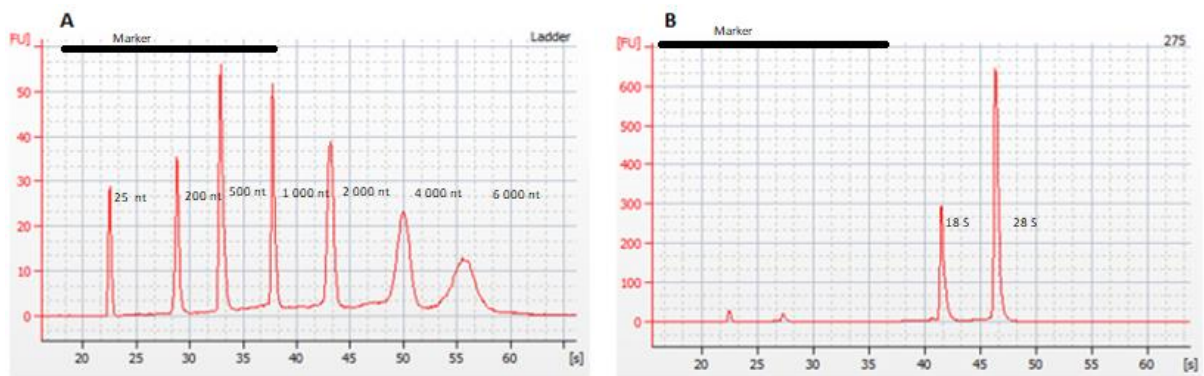
$$Absorbantie = \epsilon \times b \times c \quad (11)$$

Ook de zuiverheid van het RNA-staal wordt via spectrofotometrie (Nanodrop® ND-1000 Spectrofotometer, Isogen Life Science) bepaald. Dit door de absorptieverhouding 260/280 en 260/230 te bepalen. Contaminanten zoals eiwitten absorberen bij een golflengte van 280 nm terwijl suikers absorberen bij een golflengte van 230 nm. Onzuiverheden zoals fenolen absorberen bij beide golflengtes. Bij een ratio van respectievelijk 2,0 en 1,8 wordt het RNA als zuiver beschouwd [42].

De RNA-integriteit wordt bepaald aan de hand van on-chip gelelektroforese (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies). Hierbij wordt een RNA-staal en een RNA-ladder gedurende 2 minuten op 70°C verwarmd waardoor de aanwezige dubbelstrengs RNA-lussen eruit worden gehaald en enkelstrengs, lineair RNA ontstaat. Vervolgens wordt de chip voorbereid door 9 µL RNA 6000 Nano gel-dye mix en 5 µL RNA 6000 marker in de daarvoor voorziene wellletjes te pipetteren. Tenslotte wordt 1 µL RNA-ladder of RNA-staal aangebracht. Het programma wordt gerund waardoor elektroforese plaatsvindt en de RNA-fragmenten worden gescheiden op basis van hun grootte [39].

Het RNA-integriteitsnummer (RIN) geeft de integriteit van het RNA weer. Een goede RNA-integriteit wordt gekenmerkt door een RIN-waarde  $\geq 7,0$ . Hiervoor wordt het elektroferogram van het staal vergeleken met dat van de RNA-ladder. Een voorbeeld hiervan wordt in Figuur 8 weergegeven.

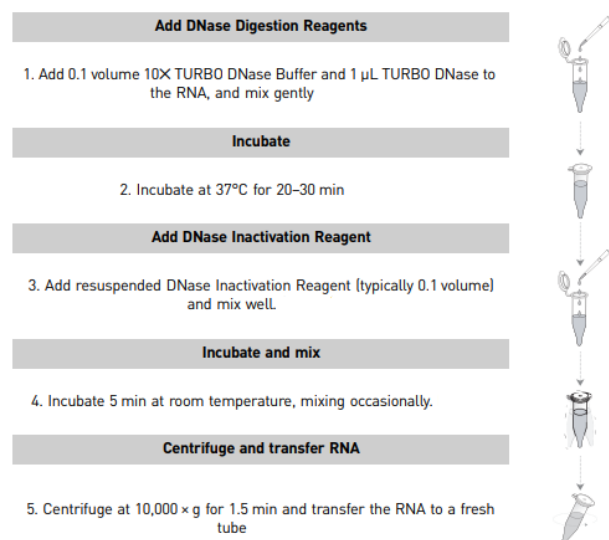




Figuur 8: (A) Een elektroferogram van een RNA-ladder waarin de verschillende pieken overeenkomen met verschillende lengtes RNA. (B) Een elektroferogram van een succesvol gerund plantenstaal waarin de twee grote pieken het ribosomaal RNA van respectievelijk 18 S en 28 S voorstellen.

### 3.3.3 RNA-opzuivering en cDNA-aanmaak

Om contaminatie tijdens de Real-Time PCR-reacties te vermijden, wordt het genomisch DNA verwijderd met behulp van een TURBO DNA-free™ Kit. Figuur 9 is hiervan een schematische weergave. Er wordt 5  $\mu$ L turbo DNase buffer en 1  $\mu$ L TURBO DNase aan 50  $\mu$ l staal dat 1  $\mu$ g RNA bevat toegevoegd. Er wordt gemixt, gespind en vervolgens 20-30 minuten op 37°C geïncubeerd. Tijdens de incubatie zorgt het enzym DNase voor DNA-degradatie. Na incubatie wordt 5  $\mu$ L DNase inactivatie-reagens toegevoegd en gemixt. Dit wordt gevolgd door 5 minuten incubatie waardoor het DNase enzymatisch wordt gedeactiveerd. Tot slot wordt gecentrifugeerd (1,5 min., 10 000 g) waardoor het DNA neerslaat. Het supernatant wordt verder gebruikt om cDNA aan te maken [43].



Figuur 9: Schematische voorstelling van RNA-opzuivering met behulp van TURBO DNA-free™ Kit [43].

cDNA wordt aangemaakt met behulp van een PrimeScript™ RT reagent kit. Hiervoor wordt een reactiemengsel gemaakt, bestaande uit 1  $\mu$ g RNA, 4  $\mu$ L 5X PrimeScript Buffer, 1  $\mu$ L PrimeScript RT Enzyme Mix I, 1  $\mu$ L Oligo dT Primer, 1  $\mu$ L Random 6 mers aangevuld tot 20  $\mu$ L met RNase vrij water. Via één PCR-reactie (15 minuten op 37 °C (reverse transcriptase), 5 seconden op 84 °C (inactivatie van reverse transcriptase door hittebehandeling in combinatie met degradatie mRNA) en afkoeling en bewaring bij 4 °C (stabilisatie)) wordt het cDNA bekomen. Dit cDNA wordt 6 maal verdund met DNase vrij water en bewaard op 4°C totdat de qPCR reacties wordt uitgevoerd. (zie 3.3.4) [44].

### 3.3.4 Real-Time PCR (qPCR)

Tijdens de qPCR-reactie kan de amplificatie van het cDNA gevolgd worden in functie van de tijd. Hiervoor wordt gebruikt gemaakt van Fast SYBR Green. Dit is een kleurstof die intercaleert in dubbelstrengs DNA. Door op het einde van elke cyclus de hoeveelheid fluorescentie te meten, kan de hoeveelheid geamplificeerd materiaal gevolgd worden. Hiervoor wordt eerst een master mix bereidt, bestaande uit 5  $\mu$ L Fast SYBR Green PCR MasterMix (Applied Biosystems), 0,3  $\mu$ L 10  $\mu$ M Forward Primer, 0,3  $\mu$ L 10  $\mu$ M Reverse Primer en 1,9  $\mu$ L RNase vrij water per staal. Hieraan wordt 2,5  $\mu$ L (< 250 ng) cDNA toegevoegd. Dit gebeurt met behulp van een automatische robot die vloeistoffen pipetteert (Qiagen QIAgility). Na pipetteren wordt de plaat afgedekt met een plasticen cover (Qiagen rotor-disc®) en in het PCR-toestel geplaatst (Qiagen rotor gene). Vervolgens worden de stalen 15 minuten verwarmd tot 95°C waardoor het Taq-polymerase wordt geactiveerd en er een initiële denaturatie plaatsvindt. Hierna worden er 40 cycli doorlopen (15 seconden op 94°C wat zorgt voor DNA-denaturatie, 30 seconden op 50-60°C waardoor de op voorhand geselecteerde primers (Tabel 2) zich vasthechten aan het ssDNA (annealing), 30 seconden op 72°C waardoor Taq-polymerase bindt, gevolgd door de aanmaak van de complementaire DNA-streng (elongatie)). Na afloop wordt een smeltcurve aangemaakt waardoor de specificiteit van de PCR wordt bepaald.

Er worden verschillende genen bestudeerd. OX-genen is een verzamelnaam voor genen die tot expressie worden gebracht wanneer planten onderhevig zijn aan oxidatieve stress, en kunnen dus beschouwd worden als merkers van oxidatieve stress [33]. GSH-genen zijn verantwoordelijk voor de GSH-biosynthese in plantencellen (zie 2.3). De hiervoor gebruikte primer staan vermeld in Tabel 2. Daarnaast worden referentiegenen gebruikt voor normalisatie (Tabel 2). Genexpressie wordt berekend aan de hand van de  $2^{-\Delta Ct}$ -methode zoals beschreven volgens Livak *et al.* en relatief uitgedrukt t.o.v. de expressie in controleplanten (niet-blootgestelde planten) [45].

Tabel 2: Sequentie van forward en reverse primers die gebruikt worden bij genexpressie.

Locus	Gen	Forward primer	Reverse Primer
<b>Referentiegenen</b>			
At4G05320	Polyubiquitin 10	GGCCTTCTATAATCCCTAGTAGAATAAG	AAAGAGATAACAGGAACGGAAACATAGT
At2G28390	SAND family protein	AACTCTATGCAGCATTGATCCACT	TGATTGCATATCTTTATCGCCATC
At5g25760	Ubiquitin conjugaat enzym	CTGCGACTCAGGGAATCTTCTAA	TTGTGCCATTGAATTGAACCC
At5g08290	Mitosis protein YLS8	TTACTGTTTCGGTTGTTCTCCATTT	CACTGAATCATGTTCGAAGCAAGT

Locus	Gen	Forward primer	Reverse Primer
<b>Stress gerelateerde genen</b>			
At2G21640	OX1: mitochondrial oxidative stress marker UPOX	GACTTGTTTCAAAAACACCATGGAC	CACTTCCTTAGCCTCAATTTGCTTC
At2G43510	OX2: defensin-like protein, marker transcript oxidative stress	ATGGCAAAGGCTATCGTTTCC	CGTTACCTTGCCTTCTATCTCC
At1G19020	OX3: unknown protein, marker transcript oxidative stress	GAAAATGGGACAAGGGTTAGACAAA	CCCAACGAAAACCAATAGCAGA
At1G05340	OX4: unknown protein, marker transcript oxidative stress	TCGGTAGCTCAGGGTAAAGTGG	CCAGGGCACAACAGCAACA
At1G57630	OX5: TIR, marker transcript oxidative stress	ACTCAAACAGGCGATCAAAGGA	CACCAATTCGTCAAGACAACACC
At4g23100	GSH1: Glutamaat-cysteine ligase	CCCTGGTGAAGTGCCTTCA	CATCAGCACCTCTCATCTCCA
At5g27380	GSH2: Glutathione synthetase 2	GGACTCGTCGTTGGTGACAA	TCTGGGAATGCAGTTGGTAGC

## 3.4 Bepaling enzymcapaciteit

### 3.4.1 Algemeen

De capaciteit (i.e. de hoeveelheid substraat die wordt omgezet in product per tijdseenheid en per massa versgewicht) van antioxidatieve enzymen wordt bepaald met behulp van spectrofotometrie. De enzymcapaciteiten van katalase, guaiacol peroxidase, syringaldazine proxidase, superoxide dismutase en glutathion reductase worden bepaald. Vervolgens worden de enzymcapaciteiten van de blootgestelde planten vergeleken met deze van de controleplanten.

Om de enzymcapaciteit te berekenen wordt de absorbantie van het reactiemengsel bepaald aan de hand van vergelijking (12). Uitgaande van de absorbantie in functie van de tijd kan de enzymcapaciteit berekend worden via vergelijking (13), met uitzondering van SOD (zie 3.4.2).

$$\text{Absorbantie} = -\log\left(\frac{\text{Intensiteit}_{\text{doorlatend licht}}}{\text{Intensiteit}_{\text{invalend licht}}}\right) \quad (12)$$

$$\text{Enzymcapaciteit (U/g)} = \frac{\Delta A}{\Delta t} \frac{V_c}{\varepsilon} \frac{V_b}{d} \frac{1}{V_e} \frac{1}{m} \quad (13)$$

Met:

U = hoeveelheid substraat dat per tijdseenheid weg reageert ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ )

$\Delta A$  = verschil in absorbantie in functie van de reactietijd

$\Delta t$  = reactietijd (s)

$\varepsilon$  = millimolaire extinctiecoëfficiënt ( $\text{L mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ).

d = afgelegde weg (cm)

$V_b$  = extractie buffer volume (mL)

$V_c$  = reactie volume (mL)

$V_e$  = extract volume (mL)

m = massa vers staal (g)

### 3.4.2 Analyse enzymcapaciteit

#### *Extractie*

Aan de ingevroren bladstalen wordt een spatelpunt polyvinylpyrrolidone (PVP40, Sigma) toegevoegd. Polyvinylpyrrolidone bindt met aanwezige polyfenolen. Dit verhindert dat polyfenolen binden met eiwitten waardoor ze worden gedeactiveerd. Vervolgens worden er

enkele chroomstalen balletjes met een diameter van 2 mm (Zirconia) toegevoegd. Het bladstaal wordt in een vooraf op stikstof gekoelde adaptor geplaatst waarna de adaptors in de vermaalmolen (Retsch MM 400) worden geplaatst en de bladstalen worden vermalen (3,5 min., 30 Hertz) [46]. Aan de vermalen bladstalen wordt 1,5 mL extractiebuffer met pH 7,8 (0,1 M Tris(hydroxymetyl)-aminoethane (TRIS) (Sigma); 1 mM *disodium salt dehydrate* (Na<sub>2</sub>-EDTA) (Sigma); 1 mM 1,4-dithiothreitol (Sigma)) toegevoegd waarna onmiddellijk wordt gehomogeniseerd (Ika Vortex 1) en gecentrifugeerd (10 min., 13 000 rpm en 4 °C, Eppendorf 5415R met F45-24-11 rotor). Het supernatant wordt overgepipetteerd in een 2 mL microtube (Eppendorf; Safe-lock, RNase/DNase vrij) en onmiddellijk bewaard op ijs waarna de stalen klaar zijn voor spectrofotometrische bepaling waardoor de absorbantie in functie van de tijd wordt bepaald [46].

### **CAT (katalase; EC 1.11.1.6)**

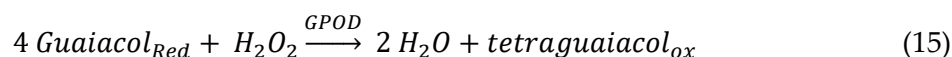
Het enzym CAT katalyseert de omzetting van 2 moleculen waterstofperoxide in 2 moleculen water en één molecule zuurstofgas (vergelijking (14)).



Voor de bepaling van de enzymcapaciteit van CAT wordt 10 µL plantenextract samen met 190 µL CAT H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> buffer (100 µL 35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma) in 20 ml 0,1 M fosfaatbuffer (pH 7,0)) in een 96-well ultraviolet-plaat (UV-plaat) (Greiner Bio One) gebracht. De afname van H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wordt berekend door de absorbantie per tijdseenheid spectrofotometrisch te bepalen bij een golflengte van 240 nm (BioTek PowerWave HT met Gen 5 software). Vervolgens kan aan de hand van vergelijking (13) de capaciteit berekend worden [46].

### **GPOD (Guaiacol peroxidase; EC 1.11.1.7)**

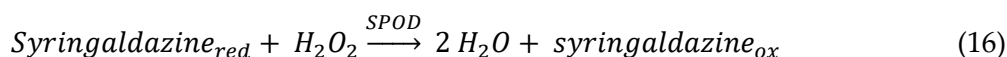
Het enzym GPOD katalyseert de reactie van 4 moleculen guaiacol met één molecule waterstofperoxide tot 2 moleculen water en één molecule tetraguaiacol (vergelijking (15)). GPOD is een niet-specifiek peroxidase met guaiacol als gemeenschappelijke aromatische elektronendonator. De toename van tetraguaiacol wordt berekend door de absorbantie per tijdseenheid spectrofotometrisch te bepalen. Volgens vergelijking (13) kan de capaciteit berekend worden.



Voor de bepaling van de enzymcapaciteit van GPOD wordt 140 µL van een 0,1 M fosfaatbuffer (pH 7,0) samen met 10 µL plantenextract en 50 µL guaiacol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> MasterMix (1:1 ratio van 90 mM guaiacol (Sigma) met 8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma)) in een 96-well plaat (Greiner Bio One) gepipetteerd. De absorbantie wordt spectrofotometrisch bepaald in functie van de tijd bij een golflengte van 436 nm (BioTek PowerWave HT met Gen 5 software) [46].

### **SPOD (Syringaldazine peroxidase; EC 1.11.1.7)**

Het enzym SPOD katalyseert de reactie van één molecule syringaldazine met één molecule waterstofperoxide tot twee moleculen water en één molecule syringaldazine in geoxideerde vorm (vergelijking (16)). SPOD is een niet-specifiek peroxidase met syringaldazine als gemeenschappelijke aromatische elektronendonor. De toename van syringaldazine<sub>ox</sub> wordt per tijdseenheid spectrofotometrisch bepaald. Volgens vergelijking (13) kan de capaciteit berekend worden.

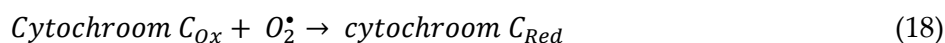
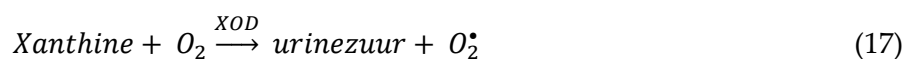


De capaciteit voor SPOD wordt bepaald door 155 µL van een 0,1M TRIS-buffer (pH 7,5, Sigma) samen met 20 µL 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma), 20 µL plantenextract en 5 µM syringaldazine (3,6 mg syringaldazine (Sigma) in 1 mL methanol (Merck) en 2 mL dioxane (Sigma)) in een 96-well UV-plaat (Greiner Bio One) te pipetteren. De absorbantie wordt spectrofotometrisch bepaald in functie van de tijd bij een golflengte van 530 nm (BioTek PowerWave HT met Gen 5 software) [46].

### **SOD (Superoxide Dismutase; EC 1.15.1.1)**

De capaciteitsbepaling van SOD is gebaseerd op de inhibitie van cytochroom C, waarbij gebruik wordt gemaakt van een blanco. In de blanco zal de aanwezigheid van xanthine, zuurstofgas en xanthine oxidase (XOD) leiden tot de productie van het superoxideradicaal (vergelijking (17)). Het gevormde superoxideradicaal veroorzaakt een reductie van cytochroom C (vergelijking (18)). Deze reacties treden ook op in aanwezigheid van het plantenstaal. Maar hier zal het superoxideradicaal ook door SOD omgezet worden in zuurstofgas en waterstofperoxide (vergelijking (19)). Er ontstaat dus een herverdeling van de superoxideradicalen wat resulteert in een verminderde reductie van cytochroom C (inhibitie van vergelijking (18)). Door de absorbantie van cytochroom C<sub>red</sub> in functie van de tijd spectrofotometrisch te bepalen, kan de SOD-capaciteit berekend worden.

Blanco:



Staal:



Vergelijking (20) berekent de relatieve inhibitie (%) van de reductie van cytochroom C (inhibitie van vergelijking (18)). Hierbij stelt  $(\Delta A/\Delta t)$  de richtingscoëfficiënt van de door het enzym geïnduceerde absorptieverandering ( $\text{min}^{-1}$ ) van de blanco en het staal voor.

$$\% \text{ inhibitie} = \frac{\left(\frac{\Delta A}{\Delta t}\right)_{\text{blanco}} - \left(\frac{\Delta A}{\Delta t}\right)_{\text{staal}}}{\left(\frac{\Delta A}{\Delta t}\right)_{\text{blanco}}} \times 100\% \quad (20)$$

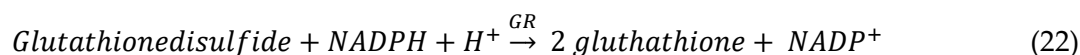
Eén eenheid (unit) SOD remt de snelheid van de reductie van cytochroom C met 50 % in een gekoppeld systeem met behulp van xanthine en XOD bij pH 7,8 en 25°C. Rekening houdende met het extractievolume in mL ( $V_e$ ), volume van de extractiebuffer in mL ( $V_b$ ) en de massa van het vers gewicht van het staal wordt vergelijking (21) bekomen waaruit de SOD-capaciteit berekend wordt.

$$\text{SOD} - \text{capaciteit} (U/g) = \frac{\% \text{ inhibitie}}{50 \%} \times \frac{V_b}{v_e m} \quad (21)$$

Voor de capaciteitsbepaling van SOD wordt 5  $\mu\text{L}$  XOD toegevoegd aan 10  $\mu\text{L}$  fosfaatbuffer (pH 7,8, Fluka), 5  $\mu\text{L}$  plantenextract, 130  $\mu\text{L}$  50 mM fosfaatbuffer (pH 7,8, Fluka) en 60  $\mu\text{L}$  SOD MasterMix. Deze mastermix bestaat uit een 1:1:1 verhouding van EDTA (Sigma) in fosfaatbuffer, pH 7,8), xanthine (Sigma) en cytochroom C (Cytochrome C from horse heart  $\geq 95\%$ ; Sigma). De absorbantie van cytochroom C wordt gemeten ten opzichte van een blanco. Voor de blanco wordt 5  $\mu\text{L}$  XOD toegevoegd aan 135  $\mu\text{L}$  fosfaatbuffer en 60  $\mu\text{L}$  SOD MasterMix. Er wordt gewerkt in een 96-well plaat (Greiner Bio One). De absorbantie wordt gemeten in functie van de tijd bij een golflengte van 550 nm (BioTek PowerWave HT met Gen 5 software) [46].

### **GR (Glutathione Reductase; EC 1.8.1.7)**

Het enzym GR katalyseert de omzetting van één molecule glutathionedisulfide en één molecule NADPH +  $\text{H}^+$  in 2 moleculen glutathione en één molecule NADP<sup>+</sup> (vergelijking (22)). De afname van glutathionedisulfide wordt per tijdseenheid spectrofotometrisch bepaald. Volgens vergelijking (13) kan de capaciteit berekend worden.



De capaciteit voor GR wordt bepaald door 165  $\mu\text{L}$  van een 0,1 M, pH 8 TRIS-buffer (Sigma) samen met 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA (Sigma), 7  $\mu\text{M}$  GR MasterMix (1:1 verhouding van 82 mM L-glutathione (Sigma) met 6 mM NADPH (Sigma)) en 28  $\mu\text{L}$  plantenextract te pipetteren in een 96-well UV-plaat (Greiner Bio One). De absorbantie wordt bepaald in functie van de tijd bij een golflengte van 340 nm (BioTek PowerWave HT met Gen 5 software) [46].

## 3.5 Statistische analyse

Alle resultaten worden via een Grubbs-test statistisch gecontroleerd op uitschieters (GraphPad Software) ( $p < 0.05$ ). Uitschieters worden niet meegenomen in verdere resultaatberekening. De statistische analyse wordt vervolgens uitgevoerd met het programma R (versie 3.5.0). Eerst wordt de data gecontroleerd op normale verdeling (Shapiro-test (1)) en gelijke verdeling van variantie (Bartlett-test (2)). Bij deze testen is de nulhypothese dat (1) data normaal verdeeld zijn en (2) de varianties gelijk verdeeld zijn. Indien niet aan deze nulhypothese wordt voldaan ( $p$ -waarde  $> 0,05$ ), worden transformaties uitgevoerd op de data ( $\log(x)$ ,  $(x)^{1/2}$ ,  $1/(x)$  en  $\exp(x)$ ) waarbij opnieuw de normaliteit en gelijkheid van variantie getest wordt. Indien voldaan wordt aan de normale verdeling en gelijkheid van varianties wordt een significant verschil tussen de resultaten onderzocht met een twee-weg analyse van variantie (ANOVA) test. Indien er een significant verschil is, wordt een post-hoc TukeyHSD-test uitgevoerd om na te gaan welke condities onderling significant verschillend zijn. Een verschil is significant wanneer de  $p$ -waarde kleiner is dan  $0,05$ .





## 4 Resultaten

---

Dit hoofdstuk beschrijft de resultaten die werden bekomen tijdens de experimenten. Het eerste deel behandelt de resultaten van de uraniumblootstelling bij verschillende calciumconcentraties. Hierbij worden de effecten op de groei, de opname en translocatie van uranium en calcium en de oxidatieve stressrespons besproken. Vervolgens behandelt het tweede deel de resultaten van de uraniumblootstelling bij aan- en afwezigheid van lanthaan(III)chloride waarbij de effecten op de groei en tot slot de oxidatieve stressresponsen besproken worden.

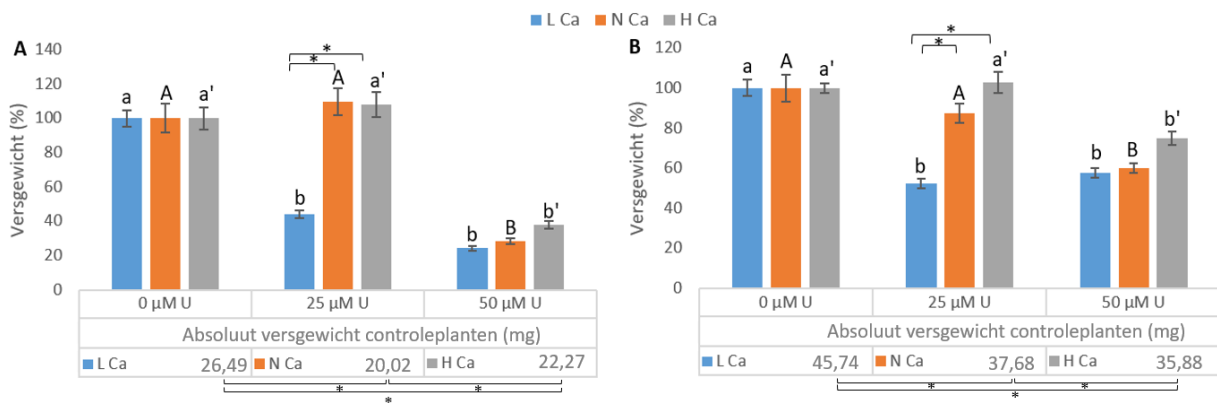
### 4.1 Uraniumblootstelling bij verschillende calciumconcentraties

In deze fase van het onderzoek worden 18-dagen oude *A. thaliana* planten gedurende 3 dagen blootgesteld aan 0, 25 en 50  $\mu\text{M}$  U in combinatie met 30, 300 en 3 000  $\mu\text{M}$  calcium. Hierdoor kan de competitie tussen uranium en calcium ter hoogte van de calciumkanalen bestudeerd worden.

#### 4.1.1 Effecten op groei

Na drie dagen blootstelling aan uranium bij verschillende calciumconcentraties werd het versgewicht van de planten bepaald. Figuur 10 geeft de versgewichten van de blootgestelde planten relatief weer ten opzichte van de controleplanten (i.e. niet-blootgestelde planten) bij dezelfde calciumconcentratie. Onder controlecondities (0  $\mu\text{M}$  U) is er een significante stijging in het versgewicht van de absolute massa's van de wortels gegroeid bij een lage calciumconcentratie (L Ca) ten opzichte van deze gegroeid bij een normale (N Ca) en hoge (H Ca) calciumconcentratie. Dit effect is ook aanwezig op bladniveau, waar er een significante daling werd waargenomen in het absoluut versgewicht bij stijgende calciumconcentratie.

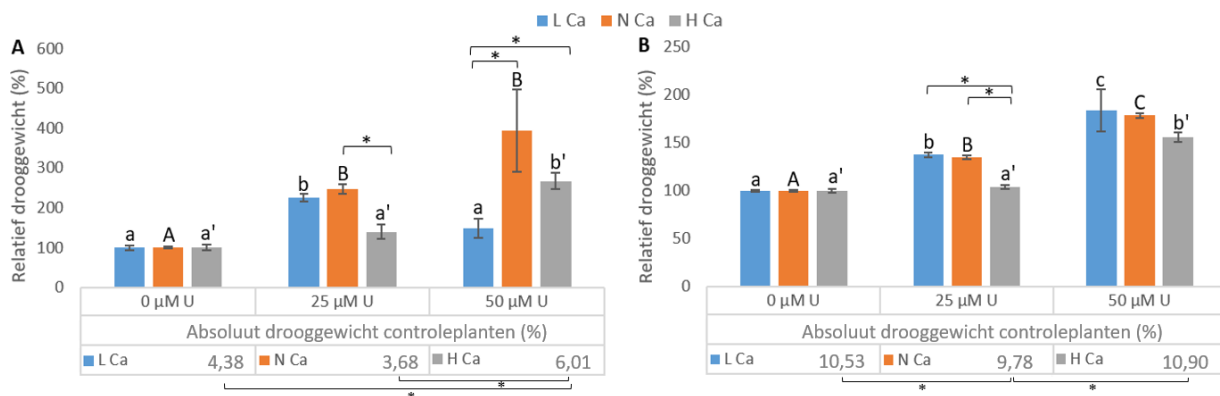
Uraniumblootstelling bij L Ca leidt tot een significante daling in versgewicht op blad- en wortelniveau bij zowel 25 als 50  $\mu\text{M}$  U. Bij N Ca en H Ca is er pas een significante daling in het versgewicht van zowel de wortels als de blaadjes na blootstelling aan 50  $\mu\text{M}$  U (Figuur 10 A en B). Dit leidt op blad- en wortelniveau tot een significant verschil in versgewicht tussen de verschillende calciumconcentraties bij 25  $\mu\text{M}$  U waarbij de L Ca significant minder wegen dan de N Ca en H Ca planten. Op wortel- en bladniveau is er geen significant verschil in versgewicht tussen de planten die werden blootgesteld aan 50  $\mu\text{M}$  U bij een verschillende calciumconcentratie.



Figuur 10: Relatieve gemiddelde versgewichten (%) ten opzichte van verschillende uranium- en calciumconcentraties voor (A) wortels en (B) blaadjes. De data zijn het gemiddelde van minimaal 60 herhalingen  $\pm$  standaarderror. Relatieve gewichten worden genomen ten opzichte van controleplanten (0  $\mu\text{M}$  U) bij overeenstemmende calciumconcentratie. Binnen dezelfde calciumconcentratie wordt een significant verschil aangeduid met een andere letter ( $p < 0,05$ ). Binnen dezelfde uraniumconcentratie wordt een significant verschil aangeduid met \* ( $p < 0,05$ ).

Wanneer de planten 1 week gedroogd waren bij 70°C kon het drooggewicht van de planten bepaald worden (Figuur 11). Onder controlecondities is er op wortelniveau (Figuur 11 A) een significante stijging in % drooggewicht in H Ca ten opzichte van L Ca en N Ca. Op bladniveau (Figuur 11 B) is een significante daling in % drooggewicht in N Ca ten opzichte van L Ca en H Ca.

Na blootstelling aan 25  $\mu\text{M}$  U is er op blad- en wortelniveau (Figuur 11 A en B) een significante stijging in % drooggewicht ten opzicht van de controleplanten in aanwezigheid van L Ca en N Ca. In aanwezigheid van H Ca is er pas een significante stijging na blootstelling aan 50  $\mu\text{M}$  U. Dit leidt tot significante effecten binnen één uraniumconcentratie voor de verschillende calciumconcentraties uitgezonderd bij 50  $\mu\text{M}$  U op bladniveau (Figuur 11 A en B).



Figuur 11: Relatieve gemiddelde drooggewichten (%) ten opzichte van verschillende uranium- en calciumconcentraties voor (A) wortels en (B) blaadjes. De data zijn het gemiddelde van 4 herhalingen  $\pm$  standaarderror. Relatieve % drooggewichten worden genomen ten opzichte van controleplanten (0  $\mu\text{M}$  U) bij overeenstemmende calciumconcentratie. Binnen dezelfde calciumconcentratie wordt een significant verschil aangeduid met een andere letter ( $p < 0,05$ ). Binnen dezelfde uraniumconcentratie wordt een significant verschil aangeduid met \* ( $p < 0,05$ ).

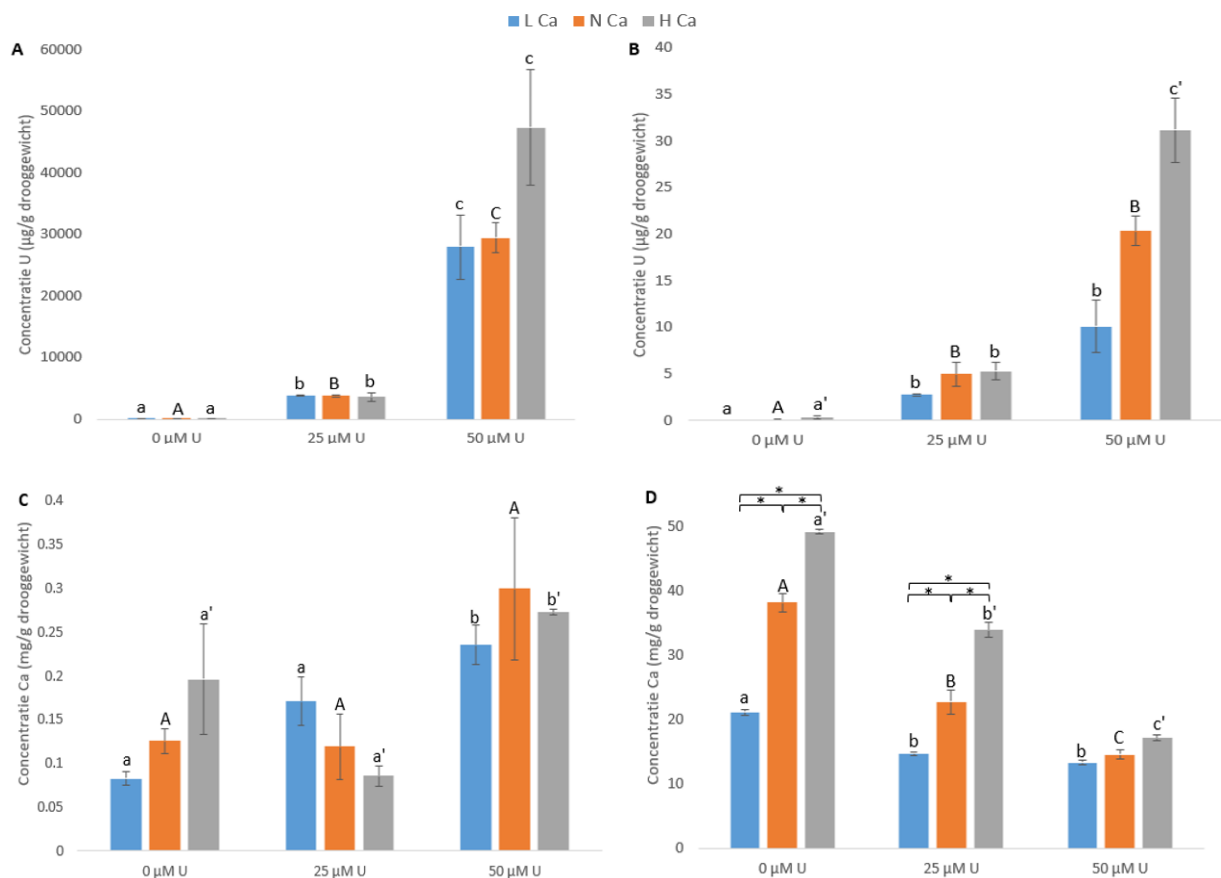
## 4.1.2 Opname en translocatie van uranium en calcium

Om de invloed van calcium op de uraniumopname en de invloed van uranium op de calciumopname te bepalen, werden de uranium- en calciumconcentraties in blad- en wortelstalen bepaald. Op wortelniveau (Figuur 12 A) is er bij stijgende uraniumconcentratie in het medium een significante stijging in de uraniumopname en dit bij alle calciumconcentraties. Op bladniveau (Figuur 12 B) is bij stijgende uraniumblootstelling een stijgende trend aanwezig in de uraniumconcentratie en dit bij alle calciumconcentraties. Bij dezelfde uraniumconcentratie is er zowel op blad- als wortelniveau geen significante verandering in uraniumconcentratie bij verschillende calciumconcentratie. Wel wordt een stijgende trend in de uraniumconcentratie van blaadjes en wortels waargenomen bij stijgende calciumconcentratie in het medium na blootstelling aan 50  $\mu\text{M}$  U (Figuur 12 A en B).

In de wortels is er een beduidend hogere uraniumconcentratie aanwezig ten opzichte van de bladeren. Dit kan gekoppeld worden aan de lage transferfactor van uranium (Tabel 3). Bij dezelfde calciumconcentratie wordt er wel een dalende transferfactor waargenomen bij stijgende uraniumconcentratie. Bij 25 en 50  $\mu\text{M}$  U is er een stijgende trend in de transferfactor bij stijgende calciumconcentratie. Er wordt dus meer uranium naar de blaadjes getransporteerd bij een hogere calciumconcentratie in het groeimedum.

Voor calcium wordt er in de wortels (Figuur 12 C) blootgesteld aan 0  $\mu\text{M}$  U een stijgende trend waargenomen in de calciumconcentraties (niet-significant) bij de verschillende calciumconcentraties in het medium. Deze trend is niet meer aanwezig na blootstelling aan 25 en 50  $\mu\text{M}$  U. Op bladniveau (Figuur 12 D) is er een significante stijging van de calciumconcentratie naarmate de calciumconcentratie in het medium stijgt na blootstelling aan 0 of 25  $\mu\text{M}$  U. Deze stijging is niet meer aanwezig na blootstelling aan 50  $\mu\text{M}$  U.

Bij eenzelfde calciumconcentratie in het medium wordt een stijgende trend waargenomen in de calciumconcentratie in de wortels bij stijgende uraniumconcentratie in het medium, uitgezonderd bij 25  $\mu\text{M}$  U H Ca (Figuur 12 C). Op bladniveau (Figuur 12 D) wordt een dalende trend in de calciumconcentratie waargenomen bij stijgende uraniumconcentratie in het medium en dit voor zowel L Ca, N Ca en H Ca.



Figuur 12: (A) en (B) concentratie uranium ( $\mu\text{g}$  per gram drooggewicht) voor (A) wortels en (B) blaadjes. C en D: concentratie calcium ( $\text{mg}$  per gram drooggewicht) voor (C) wortels en (B) blaadjes. De data zijn het gemiddelde van 4 herhalingen  $\pm$  standaarderror. Binnen dezelfde calciumconcentratie wordt een significant verschil aangeduid met een andere letter ( $p < 0,05$ ). Binnen dezelfde uraniumconcentratie wordt een significant verschil aangeduid met \* ( $p < 0,05$ ).

Tabel 3: Transferfactor voor uranium en calcium ten opzichte van verschillende uranium- en calciumconcentraties.

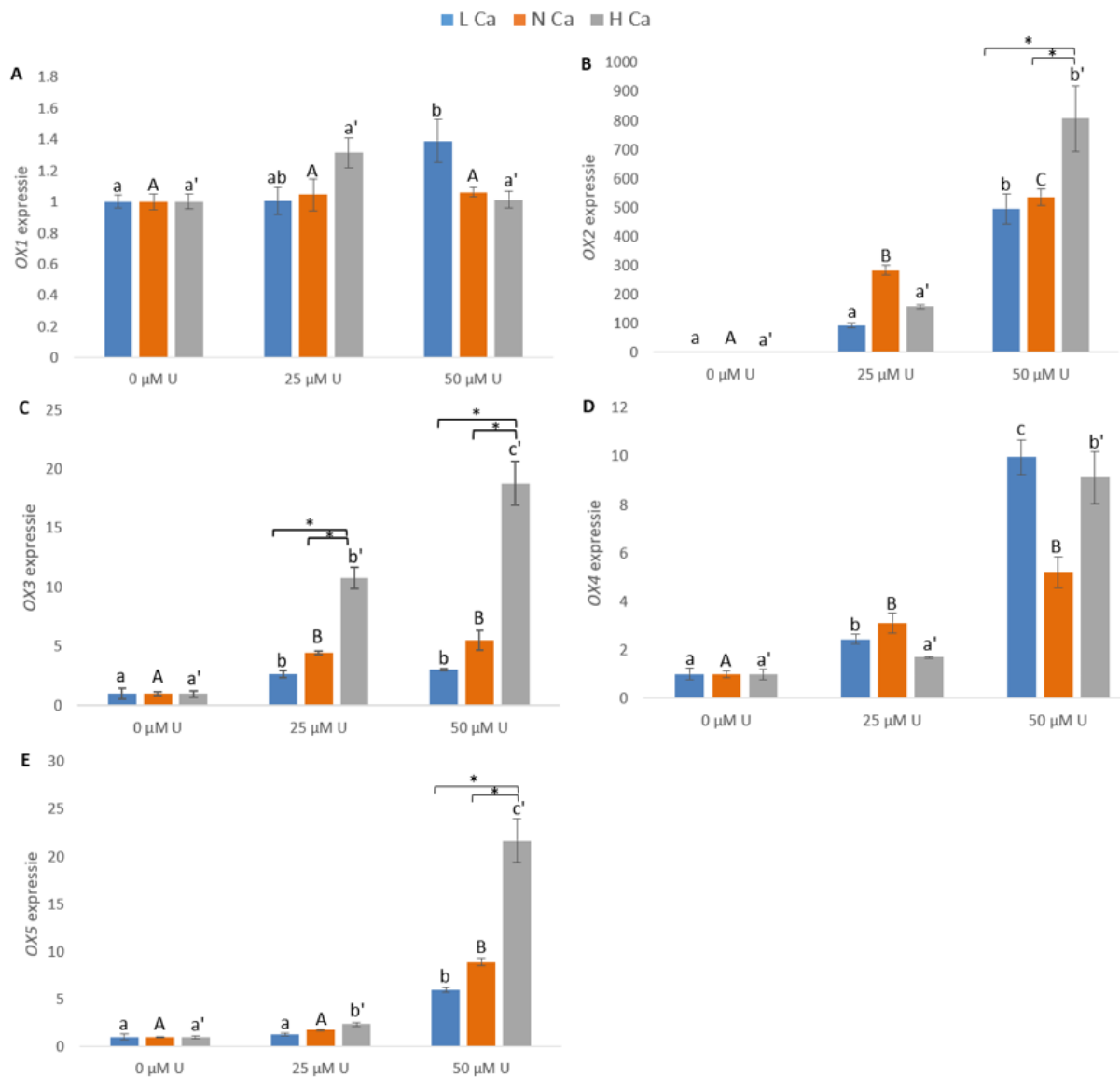
Transfer factor	25 $\mu\text{M}$ U			50 $\mu\text{M}$ U		
	L Ca	N Ca	H Ca	L Ca	N Ca	H Ca
U	0.00073 $\pm$ 0.00003	0.00132 $\pm$ 0.00035	0.00148 $\pm$ 0.00027	0.00036 $\pm$ 0.00010	0.00052 $\pm$ 0.00018	0.00066 $\pm$ 0.00007
Ca	86.19245 $\pm$ 1.72007	190.18247 $\pm$ 15.92711	396.09615 $\pm$ 13.32439	56.59477 $\pm$ 1.49568	48.63260 $\pm$ 2.49910	62.96985 $\pm$ 1.88378

### 4.1.3 Oxidatieve stress respons

Om de oxidatieve stress respons te bestuderen, wordt op moleculair niveau de expressie van enkele stress-gerelateerde genen (Tabel 2) gemeten met behulp van qPCR op zowel blad- als wortelniveau. Genen waarvan de genexpressie wordt onderzocht zijn OX- en GSH-genen (Zie tabel 2). Daarnaast hebben planten op biochemisch niveau mechanismen ingebouwd die ROS detoxificeren. Deze worden onderzocht door het bepalen van de enzymcapaciteiten van CAT, SPOD, SOD, GPOD en GR op bladniveau.

### *Moleculair niveau*

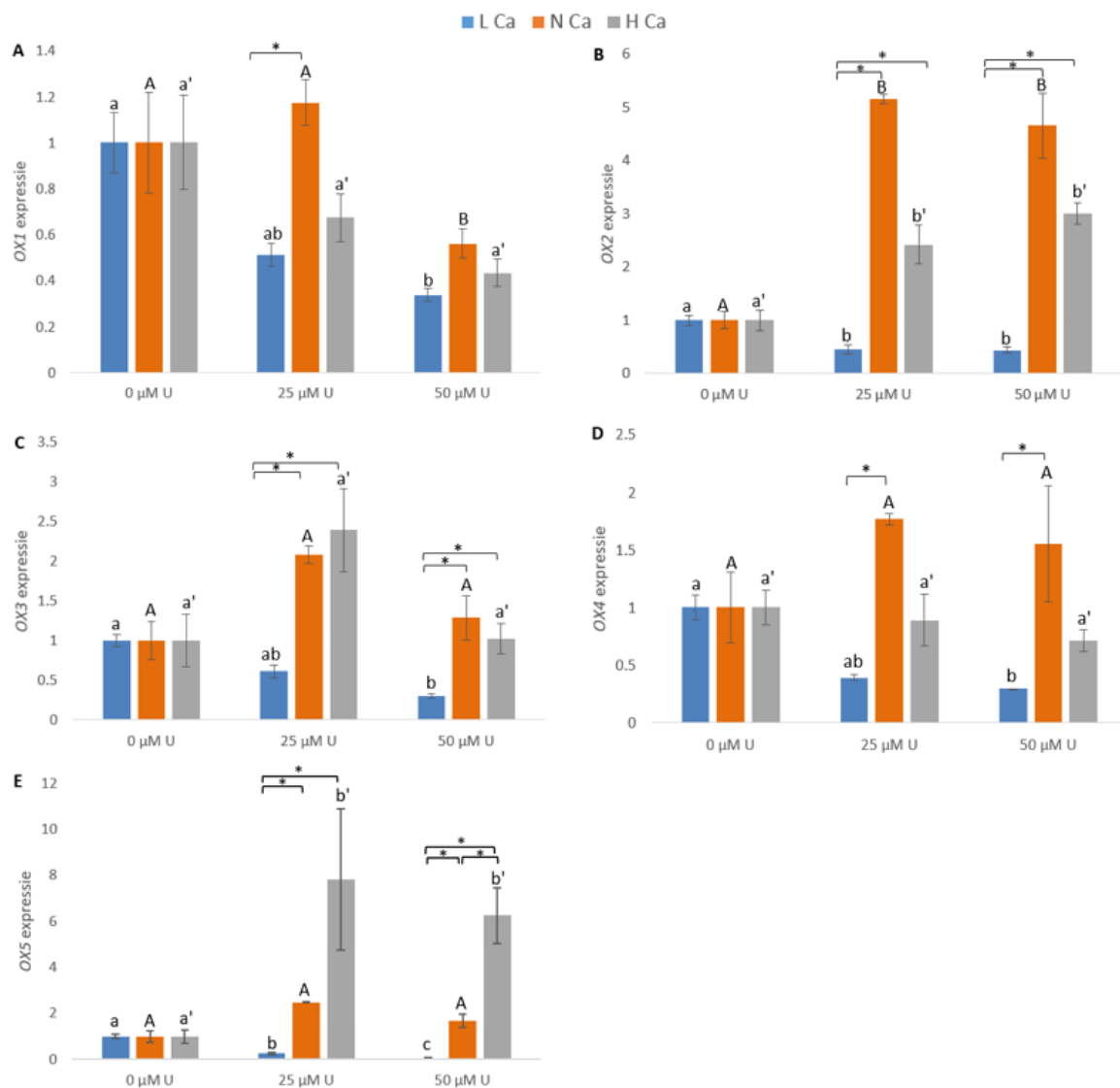
In de wortels wordt er enkel een significante stijging waargenomen in de expressie van *OX1* (Figuur 13 A) na blootstelling aan 50  $\mu\text{M}$  U bij L Ca ten opzichte van de controleplanten. In de *OX2* expressie (Figuur 13 B) is er bij normale calciumconcentratie in het voedingsmedium een significante stijging in de genexpressie na blootstelling aan 25  $\mu\text{M}$  U. Daarnaast wordt er na blootstelling aan 50  $\mu\text{M}$  U een significante stijging waargenomen bij alle calciumconcentraties, waarbij de expressie bij H Ca significant hoger is in vergelijking met L Ca en N Ca. Na blootstelling aan 25 en 50  $\mu\text{M}$  U wordt er een significante stijging waargenomen in de expressie van *OX3* (Figuur 13 C) voor alle calciumconcentraties, waarbij opnieuw de expressie bij H Ca significant hoger is in vergelijking met L Ca en N Ca. Voor de *OX4* expressie (Figuur 13 D) wordt een significante stijging waargenomen na blootstelling aan 25 en 50  $\mu\text{M}$  U bij L Ca en N Ca ten opzichte van de controleplanten. Blootstelling aan uranium bij H Ca leidt tot een significante stijging van de genexpressie enkel na blootstelling aan 50  $\mu\text{M}$  U. Bij zowel 25 als 50  $\mu\text{M}$  U is er geen significantie verandering waargenomen tussen de verschillende calciumconcentraties. Tenslotte wordt de expressie van *OX5* bepaald (Figuur 13 E). Hier wordt een significante stijging waargenomen na blootstelling aan 50  $\mu\text{M}$  U bij zowel L Ca als N Ca ten opzichte van de controleplanten. Bij hoge calciumconcentratie in het voedingsmedium is er een significante stijging van de genexpressie bij zowel 25 en 50  $\mu\text{M}$  U. Bij 50  $\mu\text{M}$  U is er bij H Ca een significante stijging van de genexpressie vergeleken met L Ca en N Ca. Voor *GSH1* en *GSH2* (Bijlage 3, Figuur 20 A en B) worden er geen significante effecten waargenomen. In Bijlage 2 wordt de relatieve genexpressie van de controleplanten weergegeven ten opzichte van N Ca voor stalen op wortel- en bladniveau



Figuur 13: Relatieve genexpressie ten opzichte van verschillende uranium- en calciumconcentraties voor de wortels. De data zijn het gemiddelde van minimum 3 herhalingen  $\pm$  standaarderror. Relatieve genexpressie wordt genomen ten opzichte van controleplanten (0  $\mu$ M U) bij overeenstemmende calciumconcentratie. Binnen dezelfde calciumconcentratie wordt een significant verschil aangeduid met een andere letter ( $p < 0.05$ ). Binnen dezelfde uraniumconcentratie wordt een significant verschil aangeduid door \* ( $p < 0.05$ ).

Hiernaast wordt er bij moleculair onderzoek op bladniveau een significante daling waargenomen in de *OX1* expressie (Figuur 14 A) na blootstelling aan 50  $\mu$ M U bij L Ca en N Ca ten opzichte van de controleplanten. Een hoge calciumconcentratie in het voedingsmedium leidt niet tot significante veranderingen in genexpressie na uraniumblootstelling, hoewel hier ook een dalende trend aanwezig is. In de expressie van *OX2* (Figuur 14 B) wordt een significante daling waargenomen bij L Ca na blootstelling aan 25 en 50  $\mu$ M U. Bij N Ca en H Ca is er een significante stijging in genexpressie na blootstelling aan 25 en 50  $\mu$ M U. Dit leidt tot een significante daling in de *OX2* expressie bij L Ca vergeleken met N Ca en H Ca bij beide uraniumconcentraties. Daarnaast wordt er voor zowel de *OX3* en *OX4* expressie (Figuur 14 C en D) een dalende trend waargenomen bij L Ca na uraniumblootstelling met een significante

daling na blootstelling aan 50  $\mu\text{M}$  U. Uraniumblootstelling bij N Ca en H Ca leidt niet tot significante veranderingen van de genexpressie. Daarnaast wordt er in de expressie van *OX5* (Figuur 14 E) een significante daling waargenomen bij L Ca na blootstelling aan 25 en 50  $\mu\text{M}$  U. Dit in tegenstelling tot de H Ca in het voedingsmedium waar een significante stijging wordt waargenomen na blootstelling aan 25 en 50  $\mu\text{M}$  U. Tenslotte wordt de expressie van *GSH1* en *GSH2* gemeten (Bijlage 3, Figuur 20 C en D). Er wordt een significante daling waargenomen in de *GSH1* expressie (Figuur 20 C) na blootstelling aan 50  $\mu\text{M}$  U bij L Ca, N ca en H Ca. Blootstelling aan 25  $\mu\text{M}$  U leidt niet tot significante veranderingen ten opzichte van de controleplanten. In de expressie van *GSH2* (Figuur 20 D) wordt er enkel een significant verschil gevonden bij de normale calciumconcentratie na blootstelling aan 25  $\mu\text{M}$  U. Blootstelling aan 25 en 50  $\mu\text{M}$  U zorgt voor een significante stijging van de genexpressie voor L Ca.

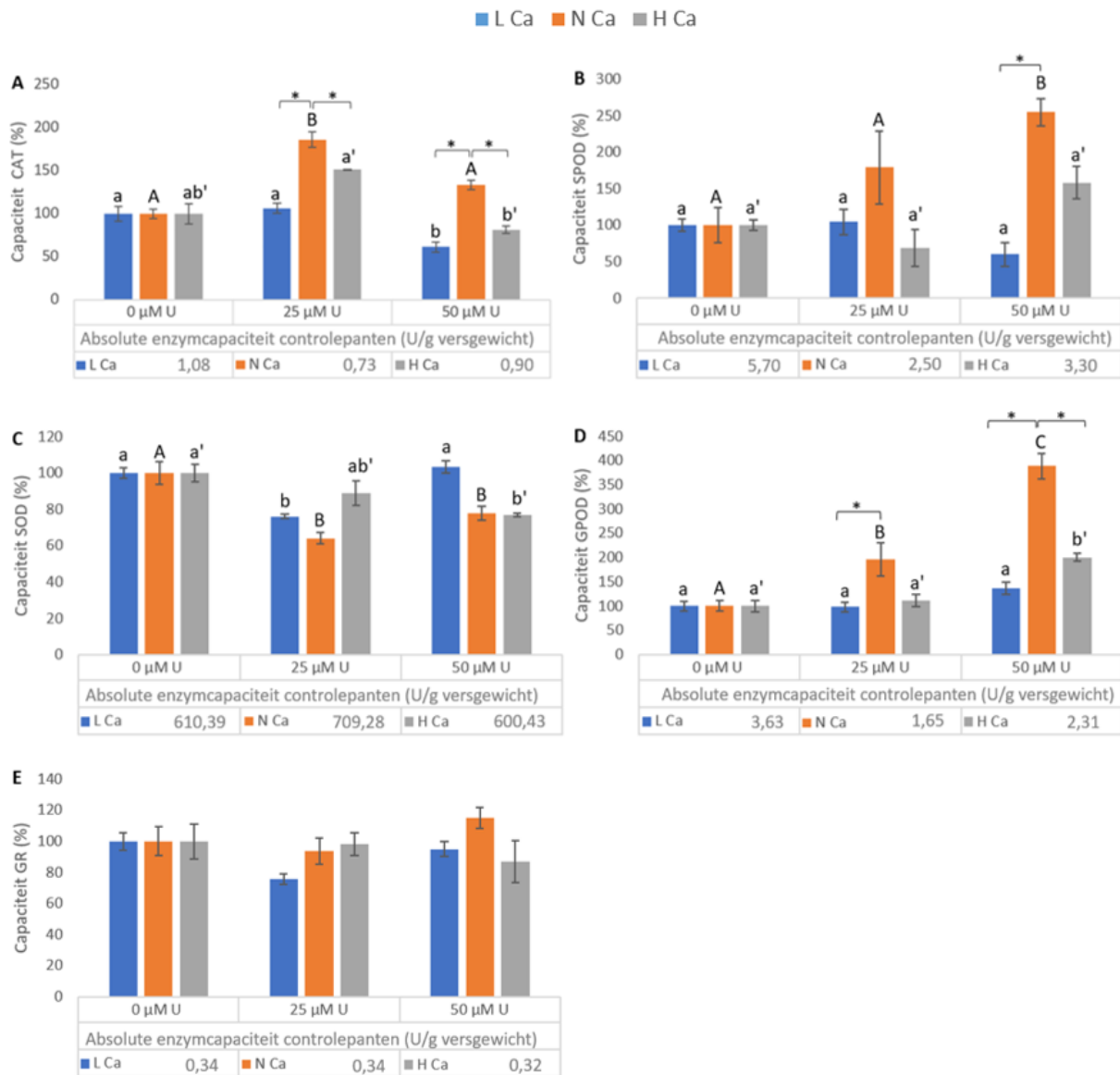


Figuur 14: Relatieve genexpressie ten opzichte van verschillende uranium- en calciumconcentraties voor de blaadjes. De data zijn het gemiddelde van minimum 3 herhalingen  $\pm$  standaarderror. Relatieve genexpressie wordt genomen ten opzichte van controleplanten (0  $\mu\text{M}$  U) bij overeenstemmende calciumconcentratie. Binnen dezelfde calciumconcentratie wordt een significant verschil aangeduid met aan andere letter (p < 0.05). Binnen dezelfde uraniumconcentratie wordt een significant verschil aangeduid door \* (p < 0,05).



### ***Biochemisch niveau***

Voor de enzymcapaciteit van CAT (Figuur 15 A) wordt er een significante daling waargenomen na blootstelling aan 50  $\mu\text{M}$  U bij L Ca. Bij normale calciumconcentratie in het voedingsmedium is er een significante stijging in de CAT-capaciteit na blootstelling aan 25  $\mu\text{M}$  U. Blootstelling aan uranium bij H Ca leidt niet tot een significante verandering in CAT-capaciteit ten opzichte van de controleplanten. Bij zowel 25 als 50  $\mu\text{M}$  U is er bij N Ca een significante stijging van de enzymcapaciteit vergeleken met L Ca en H Ca. Bij SPOD (Figuur 15 B) is er geen significante verandering waarneembaar in de enzymcapaciteit bij L Ca en H Ca. Bij normale calciumconcentratie in het voedingsmedium is er een significante stijging in de SPOD-capaciteit na blootstelling aan 50  $\mu\text{M}$  U. Dit leidt tot een significante stijging van de enzymcapaciteit in N Ca vergeleken met L Ca. Hiernaast wordt er bij SOD (Figuur 15 C) een significante daling waargenomen bij L Ca en N Ca na blootstelling aan 25  $\mu\text{M}$  U. Een significante daling wordt ook waargenomen na blootstelling aan 50  $\mu\text{M}$  U bij N Ca en H Ca. Er wordt geen significante verandering waargenomen bij L Ca in de capaciteit van GPOD (Figuur 15 D). Bij N Ca is een significante stijging waarneembaar bij blootstelling aan 25 en 50  $\mu\text{M}$  U ten opzichte van de controleplanten. Dit leidt tot een significante stijging van de enzymcapaciteit vergeleken met L Ca (25 en 50  $\mu\text{M}$  U) en H Ca (50  $\mu\text{M}$  U). Bij hoge calciumconcentratie in het voedingsmedium is er een significante stijging in de GPOD-capaciteit na blootstelling aan 50  $\mu\text{M}$  U ten opzichte van de niet blootgestelde planten. Tot slot wordt er voor GR geen significant verschil gevonden (Figuur 15 E).



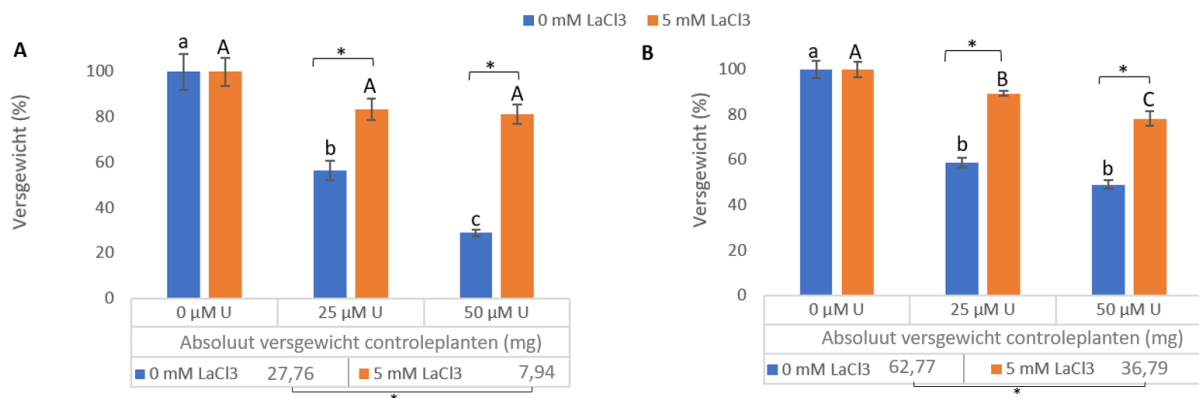
Figuur 15: Relatieve enzymcapaciteit (%) ten opzichte van verschillende uranium- en calciumconcentraties voor (A) CAT; (B) SPOD; (C) SOD; (D) GPOD en (E) GR. De data zijn het gemiddelde van minimum 3 herhalingen  $\pm$  standaarderror. Relatieve capaciteiten worden genomen ten opzichte van controleplanten (0  $\mu$ M U) bij overeenstemmende calciumconcentratie. Binnen dezelfde calciumconcentratie wordt een significant verschil aangeduid met een andere letter ( $p < 0.05$ ). Binnen dezelfde uraniumconcentratie wordt een significant verschil aangeduid met \* ( $p < 0.05$ ).

## 4.2. Uraniumblootstelling bij aan- en afwezigheid van lanthaan(III)chloride

In deze fase van het onderzoek worden 18-dagen oude *A. thaliana* planten gedurende 3 dagen blootgesteld aan 0, 25 en 50  $\mu$ M U in aan- en afwezigheid van een calciumkanaalinhibitor, i.e. lanthaan(III)chloride.

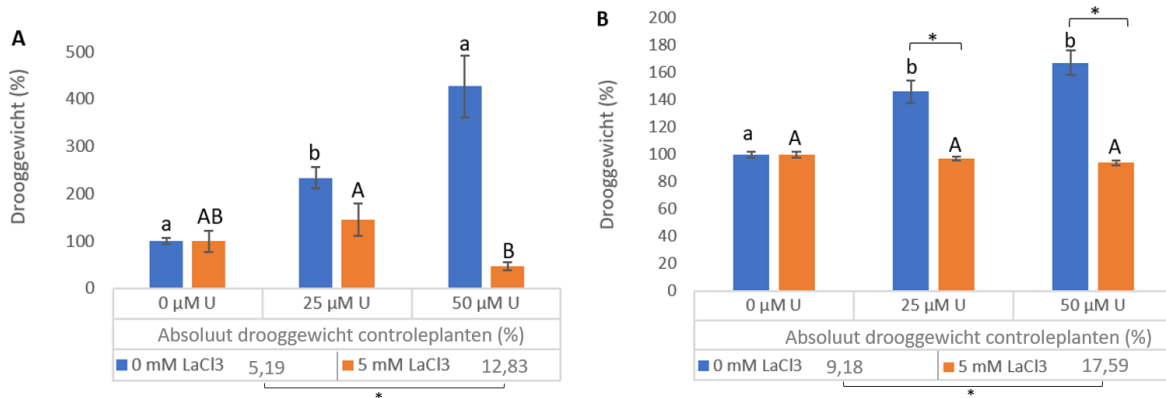
## 4.2.1 Effecten op groei

Onder controlecondities (0  $\mu\text{M}$  U) zorgt de aanwezigheid van  $\text{LaCl}_3$  voor een significante daling in versgewicht ten opzichte van de plantjes die groeiden in afwezigheid van  $\text{LaCl}_3$ , zowel op wortel- als bladniveau (Figuur 16 A en B). Na uraniumblootstelling bij 0 mM  $\text{LaCl}_3$  wordt er een significante daling waargenomen van de % versgewichten in de wortels bij stijgende uraniumconcentratie. In de aanwezigheid van 5 mM  $\text{LaCl}_3$  in het voedingsmedium wordt er op wortelniveau geen significante verandering in versgewicht gevonden na uraniumblootstelling. Dit leidt op wortelniveau tot een significante stijging in % versgewicht na uraniumblootstelling bij 5 mM  $\text{LaCl}_3$  vergeleken met de plantjes die groeiden bij 0 mM  $\text{LaCl}_3$ . Op bladniveau is er een significante daling in % versgewicht bij blootstelling aan 25 en 50  $\mu\text{M}$  U en dit bij zowel de aan- als afwezigheid van  $\text{LaCl}_3$ . Net zoals op wortelniveau veroorzaakt blootstelling aan beide uraniumconcentraties een significante stijging in % versgewicht bij 5 mM  $\text{LaCl}_3$  ten opzichte van de planten die groeiden bij 0 mM  $\text{LaCl}_3$ .



Figuur 16: Relatieve gemiddelde versgewichten (%) ten opzichte van verschillende uraniumconcentraties in aan- en afwezigheid van  $\text{LaCl}_3$  voor (A) wortels en (B) blaadjes van minimaal 76 herhalingen  $\pm$  standaarderror. Relatieve versgewichten worden genomen ten opzichte van controleplanten (0  $\mu\text{M}$  U) bij overeenstemmende  $\text{LaCl}_3$ -concentratie. Binnen dezelfde  $\text{LaCl}_3$ -concentratie wordt een significant verschil aangeduid met aan andere letter ( $p < 0.05$ ). Binnen dezelfde uraniumconcentratie wordt een significant verschil aangeduid met \* ( $p < 0.05$ ).

Naast het versgewicht wordt ook het drooggewicht van de planten bepaald. Onder controlecondities (0  $\mu\text{M}$  U) wordt er op zowel wortel- als bladniveau er een significante stijging waargenomen in % drooggewicht bij 5 mM  $\text{LaCl}_3$  vergeleken met 0 mM  $\text{LaCl}_3$ . Daarnaast wordt op wortelniveau (Figuur 17 A) na blootstelling aan 25 en 50  $\mu\text{M}$  U een significante stijging in % drooggewicht vastgesteld bij 0 mM  $\text{LaCl}_3$  ten opzichte van de controleplanten. Aanwezigheid van 5 mM  $\text{LaCl}_3$  zorgt voor een lichte daling in % drooggewicht na blootstelling aan 50  $\mu\text{M}$  U. Dit leidt tot een significant verschil in % drooggewicht tussen beide concentraties  $\text{LaCl}_3$  bij blootstelling aan 50  $\mu\text{M}$  U. Op bladniveau (Figuur 17 B) wordt er bij 0 mM  $\text{LaCl}_3$  een significante stijging in % drooggewicht waargenomen na blootstelling aan 25 en 50  $\mu\text{M}$  U. Blootstelling aan uranium in aanwezigheid van 5 mM  $\text{LaCl}_3$  in het voedingsmedium zorgt niet voor significante veranderingen. Bij zowel 25 als 50  $\mu\text{M}$  U is er bij 5 mM  $\text{LaCl}_3$  een significante daling in % drooggewicht ten opzichte van 0 mM  $\text{LaCl}_3$ .



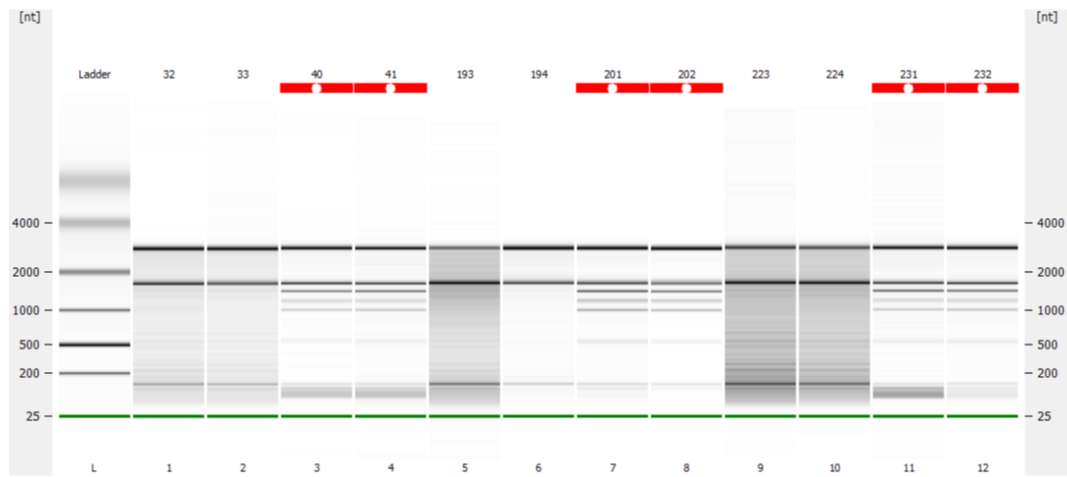
Figuur 17: Relatieve gemiddelde drooggewichten (%) ten opzichte van verschillende uranium- en LaCl<sub>3</sub>-concentraties voor (A) wortels en (B) blaadjes van 4 herhalingen. Relatieve % drooggewichten worden genomen ten opzichte van controleplanten (0 μM U) bij overeenstemmende LaCl<sub>3</sub>-concentratie. Binnen dezelfde LaCl<sub>3</sub>-concentratie wordt een significant verschil aangeduid met een andere letter ( $p < 0,05$ ). Binnen dezelfde uraniumconcentratie wordt een significant verschil aangeduid met \* ( $p < 0,05$ ).

## 4.2.2 Oxidatieve stress respons

Net zoals in het eerste experiment wordt getracht de oxidatieve stress respons te bestuderen op moleculair niveau via qPCR en op biochemisch niveau door het meten van de capaciteit van verschillende antioxidatieve enzymen (CAT, SPOD, SOD, GPOD en GR).

### *Moleculair niveau*

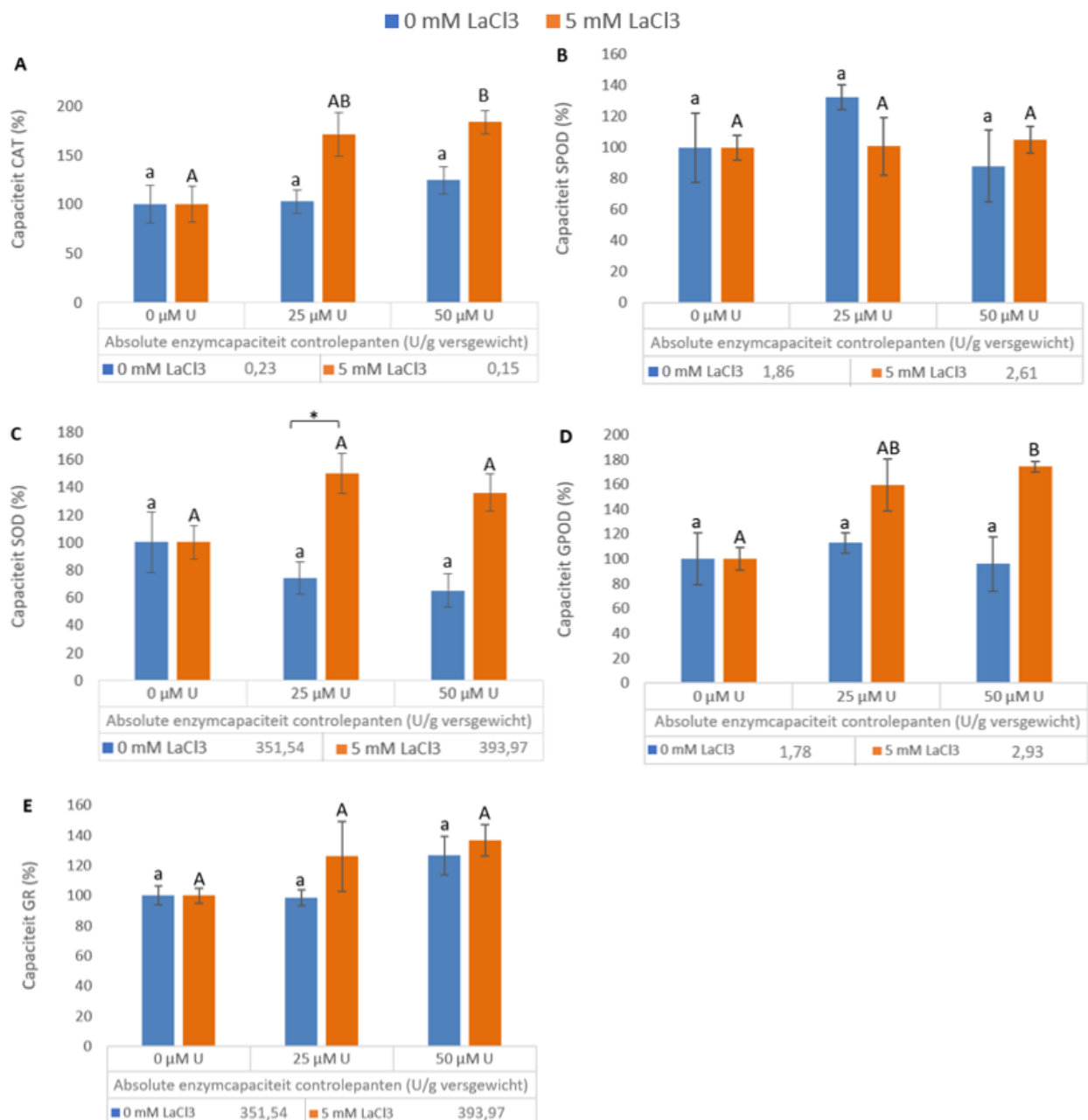
Zoals reeds aangehaald in hoofdstuk 3.3 wordt voor het uitvoeren van qPCR RNA geëxtraheerd uit wortel- en bladstalen. Vervolgens wordt de kwaliteit en kwantiteit van dit RNA gecontroleerd. In planten die blootgesteld zijn aan LaCl<sub>3</sub> wordt echter een heel lage concentratie RNA geëxtraheerd. Bovendien is het aanwezige mRNA in deze stalen van slechte kwaliteit. Resultaten van de Bioanalyser gaven duidelijk aan dat RNA gefragmenteerd werd wat resulteert in een RIN-waarde  $< 7$ . Dit was ook duidelijk zichtbaar op het elektroferogram en de bijbehorende gel. Door de aanwezigheid van het gefragmenteerd wordt qPCR niet aangewezen. In Figuur 18 wordt het resultaat van een gelelektroforese weergegeven. De stalen 32, 33, 193, 223 en 224 bevatten duidelijk een "smeer" met diverse groottes mRNA wat duidt op gefragmenteerd mRNA.



Figuur 18: Resultaat van de Bioanalyzer. Op de gel is duidelijk te zien dat de stalen 32, 33, 192, 223 en 224 een “smeer” bevatten wat duidt op gefragmenteerd RNA.

### *Biochemisch niveau*

Voor alle gemeten enzymen (CAT, SPOD, SOD, GPOD en GR) werden er geen significante verschillen gevonden na uraniumblootstelling bij 0 mM  $\text{LaCl}_3$  (Figuur 19). Wanneer planten blootgesteld werden aan uranium in de aanwezigheid van 5 mM  $\text{LaCl}_3$  kon over het algemeen een stijgende trend waargenomen worden in de enzymcapaciteiten, met een significante stijging bij CAT en GPOD na blootstelling aan 50  $\mu\text{M}$  U.



Figuur 19: Relatieve enzymcapaciteit (%) ten opzichte van verschillende uraniumconcentraties bij 0 of 5 mM LaCl<sub>3</sub> voor (A) CAT; (B) SPOD; (C) SOD; (D) GPOD en (E) GR bij minimaal 3 herhalingen en bij SOD 50 µM U, 5 mM LaCl<sub>3</sub> 2 herhalingen. Relatieve capaciteiten worden genomen ten opzichte van controleplanten (0 µM U) bij 0 of 5 mM LaCl<sub>3</sub>. Binnen dezelfde LaCl<sub>3</sub>-concentratie wordt een significant verschil aangeduid met een andere letter ( $p < 0.05$ ). Binnen dezelfde uraniumconcentratie wordt een significant verschil aangeduid met \* ( $p < 0.05$ ).



## 5 Discussie

---

Vermits er slechts weinig geweten is over de opnameroute van uranium is het doel van dit onderzoek om de opnameroute van uranium doorheen de calciumkanalen te bestuderen. Hiervoor wordt *A. thaliana* in een eerste fase blootgesteld aan 0, 25 en 50  $\mu\text{M}$  U in combinatie met 30, 300 en 3000  $\mu\text{M}$  calcium. In een tweede fase van het onderzoek is dat 0, 25 en 50  $\mu\text{M}$  in combinatie met 0 of 5 mM lantaan(III)chloride, i.e. een calciumkanaalinhibitor. De effecten in de planten worden bestudeerd op individueel, biochemisch en moleculair niveau.

Wanneer *A. thaliana* planten onder controlecondities (0  $\mu\text{M}$  U) worden blootgesteld aan 5 mM  $\text{LaCl}_3$  leidt dit tot een significante daling in versgewicht en een significante stijging in % drooggewicht ten opzichte van de planten gegroeid bij 0 mM  $\text{LaCl}_3$  (Figuur 16 en 17). Bovendien was het RNA van de plantenstalen gegroeid bij 5 mM  $\text{LaCl}_3$  volledig gefragmenteerd. Deze resultaten doen vermoeden dat de gekozen concentratie  $\text{LaCl}_3$  te hoog was voor de planten. Dit kan enerzijds te wijten zijn aan de toxiciteit van  $\text{LaCl}_3$  zelf waardoor plantencellen necrose en apoptose ondergaan. Anderzijds is het ook mogelijk dat de toxische effecten ontstaan door een tekort aan calcium, wat een essentieel element is voor de planten. Omdat er geen eenduidige conclusie getrokken kan worden uit dit experiment, worden de resultaten verder in de discussie niet besproken. In de toekomst is het aangewezen om deze testen nogmaals te herhalen bij een lagere  $\text{LaCl}_3$ -concentratie en/of bij een minder lange blootstellingstijd.

De discussie zal bijgevolg enkel over het eerste experiment gaan waarbij 18-dagen oude *A. thaliana* planten gedurende 3 dagen blootgesteld worden aan uranium in aanwezigheid van verschillende calciumconcentraties.

### 5.1 Invloed van calcium op *A. thaliana* planten

Tijdens de experimenten werden *A. thaliana* planten blootgesteld aan 0, 25 en 50  $\mu\text{M}$  U in combinatie met 30, 300 of 3000  $\mu\text{M}$  Ca. Het is daarom van belang om de invloed van deze verschillende calciumconcentraties te analyseren (in afwezigheid van uranium) om deze blootstellingscondities te valideren.

Zoals verwacht werd er zowel op blad- als wortelniveau bij de controleplanten (0  $\mu\text{M}$  U) een stijgende calciumconcentratie waargenomen naarmate deze in het voedingsmedium steeg. Het verschil in calciumconcentratie in het voedingsmedium veroorzaakte echter geen negatief effect op de groei. Uit de resultaten van de versgewichten blijkt zelfs dat de *A. thaliana* planten in aanwezigheid van een lage calciumconcentratie beter groeiden dan deze bij normale en hoge calciumconcentraties (Figuur 10). Dit zou mogelijk te wijten zijn aan een verbeterde opname van andere essentiële nutriënten zoals eerder werd aangehaald door Huang *et al.* [7]. Daarom wordt aangewezen om het volledig nutriëntenprofiel van de planten te bepalen om



deze hypothese verder te onderzoeken. Het verschillend nutriëntenprofiel zou mogelijks de verschillende drooggewichten kunnen verklaren waarbij bij L Ca mogelijks meer nutriënten worden opgenomen en bij H Ca meer Ca werd ingebouwd in de biomassa. Tenslotte werd een lichte stijging waargenomen in de CAT, SPOD en GPOD-capaciteit onder controlecondities bij de planten gegroeid met een lage calciumconcentraties (Figuur 15 A, B en D). Dit wijst er mogelijks op de deze planten toch een lichte stress ervaren door de lage calciumconcentraties. Doordat de verschillen eerder miniem zijn, kan besloten worden dat de gebruikte calciumconcentraties geschikt zijn voor dit experiment.

## 5.2 Opname en translocatie van uranium en calcium

Uit de resultaten van de uraniumopname blijkt dat de uraniumconcentratie in de wortels toeneemt met stijgende uraniumconcentratie in het medium en slechts een beperkte translocatie naar de blaadjes plaatsvindt (Figuur 12 en Tabel 3). Dit komt overeen met eerdere resultaten van Vanhoudt *et al.* en Saenen *et al.* [4], [21], [24], [47]. Daarnaast lijkt calcium een beperkte invloed te hebben op de uraniumopname. Blootstelling aan uranium bij verschillende calciumconcentraties levert geen significant verschil op. Dit is in tegenstelling met de hypothese waar werd verwacht dat er bij hoge calciumconcentratie een verminderde uraniumopname zou plaatsvinden ten gevolge van competitie ter hoogte van de calciumkanalen. Deze resultaten zijn ook tegenstrijdig met de resultaten die al gevonden werden voor cadmium. Zo heeft Rahman *et al.* (2015) aangetoond dat hoge calciumconcentratie in het voedingsmedium zorgde voor een verminderde cadmiumopname in rijst (*Oryza sativa L.*)[48]. Hoewel calcium slechts een beperkte invloed heeft op de uraniumopname, oefent het wel een invloed uit op de transfer ervan waarbij een stijging in de transferfactor wordt gevonden bij stijgende calciumconcentratie in het medium (Tabel 3).

Onder controlecondities (0  $\mu\text{M}$  U) wordt er zowel op blad- en wortelniveau een stijgende calciumconcentratie vastgesteld bij stijgende calciumconcentratie in het voedingsmedium (Figuur 12 en Tabel 3). Dit toont aan dat de verschillende calciumconcentraties geen effect hebben op de translocatie van calcium. Daarnaast leidt blootstelling aan uranium tot een verstoorde calciumhomeostase. Blootstelling aan 50  $\mu\text{M}$  U zorgt namelijk voor een verhoogde calciumopname door de wortels maar een verminderd calciumtransport naar de bladeren waarbij de calciumtransfer 4 keer lager ligt na blootstelling aan 50  $\mu\text{M}$  U in vergelijking met de controleplanten (Figuur 12 en Tabel 3). Deze resultaten werden ook eerder waargenomen door Vanhoudt *et al.* na blootstelling van *A. thaliana* planten aan 100  $\mu\text{M}$  U [4].

Omdat calcium een essentieel nutriënt is voor planten, hebben planten calciumreserves beschikbaar in o.a. de vacuole. Op basis van de gemeten calciumconcentraties kan op dit moment geen onderscheid gemaakt worden tussen calcium dat al aanwezig was in *A. thaliana* en calcium dat werd opgenomen gedurende de uraniumblootstelling. Het is dan ook aangeraden om in de toekomst te experimenteren met calciumtracers. Hierbij wordt gebruik gemaakt van radioactief gelabeld calcium. Door *A. thaliana* bloot te stellen aan uranium in combinatie met radioactief gelabeld calcium kan de opname, translocatie en locatie van dit

opgenomen gelabelde calcium bepaald worden. Dit zal meer inzicht geven over de invloed van uranium op de calciumopname en transfer.

### 5.3 De invloed van calcium op uraniumtoxiciteit

Zoals eerder aangehaald zorgt blootstelling aan 50  $\mu\text{M}$  U voor een verhoogde uraniumopname wat leidt tot een significante vermindering in versgewicht van blad en wortel, onafhankelijk van de calciumconcentratie (Figuur 10). Dit is gedeeltelijk in overeenstemming met de resultaten gevonden bij blootstelling aan 25  $\mu\text{M}$  U. Hoewel hier geen significant verschil werd gevonden in de uraniumopname bij verschillende calciumconcentraties, werd er een significante daling in versgewicht gevonden maar enkel bij L Ca (Figuur 10). Dit duidt op een mogelijk beschermend effect van calcium op de groei van de planten in aanwezigheid van uranium. Dit positieve effect van calcium werd eerder ook al waargenomen voor verschillende planten na blootstelling aan cadmium, zoals aangehaald in de review van Huang *et al* [7].

Na blootstelling aan 25 en 50  $\mu\text{M}$  uranium kan er een verhoogde ROS-productie ontstaan in de cel. Deze ROS kunnen op enzymatische en niet-enzymatische manier worden afgebroken. Bij enzymatische ROS-detoxificatie wordt er een stijging in de capaciteit van antioxidatieve enzymen verwacht waardoor de cel de schade probeert te beperken. Saenen *et al.* en Vanhoudt *et al.* toonden al aan dat een blootstelling aan uranium leidt tot een stijging in de capaciteit van deze antioxidatieve enzymen [21], [22], [24], [47]. Op bladniveau werd ook in dit experiment een stijging in de enzymcapaciteit van CAT, SPOD en GPOD waargenomen na uraniumblootstelling bij *A. thaliana* planten die groeiden in aanwezigheid van normale calciumconcentratie in het voedingsmedium (Figuur 15 A, B, D). Verhoging van deze enzymen wijst er enerzijds op dat de plant stress ervaart, maar anderzijds zorgt dit ervoor dat  $\text{H}_2\text{O}_2$  wordt afgebroken waardoor de plant zijn stressniveau probeert te verlagen. Daarnaast hebben SPOD en GPOD een belangrijke rol ter hoogte van de celwand, ze zijn namelijk belangrijk in de lignificatie. Lignine is een celwandcomponent die zorgt voor een stevigere celwand waardoor uranium mogelijks minder goed in de cellen kan binnendringen maar eerder aan de celwand gaat binden. Dit leidt tot een verlaagde biologische beschikbaarheid van uranium in het cytoplasma waardoor de plant de toxiciteit van uranium probeert te doen dalen. Om deze hypothese te bevestigen wordt aangeraden om de hoeveelheid lignine aanwezig in de celwand te bepalen. Op moleculair niveau werd een stijging waargenomen in de expressie van de OX-genen (Figuur 13 en 14). Hoewel de functie van de OX-genen nog niet gekend is, is het wel al geweten dat deze genen tot expressie komen bij verhoogde cellulaire ROS-concentratie [49], wat er opnieuw op wijst dat de plant stress ervaart na uraniumblootstelling bij normale calciumconcentratie. Hiernaast moet in acht genomen worden dat ROS ook signaalmoleculen zijn, waardoor een verhoogde signalisatie niet uitgesloten mag worden.

Net zoals bij N Ca wordt er een significante stijging waargenomen in de expressie van de OX-genen in de wortels na uraniumblootstelling bij L Ca. Dit in tegenstelling tot de blaadjes waar

geen verhoogde enzymcapaciteit waargenomen werd bij L Ca. Daarnaast werd er ook geen stijging waargenomen in de genexpressie in de blaadjes van deze planten. Het feit dat er wel een significante daling in versgewicht werd gevonden (al na blootstelling aan 25  $\mu\text{M}$  U) wijst erop dat de planten wel degelijk onder stress staan. De verlaagde enzymcapaciteit voor L Ca kan mogelijks verklaard worden door een verstoorde signalisatie door de verminderde calciumconcentratie in de plant na blootstelling aan 25  $\mu\text{M}$  U. Hierdoor ondervindt de cel wel oxidatieve stress, maar kan deze signalisatie niet worden doorgegeven waardoor een verminderde activatie van de verdedigingsmechanismen ontstaat. Deze hypothese is echter niet van toepassing na blootstelling aan 50  $\mu\text{M}$  U, waar er geen significante verschillen gevonden werden in de calciumconcentratie tussen L Ca en N Ca. Er is daarom nog meer onderzoek nodig om de gevonden effecten te verklaren.

Na uraniumblootstelling bij 3000  $\mu\text{M}$  calcium werd geen effect waargenomen op de enzymcapaciteiten van de blaadjes. Dit is in tegenstelling tot de resultaten van Ahmad *et al.* (2015) waar een stijging in enzymcapaciteit werd gevonden van SOD en GR bij stijgende calciumconcentraties na blootstelling aan cadmium. Ahmad *et al.* suggereren dat calcium in staat is om antioxidantensystemen te stimuleren die gerelateerd worden aan deze enzymen wat mosterdplanten versterkt om bij cadmiumstress te overleven [50]. Op moleculair niveau was wel duidelijk een effect zichtbaar. In de wortels werd een verhoogde expressie van de OX-genen gevonden, met meestal een sterkere inductie na 50  $\mu\text{M}$  U in vergelijking met de L Ca en N Ca (Figuur 13). Ook in de blaadjes was er een significante stijging in de expressie van OX2 en OX5 na blootstelling aan 25 en 50  $\mu\text{M}$  U (Figuur 14). Dit wijst erop dat de cel wel degelijk stress ervaart, maar nog niet de noodzaak ziet om zijn enzymatisch antioxidantief verdedigingssysteem in te schakelen. Vermits calcium belangrijk is in de integriteit en stabiliteit van de celmembraan is het mogelijk dat in de H Ca conditie er een stevigere celmembraan is waardoor de plant deze niet gaat verstevigen door een upregulatie van GPOD en SPOD-capaciteit [7]. Een andere mogelijke verklaring voor deze verminderde enzymcapaciteit kan te wijten zijn aan de aanmaak van fytochelatines bij verhoogde calciumconcentratie. Het is geweten dat calcium kan leiden tot de productie van fytochelatines [21], [47]. Wanneer deze fytochelatines binden aan uranium, is het uranium niet meer beschikbaar voor de plant waardoor de toxiciteit in de plantencel beperkt blijft. Een verhoogde productie van fytochelatines werd al aangetoond door He *et al.* (2004), in de aanwezigheid van verhoogde calciumconcentratie na cadmiumblootstelling [37]. Daarnaast is ook al geweten dat uranium zelf niet zorgt voor de productie van fytochelatines (Horemans N., persoonlijke communicatie). Om deze hypothesen verder te onderzoeken is er echter nog meer onderzoek nodig.

## 6 Besluit

---

Het doel van dit onderzoek was om meer inzicht te krijgen in de uraniumopname, meer specifiek de opname van uranium via calciumkanalen. Om dit doel te bereiken werd in de eerste fase *A. thaliana* blootgesteld aan uranium in combinatie met verschillende calciumconcentraties. Indien beide elementen in competitie treden ter hoogte van de calciumkanalen wordt er bij een verhoogde calciumconcentratie een lagere uraniumopname verwacht. In de tweede fase wordt *A. thaliana* blootgesteld aan uranium in aan- en afwezigheid van lanthaan(III)chloride, i.e. een calciumkanaalinhibitor. Als uranium doorheen de calciumkanalen wordt opgenomen, wordt er in aanwezigheid van  $\text{LaCl}_3$  minder uraniumopname verwacht. De resultaten van het  $\text{LaCl}_3$ -experiment doen vermoeden dat een te hoge  $\text{LaCl}_3$ -concentratie gebruikt werd waardoor hier geen eenduidige conclusie getrokken kan worden.

In tegenstelling tot de verwachtingen werd er geen significant verschil in uraniumconcentratie gevonden bij de verschillende calciumconcentraties. Dit in tegenstelling met de hypothese waar werd verwacht dat er bij een hoge calciumconcentratie een verminderde opname zou plaatsvinden ten gevolge van competitie ter hoogte van de calciumkanalen. Dit doet vermoeden dat uranium in *A. thaliana* niet via calciumkanalen opgenomen wordt. Daarnaast lijkt calcium wel een invloed te hebben op de uraniumtoxiciteit waarbij *A. thaliana* gevoeliger is voor uranium bij lage calciumconcentratie wat resulteert in een verminderd versgewicht van deze planten. Op moleculair en biochemisch niveau werden echter de meeste verschillen gevonden bij normale en hoge calciumconcentratie. Dit wijst er mogelijk op dat deze planten wel degelijk stress ondervinden na uraniumblootstelling, maar nog in staat zijn om met deze stress om te gaan. De normale en hoge calciumconcentratie zorgen dus voor een beschermend effect.

Er is echter nog meer onderzoek nodig om de invloed van calcium op de uraniumtoxiciteit in kaart te brengen. Bij verder onderzoek wordt ten eerste de bepaling van lignine in de celwand aanbevolen. Dit kan meer inzicht geven over de versteviging van de celwand na uraniumblootstelling wat een belangrijk verdedigingsmechanisme kan zijn tegen metaalstress. Ten tweede is het aan te bevelen om in de toekomst testen te doen met radiogelabelde calciumtracers. Hierdoor kan bestudeerd worden hoeveel calcium effectief wordt opgenomen tijdens de uraniumblootstelling. Ten derde kunnen studies over fytochelatines worden gestart om daadwerkelijk te bepalen of fytochelatines zorgen voor de biologische inactivatie van uranium. Daarnaast is het ook interessant om naar de microlocalisatie van uranium te gaan kijken in de planten en of dit beïnvloed wordt door calcium. Tot slot is het aangewezen om het experiment met  $\text{LaCl}_3$  te herhalen met een lagere  $\text{LaCl}_3$ -concentratie.



## 7 Bibliografie

---

- [1] SCK•CEN, “Even voorstellen / Over SCK•CEN / SCK•CEN - SCK•CEN.” [Online]. Available: <https://www.sckcen.be/nl/About/Introduction>. [Accessed: 01-Mar-2018].
- [2] N. Vanhoudt, H. Vandenhove, K. Smeets, T. Remans, M. Van Hees, J. Wannijn, J. Vangronsveld, and A. Cuypers, “Effects of uranium and phosphate concentrations on oxidative stress related responses induced in *Arabidopsis thaliana*,” *ScienceDirect*, vol. 46, no. 11, pp. 987–996, 2008.
- [3] N. Vanhoudt, H. Vandenhove, N. Horemans, J. Wannijn, A. Bujanic, J. Vangronsveld, and A. Cuypers, “Study of oxidative stress related responses induced in *Arabidopsis thaliana* following mixed exposure to uranium and cadmium,” *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 48, pp. 879–886, 2010.
- [4] N. Vanhoudt, H. Vandenhove, N. Horemans, D. M. Bello, M. van Hees, J. Wannijn, R. Carleer, J. Vangronsveld, and A. Cuypers, “Uranium induced effects on development and mineral nutrition of *Arabidopsis thaliana*,” *J. Plant Nutr.*, vol. 34, no. 13, pp. 1940–1956, 2011.
- [5] ATSDR, *Toxicological profile for uranium*. 2013.
- [6] G. Zhu, Y. Peng, B. Li, J. Guo, Q. Yang, S. Wang, K. Mustafa, and A. M. Sirri, *Uranium in the environment: occurrence, transfer and biological effects*, vol. 225, no. September. 1994.
- [7] D. Huang, X. Gong, Y. Liu, G. Zeng, C. Lai, H. Bashir, L. Zhou, D. Wang, P. Xu, M. Cheng, and J. Wan, “Effects of calcium at toxic concentrations of cadmium in plants,” *Planta*, vol. 245, no. 5, pp. 863–873, 2017.
- [8] S. Tian, R. Xie, H. Wang, Y. Hu, J. Ge, X. Liao, X. Gao, P. Brown, X. Lin, and L. Lu, “Calcium Deficiency Triggers Phloem Remobilization of Cadmium in a Hyperaccumulating Species 1,” *Plant Physiol.*, vol. 172, pp. 2300–2313, 2016.
- [9] F. Doustaly, F. Combes, J. B. Fié, S. Berthet, Vé, R. Hugouvieux, O. Bastien, I. Aranjuelo, N. Leonhardt, C. Rivasseau, M. Carriè, A. Vavasseur, J.-P. Renou, Y. Vandembrouck, and J. Bourguignon, “Uranium perturbs signaling and iron uptake response in *Arabidopsis thaliana* roots,” *Metallomics*, vol. 6, p. 809, 2014.
- [10] A. Arora, R. K. Sairam, and G. C. Srivastava, “Oxidative stress and oxidative system in plants,” *Curr. Sci.*, vol. 82, no. 10, pp. 1227–1238, 2002.
- [11] L. Sahijram and B. Bahadur, *Plant Biology and Biotechnology Vol II*, vol. II. 2015.
- [12] N. Severijns, “Kernenergie,” pp. 195–222, 2018.
- [13] R. S. Duggirala R., Lal A., *Radioisotope Thin-Film Powered Microsystems*, . New York: Springer, 2010.
- [14] A. Brain and T. Jack, *Heavy metals in soils: trace metals and metalloids in soils and their bioavailability*. 1995.
- [15] R. M. Timerbaev A.R., imerbaev, “Recent progress of capillary electrophoresis in

- studying the speciation of actinides," *Trends Anal. Chem.*, vol. 51, pp. 44–50, 2013.
- [16] N. Priest, "Toxicity of depleted uranium," *Lancet*, vol. Vol.357(92), p. pp.244-246, 2001.
- [17] C. Walther and D. K. Gupta, *Radionuclides in the environment*, vol. 10. 2013.
- [18] Milieuprogramma van de Verenigde Naties (UNEP), "Straling: effecten en bronnen," 2016.
- [19] World Health organisation, "Chemical and radiological hazards associated with exposure to depleted uranium."
- [20] Z. Hon, Ö. Jan, and L. Navrátil, "Depleted Uranium and Its Effects on Humans," *Sustainability*, vol. 7, no. 4, pp. 4063–4077, 2015.
- [21] E. Saenen, N. Horemans, N. Vanhoudt, H. Vandenhove, G. Biermans, M. Van Hees, J. Wannijn, J. Vangronsveld, and A. C. Cuypers, "Effects of pH on uranium uptake and oxidative stress responses induced in *Arabidopsis thaliana*," *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 32, no. 9, pp. 2125–2133, 2013.
- [22] N. Vanhoudt, H. Vandenhove, K. Smeets, T. Remans, M. Van Hees, J. Wannijn, J. Vangronsveld, and A. Cuypers, "Effects of uranium and phosphate concentrations on oxidative stress related responses induced in *Arabidopsis thaliana*," *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 46, no. 11, pp. 987–996, 2008.
- [23] H. Vandenhove, N. Vanhoudt, A. Cuypers, M. van Hees, J. Wannijn, and N. Horemans, "Life-cycle chronic gamma exposure of *Arabidopsis thaliana* induces growth effects but no discernable effects on oxidative stress pathways," *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 48, no. 9, pp. 778–786, 2010.
- [24] E. Saenen, N. Horemans, N. Vanhoudt, H. Vandenhove, G. Biermans, M. van Hees, J. Wannijn, J. Vangronsveld, and A. Cuypers, "Oxidative stress responses induced by uranium exposure at low pH in leaves of *Arabidopsis thaliana* plants," *J. Environ. Radioact.*, vol. 150, pp. 36–43, 2015.
- [25] N. Vanhoudt, H. Vandenhove, N. Horemans, T. Remans, K. Opdenakker, K. Smeets, D. M. Bello, J. Wannijn, M. Van Hees, J. Vangronsveld, and A. Cuypers, "Unraveling uranium induced oxidative stress related responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings. Part I: Responses in the roots," *J. Environ. Radioact.*, vol. 102, no. 6, pp. 630–637, 2011.
- [26] F. Doustaly, F. Combes, F. J. B., S. Berthet, V. Hugouvieux, B. Olivier, I. Aranjuelo, N. Leonhardt, C. Rivasseau, M. Carrière, A. Vavasseur, J.-P. Renou, Y. Vandembrouckef, and J. Bourguignon, "Uranium perturbs signaling and iron uptake response in *Arabidopsis thaliana* roots," *Metallomics*, vol. 6, p. 809, 2014.
- [27] T. Karuppanapandian, J. C. Moon, C. Kim, K. Manoharan, and W. Kim, "Reactive oxygen species in plants: Their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms," *Aust. J. Crop Sci.*, vol. 5, no. 6, pp. 709–725, 2011.
- [28] F. J. C. Dharmendra K. Gupta, José M. Palma, *Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Plants Under Stress*. Switzerland: Springer International Publishing Switzerland 2015, 2015.
- [29] N. Vanhoudt, N. Horemans, G. Biermans, E. Saenen, J. Wannijn, R. Nauts, M. Van Hees,

- and H. Vandenhove, "Uranium affects photosynthetic parameters in *Arabidopsis thaliana*," *Environ. Exp. Bot.*, vol. 97, pp. 22–29, 2014.
- [30] S. Singh Gill and N. Tuteja, "Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants," 2010.
- [31] A.-A. Véry, "Cation channels in the *Arabidopsis* plasma membrane," *Trends Plant Sci.*, vol. 7, no. 4, pp. 168–175, 2002.
- [32] R. Mittler, "Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance," *Trends Plant Sci.*, vol. 7, no. 9, pp. 405–410, 2002.
- [33] B. C. Bønsager, A. Shahpiri, C. Finnie, and B. Svensson, "Proteomic and activity profiles of ascorbate-glutathione cycle enzymes in germinating barley embryo," *Phytochemistry*, vol. 71, pp. 1650–1656, 2010.
- [34] P. J. White, "Calcium channels in higher plants," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1465, no. 1–2, pp. 171–189, 2000.
- [35] S. S. G. M. Naeem, Abid A. Ansari, *Essential Plant Nutrients Uptake, Use Efficiency, and Management*. Switzerland: Springer Nature, 2017.
- [36] N. Vanhoudt, H. Vandenhove, N. Horemans, D. M. Bello, M. Van Hees, J. Wannijn, R. Carleer, J. Vangronsveld, and A. C. Cuypers, "Uranium induced effects on development and mineral nutrition of *Arabidopsis thaliana*," *J. Plant Nutr.*, vol. 34, pp. 1940–1956, 2011.
- [37] Z. He, J. Li, H. Zhang, and M. Ma, "Different effects of calcium and lanthanum on the expression of phytochelatin synthase gene and cadmium absorption in *Lactuca sativa*," *Plant Sci.*, vol. 168, pp. 309–318, 2004.
- [38] N. Ben Amor, B. Wided Megdiche, B. Ana Jiménez, B. Francisca Sevilla, and B. Chedly Abdelly, "The effect of calcium on the antioxidant systems in the halophyte *Cakile maritima* under salt stress," *Plant Physiol.*, vol. 32, pp. 453–461, 2010.
- [39] TechnologiesAgilent, "Agilent RNA 6000 Nano Kit Guide Notices Manual Part Number Technology Licenses Restricted Rights Legend," Germany, 2016.
- [40] Wannijn Jean, "RNA extraction from plant samples," Belgium, 2015.
- [41] Thermo Scientific, "NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.8 User's Manual," 2010.
- [42] Thermo Scientific, "T042-Technical bulletin NanoDrop Spectrophotometers," 2017.
- [43] LifeTechnologies, "TURBO DNA-free™ Kit TURBO™ DNase Treatment and Removal Reagents Product description TURBO DNA-free™ Kit User Guide," Carlsbad, CA 92008 USA, 2012.
- [44] Takara Bio, "RR047A For Research Use PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser ( Perfect Real Time ) Product Manual," 2017.
- [45] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method," *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, 2001.



- [46] Wannijg Jean, "Enzyme Analysis by Spectrophotometry -Plate Reader method," 2017.
- [47] E. Saenen, N. Horemans, N. Vanhoudt, H. Vandenhove, G. Biermans, M. Van Hees, J. Wannijn, J. Vangronsveld, and A. Cuypers, "MiRNA398b and miRNA398c are involved in the regulation of the SOD response in uranium-exposed *Arabidopsis thaliana* roots," *Environ. Exp. Bot.*, vol. 116, pp. 12–19, 2015.
- [48] A. Rahman, M. G. Mostofa, K. Nahar, M. Hasanuzzaman, and M. Fujita, "Exogenous calcium alleviates cadmium-induced oxidative stress in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings by regulating the antioxidant defense and glyoxalase systems: Calcium-induced cadmium stress tolerance in rice," *Rev. Bras. Bot.*, vol. 39, no. 2, pp. 393–407, 2016.
- [49] I. Gadjev, S. Vanderauwera, T. S. Gechev, C. Laloi, C. Laloi, I. N. Minkov, R. Mittler, F. Van Breusegem, V. Shulaev, K. Apel, and D. Inze, "Transcriptomic Footprints Disclose Specificity of Reactive Oxygen Species Signaling in *Arabidopsis*," *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 141, no. June, pp. 436–445, 2006.
- [50] P. Ahmad, M. Sarwat, N. A. Bhat, M. R. Wani, A. G. Kazi, and L. S. P. Tran, "Alleviation of cadmium toxicity in *Brassica juncea* L. (Czern. & Coss.) by calcium application involves various physiological and biochemical strategies," *PLoS One*, vol. 10, no. 1, pp. 1–17, 2015.

## 8 Bijlagen

---

### *Bijlage 1: Hoagland oplossing*

Hoagland stockoplossing

<b>Macro elementen zonder NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	voor 2L
KNO <sub>3</sub>	20,4 g
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	14,16 g
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	9,8 g
<b>Fosfaatoplossing</b>	voor 2 L
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,6 g
<b>Ijzeroplossing</b>	voor 250 mL
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	1,9 g
EDTA-Na <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	1,25 g
<b>Sporenelementen</b>	voor 1L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86 g
MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	1,81 g
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,08 g
H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	0,09 g
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,22 g

### *Hoagland HP 1:10 vanuit Hoagland stockoplossing voor 10 L*

Macro-elementen	100 mL	
Fosfaatoplossing	50 mL	HP = (1:20)
Ijzeroplossing	0,6 mL	
sporenelementen	1,0 mL	

### *Hoagland LP 1:10 vanuit Hoagland stockoplossing voor 10 L*

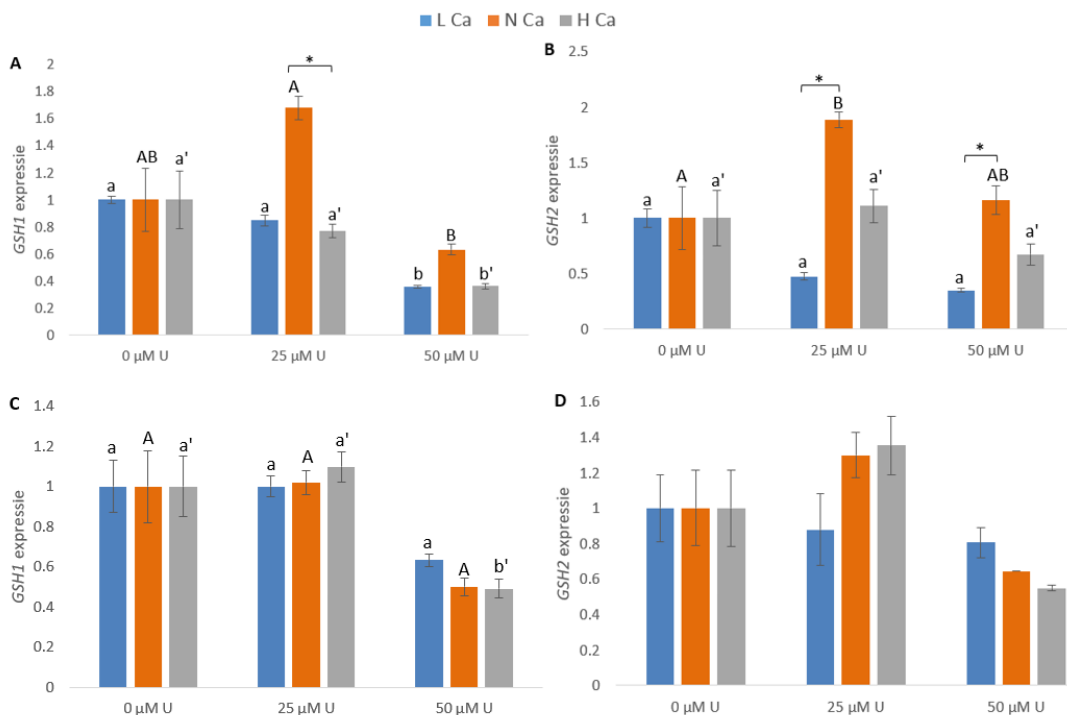
Macro-elementen	100 mL	
Fosfaatoplossing	12,5 mL	HP = (1:80)
Ijzeroplossing	0,6 mL	
sporenelementen	1,0 mL	

## Bijlage 2: Tabel genexpressie van de controlestalen

Tabel 4: Relatieve genexpressie van de controleplanten ten opzichte van N Ca voor stalen op wortel- en bladniveau

Gen	Wortel			Blad		
	L Ca	N Ca	H Ca	L Ca	N Ca	H Ca
OX1	1.04	1.00	1.06	1.86	1.00	1.74
OX2	1.68	1.00	0.98	12.45	1.00	2.06
OX3	1.79	1.00	0.39	3.20	1.00	0.92
OX4	0.79	1.00	0.01	4.20	1.00	2.18
OX5	1.85	1.00	0.55	18.41	1.00	0.43
GSH1	1.04	1.00	0.93	1.62	1.00	1.65
GSH2	1.24	1.00	1.04	3.06	1.00	1.46

## Bijlage 3: Genexpressie GSH-genen



Figuur 20: Relatieve genexpressie ten opzichte van verschillende uranium- en calciumconcentraties voor de (A) en (C) wortels en (C) en (D) blaadjes. De data zijn het gemiddelde van 4 herhalingen  $\pm$  standaarderror. Relatieve genexpressie wordt genomen ten opzichte van controleplanten (0  $\mu$ M U) bij overeenstemmende calciumconcentratie. Binnen dezelfde calciumconcentratie wordt een significant verschil aangeduid met een andere letter ( $p < 0.05$ ). Binnen dezelfde uraniumconcentratie wordt een significant verschil aangeduid door \* ( $p < 0.05$ ).

# Auteursrechtelijke overeenkomst

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling:  
**De rol van calciumtransporters in uraniumopname bij *Arabidopsis thaliana***

Richting: **master in de industriële wetenschappen: biochemie**  
Jaar: **2018**

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.

Voor akkoord,

**Wuyts, Karen**

Datum: **11/06/2018**