

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program:

Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor:

Molekulární biologie a biochemie organismů



**Eliška Kobercová**

Glutamin syntetázy a jejich role v metabolismu dusíku v prýtu rostlin  
Glutamine synthetases and their role in nitrogen metabolism in plant shoot

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Lukáš Fischer, Ph.D.

Praha, 2014

**Poděkování:**

Děkuji RNDr. Lukáši Fischerovi, Ph.D. za cenné připomínky, rady a trpělivé vedení po celou dobu zpracování bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat všem, kteří mě při psaní této práce podporovali.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 16. 5. 2014

Podpis

## **Abstrakt**

Glutamin syntetáza je klíčový enzym pro asimilaci amonných iontů a biosyntézu glutaminu v rostlinách. Amonné ionty jsou důležitým meziproduktem metabolismu dusíku, ve zvýšené koncentraci jsou však pro rostlinu toxické. Správné fungování glutamin syntetázy je pro rostlinu životně důležité - glufosinát, specifický inhibitor glutamin syntetázy, účinkuje jako totální herbicid. Glutamin syntetáza se uplatňuje v řadě významných metabolických procesů: při primární asimilaci dusíkatých živin, při reasimilaci amonných iontů během fotorespirace či metabolismu fenyylpropanoidů a při remobilizaci dusíku při tvorbě semen, během klíčení nebo senescence. Podle lokalizace v buňce se glutamin syntetázy krytosemenných rostlin dělí na plastidovou (GS2), která je kódována zpravidla jedním genem, a na cytosolickou (GS1), kterou kóduje rodina několika genů. Jednotlivé isoformy glutamin syntetáz mají rozdílnou lokalizaci v rámci rostlinných orgánů a pletiv, liší se způsobem regulace a úlohou v metabolismu dusíku.

### **Klíčová slova:**

plastidová a cytosolická glutamin syntetáza, asimilace amonných iontů, metabolismus dusíku, fotorespirace

## **Abstract**

Glutamine synthetase is a key enzyme for ammonium assimilation and glutamine biosynthesis in plants. Ammonium ions are important intermediates in nitrogen metabolism, but their elevated concentration is toxic to plants. Correct function of glutamine synthetase is essential to plant life - glufosinate, a specific inhibitor of glutamine synthetase acts as a total herbicide. Glutamine synthetase is involved in a number of important metabolic processes: primary assimilation of nitrogen nutrients, in reassimilation of ammonium ions released during photorespiration or metabolism of phenylpropanoids and in nitrogen remobilization in developing seeds, during germination or senescence. According to localization in the cell glutamine synthetases in angiosperms are divided into the plastid form (GS2), which is typically encoded by a single gene, and the cytosolic form (GS1), which is encoded by a small multigene family. The various isoforms of glutamine synthetases have different location within plant organs and tissues, ways of regulation and role in nitrogen metabolism.

## **Keywords:**

plastid and cytosolic glutamine synthetase, ammonium assimilation, nitrogen metabolism, photorespiration

## **Obsah**

1. Úvod .....	1
2. Metabolismus amonných iontů v rostlinách .....	2
3. Obecné vlastnosti glutamin syntetázy – evoluce, struktura a regulace .....	8
4. Glutamin syntetázy a metabolismus dusíku .....	11
4.1 Primární asimilace .....	11
4.2 Reasimilace amonných iontů .....	13
4.2.1 Fotorespirace.....	13
4.2.2 Metabolismus fenylpropanoidů .....	18
4.3 Remobilizace dusíku.....	19
5. Závěr.....	21
6. Seznam použité literatury .....	21

## **Seznam použitých zkratk**

- AGT1 – alanin-glyoxylát aminotransferáza, která může použít jako substrát místo alaninu i serin nebo asparagin a namísto glyoxylátu pyruvát (Liepman a Olsen, 2001; Zhang *et al.*, 2013)
- AMT – z angl. ammonium transporter
- AS – asparagin syntetáza
- AspAT - aspartát aminotransferáza
- ASPG – asparagináza
- bar* – z angl. bialaphos resistence – bialaphos je analogem fosfinitricinu, *bar* gen kóduje fosfinitricin acetyltransferázu
- CK - z angl. carbamate kinase
- CPS – z angl. carbamoyl phosphate synthetase
- DUR3 – z angl. degradation of urea, transportér močoviny
- EC – z angl. enzyme commission, označuje číselnou klasifikaci enzymů
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations
- GDC – z angl. glycine decarboxylase complex
- GDH – glutamát dehydrogenáza
- Gln* – označení genu pro glutamin syntetázu
- Glu* – označení genu pro glutamát syntázu
- GOGAT – glutamin-oxoglutarát aminotransferáza neboli glutamát syntáza
- GS – glutamin syntetáza
- GSr - isoforma cytosolické GS, historicky objevena jako specifická pro kořeny
- HATS – z angl. high affinity transport system
- LATS - z angl. low affinity transport system
- Ljgln2* – mutant v genu pro GS2 u štírovníku (*Lotus japonicus*)
- NiR – nitrit reduktáza
- NR – nitrát reduktáza
- NRT – z angl. nitrate transporter
- MSO – methion sulfoximin, specifický inhibitor GS
- OCT – z angl. ornithine carbamoyl transferase
- PAL – z angl. phenylalanine ammonia lyase
- pat* – z angl. phosphinothricin acetyltransferase
- PPT – phosphinothricin, specifický inhibitor GS
- SHMT – serin hydroxymethyltransferáza
- SLAC1/SLAH – z angl. slow anion channel-associated 1 / homolog 3 – nitrátový přenašeč
- VSP – vegetative storage proteins

## 1. Úvod

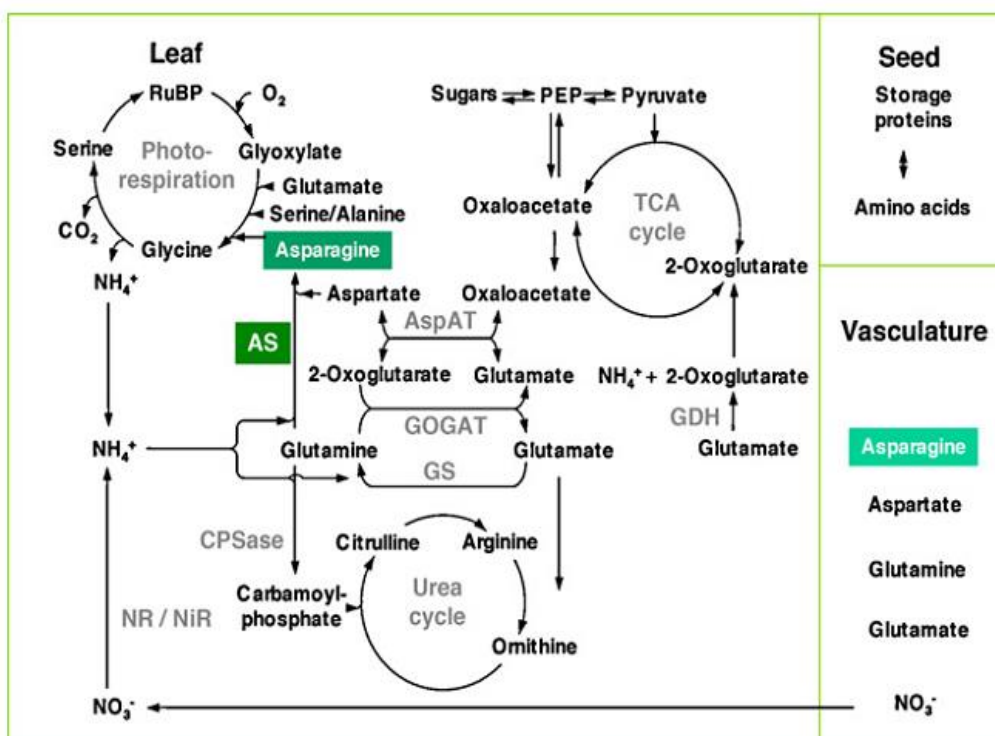
Dusík je klíčovou živinou rostlin, jejíž dostupnost bývá často limitujícím faktorem pro růst a vývoj rostlin. Dusík je součástí proteinů, nukleových kyselin a dalších látek, které jsou esenciální pro každou buňku i rostlinu jako celek. Obsah dusíku v bylinách se udává mezi 1,5 až 4,5 % suché hmotnosti. Z pohledu zemědělství se zároveň jedná o nejdražší živinu (Betti *et al.*, 2012). Celosvětově se spotřebuje přes 100 milionů tun dusíkatých hnojiv ročně (FAO, 2012). Kromě finanční nákladnosti má hnojení samozřejmě vliv i na životní prostředí. Dlouhodobě se tedy usiluje o to, aby rostliny byly schopné lépe využívat dusík ze substrátu.

Jedním z proteinů, který je klíčový pro metabolismus dusíku a tedy i vhodným kandidátem pro cílené modifikace rostlin, je glutamin syntetáza (GS), která katalyzuje reakci amonného iontu s glutamátem za vzniku glutaminu. Testování transgenních topolů se zvýšeným obsahem glutamin syntetázy ukázalo, že tato modifikace přináší řadu výhod, např. rychlejší nárůst biomasy (Jing *et al.*, 2004). GS a její správné fungování je pro rostliny životně důležité, o čemž svědčí i fakt, že fosfotricin neboli glufosinát, specifický inhibitor GS, je účinnou složkou hojně používaného totálního herbicidu, který je dostupný pod komerčními názvy Liberty nebo Basta. Geneticky modifikované rostliny nesoucí rezistenci ke zmiňovanému herbicidu se rovněž komerčně používají - např. bavlník, kukuřice (Tan *et al.*, 2006).

Z uvedeného je zřejmé, že glutamin syntetáza je důležitá nejen pro rostliny, ale i pro zemědělské využití. Není proto překvapivé, že i 60 let po objevení tohoto enzymu (Elliott, 1953) se glutamin syntetáze stále věnuje řada vědeckých prací. Účelem této bakalářské práce bylo shrnout dosavadní poznatky o úloze glutamin syntetázy v metabolismu dusíku, zejména pak v nadzemních částech rostlin vzhledem k významné funkci GS během fotorespirace. Přesto, v zájmu vytvoření uceleného přehledu, nešlo zcela vynechat ani primární asimilaci, i když probíhá z větší části v kořenech. Pro komplexnější náhled jsou v práci popsány i enzymy, které funkčně souvisí s GS nebo které by ji mohly za určitých okolností zastoupit při zpracování amonných iontů, které jsou ve zvýšené koncentraci pro rostlinu toxické.

## 2. Metabolismus amonných iontů v rostlinách

Amonné ionty mají výsadní postavení v metabolismu dusíku, jsou totiž jedinou formou dusíku, která je přímo zabudována do aminokyselin a následně do proteinů. Rostliny přijímají  $\text{NH}_4^+$  ze substrátu nebo amonné ionty vznikají při redukci dusičnanů, resp. dusitanů (případně vzdušného dusíku u rostlin se symbiotickými fixátory dusíku). Amonné ionty jsou také uvolňovány během fotorespirace, při degradaci proteinů a přeměnách aminokyselin či biosyntéze ligninu (viz Obr. 1; Lam *et al.*, 1996).



**Obr. 1 - Schéma popisující metabolismus amonných iontů a propojení enzymatických reakcí popsaných v této kapitole.**

Primárně je schéma zaměřeno na úlohu asparaginu a asparagin syntetázy v metabolismu dusíku. Nutno podotknout, že asparagin může vstupovat do fotorespiračního cyklu jako alternativní substrát serin-glyoxylát aminotransferázy (AGT1, EC 2.6.1.45), jak bylo v nedávné době potvrzeno u *Arabidopsis thaliana* (Zhang *et al.*, 2013). Je zanedbána stechiometrie reakcí a lokalizace v jednotlivých organelách. Použité zkratky: AS – asparagin syntetáza, AspAT – aspartát aminotransferáza, CPSase – karbamoylfosfát syntetáza, GDH – glutamát dehydrogenáza, GOGAT – glutamát syntáza, GS – glutamin syntetáza, NiR – nitrit reduktáza, NR- nitrát reduktáza, PEP – fosfoenolpyruvát, RuBP – ribulóza-1,5-bisfosfát. Schéma bylo převzato z Gaufichon *et al.*, 2010.

Amonné ionty mohou být pro rostlinu i toxické. Jejich hromadění vede k omezení růstu, zakrnění kořenového systému, chloróze listů a následně až k nekróze. I když jsou známy některé komponenty těchto reakcí i na molekulární úrovni (např. omezení kořenové elongace, narušení gravitropismu kořenů), detailní mechanismus toxicity amonných iontů není objasněn - hlavně jeho regulace a signální transdukce (Li *et al.*, 2014).

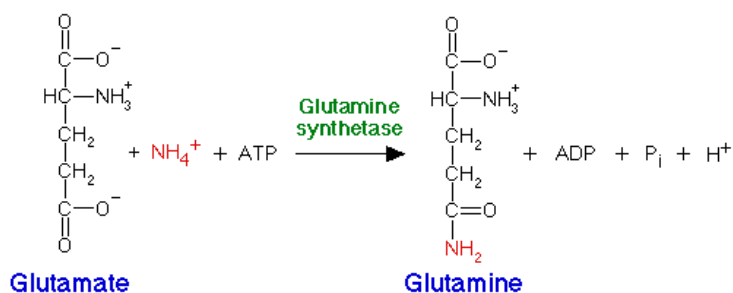


Usuzuje se, že některé projevy jsou způsobené nerovnováhou kationtů ( $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ). Vysoká koncentrace  $NH_4^+$  v půdě brání příjmu draselných iontů (přes vysokoafinitní transportéry, HATS). Pokud je zvýšena koncentrace  $K^+$  iontů v substrátu, dochází k potlačení toxicity  $NH_4^+$  a k příjmu  $K^+$  přes nízkoafinitní transportní systém (LATS). Amonné ionty ovlivňují distribuci draselných iontů i uvnitř rostliny, brání transportu  $K^+$  do prýtu. Molekulární mechanismus interakce obou iontů však není znám (Szczerba *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2014).

Ke zmírnění toxicity  $NH_4^+$  dochází i v přítomnosti  $NO_3^-$  v substrátu. Vysvětlující hypotézy jsou různé. Je možné, že nitrát funguje jako signál pro některé biochemické procesy, např. zvyšuje syntézu cytokininů nebo zabraňuje zvýšené acidifikaci v okolí kořenů. Příjem amonných iontů je totiž spojen s transportem  $H^+$  ven z buňky, naopak nitrát je transportován do buňky spolu s  $H^+$  (Britto a Kronzucker, 2002). Na toxicitu amonných iontů se tedy dá nahlížet i jako na relativní nedostatek nitrátu. U rostlin tabáku, pěstovaných na substrátu jen s  $NH_4^+$  tak, aby nebyly patrné žádné vizuální symptomy toxicity, došlo k omezení růstu listů již během 24 hod po aplikaci  $NH_4^+$ , kdy hladina nitrátu klesla na nulu. Později byly patrné změny v morfologii listů (méně buněk i menší buňky v listové pokožce). Omezení dělení a prodlužování buněk bylo spojené se sníženým transportem cytokininů do prýtu (Walch-Liu *et al.*, 2000).

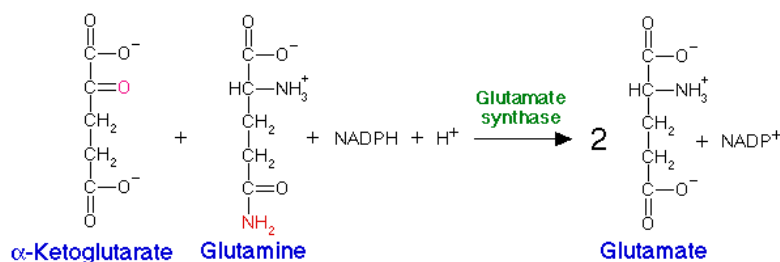
Mezi další vysvětlení toxicity  $NH_4^+$  patří energeticky náročná, ale marná snaha transportovat přebytek amonných iontů ven z cytoplazmy. Při vysoké koncentraci  $NH_4^+$  v substrátu totiž dochází k masivnímu příjmu  $NH_4^+$  přes konstitutivní vysokokapacitní transportéry s nízkou afinitou (LATS), a tak ani narůstající transport nadbytečného  $NH_4^+$  ven z buňky nevede k efektivnímu snížení koncentrace amonných iontů, jen ke spotřebě ATP. U rostlin odolných vůči vyšší koncentraci  $NH_4^+$  (př. rýže) je narušeno popsané cyklování amonných iontů přes plazmatickou membránu (Britto *et al.*, 2001; Kronzucker *et al.*, 2001). Toxicita amonných iontů může souviset i s vlivem  $NH_4^+$  na hormonální rovnováhu (ovlivňuje transport auxinu, syntézu ethylenu) a na fotosyntézu (narušení stavby chloroplastů, omezení fixace  $CO_2$  aj.). Nutno dodat, že jednotlivé rostliny jsou různě citlivé k amonným iontům a jinak se vyrovnávají s projevy jejich toxicity (Britto a Kronzucker, 2002).

Za klíčové enzymy pro asimilaci amonných iontů jsou považovány glutamin syntetáza (GS), jež katalyzuje reakci glutamátu a  $\text{NH}_4^+$  za vzniku glutaminu (viz Obr. 2, o GS je detailně pojednáno v dalších pasážích práce), a glutamát syntáza (neboli glutamin-oxoglutarát aminotransferáza, GOGAT), která zajišťuje za přítomnosti vhodného donoru elektronů (ferredoxin, NAD(P)H) přenos amidové skupiny glutaminu na 2-oxoglutarát za vzniku dvou molekul glutamátu (viz Obr. 3; Lea a Miflin, 1974).



**Obr. 2 - Reakce katalyzovaná glutamin syntetázou (GS).** Převzato z [http://plantcellbiology.masters.grkraj.org/html/Plant\\_Cell\\_Biochemistry\\_And\\_Metabolism4-Nitrogen\\_Metabolism.htm](http://plantcellbiology.masters.grkraj.org/html/Plant_Cell_Biochemistry_And_Metabolism4-Nitrogen_Metabolism.htm)

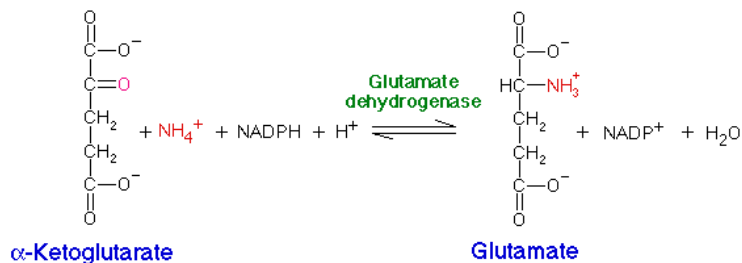
U rostlin se glutamát syntáza nachází ve dvou isoformách lokalizovaných v plastidech, Fd-GOGAT (EC 1.4.7.1) a NADH-GOGAT (EC 1.4.1.14). U většiny rostlin byl nalezen pouze jeden gen pro Fd-GOGAT. U *Arabidopsis* byly však nalezeny dva geny, nazývané *Glu1* a *Glu2*. *Glu1* se vyskytuje hlavně ve fotosynteticky aktivních pletivech. Expres *Glu1* je regulována světlem a přítomností nitrátu. Účastní se zpracování  $\text{NH}_4^+$  uvolněných během primární asimilace i fotorespirace. Expres *Glu2* je velmi nízká, avšak konstitutivní, nereaguje na světlo, ani sacharózu. NADH-GOGAT se tvoří hlavně v nefotosyntetických orgánech, její úlohou je primární asimilace  $\text{NH}_4^+$  v kořenech (Lea a Miflin, 2003; Potel *et al.*, 2009).



**Obr. 3 - Reakce katalyzovaná glutamát syntázou (GOGAT).** Donorem elektronů může být NAD(P)H nebo ferredoxin. Převzato z: [http://plantcellbiology.masters.grkraj.org/html/Plant\\_Cell\\_Biochemistry\\_And\\_Metabolism4-Nitrogen\\_Metabolism.htm](http://plantcellbiology.masters.grkraj.org/html/Plant_Cell_Biochemistry_And_Metabolism4-Nitrogen_Metabolism.htm)

Vedle klíčového GS/GOGAT cyklu jsou amonné ionty součástí řady dalších metabolických reakcí na straně substrátů i produktů. Nejdůležitější enzymy a jimi katalyzované reakce jsou uvedeny v následujícím přehledu.

Do doby, než byl objeven GS/GOGAT cyklus se soudilo, že asimilace  $\text{NH}_4^+$  probíhá přes glutamát dehydrogenázu (GDH, EC 1.4.2.1), která se nachází hlavně v mitochondriích (ve formě NADH-GDH), ale i v chloroplastech (NADPH-GDH). GDH katalyzuje v *in vitro* podmínkách tuto zvratnou reakci popsanou na Obr. 4.

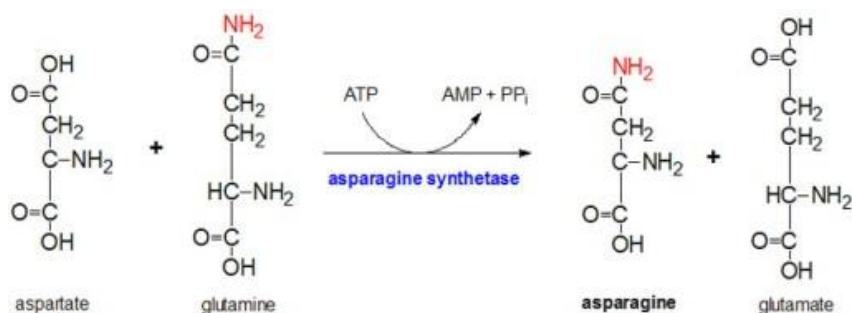


**Obr. 4-** Schéma reakce katalyzované glutamát dehydrogenázou (GDH). Převzato z

[http://plantcellbiology.masters.grkraj.org/html/Plant\\_Cell\\_Biochemistry\\_And\\_Metabolism4-Nitrogen\\_Metabolism.htm](http://plantcellbiology.masters.grkraj.org/html/Plant_Cell_Biochemistry_And_Metabolism4-Nitrogen_Metabolism.htm)

V rostlinách se tvoří GDH v průvodních buňkách sítkovic. Expres genů pro GDH je zvýšena za tmy, naopak reprimována světlem a sacharózou. Úloha GDH v metabolismu dusíku zůstává kontroverzní (Dubois *et al.*, 2003). Situaci komplikuje, že GDH je hexamerní enzym, tvořený z podjednotek  $\alpha$  a  $\beta$ . Mohou se vytvářet homohehexamery i heterohehexamery, celkem tedy sedm isoenzymů. U *Arabidopsis thaliana* byl navíc objeven třetí gen pro GDH – podjednotka  $\gamma$  se tvoří hlavně v kořenech a může se kombinovat s ostatními podjednotkami. V současnosti je přijímáno, že *in vivo* probíhá reakce ve směru produkce  $\text{NH}_4^+$ , hlavní funkcí GDH je tedy tvorba 2-oxoglutarátu pro Krebsův cyklus při nedostatku uhlíkatých sloučenin. Za určitých podmínek může však docházet i k aminaci glutamátu - při odpovědi na vysokou salinitu či koncentraci  $\text{NH}_4^+$  v okolí a během senescence (Tercé-Laforgue *et al.*, 2013).

Další alternativní cesta asimilace  $\text{NH}_4^+$  je přes asparagin syntetázu (AS, EC 6.3.5.4), jež primárně katalyzuje reakci uvedenou na Obr. 5.

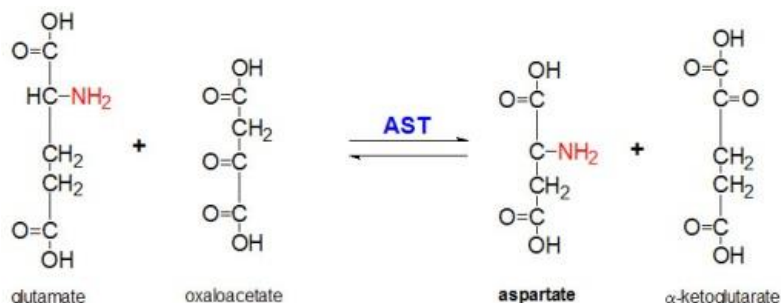


**Obr. 5 -** Reakce katalyzovaná asparagin syntetázou (AS). Převzato z <http://themedicalbiochemistrypage.org/amino-acid-metabolism.php#aspartate>

Místo amidové skupiny glutaminu ale může být použit i volný amonný iont, i když asi s dvacetkrát menší afinitou. Expres genů pro AS je negativně regulována světlem a

sacharózou. Asparagin je důležitou transportní a zásobní formou dusíku v rostlinách, je spojen s klíčením semen a senescencí listů (Gaufichon *et al.*, 2010).

Aspartát aminotransferázy (AspAT, EC 2.6.1.1) jsou skupinou rozličných isoenzymů, které katalyzují reakci popsanou na Obr. 6.

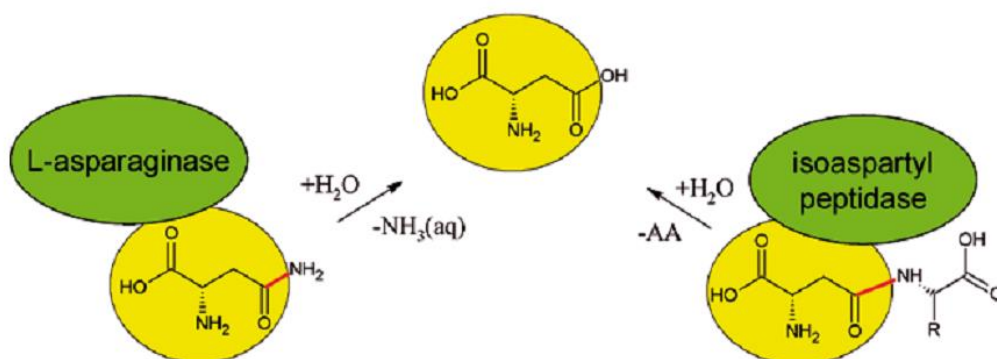


**Obr. 6 - Reakce katalyzovaná aspartát aminotransferázou (AST neboli AspAT).**

Převzato z <http://themedicalbiochemistrypage.org/amino-acid-metabolism.php#aspartate>

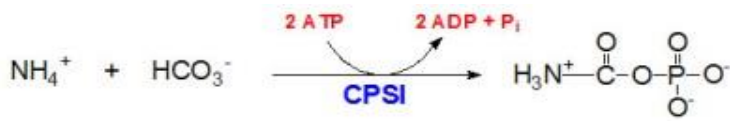
AspAT se nachází v různých pletivech i odlišných buněčných kompartmentech (cytoplazma, mitochondrie, chloroplasty, peroxizómy). Rozdílně reagují na změny okolního prostředí nebo stav metabolismu. Jsou hlavním producentem aspartátu v buňce. Mají důležitou úlohu při asimilaci amonných iontů (navazují na GS/GOGAT tím, že odčerpávají produkovaný glutamát) a podílí se na přenosu CO<sub>2</sub> u některých typů C<sub>4</sub> fotosyntézy (Wadsworth, 1997).

Amonné ionty jsou uvolňovány i při katabolismu asparaginu cytosolickým enzymem asparaginázou (ASPG, EC 3.5.1.1), která katalyzuje reakci: asparagin + H<sub>2</sub>O → aspartát + NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Ireland a Joy, 1983). Rostlinné asparaginázy jsou součástí skupiny Ntn (N-terminal nucleophile)-hydroláz. Kromě asparaginázové aktivity mají výraznou isoaspartyl aminopeptidázovou aktivitu (viz Obr. 7). Asparaginázu nacházíme v místech, kde probíhá intenzivní proteosyntéza (v mladých listech, v semenech; Michalska a Jaskolski, 2006).



**Obr. 7 - Asparaginázová a isoaspartyl aminopeptidázová aktivita rostlinných asparagináz vedoucí ke vzniku aspartátu.** Červeně vyznačena štěpná vazba, převzato z Michalska a Jaskolski, 2006.

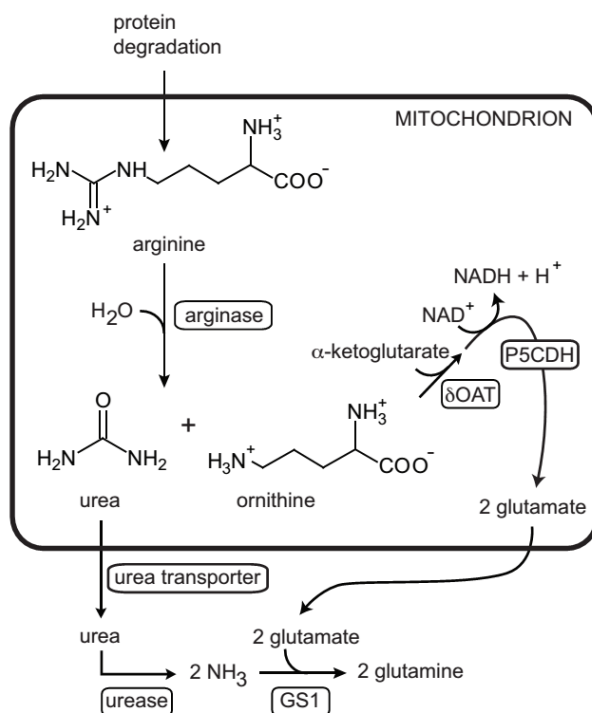
Do asimilace amonných iontů se může zapojovat i karbamoylfosfát syntetáza (CPS, EC 6.3.5.5) katalyzující reakci uvedenou na Obr. 8.



**Obr. 8 - Syntéza karbamoylfosfátu pomocí enzymu karbamoylfosfát syntetázy typu I (CPSI).** Převzato z

<http://themedicalbiochemistrypage.org/cps-deficiency.php>

Následné reakce vedou k biosyntéze argininu, významné zásobní formě organického dusíku (Potel *et al.*, 2009). Arginin se hojně nachází v semenech. U některých rostlin (zejména u dřevin) je hlavní transportní formou asimilovaného dusíku. Arginin je degradován mitochondriálním enzymem arginázou (EC 3.5.3.1) za vzniku močoviny a ornithinu (viz Obr. 9). Močovina posléze podléhá hydrolyze ureázou (EC 3.5.1.5) za vzniku CO<sub>2</sub> a NH<sub>3</sub>. Ureáza se nachází v cytoplazmě a zdá se, že je aktivní ve všech rostlinných pletivech. Močovina může vznikat i při katabolismu ureidů, které jsou hlavní transportní formou dusíku u některých luštěnin (Witte, 2011).



**Obr. 9 - Katabolismus argininu.** Arginin je v mitochondriích hydrolyzován arginázou na močovinu a ornithin. Močovina podléhá hydrolyze ureázou v cytoplazmě, uvolněné amonné ionty jsou zpracovány cytosolickou glutamin syntetázou (GS1). V mitochondriích  $\delta$ -ornithin aminotransferáza ( $\delta$ -OAT, EC 2.6.1.13) předává aminovou skupinu postranního řetězce ornithinu na 2-oxoglutarát za vzniku glutamátu a 1-pyrrolin-5-karboxylátu, který je následně oxidován pyrrolin-5-karboxylát dehydrogenázou (P5CDH, EC 1.5.1.12) za vzniku další molekuly glutamátu. Glutamát může být použit jako substrát pro GS1. Převzato z Witte, 2011.

Amonné ionty také vznikají při asimilaci nitrátu, probíhající přes nitrát reduktázu (NR, EC 1.6.6.1-2, donorem elektronů je NAD(P)H), která v cytoplazmě přeměňuje  $\text{NO}_3^-$  na  $\text{NO}_2^-$ , který je poté využíván plastidovou nitrit reduktázu (NiR, EC 1.7.7.1, donorem elektronů je ferredoxin). Nitrát reduktáza je regulována amonnými ionty a močovinou, NiR pak nitrátem. Expres genů pro NR a NiR je indukována světlem (Andrews *et al.*, 2013).

Při fotorespiraci jsou amonné ionty uvolňovány v mitochondriích během přeměny dvou molekul glycinu na serin. Glycin dekarboxylázový komplex (GDC) oxiduje jednu molekulu glycinu za vzniku  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -metylen-THF (tetrahydrofolátu). Poté serin hydroxymethyltransferáza (SHMT, EC 2.1.2.1) použije  $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -metylen-THF jako donor C1 skupiny pro druhou molekulu glycinu za vzniku serinu. Komplex GDC je tvořen čtyřmi proteiny, vlastní glycin dekarboxylázovou aktivitu nese P protein, EC 1.4.4.2 (Bauwe a Kolukisaoglu, 2003).

Amonné ionty vznikají i při metabolismu fenylypropanoidů, resp. biosyntéze ligninu a dalších fenolických látek. Prvním krokem této metabolické dráhy je deaminace fenylyalaninu nebo tyrosinu enzymem fenylyalanin amonium lyázou (PAL, EC 4.3.1.5, viz Obr. 10) za vzniku *trans*-skořicové kyseliny, resp. *p*-kumarové kyseliny. Zvýšená aktivita PAL souvisí s reakcí na stres - poranění, teplotní změny, infekci, vysokou ozářenost aj. (Adámková *et al.*, 2006).



Obr. 10 - Reakce katalyzovaná fenylyalanin amonium lyázou (PAL). Převzato z Adámková *et al.*, 2006.

### 3. Obecné vlastnosti glutamin syntetázy – evoluce, struktura a regulace

Glutamin syntetáza (GS, EC 6.3.1.2) je klíčový enzym pro biosyntézu glutaminu a asimilaci amonných iontů. GS jsou jedny z nejstarších enzymů. Jsou všudypřítomné, nalézáme je ve všech třech doménách organismů. GS se rozdělují do tří základních skupin: GSI, GSII a GSIII, lišících se molekulovou hmotností a strukturou (Betti *et al.*, 2012).

Dodekamerní GSI se nachází hlavně u domén *Eubacteria* a *Archaea* (Bhatnagar *et al.*, 1986). Mohou se rozdělovat do dvou podskupin podle toho, jestli se při jejich regulaci uplatňuje adenylace na tyrosinovém zbytku (Pesole *et al.*, 1995). Dvanáct podjednotek GSI je uspořádáno ve dvou hexamerních kruzích („back-to-back“). Aktivní místa, která jsou konzervovaná u všech skupin GS, se nachází na rozhraní sousedních podjednotek hexamerů

(tudíž jich je celkem 12). Každé aktivní místo obsahuje dva dvoumocné kationty,  $Mg^{2+}$  nebo  $Mn^{2+}$  (Almassy *et al.*, 1986; Yamashita *et al.*, 1989).

U rostlin se GSI nevyskytují, avšak byly zde nalezeny tzv. GSI-like proteiny (též označované jako Nod-GSI proteiny). Jedná se o fúzní proteiny, jejichž C-koncová část je asi ze 40 % podobná GSI a N-koncová část sdílí homologii s noduliny (Mathis *et al.*, 2000). GSI-like proteiny nevykazují enzymatickou aktivitu GS. Jsou exprimovány především v kořenech. Po snížení jejich exprese pomocí RNA interference došlo k výrazným fenotypovým projevům (zkrácení hlavního kořene, poškození kořenové čepičky aj.). Je možné, že se účastní odpovědi na biotický stres a že interagují s cytoskeletem. Jejich funkce v buňce však zůstává nadále problematická (Doskočilová *et al.*, 2011).

Dekamerní GSII se vyskytují především u eukaryot, i když geny pro GSII byly nalezeny i u některých bakterií (např. *Frankia*, *Rhizobium*, *Streptomyces*), což bylo vysvětlováno horizontálním přenosem genů mezi rostlinou a těmito symbiotickými bakteriemi (Carlson a Chelm, 1986). Po objevení GSII i u nesymbiotických bakterií se ukázala pravděpodobnější hypotéza, že geny pro GSI a GSII vznikly genovou duplikací před oddělením prokaryot a eukaryot (Kumada *et al.*, 1993). Dávné genové duplikaci by nasvědčovala i přítomnost výše popsaných GSI-like proteinů rostlin. U zelené řasy *Chlamydomonas reinhardtii* byly objeveny dva zástupci GSII – cytosolická GS (GSIIe - eukaryotická), která má blíže k eukaryotickým formám v cévnatých rostlinách, a plastidová GS, která se více podobá eubakteriálním proteinům (Chen a Silflow, 1996; Ghoshroy *et al.*, 2010). Eubakteriální typ GSII (tj. GSIIb) u *Chloroplastid* (neboli *Viridiplantae*) se nachází jen u nižších vývojových skupin – u zelených řas a bazálních zástupců streptofytů až po vranečky (*Selaginella*), u semenných rostlin se GSIIb nevyskytuje (Ghoshroy *et al.*, 2010). Autoři se přiklání k hypotéze, že se GSIIb dostala z  $\gamma$ -proteobakterií do *Chloroplastid* horizontálním genovým přenosem.

Dřívější studie předpokládaly, že se GSII skládá z osmi podjednotek, tvořících dva tetramerické kruhy (Llorca *et al.*, 2006). Analýzy struktur GSII u rostlin, savců a kvasinek však ukázaly, že se jedná o dekamerní enzym, nesoucí 10 aktivních míst (Betti *et al.*, 2012).

GSIII se vyskytuje u *Bacteroides*, *Butyvirio* a některých sinic, ale překvapivě také u některých eukaryot – např. u rozsivek, obrněnek, hlenek. U většiny eukaryotických GSIII se předpokládá, že jsou směřovány do mitochondrií (Ghoshroy a Robertson, 2012). GSIII je podobně jako GSI tvořena 12 podjednotkami uspořádanými ve dvou hexamerních kruzích. Podjednotky jsou ale výrazně větší než u GSI, např. 82,7 kDa GSIII u *Bacteroides fragilis* vůči 51,6 kDa GSI u *Salmonella typhimurium* (van Rooyen *et al.*, 2006). Dalším rozdílem

oproti GSI je uspořádání domén na rozhraní obou kruhů, u GSIII je tvořeno N-koncovou doménou, u GSI C-koncovou (van Rooyen *et al.*, 2011).

Evoluce genů pro GS je složitá a zdaleka není vyřešena - zvláště na eukaryotické úrovni, kde se navíc uplatňovaly přenosy genů během endosymbióz (Ghoshroy a Robertson, 2012). I tak ale může vzhledem k univerzálnímu rozšíření GS posloužit jako gen, u kterého se dá předpokládat clock-like evoluce (Pesole *et al.*, 1991), pokud se vezmou v potaz zmiňované horizontální přenosy genů.

Rostlinné GS (eukaryotického typu GSIIe) se dělí podle lokalizace v buňce na chloroplastové (GS2) o velikosti kolem 45 kDa, které jsou kódovány zpravidla jedním genem, a na skupinu cytosolických GS1 (38-41 kDa), kódovaných rodinou několika genů (Tingey *et al.*, 1988). Výjimkou jsou dva geny pro GS2 u vojtěšky (*Medicago trunculata*), které vznikly duplikací během vývoje bobovitých (Seabra *et al.*, 2010). U *Arabidopsis* patří GS2 mezi duálně cílené proteiny, je směřována jak do plastidů, tak do mitochondrií (Taira *et al.*, 2004). GS1 a GS2 vznikly genovou duplikací původní cytosolické GS, ke které došlo před rozdělením nahosemenných a krytosemenných rostlin (Sáez *et al.*, 2000). GS2 se tvoří především ve fotosyntetických pletivech (listovém a stonkovém chlorenchymu, v dělohách), ale minoritně se vyskytuje i v kořenech. GS1 je lokalizována hlavně v cévních svazcích, konkrétně ve floému. Je dominantní isoformou v kořenech a dalších nefotosyntetických orgánech (Edwards *et al.*, 1990).

U nahosemenných byly objeveny jen cytosolické GS, výjimkou je *Ginkgo*, u kterého se našla i plastidová GS2 (García-Gutiérrez *et al.*, 1998). U jehličnanů se nachází dvě pletivově a funkčně odlišné cytosolické GS. GS1a se vyskytuje hlavně ve fotosyntetických pletivech. Funkcí a regulací se podobá chloroplastové GS2 u krytosemenných. GS1b se nachází v cévních svazcích, je dominantní v kořenech, hypokotylu a v embryu v časně fázi klíčení (Avila *et al.*, 2001).

Glutamin syntetázy jsou regulované hlavně na úrovni transkripce (reakce na světlo, přítomností amonných iontů), ale také podléhají post-translačním modifikacím, mezi které patří fosforylace a vazba 14-3-3 proteinu, regulace thiolových skupin, sumoylace a nitrace tyrosinu (Betti *et al.*, 2012). Exprese genu pro GS2 je indukována světlem přes fytochrom, u GS1 dochází k indukci zprostředkovaně přes sacharózu a další uhlíkaté sloučeniny (Oliveira a Coruzzi, 1999).



## 4. Glutamin syntetázy a metabolismus dusíku

### 4.1 Primární asimilace

Rostliny přijímají dusík z půdy ve formě anorganické (nitrát, amonné ionty) nebo organické (močovina, aminokyseliny). Příjem probíhá přímo kořeny nebo přes mykorhizní síť. Navzdory energetické náročnosti asimilace nitrátu jej většina rostlin preferuje jako zdroj dusíku vzhledem k toxicitě amonných iontů. Existují však výjimky – např. rýže, rostoucí na zaplavovaných polích, využívá hlavně  $\text{NH}_4^+$ . Nitrát je přijímán transportním systémem s nízkou afinitou LATS nebo vysokou afinitou HATS (Andrews *et al.*, 2013). Je známo pět genových rodin přenašečů  $\text{NO}_3^-$ , pro příjem kořeny jsou důležité rodiny NRT1 a NRT2 (Nacry *et al.*, 2013). Nitrát může být uložen do vakuoly, redukován v kořenech anebo transportován do prýtu a teprve tam asimilován za využití redukční síly z fotosyntézy. Jak moc převažuje asimilace nitrátu v kořenech, nebo v prýtu, závisí na genotypu a na podmínkách prostředí, především na obsahu  $\text{NO}_3^-$  v půdě. Transport nitrátu se na delší vzdálenosti uskutečňuje xylémem, i když byl nalezen nitrátový přenašeč i do floému, který zřejmě slouží k lokální redistribuci nitrátu. Transport nitrátu do prýtu úzce souvisí i s transportem kationtů (hlavně  $\text{K}^+$ ). Je třeba zmínit i úlohu nitrátu jako aniontového osmotika při zavírání průduchů (přes nitrátové přenašeče rodiny SLAC1/SLAH) a jeho vliv na vývoj laterálních kořenů (Wang *et al.*, 2012). Asimilace nitrátu probíhá přes cytosolickou nitrát reduktázu a plastidovou nitrit reduktázu (jak bylo zmíněno v kapitole 2). Uvolňované amonné ionty jsou poté zpracovány GS/GOGAT cyklem. Nitrát reduktáza je regulována amonnými ionty a močovinou, NiR pak nitrátem (Andrews *et al.*, 2013). Asimilace nitrátu je snížena v atmosféře se zvýšenou hladinou  $\text{CO}_2$ . Vysvětlením může být, že omezení fotorespirace vede i ke snížení redukováných forem (NADH) v cytoplazmě, a tím utlumení redukce nitrátu na  $\text{NO}_2$  (Bloom *et al.*, 2010). Vysoká koncentrace  $\text{NO}_3^-$ , stejně jako amonných iontů, inhibuje růst. Projevem je chloróza mezi žilkami listu, způsobená nedostatkem železa, protože vyšší koncentrace, resp. příjem  $\text{NO}_3^-$  je spjat s vyšším pH na povrchu kořenů a dochází tak k inhibici příjmu železa (Andrews *et al.*, 2013).

Příjem amonných iontů probíhá hlavně přes vysokoafinitní přenašeče z rodiny AMT. Amonné ionty jsou poté asimilovány v kořenech cytosolickou GS a NADH-GOGAT. Při vysoké koncentraci  $\text{NH}_4^+$  dochází i ke xylémovému transportu do prýtu (Andrews *et al.*, 2013).

Močovina, nejpoužívanější forma dusíku při hnojení, je přijímána kořeny rostlin (aktivním transportérem s vysokou afinitou DUR3 nebo pasivně přes aquaporiny). Močovina

je hydrolyzována ureázou za vzniku CO<sub>2</sub> a amonných iontů, které jsou následně asimilovány GS/GOGAT systémem v cytoplazmě (Witte, 2011).

Primární asimilace v kořenech se účastní hlavně cytosolická GS1, i když nelze opomenout ani minoritně exprimovanou plastidovou GS2. Expres genu pro GS2 se zvyšuje za přítomnosti NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Redinbaugh a Campbell, 1993). Jednotlivé isoformy GS1 mají odlišné kinetické vlastnosti, jinou lokalizaci v kořeni a způsob regulace. Například u *Arabidopsis* nacházíme nízkoafinitní GS1 nazývané GLN1.2 a GLN1.3 a vysokoafinitní GLN1.1 a GLN1.4. Expres *GLN1.2* je zvýšena za přítomnosti amonných iontů, u *GLN1.1* dochází naopak k inhibici. Expres *GLN1.3* je snížena při vysoké koncentraci glutamátu (Ishiyama *et al.*, 2004). Při pokusech na pšenici pěstované za přítomnosti různých zdrojů dusíku (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, močovina a vzájemné kombinace) byla pozorována maximální aktivita GS u rostlin s dodanými amonnými ionty. Nárůst aktivity GS se odehrával v kořenech. Při kombinaci všech tří zdrojů dusíku došlo překvapivě k poklesu kořenové aktivity GS. Autoři navrhuji, že nitrát může stimulovat asimilaci NH<sub>4</sub><sup>+</sup> tím, že aktivuje alternativní dráhy asimilace - přes AS nebo GDH (Garnica *et al.*, 2010).

Příjem dusíku (jakožto i dalších živin) je ovlivněn také symbiotickými vztahy rostlin. Přítomnost arbuskulárně mykorhizní houby má vliv na expresi některých genů pro příjem a zpracování amonných iontů v kořenech rostlin, což bylo prokázáno u rýže pro transportéry AMT či GOGAT2 (Pérez-Tienda *et al.*, 2014). Zvláštní situace je u rostlin se symbiotickými fixátory vzdušného dusíku (většina luštěnin, cukrová třtina, rýže aj.). Bakteriální enzym nitrogenáza (EC 1.18.6.1) katalyzuje redukci vzdušného dusíku až na amonné ionty (Franché *et al.*, 2009). Tyto ionty jsou následně fixovány aktivitou GS - v hlízkách luštěnin se tvoří hlavně specifická isoforma GS1, ale i GS2, která se na celkové aktivitě GS v hlízkách podílí kolem 40 %. U mutantů v genu pro GS2 byl pozorován negativní vliv fotorespirace na nodulaci a fixaci dusíku, např. úbytek škrobových zrn, menší hustota bakteroidů. Tyto projevy se nedostavily v atmosféře s vyšším obsahem CO<sub>2</sub> (García-Calderón *et al.*, 2012). Asimilovaný dusík je transportován do zbytku rostliny v podobě amidů (Gln, Asn) u luštěnin mírného pásu nebo ureidů (allantoin, kyselina allantová) u tropických zástupců (Todd *et al.*, 2006).

## 4.2 Reasimilace amonných iontů

### 4.2.1 Fotorespirace

Fotorespirace zahrnuje soubor reakcí vyvolaných oxygenázovou aktivitou enzymu rubisco, kterými se rostliny a další fotosyntetizující organismy snaží vyrovnat s jejími negativními důsledky. Fotorespirace probíhá v chloroplastech, peroxizómech, mitochondriích, ale i v cytoplazmě. Zdá se, že na enzymatické úrovni se jedná o dobře popsany proces, současný výzkum je zaměřen hlavně na hledání transportních systémů a na cílené modifikace vedoucí k potlačení fotorespirace (Eisenhut *et al.*, 2013). Pro studium fotorespirace byl klíčový objev tzv. fotorespiračních mutantů, kteří jsou letální v normální atmosféře, ale přežívají v atmosféře s vyšší koncentrací CO<sub>2</sub> (> 0,2 %) potlačující fotorespiraci. První popsany fotorespirační mutant měl poškozený gen pro fosfoglykolát fosfatázu (EC 3.1.3.18; Somerville a Ogren, 1979).

Jak už bylo zmíněno v kapitole 2, během fotorespirace jsou amonné ionty uvolňovány glycin dekarboxylázovým komplexem (GDC). Asimilace uvolněných NH<sub>4</sub><sup>+</sup> iontů je zajišťována GS2/Fd-GOGAT cyklem, což je zřejmé z lokalizace isoform příslušných enzymů v rámci pletiv a z charakterizace fotorespiračních mutantů.

V prýtu rostlin se GS2, stejně jako Fd-GOGAT, tvoří hlavně ve fotosyntetických pletivech, zatímco cytosolická GS1 a NADH-GOGAT se nachází v cévních svazcích, především ve floému (Edwards *et al.*, 1990; Potel *et al.*, 2009). Obdobný způsob lokalizace najdeme i u jednoděložných rostlin. Například u pšenice se GS2 tvoří v parenchymatických buňkách mezofylu a pochvy cévních svazků. Cytosolická isoforma GSr (GS roots, historicky objevena jako specifická pro kořeny) se nachází v sítkovicích a v parenchymatických buňkách přilehlých ke xylémovým buňkám. Další cytosolická isoforma GS1 se nalézá v pochvě cévních svazků (Bernard *et al.*, 2008). U kukuřice však byla nalezena cytosolická GS1-3 i v mezofylových buňkách (Martin *et al.*, 2006). Rozdílnou lokalizaci cytosolických GS najdeme i u jehličnanů – GS1a je typická pro fotosyntetická pletiva a zastává zde obdobnou funkci jako plastidová GS2 u krytosemenných rostlin, GS1b se nachází v cévních svazcích (Avila *et al.*, 2001).

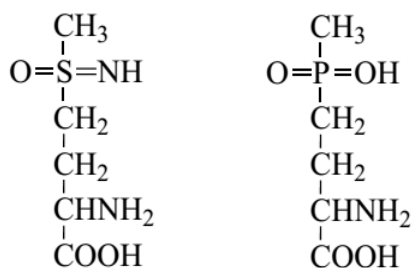
Zatímco fotorespirační mutanti s poškozeným genem pro Fd-GOGAT byli nalezeni u různých rostlinných druhů (*Arabidopsis*, ječmen, hrách, tabák), překvapivě mutanti v GS2 byli popsáni pouze u ječmene a štirovníku (Betti *et al.*, 2012). Po mutagenезi azidem byli u ječmene získáni fotorespirační mutanti se sníženou aktivitou GS na 20-27 % v porovnání s normálními rostlinami. Po vystavení těchto fotorespiračních mutantů běžné atmosféře

docházelo během 2-3 dnů ke chloróze a bylo pozorováno zvýšení koncentrace amonných iontů v listech. Cytosolická GS byla v listech přítomna, jednalo se tedy o mutanty v GS2. Aktivity Fd-GOGAT a GDH zůstaly stejné jako u nemutovaných rostlin (Wallsgrave *et al.*, 1987). Obdobným způsobem byli získáni mutanti v GS2 u štirovníku (*Lotus japonicus*) s přibližně 30% aktivitou GS v listech. Popsaní mutanti se označují *Ljgln2-1* a *Ljgln2-2*. Letalita těchto mutantů se projevila až po delším vystavení normální atmosféře. U mutantů nebyla detekována GS2 ani v kořenech (Orea *et al.*, 2002).

Letalita za podmínek vedoucích k fotorespiraci byla pozorována i u rostlin tabáku, které exprimovaly gen pro GS2 v antisense orientaci. Byly získány tři transgenní linie – aktivita GS2 v listech klesla na 45 %, 36 % a 56 % aktivity u kontrolních rostlin. Po přenosu těchto transgenních rostlin do normální atmosféry se dostavily projevy chlorózy a došlo k předčasnému kvetení, semena se však netvořila (Migge a Becker, 2000).

Pokusy najít fotorespirační mutanty v GS2 u *Arabidopsis* byly neúspěšné. Bylo navrhováno několik vysvětlení: 1. Screening nebyl dostatečně velký, i když to se zdá nepravděpodobné vzhledem k izolování 58 mutantů v genu pro Fd-GOGAT. 2. Cytosolická GS se tvoří i v mezofylových buňkách, což bylo v rozporu s pozorováním u tabáku a rýže. 3. U *Arabidopsis* je další gen pro GS2, což již bylo popřeno sekvenací genomu. 4. Mutace v GS2 je letální i při zvýšené koncentraci oxidu uhličitého (Lam *et al.*, 1996). Nejpravděpodobnější se zdá být vysvětlení 2 vzhledem k tomu, že u kukuřice se jedna z isoform GS1 nachází v mezofylu (Martin *et al.*, 2006).

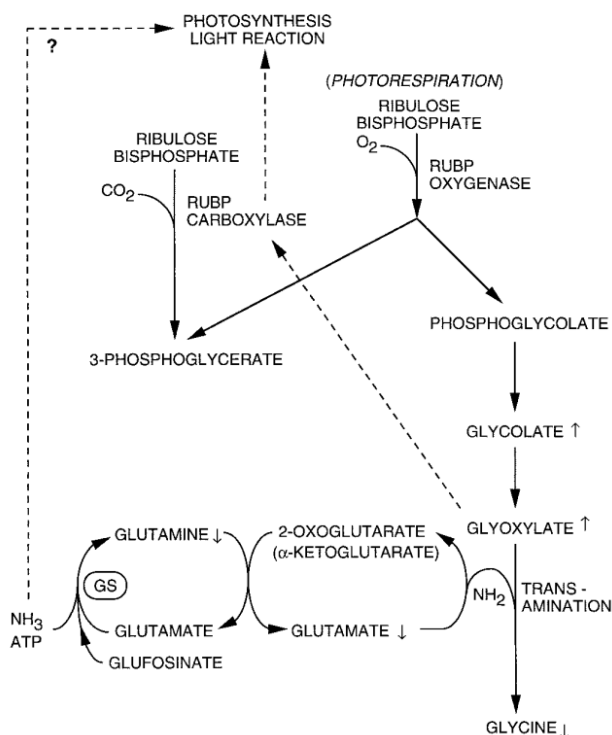
Význam GS pro fotorespirační cyklus je dokumentován i důsledky její specifické inhibice sloučeninami fosfinitricinem (PPT; synonymum L-glufosinát) nebo methionin sulfoximinem (MSO; viz Obr. 11; Evstigneeva *et al.*, 2003).



**Obr. 11 - Vzorce methionin sulfoximinu (MSO) a fosfinitricinu (PPT).** Převzato z Evstigneeva *et al.*, 2003.

Nutno však podotknout, že těmito látkami dochází k inhibici jak plastidové, tak cytosolické GS. Fosfinitricin je účinnou složkou běžně používaných komerčních herbicidů Basta nebo Liberty. Po působení PPT dochází během 3-5 dnů k chloróze, která je následována nekrózou (během 1-2 týdnů). Usuzuje se, že prvotní příčinou není akumulace toxických

amonných iontů, nýbrž nedostatek donorů aminoskupiny (viz Obr. 12), konkrétně glutamátu pro transaminační reakci glyoxylátu na glycin ve fotorespiračním cyklu, což vede k akumulaci fosfoglykolátu, glykolátu a glyoxylátu, který inhibuje fotosyntézu (Hess, 2000).



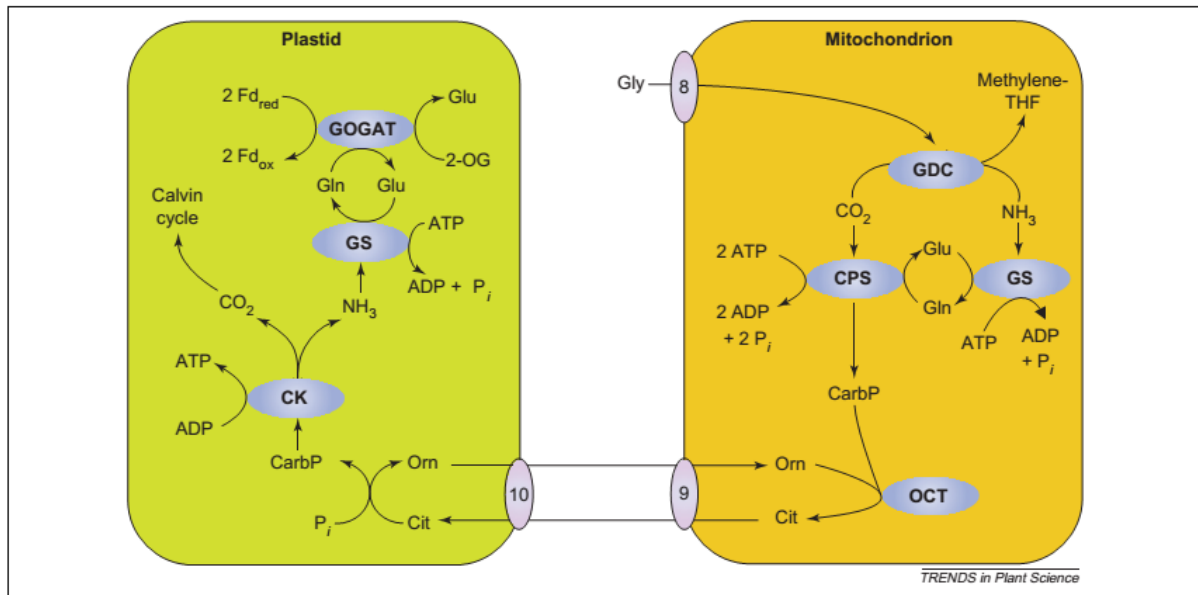
**Obr. 12 - Schéma účinku fosfinitricinu (L-glufosinátu), specifického inhibitoru glutamin syntetázy (GS).** Glufosinát se nevratně váže do vazebného místa pro glutamát. Nedochozí tak k syntéze glutaminu, následně ani k syntéze glutamátu, což vede k hromadění glyoxylátu a glykolátu. Zvýšená hladina glyoxylátu inhibuje enzym rubisco. Převzato z Hess, 2000.

Geny zajišťující rezistenci k fosfinitricinu - *bar* nebo *pat* geny kódující fosfinitricin N-acetyltransferázu (EC 2.3.2.183), která přeměňuje PPT na neaktivní N-acetylfosfinitricin - byly vneseny do genomu některých kulturních plodin (např. kukuřice, bavlník). Tyto geneticky modifikované plodiny jsou komerčně využívány (Tan *et al.*, 2006).

Klasickou představu o fotorespiračním cyklu narušuje fakt, že minimálně u *Arabidopsis thaliana* je GS2 směřována jak do plastidů, tak i do mitochondrií, jak bylo zjištěno pomocí fluorescenčního značení (GLN2::GFP) i analýzou proteinů z purifikovaných mitochondrií a plastidů. Naskytá se tak možnost, že amonné ionty jsou rovnou asimilovány v mitochondriích. Produkty asimilace by měly být transportovány do chloroplastů, kde se nachází Fd-GOGAT (Taira *et al.*, 2004). Jsou navrhovány dvě transportní cesty: citrulin-ornithinová a glutamát-glutaminová (Linka a Weber, 2005).

Citrulin-ornithinovou dráhu začíná karbamoylfosfát syntetáza (CPS), která využívá glutamin, CO<sub>2</sub> a dvě ATP. Vzniklý karbamoylfosfát je následně přeměněn ornithin karbamoyltransferázou (OCT, EC 2.1.3.3) na citrulin, který je transportován do chloroplastů.

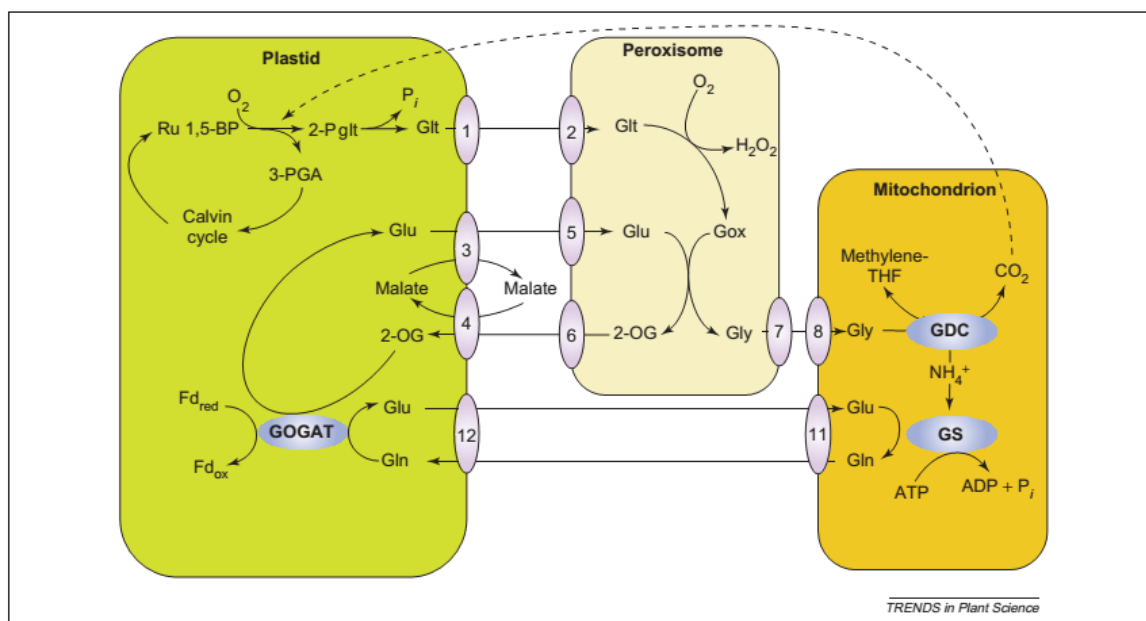
Tam dochází k přeměně zpátky na ornithin a karbamoylfosfát, který je karbamát kinázou (CK, EC 2.7.2.2) rozložen na  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{CO}_2$  (viz Obr. 13). Transportéry ornithinu a citrulinu byly popsány u kvasinek a savců, avšak u rostlin nebyly zatím identifikovány konkrétní proteiny, i když podle pokusů s izolovanými mitochondriemi a chloroplasty se zdá, že k transportu dochází. Popsaná dráha je dosti energeticky náročná. Výhodou zůstává, že zahrnuje přenos  $\text{CO}_2$  z mitochondrií do chloroplastů, kde může být znovu fixován v Calvinově cyklu (Linka a Weber, 2005).



**Obr. 13 – Schéma citrulin-ornithinové dráhy.**

CarbP – karbamoylfosfát Cit – citrulin, CK – karbamát kináza, CPS – karbamoylfosfát syntetáza, Fd- ferredoxin, GOGAT – glutamát syntáza, GS – glutamin syntetáza, Orn – ornithin, PEP – fosfoenolpyruvát, THF – tetrahydrofolát, 2-OG – 2-oxoglutarát, vyznačené transportéry: 8 - mitochondriální transportér glycinu, 9 a 10 – ornithin-citrulinový translokátor. Převzato z Linka a Weber, 2005.

U glutamát-glutaminové dráhy by docházelo přímo k transportu Gln z mitochondrií do chloroplastů (viz Obr. 14, str. 17). Na izolovaných chloroplastech byl nalezen Gln-Glu antiportér, avšak jen velmi málo je známo o mitochondriálních přenašečích aminokyselin - neví se, jestli a jakým způsobem je transportován glutamin z mitochondrií. Tato méně energeticky náročná dráha popisuje jen transport amonných iontů, přenos  $\text{CO}_2$  by závisel pouze na prosté difúzi (Linka a Weber, 2005).



**Obr. 14 – Schéma navrhované glutamát-glutaminové dráhy.**

Fd- ferredoxin, GDC – glycin dekarboxylázový komplex, Glt – glykolát, GOGAT – glutamát syntáza, Gox – glyoxylát, GS – glutamin syntetáza, Orn – ornithin, Ru 1,5-BP – ribulóza-1,5-bisfosfát THF – tetrahydrofolát, 2-P-glt – 2-fosfoglykolát, 2-OG – 2-oxoglutarát, 3-PGA -3- fosfoglycerát. Pro zjednodušení je vynechána přeměna serinu na 3-fosfoglycerát. Číslicemi jsou označeny jednotlivé druhy přenašečů. Převzato z Linka a Weber, 2005.

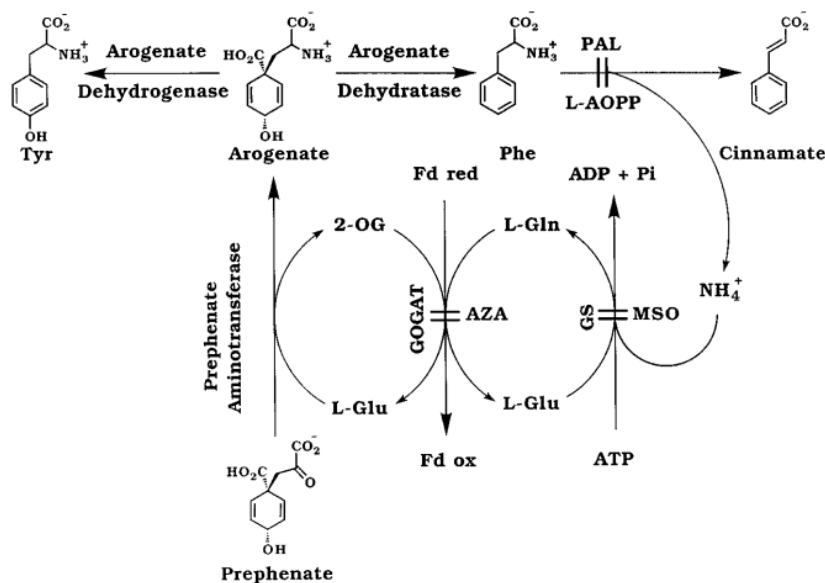
Do úvah o mitochondriální asimilaci  $\text{NH}_4^+$  musíme zahrnout zjištění, že Fd-GOGAT se také aspoň částečně nachází v mitochondriích. Fd-GOGAT v mitochondriích fyzicky interaguje se serin hydroxymethyltransferázou (SHMT). Vzhledem k přítomnosti fotorespiračního mutanta v genu pro Fd-GOGAT, který se projevuje sníženou aktivitou SHMT, se zdá, že má Fd-GOGAT vliv na funkci SHMT během fotorespirace, i když pro tuto funkci asi nejsou podstatné vlastní katalytické vlastnosti Fd-GOGAT (Jamai *et al.*, 2009). Úloha Fd-GOGAT v mitochondriích tak zůstává ne zcela objasněna.

Zvýšení exprese *GS1* ve fotosynteticky aktivních pletivech vede ke zvýšení biomasy, obsahu proteinů, chlorofylu. V případě transgenního topolu byly provedeny již polní zkoušky (Jing *et al.*, 2004). Kromě zvýšeného růstu a využitelnosti dusíku bylo však pozorováno v některých studiích i předčasné kvetení a senescence. Rozporuplné výsledky v některých případech zvýšení exprese *GS1* ukazují, že záleží na zvoleném rostlinném druhu, použitém konstrukt a hlavně promotoru (Good *et al.*, 2004).

Zvýšení exprese *GS2* však paradoxně nevedlo k podobným výsledkům jako u *GS1*. I když byla zvýšena hladina transkriptu až osmnáctkrát, došlo ke zvýšení GS aktivity v listech pouze dvakrát, což je vysvětlováno post-transkripční kontrolou akumulace *GS2* (Migge *et al.*, 2000).

## 4.2.2 Metabolismus fenylpropanoidů

Metabolismus fenylpropanoidů se uplatňuje při biosyntéze ligninů, lignanů, suberinů, flavonoidů, taninů. Tyto fenolické látky významně ovlivnily adaptaci rostlin na suchozemský život - zajišťují zpevnění rostlinného těla, pigmentaci, ochranu při abiotickém i biotickém stresu, jsou součástí signalizačních drah. Klíčovým enzymem metabolismu fenylpropanoidů je fenylalanin amonium lyáza (PAL, viz kapitola 2), která zajišťuje deaminaci tyrosinu a fenylalaninu. Při biosyntéze ligninu jsou potřeba i donory methylové skupiny, jejichž hlavním zdrojem je serin hydroxymethyltransferáza (SHMT), která funkčně navazuje na glycin dekarboxylázový komplex. V obou případech se uvolňují amonné ionty (Cantón *et al.*, 2005). Je možné, že právě asimilace  $\text{NH}_4^+$  je kontrolním bodem v regulaci biosyntézy ligninu. Předpokládá se, že dochází k recyklaci amonných iontů (viz Obr. 15) - po asimilaci  $\text{NH}_4^+$  GS/GOGAT cyklem je vzniklý glutamát přeměněn na arogenát, který je prekurzorem tyrosinu a fenylalaninu (van Heerden *et al.*, 1996).



Obr. 15 - Schéma popisující recyklování amonných iontů v metabolismu fenylpropanoidů.

L-AOPP – L-2-aminooxy-3-fenylpropionová kyselina AZA – azaserin (inhibitor GOGAT), GOGAT – glutamát syntáza, GS – glutamin syntetáza, MSO – methionin sulfoximin (inhibitor GS), PAL – fenylalanin amonium lyáza. Převzato z Heerden *et al.*, 1996.

U jehličnanů je s biosyntézou ligninu spjata cytosolická GS1b. Promotor genu pro GS1b obsahuje tři AC elementy, které jsou přítomné i u promotorů pro PAL a další enzymy, které se nachází v cévních svazcích a účastní se biosyntézy fenylpropanoidů (Gómez-Maldonado *et al.*, 2004). Vzhledem k tomu, že Fd-GOGAT se tvoří v kmeni a kořenech borovice jen v malém množství, předpokládá se, že asimilace  $\text{NH}_4^+$  se v lignifikujících



buňkách účastní NADH-GOGAT. Nelze vyloučit i zapojení enzymů AS a GDH (Cantón *et al.*, 2005).

### 4.3 Remobilizace dusíku

Jedním z příkladů remobilizace dusíku je tvorba zásobní proteinů semen a jejich následné štěpení a zpracování během klíčení. Pro transport dusíku do semen je podstatná cytosolická GS1 (geny *Gln1*), zpravidla její určitá isoforma. U kukuřice byli zkoumáni mutanti *gln1-4* a *gln1-3*. Isoforma Gln1-3, která se tvoří v mezofylových buňkách, má vliv na počet zrn. U mutanta v genu pro Gln1-4, který je exprimován specificky v listové pochvě, došlo ke zmenšení zrn. U obou mutantů i dvojitého mutanta byl pozorován pokles hladiny aminokyselin (kromě glutamátu) ve floémovém toku. Při zvýšení exprese *Gln1-3* se zvýšil výnos zrn až o 30 % v porovnání s kontrolními rostlinami (Martin *et al.*, 2006). U vojtěšky (*Medicago trunculata*) se účastní při plnění semen, na rozdíl od většiny ostatních druhů rostlin, jeden ze dvou paralogů plastidové GS2 (označovaný *MtGS2b*), který vznikl při relativně nedávné duplikaci (Seabra *et al.*, 2010).

U jehličnanů jsou zásobní proteiny v semenech bohaté na arginin, aminokyselinu, která má relativně nejvyšší obsah dusíku a slouží během klíčení jako zdroj dusíku pro syntézu aminokyselin a proteinů. Ve vyvíjejících se dělohách se výrazně tvoří argináza, která štěpí arginin za vzniku ornithinu a močoviny, kterou následně odbourává ureáza (viz kapitola 2). Uvolněné amonné ionty jsou v počáteční fázi klíčení asimilovány GS1b, která se tvoří v buňkách prokambia v hypokotylu, v místech budoucích cévních svazků (Cantón *et al.*, 2005). Exprese genu pro GS1b je regulována gibereliny - promotor *GS1b* u borovice totiž obsahuje element inducibilní ke kyselině giberelové (Gómez-Maldonado *et al.*, 2004).

Pro víceleté rostliny je velmi důležité hospodaření s dusíkem v závislosti na sezónních změnách. U mnoha stromů dochází na podzim k remobilizaci dusíku a uhlíku z listů a k jejich uložení v podobě VSP (vegetative storage proteins) v trvalých pletivech, odkud můžou být znovu využity na jaře. K tvorbě VSP dochází však i u jehličnanů (Cantón *et al.*, 2005).

Senescence je komplexním procesem, při kterém dochází k řízené degradaci makromolekul v určitém orgánu a následnému zpracování a uložení komponent do jiných částí rostliny. Během degradace chlorofylu, proteinů a dalších látek dochází k uvolňování amonných iontů, které jsou zpracovány GS a dalšími enzymy na transportní formy dusíku - hlavně glutamin a asparagin (Buchanan-Wollaston, 1997). Během senescence listů dochází k poklesu hladiny GS2, tedy i celkové aktivity GS. Naopak se začne v mezofylových buňkách hromadit GS1, zpravidla isoforma typická právě pro remobilizaci. Vysoká hladina GS1

zůstává i v cévních svazcích, zároveň narůstá i exprese genů pro AS nebo NADH-GDH. Vytvářený glutamin a asparagin jsou transportovány floémem (Brugière *et al.*, 2000).

Projevy senescence mohou být vyvolané nejen stářím, ale i působením stresu. Jednou z klíčových molekul odpovědi na stres je prolin, který se tvoří a hromadí v reakci na sucho, salinitu, vysokou ozáření, UV záření, přítomnost těžkých kovů (např. kadmium) v substrátu nebo biotický stres (Szabados a Saviouré, 2010). Výraznou úlohu má prolin při detoxifikaci kyslíkových radikálů, i když samotná molekula prolinu je zřejmě nezachycuje (Signorelli *et al.*, 2013). V rostlinách je prolin syntetizován zejména z glutamátu, alternativně pak z ornithinu. Prolin se tvoří i nezávisle na stresu, najdeme ho především v rychle se dělících pletivech (např. kořenová špička, květní meristém), výrazně je zastoupen i v semenech a pylu (Lehmann *et al.*, 2010).

Význam floémově specifické GS1 v produkci prolinu (v reakci na vysokou salinitu) byl prokázán u tabáku se sníženou expresí příslušného genu (*Gln1-5*) pomocí antisense RNA (Brugière *et al.*, 1999). Zvýšení exprese *GS1* naopak zvyšuje odolnost k suchu. I při dlouhodobém působení sucha zůstávala v listech topolu vysoká koncentrace chlorofylu, proteinu rubisco a dalších proteinů. Navzdory zavřeným průduchům nedošlo k poškození fotorespiračního aparátu – zvýšená hladina GS1 navyšovala kapacitu fotorespirace, která odčerpává nadbytečné elektrony a chrání před fotooxidací (El-Khatib *et al.*, 2004).

U plastidové GS2 je situace komplikovanější. U mutanta štírovníku *Ljgln2-2* se při suchu tvořilo méně prolinu a došlo k vážnějšímu oxidativnímu poškození. Usuzuje se, že biosyntéza prolinu v plastidech se podílí kolem 40 % na akumulaci prolinu během stresu, zbytek syntézy se odehrává v cytoplazmě. Dokonce je navrhováno, že právě v plastidech probíhá biosyntéza prolinu indukovaná stresem (Díaz *et al.*, 2010). Při zvýšení exprese *GS2* u tabáku byla pozorována větší tolerance k fotooxidaci během vysoké ozáření díky zvýšení kapacity fotorespirace (Kozaki a Takeba, 1996). Obdobný vliv má zvýšení exprese *GS2* na ochranu fotosystémů před oxidativním poškozením v případě vysoké salinity. Autoři navrhují, že overexprese *GS2* vede možná i ke zvýšení tolerance k chladu (Hoshida *et al.*, 2000).

## 5. Závěr

V předcházejících odstavcích jsem se pokusila podat ucelený náhled na úlohu glutamin syntetázy v rámci metabolismu dusíku v rostlinách. Na první pohled se tato problematika jeví jako poměrně dobře probádaná, avšak v některých oblastech zůstává řada nejasností. Mezi nevyjasněné otázky patří např. úloha GS2 v mitochondriích během fotorespirace u *Arabidopsis* a není uspokojivě vyřešena ani možnost zpracování amonných iontů glutamát dehydrogenázou, tedy nahraditelnost funkce GS. Zarážející je i skutečnost, že u *Arabidopsis* nebyli dosud nalezeni fotorespirační mutanti v genu pro GS2. Nelze proto vyloučit, že funkci GS2 při fotorespiraci mohou převzít i cytosolické GS1, i když se v listech tvoří většinou jen v cévních svazcích. Řešení této otázky bych se ráda dotkla i ve své diplomové práci zaměřené primárně na zkoumání indukované letálnosti rostlin vyvolané inaktivací genů pro GS pomocí RNA interference.

## 6. Seznam použité literatury

- Adámková Š, Luhová L, Petřivalský M, Peč P, 2006. Role L-fenylaalaninamoniumlyasy při obranné reakci rostlin. *Chemické Listy* **100**, 486–494.
- Almassy RJ, Janson CA, Hamlin R, Xuong NH, Eisenberg D, 1986. Novel subunit-subunit interactions in the structure of glutamine synthetase. *Nature* **323**, 304–309.
- Andrews M, Raven JA, Lea PJ, 2013. Do plants need nitrate? The mechanisms by which nitrogen form affects plants. *Annals of Applied Biology* **163**, 174–199.
- Avila C, Suárez MF, Gómez-Maldonado J, Cánovas FM, 2001. Spatial and temporal expression of two cytosolic glutamine synthetase genes in Scots pine: functional implications on nitrogen metabolism during early stages of conifer development. *The Plant Journal* **25**, 93–102.
- Bauwe H, Kolukisaoglu U, 2003. Genetic manipulation of glycine decarboxylation. *Journal of Experimental Botany* **54**, 1523–1535.
- Bernard SM, Møller ALB, Dionisio G, Kichey T, Jahn TP, Dubois F, Baudo M, Lopes MS, Tercé-Laforgue T, Foyer CH, Parry MAJ, Forde BG, Araus JL, Hirel B, Schjoerring JK, Habash DZ, 2008. Gene expression, cellular localisation and function of glutamine synthetase isozymes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Molecular Biology* **67**, 89–105.
- Betti M, García-Calderón M, Pérez-Delgado CM, Credali A, Estivill G, Galván F, Vega JM, Márquez AJ, 2012. Glutamine synthetase in legumes: recent advances in enzyme structure and functional genomics. *International Journal of Molecular Sciences* **13**, 7994–8024.
- Bhatnagar L, Zeikus JG, Aubert JP, 1986. Purification and characterization of glutamine synthetase from the archaeobacterium *Methanobacterium ivanovi*. *Journal of Bacteriology* **165**, 638–643.

- Bloom AJ, Burger M, Rubio Asensio JS, Cousins AB, 2010. Carbon dioxide enrichment inhibits nitrate assimilation in wheat and Arabidopsis. *Science* **328**, 899–903.
- Britto DT, Kronzucker HJ, 2002. Review NH<sub>4</sub><sup>+</sup> toxicity in higher plants : a critical review. *Journal of Plant Physiology* **159**, 567–584.
- Britto DT, Siddiqi MY, Glass ADM, Kronzucker HJ, 2001. Futile transmembrane NH<sub>4</sub><sup>+</sup> cycling: a cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 4255–4258.
- Brugière N, Dubois F, Limami AM, Lelandais M, Roux Y, Sangwan RS, Hirel B, 1999. Glutamine synthetase in the phloem plays a major role in controlling proline production. *The Plant Cell* **11**, 1995–2012.
- Brugière N, Dubois F, Masclaux C, Sangwan RS, Hirel B, 2000. Immunolocalization of glutamine synthetase in senescing tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves suggests that ammonia assimilation is progressively shifted to the mesophyll cytosol. *Planta* **211**, 519–527.
- Buchanan-Wollaston V, 1997. The molecular biology of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* **48**, 181–199.
- Cantón FR, Suárez MF, Cánovas FM, 2005. Molecular aspects of nitrogen mobilization and recycling in trees. *Photosynthesis Research* **83**, 265–278.
- Carlson TA, Chelm BK, 1986. Apparent eukaryotic origin of glutamine synthetase II from the bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Nature* **322**, 568–570.
- Díaz P, Betti M, Sánchez DH, Udvardi MK, Monza J, Márquez AJ, 2010. Deficiency in plastidic glutamine synthetase alters proline metabolism and transcriptomic response in *Lotus japonicus* under drought stress. *The New Phytologist* **188**, 1001–1013.
- Doskočilová A, Plíhal O, Volc J, Chumová J, Kourová H, Halada P, Petrovská B, Binarová P, 2011. A nodulin/glutamine synthetase-like fusion protein is implicated in the regulation of root morphogenesis and in signalling triggered by flagellin. *Planta* **234**, 459–476.
- Dubois F, Tercé-Laforgue T, Gonzalez-Moro M-B, Estavillo J-M, Sangwan R, Gallais A, Hirel B, 2003. Glutamate dehydrogenase in plants: is there a new story for an old enzyme? *Plant Physiology and Biochemistry* **41**, 565–576.
- Edwards JW, Walker EL, Coruzzi GM, 1990. Cell-specific expression in transgenic plants reveals nonoverlapping roles for chloroplast and cytosolic glutamine synthetase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 3459–3463.
- Eisenhut M, Pick T, Bordych C, Weber A, 2013. Towards closing the remaining gaps in photorespiration - the essential but unexplored role of transport proteins. *Plant Biology* **15**, 676–685.
- El-Khatib RT, Hamerlynck EP, Gallardo F, Kirby EG, 2004. Transgenic poplar characterized by ectopic expression of a pine cytosolic glutamine synthetase gene exhibits enhanced tolerance to water stress. *Tree Physiology* **24**, 729–736.
- Elliott WH, 1953. Isolation of glutamine synthetase and glutamotransferase from green peas. *The Journal of Biological Chemistry* **201**, 661–672.

- Evstigneeva ZG, Solov'eva N, Sidel'nikova L, 2003. Methionine sulfoximine and phosphinothrycin: A review of their herbicidal activity and effects on glutamine synthetase. *Applied Biochemistry and Microbiology* **39**, 539–543.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2012 – Current world fertilizer trends and outlooks to 2016, dostupné na <ftp://ftp.fao.org/ag/agp/docs/cwfto16.pdf>
- Franche C, Lindström K, Elmerich C, 2009. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil* **321**, 35–59.
- García-Calderón M, Chiurazzi M, Espuny MR, Márquez AJ, 2012. Photorespiratory metabolism and nodule function: behavior of *Lotus japonicus* mutants deficient in plastid glutamine synthetase. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**, 211–219.
- García-Gutiérrez A, Dubois F, Cantón FR, Gallardo F, Sangwan RS, Cánovas FM, 1998. Two different modes of early development and nitrogen assimilation in gymnosperm seedlings. *The Plant Journal* **13**, 187–199.
- Garnica M, Houdusse F, Zamarreño AM, Garcia-Mina JM, 2010. Nitrate modifies the assimilation pattern of ammonium and urea in wheat seedlings. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **90**, 357–369.
- Gaufichon L, Reisdorf-Cren M, Rothstein SJ, Chardon F, Suzuki A, 2010. Biological functions of asparagine synthetase in plants. *Plant Science* **179**, 141–153.
- Ghoshroy S, Binder M, Tartar A, Robertson DL, 2010. Molecular evolution of glutamine synthetase II: Phylogenetic evidence of a non-endosymbiotic gene transfer event early in plant evolution. *BMC Evolutionary Biology* **10**, 198.
- Ghoshroy S, Robertson DL, 2012. Molecular evolution of glutamine synthetase II and III in the chromalveolates. *Journal of Phycology* **48**, 768–783.
- Gómez-Maldonado J, Cánovas FM, Avila C, 2004. Molecular analysis of the 5'-upstream region of a gibberellin-inducible cytosolic glutamine synthetase gene (GS1b) expressed in pine vascular tissue. *Planta* **218**, 1036–1045.
- Good AG, Shrawat AK, Muench DG, 2004. Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? *Trends in Plant Science* **9**, 597–605.
- Hess FD, 2000. Light-dependent herbicides: an overview. *Weed Science* **48**, 160–170.
- Hoshida H, Tanaka Y, Hibino T, Hayashi Y, Tanaka A, Takabe T, 2000. Enhanced tolerance to salt stress in transgenic rice that overexpresses chloroplast glutamine synthetase. *Plant Molecular Biology* **43**, 103–111.
- Chen Q, Silflow CD, 1996. Isolation and characterization of glutamine synthetase genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* **112**, 987–996.
- Ireland RJ, Joy KW, 1983. Subcellular localization of asparaginase and asparagine aminotransferase in *Pisum sativum* leaves. *Plant Physiology* **72**, 1127–1129.

- Ishiyama K, Inoue E, Watanabe-Takahashi A, Obara M, Yamaya T, Takahashi H, 2004. Kinetic properties and ammonium-dependent regulation of cytosolic isoenzymes of glutamine synthetase in Arabidopsis. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 16598–16605.
- Jamai A, Salomé PA, Schilling SH, Weber APM, McClung CR, 2009. Arabidopsis photorespiratory serine hydroxymethyltransferase activity requires the mitochondrial accumulation of ferredoxin-dependent glutamate synthase. *The Plant Cell* **21**, 595–606.
- Jing ZP, Gallardo F, Pascual MB, Sampalo R, Romero J, De Navarra AT, Cánovas FM, 2004. Improved growth in a field trial of transgenic hybrid poplar overexpressing glutamine synthetase. *New Phytologist* **164**, 137–145.
- Kozaki A, Takeba G, 1996. Photorespiration protects C3 plants from photooxidation. *Nature* **384**, 557–560.
- Kronzucker HJ, Britto DT, Davenport RJ, Tester M, 2001. Ammonium toxicity and the real cost of transport. *Trends in Plant Science* **6**, 335–337.
- Kumada Y, Benson DR, Hillemann D, Hosted TJ, Rochefort DA, Thompson CJ, Wohlleben W, Tateno Y, 1993. Evolution of the glutamine synthetase gene, one of the oldest existing and functioning genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 3009–3013.
- Lam H-M, Coschigano KT, Oliveira IC, Melo-Oliveira R, Coruzzi GM, 1996. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**, 569–593.
- Lea PJ, Mifflin BJ, 1974. Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature* **251**, 614–616.
- Lea PJ, Mifflin BJ, 2003. Glutamate synthase and the synthesis of glutamate in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**, 555–564.
- Lehmann S, Funck D, Szabados L, Rentsch D, 2010. Proline metabolism and transport in plant development. *Amino Acids* **39**, 949–962.
- Li B, Li G, Kronzucker HJ, Baluška F, Shi W, 2014. Ammonium stress in Arabidopsis: signaling, genetic loci, and physiological targets. *Trends in Plant Science* **19**, 107–114.
- Liepman AH, Olsen LJ, 2001. Peroxisomal alanine: glyoxylate aminotransferase (AGT1) is a photorespiratory enzyme with multiple substrates in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* **25**, 487–498.
- Linka M, Weber APM, 2005. Shuffling ammonia between mitochondria and plastids during photorespiration. *Trends in Plant Science* **10**, 461–465.
- Llorca O, Betti M, González J, Valencia A, Márquez AJ, Valpuesta JM, 2006. The three-dimensional structure of an eukaryotic glutamine synthetase: Functional implications of its oligomeric structure. *Journal of Structural Biology* **156**, 469–479.
- Martin A, Lee J, Kichey T *et al.*, 2006. Two cytosolic glutamine synthetase isoforms of maize are specifically involved in the control of grain production. *The Plant Cell* **18**, 3252–3274.

- Mathis R, Gamas P, Meyer Y, Cullimore J, 2000. The presence of GSI-like genes in higher plants: support for the paralogous evolution of GSI and GSII genes. *Journal of Molecular Evolution* **50**, 116–122.
- Migge A, Becker TW, 2000. Greenhouse-grown conditionally lethal tobacco plants obtained by expression of plastidic glutamine synthetase antisense RNA may contribute to biological safety. *Plant Science* **153**, 107–112.
- Migge A, Carrayol E, Hirel B, Becker TW, 2000. Leaf-specific overexpression of plastidic glutamine synthetase stimulates the growth of transgenic tobacco seedlings. *Planta* **210**, 252–260.
- Michalska K, Jaskolski M, 2006. Structural aspects of L-asparaginases, their friends and relations. *Acta Biochimica Polonica* **53**, 627–640.
- Nacry P, Bouguyon E, Gojon A, 2013. Nitrogen acquisition by roots: physiological and developmental mechanisms ensuring plant adaptation to a fluctuating resource. *Plant and Soil* **370**, 1–29.
- Oliveira IC, Coruzzi GM, 1999. Carbon and amino acids reciprocally modulate the expression of glutamine synthetase in Arabidopsis. *Plant Physiology* **121**, 301–309.
- Orea A, Pajuelo P, Pajuelo E, Quidiello C, Romero JM, Márquez AJ, 2002. Isolation of photorespiratory mutants from *Lotus japonicus* deficient in glutamine synthetase. *Physiologia Plantarum* **115**, 352–361.
- Pérez-Tienda J, Corrêa A, Azcón-Aguilar C, Ferrol N, 2014. Transcriptional regulation of host NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transporters and GS/GOGAT pathway in arbuscular mycorrhizal rice roots. *Plant Physiology and Biochemistry* **75**, 1–8.
- Pesole G, Bozzetti MP, Lanave C, Preparata G, Saccone C, 1991. Glutamine synthetase gene evolution: A good molecular clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 522–526.
- Pesole G, Gissi C, Lanave C, Saccone C, 1995. Glutamine synthetase gene evolution in bacteria. *Molecular Biology and Evolution* **12**, 189–197.
- Potel F, Valadier M-H, Ferrario-Méry S, Grandjean O, Morin H, Gaufichon L, Boutet-Mercey S, Lothier J, Rothstein SJ, Hirose N, Suzuki A, 2009. Assimilation of excess ammonium into amino acids and nitrogen translocation in *Arabidopsis thaliana* - roles of glutamate synthases and carbamoylphosphate synthetase in leaves. *The FEBS Journal* **276**, 4061–4076.
- Redinbaugh MG, Campbell WH, 1993. Glutamine synthetase and ferredoxin-dependent glutamate synthase expression in the maize (*Zea mays*) root primary response to nitrate. *Plant Physiology* **101**, 1249–1255.
- Sáez CÁ, Muñoz-Chapuli R, Plomion C, Frigerio J-M, Cánovas FM, 2000. Two genes encoding distinct cytosolic glutamine synthetases are closely linked in the pine genome. *FEBS Letters* **477**, 237–243.
- Seabra AR, Vieira CP, Cullimore J V, Carvalho HG, 2010. *Medicago truncatula* contains a second gene encoding a plastid located glutamine synthetase exclusively expressed in developing seeds. *BMC Plant Biology* **10**, 183.

- Signorelli S, Arellano JB, Melø TB, Borsani O, Monza J, 2013. Proline does not quench singlet oxygen: Evidence to reconsider its protective role in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **64**, 80–83.
- Somerville C, Ogren W, 1979. A phosphoglycolate phosphatase-deficient mutant of Arabidopsis. *Nature* **280**, 833–836.
- Szabados L, Savaure A, 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* **15**, 89–97.
- Szczerba MW, Britto DT, Ali SA, Balkos KD, Kronzucker HJ, 2008. NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-stimulated and -inhibited components of K<sup>+</sup> transport in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany* **59**, 3415–3423.
- Taira M, Valtersson U, Burkhardt B, Ludwig RA, 2004. Arabidopsis thaliana GLN2-encoded glutamine synthetase is dual targeted to leaf mitochondria and chloroplasts. *The Plant Cell* **16**, 2048–2058.
- Tan S, Evans R, Singh B, 2006. Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. *Amino Acids* **30**, 195–204.
- Tercé-Laforgue T, Bedu M, Dargel-Grafin C, Dubois F, Gibon Y, Restivo FM, Hirel B, 2013. Resolving the role of plant glutamate dehydrogenase: II. Physiological characterization of plants overexpressing the two enzyme subunits individually or simultaneously. *Plant and Cell Physiology* **54**, 1635–1647.
- Tingey S V, Tsai F, Edwards JW, Walker EL, Coruzzi GM, 1988. Chloroplast and cytosolic glutamine synthetase are encoded by homologous nuclear genes which are differentially expressed in vivo. *The Journal of Biological Chemistry* **263**, 9651–9657.
- Todd CD, Tipton PA, Blevins DG, Piedras P, Pineda M, Polacco JC, 2006. Update on ureide degradation in legumes. *Journal of Experimental Botany* **57**, 5–12.
- Van Heerden PS, Towers GHN, Lewis NG, 1996. Nitrogen metabolism in lignifying *Pinus taeda* cell cultures. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 12350–12355.
- Van Rooyen JM, Abratt VR, Belrhali H, Sewell T, 2011. Crystal structure of type III glutamine synthetase: Surprising reversal of the inter-ring interface. *Structure* **19**, 471–483.
- Van Rooyen JM, Abratt VR, Sewell BT, 2006. Three-dimensional structure of a type III glutamine synthetase by single-particle reconstruction. *Journal of Molecular Biology* **361**, 796–810.
- Wadsworth GJ, 1997. The plant aspartate aminotransferase gene family. *Physiologia Plantarum* **100**, 998–1006.
- Walch-Liu P, Neumann G, Bangerth F, Engels C, 2000. Rapid effects of nitrogen form on leaf morphogenesis in tobacco. *Journal of Experimental Botany* **51**, 227–237.
- Wallsgrave RM, Turner JC, Hall NP, Kendall AC, Bright SWJ, 1987. Barley Mutants Lacking Chloroplast Glutamine Synthetase—Biochemical and Genetic Analysis. *Plant Physiology* **83**, 155–158.



- Wang Y-Y, Hsu P-K, Tsay Y-F, 2012. Uptake, allocation and signaling of nitrate. *Trends in Plant Science* **17**, 458–467.
- Witte C-P, 2011. Urea metabolism in plants. *Plant Science* **180**, 431–438.
- Yamashita MM, Almassy RJ, Janson CA, Cascio D, Eisenberg D, 1989. Refined atomic model of glutamine synthetase at 3.5 Å resolution. *The Journal of Biological Chemistry* **264**, 17681–17690.
- Zhang Q, Lee J, Pandurangan S, Clarke M, Pajak A, Marsolais F, 2013. Characterization of *Arabidopsis* serine:glyoxylate aminotransferase, AGT1, as an asparagine aminotransferase. *Phytochemistry* **85**, 30–35.