

## IZOFORMY SYNTETAZY GLUTAMINOWEJ W ROŚLINACH WYŻSZYCH

### Glutamine synthetase isoforms in higher plants

Wiesław BIELAWSKI

**Summary.** The main pathway of ammonia assimilation in the photosynthesizing organs of higher plants is the GS-GOGAT cycle (glutamine synthetase – glutamate synthase cycle). GS can appear in the form of cytosolic (GS<sub>1</sub>) or chloroplastic (GS<sub>2</sub>) enzyme. The synthesis of GS isoforms seems to be connected with photorespiration, phytochrome activity and the level of exogenous ammonium. The activities of GS<sub>1</sub> and GS<sub>2</sub> are regulated by ions of bivalent metals, especially Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup> and by compounds regulating the oxidation-reduction potential in the cell.

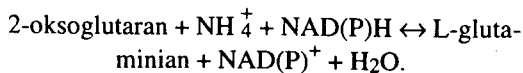
Both GS isoforms are usually built from eight identical subunits arranged in flattened parallel to each other sets of tetramers. The main physiological function of GS<sub>2</sub> seems to be the assimilation of the photorespiratory ammonium. The role of GS<sub>1</sub> is less well known although the results obtained so far point to its participation in the assimilation of NH<sub>3</sub> in the darkness or in the case of intensive fertilization of the plants with the ammonium form of nitrogen.

**Key words:** glutamine synthetase, isoenzymes, activity regulation, physiological functions

*Dr hab. W. Bielawski, Katedra Biochemii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, 02–528 Warszawa ul. Rakowiecka 26/30*

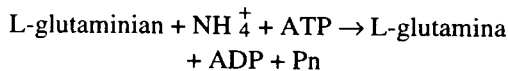
#### WSTĘP

Wśród przemian o szczególnym znaczeniu dla kształtowania wysokości plonu, a zwłaszcza zawartości białka, jest proces włączania azotu nieorganicznego do związków organicznych. Przez wiele lat uważano, że główną drogą asymilacji NH<sub>4</sub><sup>+</sup> u roślin jest redukcyjna aminacja 2-oksoglutaranu, katalizowana przez dehydrogenazę glutaminianową (GDH, EC. 1.4.1.2–4.) współdziałającą z NADH lub NADPH [4, 5, 49]:



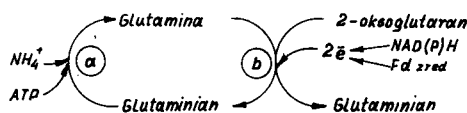
Pogląd ten ukształtował się na podstawie danych dotyczących poziomu aktywności tego enzymu oraz kinetyki włączania <sup>15</sup>N do związków organicznych, z której wynikało, że ok. 75% znakowanego azotu wykrywano w kwasie glutaminowym.

Inną drogą asymilacji NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, znaną od dawna, jest powstawanie glutaminy w reakcji katalizowanej przez syntetazę glutaminową (GS, EC. 6.3.1.2.).



Enzym ten nie był zaliczany do uczestniczących w pierwotnej syntezie aminokwasów, gdyż nie znano mechanizmu przekształcania grupy amidowej glutaminy w grupę aminową. Stąd też reakcję katalizowaną przez GS traktowano głównie jako mechanizm odtruwający, który działa przy nadmiarze NH<sub>4</sub><sup>+</sup> w komórce. Wskazywały na to wyniki badań świadczące, że w warunkach obfitego nawożenia solami amonowymi nagromadza się znaczna ilość glutaminy [2, 4, 94, 96].

Przełomowe dla badań nad rolą GS było wykrycie w roślinach syntazy glutaminianowej



Ryc. 1. Wytwarzanie glutaminianu z udziałem GS(a) i GOGAT(b).

Fig. 1. Generation of glutamate with participation of GS(a) and GOGAT(b).

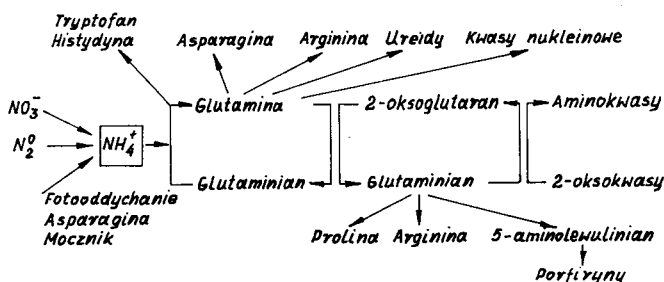
(GOGAT), enzymu katalizującego przeniesienie grupy amidowej na 2-oksoglutaran [24, 30, 55]. Okazało się ponadto, że enzym ten ma zdolność do współdziałania z syntetazą glutaminy w tzw. cyklu GS-GOGAT (ryc. 1).

W przemianach tych glutaminian jest zarówno akceptorem amoniaku jak i produktem jego asymilacji. Dalsze badania wykazały, że GOGAT była obecna we wszystkich badanych roślinach wyższych, gdzie występowała najczęściej w dwóch formach: jedna wykorzystująca NAD(P)H jako donor elektronów (EC. 1.4.1.13) i zlokalizowana w tkankach niefotosyntetyzujących, druga pobierająca elektrony od zredukowanej ferredoksyny (EC. 1.4.7.1) zlokalizowana w chloroplastach [35, 68, 85, 91]. Istnieje obecnie wiele danych świadczących, że cykl GS-GOGAT może być uznawany za główny mechanizm asymilacji jonów amonowych u roślin wyższych. Niektórzy autorzy sugerują, że w liściach roślin wyższych co najmniej 90%  $\text{NH}_4^+$  jest asymilowane na tej drodze. Podstawą do

przyjęcia takiego poglądu były z jednej strony wyniki doświadczeń nad włączaniem  $^{15}\text{NH}_4^+$  i działaniem specyficznych inhibitorów, z drugiej zaś nad właściwościami kinetycznymi oraz mechanizmami regulacji aktywności enzymów uczestniczących w tym procesie [12, 29, 58, 73]. W świetle tych danych zmienił się pogląd na rolę glutaminy w przemianach związków azotowych organizmów roślinnych. Według Lea i współautorów [56] glutamina wydaje się być centralnym związkiem w syntezie aminokwasów, a pośrednio również białek, kwasów nukleinowych i innych związków u wielu gatunków roślin (rys. 2).

### WYSTĘPOWANIE IZOFORM GS

Uznanie cyklu GS-GOGAT jako głównego mechanizmu asymilacji  $\text{NH}_4^+$  u roślin wyższych wpłynęło na znaczny wzrost zainteresowania badaczy syntetazą glutaminową. Podjęto szereg badań, w wyniku których stwierdzono obecność dwóch izoform tego enzymu w liściach (cytoplazmatycznej – GS<sub>1</sub> i chloroplastowej GS<sub>2</sub>) oraz jednej w korzeniach – GS<sub>R</sub> [14, 15, 18, 36, 48, 60, 65, 84, 90]. Wyjątek stanowią niektóre gatunki roślin z rodziny motylkowatych, u których w korzeniach występują dwie formy GS przy czym jedna z nich ma ścisły związek z brodawkami [79]. Dalsze badania nad dystrybucją izoform GS w komorce i organach roślin pozwoliły na wyróżnienie czterech grup roślin charakteryzujących się różnym procentowym



Ryc. 2. Włączanie azotu do białek, kwasów nukleinowych i innych związków.

Fig. 2. Incorporation of nitrogen into the proteins, nucleic acids and other compounds.

udziałem GS<sub>1</sub> i GS<sub>2</sub> w całkowitej aktywności lub też brakiem aktywności jednej z tych form [39, 65].

Do pierwszej grupy roślin zaliczono te gatunki (bezhlorofilowe pasożyty roślin wyższych zależne pod względem odżywiania od organizmu żywiciela), w których stwierdzono aktywność tylko cytoplazmatycznej formy enzymu [70].

Drugą grupę roślin stanowią gatunki charakteryzujące się obecnością tylko enzymu chloroplastowego. Należy tu wiele chwastów rosnących w różnych środowiskach, w tym nawet na silnie zasadowych bagnach, a wśród roślin uprawnych: szpinak, tytoń, pomidory [28, 65, 71].

Rośliny zaliczone do trzeciej grupy zawierają w liściach zarówno GS<sub>1</sub> jak i GS<sub>2</sub>, przy czym aktywność pierwszej z nich stanowi 5–30% całkowitej aktywności GS. Taki stosunek aktywności izoform syntetazy glutaminowej jest typowy dla wielu gatunków roślin z rodziny traw i niektórych roślin strączkowych [11, 12, 38, 60, 65].

W czwartej grupie roślin obie formy syntetazy glutaminowej występują w zbliżonych ilościach, a ich procentowy udział waha się najczęściej od 45 do 65%. Dominują tu rośliny o fotosyntezie typu C<sub>4</sub>, a także gruboszowate i niektóre tropikalne strączkowe [1, 57, 65].

W celu pełniejszego poznania różnic strukturalnych między GS<sub>1</sub> i GS<sub>2</sub> w wielu laboratoriach przeprowadzono badania metodami immunodyfuzji i immunoprecypitacji [39, 65]. Uzyskane wyniki wykazały, że GS<sub>1</sub> i GS<sub>2</sub> pochodzące nie tylko z różnych gatunków roślin, ale również z jednego gatunku, są różnymi białkami. Mimo wielu dowodów wykazujących znaczne różnice właściwości GS<sub>1</sub> i GS<sub>2</sub> nadal brak było odpowiedzi na pytanie czy istnienie tych form jest wynikiem potranslacyjnej modyfikacji jednej z nich, czy też odrębnej syntezy *de novo*. Nato i współautorzy [71] wykazali, że chloroplastowa forma GS z liści tytoniu jest glikoproteiną zawierającą cukry (mannozę, galaktozę, glukozę) oraz aminocukry (glukozaaminę i galaktozaaminę). Obecność składnika niebiałkowego stanowiącego 5% masy cząsteczkowej GS<sub>2</sub> mogłaby wyjaśniać różnice we właściwo-

ściach immunologicznych obu form enzymu. Autorzy ci sugerują, że obie formy GS są syntetyzowane w cytosolu, gdzie białko enzymu ulega glikozylacji i następnie jest transportowane do chloroplastów. Przyjęcie tego poglądu oznaczałoby, iż GS<sub>2</sub> jest efektem potranslacyjnej modyfikacji GS<sub>1</sub>. Badania ostatnich lat nie potwierdzają tej hipotezy i dowodzą, że formy GS cytoplazmatyczna i chloroplastowa są kodowane przez wysokohomologiczne, lecz różne geny jądrowe [26, 64, 87, 88].

### REGULACJA SYNTEZY

Wzajemne proporcje aktywności GS<sub>1</sub> i GS<sub>2</sub> w fotosyntetyzujących organach roślin wyższych są ściśle uzależnione od dostępu światła [12, 21, 23, 26, 27, 38, 64, 75]. Wykazano bowiem, że w etiolowanych siewkach wielu gatunków roślin wystawionych na działanie światła znacznie wzrasta aktywność GS<sub>2</sub>, osiągając wartość maksymalną po 72 godzinach ekspozycji, natomiast aktywność GS<sub>1</sub> pozostaje bez zmian lub nieznacznie maleje [26, 38, 88]. Obserwowane zmiany aktywności izoform GS są efektem indukcji lub represji syntezy białek izoenzymowych, co znajduje potwierdzenie w zmianach poziomu mRNA-GS<sub>1</sub> i mRNA-GS<sub>2</sub>. Stwierdzono także, że zielone siewki grochu pozbawione przez 96 godzin światła wykazują kilkakrotny spadek poziomu białka GS<sub>2</sub> i znacznie większy, bo aż 20-krotny spadek poziomu mRNA-GS<sub>2</sub> [26].

Zmiany poziomu białek GS<sub>1</sub> i GS<sub>2</sub> w zieleńających roślinach wydają się mieć związek z procesem fotooddychania oraz działaniem fitochromu. Tingey i współautorzy [88] oraz Sakamoto i współautorzy [81] dowiedli bowiem, że indukowana światłem ekspresja genów kodujących GS<sub>2</sub> jest spowodowana przynajmniej w części działaniem fitochromu. Natomiast Edwards i Coruzzi [26] uważają, że głównym czynnikiem indukującym syntezę mRNA-GS<sub>2</sub> jest amoniak powstający w procesie fotooddychania, a rola fitochromu w tym procesie jest znacznie mniejsza. Regulacja syntezy GS<sub>1</sub> oraz form zlokalizowanych w korzeniach jest zdecydowanie mniej poznane. Przypuszcza się, że jon

$\text{NH}_4^+$  może być czynnikiem wywołującym ekspresję genów tych form enzymu [20, 41, 66].

### REGULACJA AKTYWNOŚCI

Czynnikiem niezbędnym do działania izoenzymów syntetazy glutaminowej jest obecność jonów metali dwuwartościowych [19, 36, 48]; dializa preparatu enzymowego powoduje bowiem szybką i całkowitą utratę aktywności. Największy wpływ na aktywność  $\text{GS}_1$  i  $\text{GS}_2$  mają jony  $\text{Mg}^{2+}$ , jakkolwiek jony  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ , a u niektórych gatunków roślin również jony  $\text{Zn}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{2+}$  działają jako aktywatory [36, 48]. Stężenie jonu  $\text{Mg}^{2+}$  niezbędne dla pełnego wysycenia enzymu cytoplazmatycznego jest zazwyczaj kilkakrotnie niższe niż w przypadku enzymu chloroplastowego [12, 36]. Różnice te świadczą o różnym powinowactwie izoform GS do tego jonu i wydają się też być dowodem wskazującym na dostosowanie się poszczególnych izoform enzymu do warunków ich działania wewnątrz komórki. Wiadomo bowiem, że stężenie  $\text{Mg}^{2+}$  w stromie chloroplastowej roślin naświetlanych osiąga poziom nawet 10–15 mM, podczas gdy w cytoplazmie jest znacznie niższe [76, 85]. Ponadto przy znacznym nagromadzeniu się w stromie kationów, w tym głównie  $\text{Mg}^{2+}$ , podczas naświetlania roślin wzrasta pH środowiska z 7.0 do 8.0 co powoduje zmiany warunków działania chloroplastowej formy enzymu [76, 85, 95]. Wielu autorów dowodzi, że aktywność izoform GS zależna jest nie tylko od stężenia jonów  $\text{Mg}^{2+}$ , ale także od stosunku stężenia  $\text{Mg}^{2+}$  do ATP, sugerując, że właściwym substratem dla enzymu jest nie ATP lecz kompleks  $\text{MgATP}^{2-}$  [19, 41, 51]. Jednakże wyniki dotychczas prowadzonych badań nie pozwalają na precyzyjne określenie mechanizmów aktywacji syntetazy glutaminowej, czy jej izoform przez jony metali dwuwartościowych. Knight i Langston-Unkefer [51] sugerują, że  $\text{Mg}^{2+}$  przyłącza się do centrum allosterycznego każdej podjednostki enzymu jako kompleks  $\text{MgATP}^{2-}$ . Inni badacze postulują, że jedynie centrum aktywne enzymu jest miejscem tworzenia kompleksu  $\text{MgATP}^{2-}$  [44, 63]. Eads i współpracownicy [25] opisując mechanizm reakcji katalizowanej przez

GS sugerują, że jony metali dwuwartościowych, w tym  $\text{Mg}^{2+}$  przyłączając się do centrum aktywnego enzymu pełnią funkcję stabilizującą powstawanie tetraedrycznego kompleksu złożonego z amoniaku i  $\gamma$ -glutamylfosforanu.

Zastąpienie jonu  $\text{Mg}^{2+}$  innym jonem dwuwartościowym ma wpływ na zmianę wtórnej struktury białka enzymowego, co w konsekwencji prowadzi do obniżenia szybkości reakcji. Zjawisku temu towarzyszy również zmiana optimum pH działania enzymu [17, 48, 74]. Ponadto obniżenie aktywności zarówno  $\text{GS}_1$  jak i  $\text{GS}_2$  w wyniku zastąpienia jonów  $\text{Mg}^{2+}$  przez  $\text{Mn}^{2+}$  lub  $\text{Co}^{2+}$  może wynikać z faktu, że metale te cechuje odmienne powinowactwo do ligandów [33], stąd pełnią prawdopodobnie różną rolę w katalizie enzymatycznej. Rodzaj jonu metalu dwuwartościowego wiąże się z wpływem nie tylko na poziom aktywności  $\text{GS}_1$  i  $\text{GS}_2$ , oraz optimum pH, ale również zmienia specyficzność obu izoform GS w stosunku do ATP i L-glutaminianu [12, 74]. Istnienie różnic w sposobie regulacji  $\text{GS}_1$  i  $\text{GS}_2$  ma też ścisły związek z różną dostępnością grup SH w obydwu izoformach. Aktywność enzymu chloroplastowego niektórych gatunków zbóż jest silnie hamowana w obecności związków wiążących grupy SH, podczas gdy poziom aktywności enzymu cytoplazmatycznego nie ulega pod ich wpływem większym zmianom [12]. Wydaje się, że cecha ta u  $\text{GS}_2$  ma pewien związek z lokalizacją enzymu w chloroplastach. Wyniki prac innych autorów wykazują bowiem, że w chloroplastach roślin naświetlanych w szybszym tempie niż w innych strukturach subkomórkowych nagromadzają się związki zawierające grupy SH [9, 54, 83, 89]. Związki te uczestniczą w zależnej od światła aktywacji nie tylko enzymów cyklu Calvina, ale również kluczowych enzymów przemian azotowych zlokalizowanych w chloroplastach [3, 22, 60, 89]. Manderscheid i Wild [59] uważają, że grupy SH uczestniczą bezpośrednio w wiązaniu L-glutaminianu, a utlenianie tych grup wpływa na zmianę właściwości kinetycznych, zwłaszcza na wzrost powinowactwa enzymu do L-glutaminianu. Przyjęcie tego poglądu oznaczałoby, że poziom związków hydrosulfidowych oraz innych związków regulujących potencjał oksydoredu-

kcyjny w chloroplastach byłby jednym z ważniejszych czynników regulujących intensywność włączania  $\text{NH}_4^+$  do związków organicznych.

Mechanizmy regulacji aktywności izoformy GS funkcjonującej w korzeniach poznane są w niewielkim stopniu. Wiadomo jedynie, że istnieje duże podobieństwo w sposobie regulacji między tą izoformą a cytoplazmatyczną z tkanek fotosyntetyzujących [11, 36].

#### WŁAŚCIWOŚCI, SPECYFICZNOŚĆ SUBSTRATOWA ORAZ BUDOWA

Wartości stałych  $K_m$  mogą również determinować określoną rolę poszczególnych izoform GS w metabolizmie komórki, zwłaszcza, że są one zlokalizowane w różnych strukturach subkomórkowych, znacznie różniących się dostępnością dla L-glutaminianu,  $\text{NH}_4^+$  i ATP. Powinowactwo substratowe  $\text{GS}_1$ ,  $\text{GS}_2$  i  $\text{GS}_R$  jest znacznie zróżnicowane u wielu gatunków roślin wyższych [1, 11, 48, 61]. Najczęściej jednak  $\text{GS}_2$  wykazuje kilkakrotnie mniejsze powinowactwo do L-glutaminianu niż  $\text{GS}_1$  i  $\text{GS}_R$  [1, 11, 36]. Wszystkie izoformy GS charakteryzują się zbliżonym powinowactwem do  $\text{NH}_4^+$  i jest ono zwykle 10–100 krotnie wyższe od powinowactwa jakie wykazuje dehydrogenaza glutaminianowa izolowana z tych samych gatunków roślin [31]. Na uwagę zasługuje również fakt iż najczęściej optymalna wartość pH  $\text{GS}_2$  jest wyższa, średnio o 0.5 jednostki od optymalnej wartości pH działania  $\text{GS}_1$  i  $\text{GS}_R$ ; wartości te wahają się w granicach 7.0–8.2 [11, 36, 38, 48, 61]. Ponadto  $\text{GS}_2$  wykazuje niższą termostabilność i niższą optymalną temperaturę działania niż  $\text{GS}_1$  i  $\text{GS}_R$  [36]. Termostabilność izoform GS była znacznie wyższa w obecności  $\text{Mg}^{2+}$  i ATP, co potwierdzałoby tezę iż kompleks  $\text{MgATP}^{2-}$  pełni funkcję substratu stabilizującego wtórną strukturę białek izoenzymowych [12, 44, 51].

Badania dotyczące specyficzności substratowej GS i jej izoform wskazują na wysoką ich specyficzność w stosunku do L-glutaminianu i ATP, lecz jedynie wówczas gdy funkcję aktywatora pełnią jony  $\text{Mg}^{2+}$  [12, 74]. Zastąpienie ich przez  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  lub innymi jonami dwu-

wartościowymi znacznie obniża specyficzność substratową oraz powinowactwo enzymu do substratu. Zjawisko to wiąże się ze zmianą wtórnej struktury białka enzymowego [12, 74].

Masy cząsteczkowe izoform GS są zróżnicowane w zależności od gatunku roślin oraz lokalizacji wewnątrzkomórkowej i wahają się w granicach 320.000–480.000 Da [7, 12, 28, 40, 88]. Najczęściej chloroplastowa forma GS charakteryzuje się wyższą masą cząsteczkową niż pozostałe formy [7, 12, 34, 88]. Znane są gatunki roślin, w których wszystkie izoformy GS mają masy cząsteczkowe zbliżone do siebie, a nawet najwyższą jej wartość wykazuje  $\text{GS}_1$  [36, 53]. Izoformy GS roślin wyższych zbudowane są najczęściej z ośmiu identycznych monomerów, które wchodziły w skład dwóch spłaszczonych, równoległe wobec siebie ułożonych tetramerów [12, 77]. Jednakże izoenzymy GS zlokalizowane w brodawkach korzeniowych roślin motylkowych zbudowane są z dwóch typów podjednostek tworzących oktaimer [79]. Nieco odmienny pogląd prezentują Mäck i Tischner [62] którzy wykazali, że izoformy GS z liści buraka cukrowego mogą występować zarówno w formie oktameru, jak i tetrameru. Obydwie formy są aktywne, lecz różnią się sposobem regulacji aktywności, tetramer wymaga bowiem obecności związków hydrosulfidowych jako aktywatorów. Wzajemny stosunek aktywności oktameru do tetrameru był zmienny i zależny od wieku roślin, rodzaju organu i dostępnej formy azotu nieorganicznego. W liściach najstarszych, pożółkłych oktamer pozostawał jedyną aktywną formą enzymu. Z kolei Häpfner i współ. [42] stosując metody izoelektroogniskowania wykazali, że oktaimer ten składa się z 6 różnych typów łańcuchów polipeptydowych. Ta różnorodność polipeptydów tworzących oktaimer stwarza możliwości funkcjonowania wielu izoform GS. Zagadnienie to nie jest jeszcze w pełni poznane i wymaga dalszych badań.

#### FUNKCJE FIZJOLOGICZNE

Występowanie kilku form molekularnych enzymu w różnych strukturach subkomórkowych może świadczyć o ich różnych funkcjach

fizjologicznych bądź też może być odzwierciedleniem subkomórkowej lokalizacji torów metabolicznych związanych z asymilacją  $\text{NH}_4^+$  i ściślego współdziałania poszczególnych organelli w regulacji metabolizmu komórki. W zielonych organach roślin izoenzymy syntetazy glutaminowej uczestniczą zarówno w procesie pierwotnej, jak i wtórnej asymilacji  $\text{NH}_4^+$ . Głównym źródłem  $\text{NH}_4^+$  do pierwotnej jego asymilacji jest reakcja katalizowana przez reduktazę azotynową [43, 82]. Ponieważ redukcja azotynów do  $\text{NH}_4^+$  przebiega w chloroplastach, wydaje się logiczne, iż włączenie powstałego w ten sposób amoniaku do związków organicznych zachodzi przy udziale chloroplastowej formy GS [72]. Wynika to z faktu, że poziom drugiego substratu reakcji – kwasu glutaminowego w chloroplastach jest wystarczający ze względu na obecność innego enzymu cyklu GS-GOGAT – syntetazy glutaminianowej [68]. Podstawowym źródłem endogennej  $\text{NH}_4^+$  w komórce liści wydaje się być proces fotooddychania, bowiem udowodniono, że w procesie tym wytwarzane jest co najmniej 90%  $\text{NH}_4^+$  komórki [6, 50]. Rola izoenzymów syntetazy glutaminowej w reasymilacji  $\text{NH}_4^+$  powstałego z kondensacji 2 cząsteczek glicyny do seryny jak dotąd nie jest w pełni wyjaśniona. Początkowo sądzono, że uwolniony w mitochondriach amoniak jest transportowany do cytosolu i asymilowany przy udziale  $\text{GS}_1$  [50]. Jednakże bardzo niski procentowy udział  $\text{GS}_1$  w całkowitej aktywności enzymu u wielu gatunków roślin o fotosyntezie typu  $\text{C}_3$  przy wysokiej intensywności procesu fotooddychania wzbudzał wątpliwości co do faktycznej roli w tym procesie.

Wyjaśnienia tego problemu szukano stosując mutanty roślin wyższych niezdolnych do życia w warunkach stymulujących proces fotooddychania, lecz wykazujących normalny wzrost w warunkach wysokich stężeń  $\text{CO}_2$  lub niskich  $\text{O}_2$  [13, 45, 56, 93]. Mutanty te charakteryzowały się bardzo niską aktywnością  $\text{GS}_2$  lub całkowitym jej brakiem, podczas gdy aktywność  $\text{GS}_1$  pozostawała na niezmiennym poziomie. Na tej podstawie wnioskowano, że aktywność chloroplastowej formy enzymu jest nierozłącznie związana z procesem fotooddychania. Edwards

i Coruzzi [26] badając wpływ fotooddychania na poziom mRNA- $\text{GS}_2$  w liściach grochu wykazali, że przy 2-procentowym stężeniu  $\text{CO}_2$  w atmosferze poziom mRNA- $\text{GS}_2$  jest ponad 4-krotnie niższy niż przy 0.02%  $\text{CO}_2$ . Poziom mRNA- $\text{GS}_1$  w tych samych warunkach pozostawał niezmienny. Wysoki poziom mRNA- $\text{GS}_2$  w warunkach przyspieszających fotooddychanie może odzwierciedlać szybkość transkrypcji genu odpowiedzialnego za syntezę  $\text{GS}_2$  lub świadczyć o zwiększonej stabilności mRNA- $\text{GS}_2$ . Wątpliwości te mogłaby wyjaśnić analiza zmian poziomu białek izoenzymowych potwierdzająca wcześniejsze zmiany poziomu mRNA.

Aktywność syntetazy glutaminowej u wielu gatunków roślin jest uzależniona od dostępności egzogennej azotu nieorganicznego. Dokarmianie roślin  $\text{NO}_3^-$  lub  $\text{NH}_4^+$  wpływa na wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów amonowych [8, 10, 52]. Podwyższenie poziomu  $\text{NH}_4^+$  w komórkach badanych roślin powodowało znaczny wzrost aktywności całkowitej syntetazy glutaminowej [8, 10, 53, 62, 78, 91]. Obserwowany wzrost aktywności GS jest wynikiem indukcji syntezy białka enzymowego przez jony amonowe, co znalazło potwierdzenie w doświadczeniach, w których stosowano specyficznie działające inhibitory biosyntezy białek [8]. Indukcyjny charakter syntetazy glutaminowej może mieć istotne znaczenie przy ocenie potencjału metabolicznego poszczególnych gatunków roślin, gdyż zdolność do indukowanej syntezy GS pod wpływem  $\text{NH}_4^+$  świadczy o efektywności mechanizmów wiązania  $\text{NH}_4^+$  i możliwości przystosowania się roślin do podwyższonego poziomu  $\text{NH}_4^+$  w środowisku.

Prowadzone dotychczas badania nad indukcją GS najczęściej ograniczały się do zmian aktywności całkowitej enzymu i nie wyjaśniały udziału poszczególnych jego izoform w wiązaniu  $\text{NH}_4^+$  w komórce przy wysokich jego stężeniach. Rola  $\text{GS}_2$  w procesie detoksykacji amoniaku wydaje się być raczej ograniczona, gdyż stężenie  $\text{NH}_4^+$  w chloroplastach ze względu na istnienie ścisłej jego kontroli nie może być zbyt wysokie ani podlegać dużym wahaniom. Wiadomo też, że już przy stężeniu  $\text{NH}_4^+$  w chloroplastach wynoszącym 0.5–1.0 mM następuje

rozkojarzenie fosforylacji fotosyntetycznej, a przy stężeniu 2 mM tego związku następuje znaczne uszkodzenie chloroplastów (32).

O ile rola GS<sub>2</sub> w metabolizmie azotowym została w dość dużym stopniu poznana to nadal jest niewiele przekonujących danych o roli enzymu cytoplazmatycznego. Niektórzy autorzy uważają, że GS<sub>1</sub> może pełnić istotną funkcję w procesie asymilacji NH<sub>4</sub><sup>+</sup> w ciemności [16, 23, 36, 59]. Tłumaczy się to tym, że zmiany zachodzące w chloroplastach roślin przeniesionych do ciemności mogą znacznie ograniczać szybkość reakcji katalizowanej przez GS<sub>2</sub> lub nawet całkowicie uniemożliwiać jej przebieg. Ulega bowiem zmniejszeniu nie tylko dostępność ATP, glutaminianu i Mg<sup>2+</sup> w chloroplastach, ale również ustaje główne źródło endogenego azotu nieorganicznego w wyniku zahamowania fotooddychania. Na znaczną rolę GS<sub>1</sub> w metabolizmie komórki wskazują wyniki doświadczeń, w których wykazano, że w warunkach rosnącego wewnątrzkomórkowego stężenia NH<sub>4</sub><sup>+</sup> zwiększa się procentowy udział GS<sub>1</sub> w całkowitej aktywności enzymu [12, 46, 47]. Wskazywałoby to, że cytoplazmatyczna forma GS może pełnić istotną funkcję w procesie wiązania nadmiernych ilości toksycznego amoniaku przekształcając go w formę obojętną dla roślin – glutaminę. Znaczenie tej izoformy GS może również być większe w starzejących się organach rośliny, gdzie obserwowano nagromadzenie się NH<sub>3</sub> będącego efektem przewagi procesów katabolicznych nad anabolicznymi [57]. Podstawową zaś funkcją izoform GS zlokalizowanych w systemie korzeniowym wydaje się być asymilacja znacznej części NH<sub>4</sub><sup>+</sup> pobranego przez roślinę z podłoża bądź też NH<sub>4</sub><sup>+</sup> powstałego w brodawkach w wyniku wiązania azotu atmosferycznego. Powstała glutamina może być transportowana do części nadziemnych rośliny bądź też na miejscu wykorzystywana do syntezy glutaminianu, asparaginy, argininy, ureidów, kwasów nukleinowych, białek i wielu innych związków.

## LITERATURA

- [1] ACASTER M. A., WEITZMAN P. D. J. 1985. Kinetic analysis of glutamine synthetases from various plants. *FEBS Lett.* **189**: 241–244.
- [2] ARIMA Y., KUMAZAWA K. 1977. Evidence of ammonium assimilation via the glutamine synthetase system in rice seedling roots. *Plant Cell Physiol.* **18**: 1121–29.
- [3] BACHANAN B. B. 1980. Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **31**: 341–374.
- [4] BARASH J. B., SADON T., MOR H. 1974. Relationship of glutamate dehydrogenase levels to free amino acids, amides and ammonia in excised oat leaves. *Plant Cell Physiol.* **15**: 563–566.
- [5] BASHMAN J. A., KIRK M. 1964. Photosynthesis of amino acids. *Biochim. Biophys. Acta.* **90**: 553–562.
- [6] BERGMAN A., GARDESTROM P., ERICSON J. 1981. Release and refixation of ammonia during photorespiration. *Physiol. Plant.* **53**: 528–532.
- [7] BEUDEKER R. F., TOBITA F. R. 1985. Characterization of glutamine synthetase isoforms from *Chlorella*. *Plant Physiol.* **77**: 91–794.
- [8] BIELAWSKI W., KĄCZKOWSKI J. 1984. Pathways of ammonia assimilation in rye seedlings at different concentration of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. I. The enzyme activities and level of metabolites. *Acta Physiol. Plant.* **6**: 145–158.
- [9] BIELAWSKI W., JOY K. W. 1986. Reduced and oxidized glutathione and glutathione reductase activity in tissues of *Pisum sativum*. *Planta* **169**: 267–272.
- [10] BIELAWSKI W., KWINTA J., KĄCZKOWSKI J. 1989. Comparison of some cereal seedlings on the ability of glutamine synthetase induction. *Acta Physiol. Plant.* **11**: 147–156.
- [11] BIELAWSKI W., KWINTA J., KĄCZKOWSKI J. 1990. Isoenzymes of glutamine synthetase isolated from rye and Triticale seedlings. *Acta Physiol. Plant.* **12**: 7–13.
- [12] BIELAWSKI W. 1992. Izoenzymy syntetazy glutaminowej z siewek pszenżyta na przykładzie odmiany *Malno*. Rozprawa habilitacyjna. Wydawnictwo SGGW Warszawa.
- [13] BLACKWELL R. D., MURRAY A. J. S., LEA P. J. 1987. Inhibition of photosynthesis in barley with decreased levels of glutamine synthetase activity. *J. Exp. Bot.* **38**: 1799–1809.
- [14] CABELLO P., DELAHABA P., MALDONADO J. M. 1991. Isoforms of glutamine synthetase in cotyledons, leaves and roots of sunflower plants. *J. Plant Physiol.* **137**: 378–380.
- [15] CALVEZ S., CALLARDO F., CANOVAS F. 1990. The occurrence of glutamine synthetase isoenzymes in tomato plants in correlated to plastid differentiation. *J. Plant Physiol.* **137**: 1–4.
- [16] CANOVAS F., AVILA M. C., BOTELLA J. R., Valpuesta, Nunez de Castro J. 1986. Effect of light – dark transition on glutamine synthetase activity in tomato leaves. *Physiol. Plant.* **66**: 648–652.
- [17] CHAPMAN H. D. 1973. Diagnostic criteria for plants and soils. H. D. CHAPMAN. ed. Dep. of soils and Plant

- Nutrition, University of California Citrus Research Center and Agricultural Experimental Station, Riverside.
- [18] CHANDLER G., LANDLEY P., McNALLY S. F., PATEL M., STEWART G. R., SUMAR N. 1985. The activity and isoforms complement of glutamine synthetase in *Panicum* species differing in photosynthetic pathway. *J. Plant Physiol.* **121**: 13–21.
  - [19] CHEN J., KENNEDY J. R. 1985. Purification and properties of lupin nodule glutamine synthetase. *Phytochemistry* **12**: 2167–2172.
  - [20] COCK J. M., MOULD R. M., BENNETT M. J., CULLIMORE J. V. 1990. Expression of glutamine synthetase genes in roots and nodules of *Phaseolus vulgaris* following changes in the ammonium supply and infection with various *Rhizobium* mutants. *Plant Mol. Biol.* **14**: 543–569.
  - [21] COCK J. M., BROCK J. W., WATSON A. T., SWARUP R., MORBY A. P., CULLIMORE J. V. 1991. Regulation of glutamine synthetase genes in leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Mol. Biol.* **17**: 761–771.
  - [22] CULLIMORE J. V. 1981. Glutamine synthetase of *Chlamydomonas* rapid reversible deactivation. *Planta* **152**: 587–591.
  - [23] DE LA HABA P., CABELLO P., MALDONADO J. M. 1992. Glutamine synthetase isoforms appearing in sunflower cotyledons during germination. Effects of light and nitrate. *Planta* **186**: 577–581.
  - [24] DOUGALL D. K. 1974. Evidence for the presence of glutamate synthase in extracts of carrot cell cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **58**: 639–646.
  - [25] EADS CH. D., LO BRUTTO R., KUMAR A., VILAFRANCA J. J. 1988. Identification of nonprotein ligands to the metal ions bound to glutamine synthetase. *Biochemistry* **27**: 165–170.
  - [26] EDWARDS J. W., CORUZZI G. M. 1989. Photorespiration and light act in concert to regulate the expression of the nuclear gene for chloroplast glutamine synthetase. *The Plant Cell* **1**: 241–248.
  - [27] ELMLINGER M. W., MOHR H. 1992. Glutamine synthetase in Scots pine seedlings and its control by blue light and light absorbed by cytochrome. *Planta* **188**: 396–402.
  - [28] ERICSON M. C. 1985. Purification and properties of glutamine synthetase from Spinach leaves. *Plant Physiol.* **79**: 823–827.
  - [29] FENTEM P. A., LEA P. J., STEWART G. R. 1983. Ammonia assimilation in the roots of nitrate and ammonia-grown *Hordeum vulgare* L. (cv. Golden Promise). *Plant Physiol.* **71**: 496–501.
  - [30] FOWLER M. W., JESSUP W., SARKISSIAN G. S. 1974. Glutamate synthetase type activity in higher plants. *FEBS Lett.* **46**: 340–342.
  - [31] GIVAN C. V. 1979. Metabolism detoxication of ammonia in tissues of higher plants. *Phytochemistry* **18**: 375–382.
  - [32] GOOD N. E. 1960. Action of the Hill reaction by amines. *Biochim. Biophys. Acta* **40**: 502–517.
  - [33] HARISSON P. M., HOARE R. J. 1980. Metals in Biochemistry. Chapman and Hall, London and New York.
  - [34] HAYAKAWA T., KAMACHI K., OIKAWA M., OJIMA K., YAMAYA T. 1990. Response of glutamine synthetase and glutamate synthase isoforms to nitrogen sources in rice cell cultures. *Plant and Cell Physiol.* **31**: 1071–1078.
  - [35] HECHT U., DELMÜLLER R., SCHMIT S., MOHR H. 1988. Action of light, nitrate and ammonium on the levels of NADH – and ferredoxin – dependent glutamate synthases in the cotyledons of mustard seedlings. *Planta* **175**: 130–138.
  - [36] HIREL B., GADAL P. 1980. Glutamine synthetase in rice. A comparative study of enzymes from roots and leaves. *Plant Physiol.* **66**: 619–623.
  - [37] HIREL B., GADAL P. 1982. Glutamine synthetase isoforms in leaves of a C4 plant: *Sorghum vulgare*. *Physiol. Plant.* **54**: 69–74.
  - [38] HIREL B., VIDAL J., GADAL P. 1982. Evidence for a cytosol dependent light induction of chloroplastic glutamine synthetase during greening of etiolated rice leaves. *Planta* **155**: 17–23.
  - [39] HIREL B., McNALLY S. F., GADAL P., SUMAR N., STEWARD G. R. 1984. Cytosolic glutamine synthetase in higher plants. *Eur. J. Biochem.* **138**: 63–66.
  - [40] HIREL B., WEATHERLEY C., CRETIN, BERGOUNIOUX, GADAL P. 1984. Multiple subunit composition of chloroplastic glutamine synthetase of *Nicotiana tabacum* L. *Plant Physiol.* **74**: 448–450.
  - [41] HIREL B., BOUET C., KING B., LAYZELL D., JACOBS F., VERMAD P. S. 1987. Glutamine synthetase genes are regulated by ammonia provided externally or by symbiotic nitrogen fixation. *EMBO J. G.* (1987): 1167–117.
  - [42] HÖPFNER M., REIFFERSCHIED G., WILD A. 1988. Molecular composition of glutamine synthetase of *Sinapis alba* L. *Z. Naturforsch.* **43**: 194–198.
  - [43] IP S. M., KERR J., INGLEDEW W. J., WRAY J. L. 1990. Purification and characterisation of barley leaf nitrite reductase. *Plant Sci.* **66**: 155–165.
  - [44] JAENICKE L., JESIOR J. C. 1978. Pig brain glutamine synthetase. An interpretation of the sigmoidal kinetics for magnesium and adenosine triphosphate. *FEBS Lett.* **90**: 115–118.
  - [45] JOY K. W., BLACKWELL R. D., LEA P. J. 1992. Assimilation of nitrogen in mutants locking enzymes of the glutamate synthase cycle. *J. Exp. Bot.* **43**: 139–145.
  - [46] KAMACHI K., YAMAYA T., HAYAKAWA T., MAE T., OJIMA K. 1992. Changes in cytosolic glutamine synthetase polypeptide and its mRNA in a leaf blade of rice plants during natural senescence. *Plant Physiol.* **98**: 1323–1329.
  - [47] KAMACHI K., YAMAYA T., HAYAKAWA T., MAE T., OJIMA K. 1992. Vascular bundle-specific localization of cytosolic glutamine synthetase in rice leaves. *Plant. Physiol.* **99**: 1481–1486.
  - [48] KANG S., HYMOWITZ T. 1988. Characteristic of two glutamine synthetase isoenzymes in soybean. *Phytochemistry* **27**: 2017–2021.
  - [49] KENNEDY I. R. 1966. Primary products of symbiotic nitrogen fixation. II. Pulse-labelling of sarradella nodules with <sup>15</sup>N. *Biochim. Biophys. Acta* **130**: 295–303.
  - [50] KEYS A. J., BIRD I. F., CORNELIUS M. J., LEA P. J.,

- WALLSGROVE R. M., MIFLIN B. J. 1978. Photorespiratory nitrogen cycle. *Nature* **275**: 741–743.
- [51] KNIGHT T. J., LANGSTON-UNKEFER P. J. 1988. Adenine nucleotides as allosteric effectors of pea seed glutamine synthetase. *J. Biol. Chem.* **263**: 11084–11089.
- [52] KRETOVICH W. L., KARIAKINA T. J., SIEDELNIKOWA L. J. 1973. Regulacje amoniem glutamatdehidrogenazy prorostkow pszenicy. *Dokl. A. N., SSSR*. **208**: 464–467.
- [53] KRETOVICH W. L., EVSTEGNEEVA Z. G., PUSHKIN A. V., DZHOKNASIDZE T. Z. 1981. Two forms of glutamine synthetase in leaves of Cucurbitaceae. *Phytochemistry* **20**: 625–629.
- [54] LAW M. Y., CHARLES S. A., HALLIWELL B. 1983. Glutathione and ascorbic acid in spinach chloroplasts. *Biochem. J.* **210**: 899–903.
- [55] LEA P. J., MIFLIN B. J. 1974. Alternate route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature* **251**: 614–616.
- [56] LEA P. J., BLACKWELL R. D., MURRAY A. J. S., JOY K. W. 1989. The use of mutants lacking glutamine synthetase and glutamate synthase to study their role in plant nitrogen metabolism. Recent advances in Phytochemistry, vol. 23; W: POULTON J. E., ROMEO J. T., CONN E. E. (red.). *Plant nitrogen metabolism*. Plenum Press New York and London, ss. 157–189.
- [57] LEA P. J., RIDLEY S. M. 1989. Glutamine synthetase and its inhibition. In herbicides and plant metabolism. 137–167, A. D. DODGE (red.), Cambridge University Press, Cambridge.
- [58] LEWIS O. A. M., CHADWICKS S., WITHERS J. 1983. The assimilation of ammonia by barley roots. *Planta* **159**: 483–486.
- [59] MANDERSCHIED R., WILD A. 1986. Characterization of glutamine synthetase of roots, etiolated cotyledons and green leaves from *Sinapis alba* L. *Z. Naturforsch.* **41c**: 712–716.
- [60] MANN A. F., FENTEM P. A., STEWARD G. R. 1979. Identification of two forms of glutamine synthetase in barley (*Hordeum vulgare*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **88**: 515–521.
- [61] MANN A. F., FENTEM P. A., STEWARD G. R. 1980. Tissue localization of barley (*Hordeum vulgare*) glutamine synthetase isoenzymes. *FEBS Lett.* **110**: 265–267.
- [62] MÄCK G., TISCHNER 1990. Glutamine synthetase oligomers and isoforms in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). *Planta* **18**: 10–17.
- [63] McCORMACK D. K., FARNDEN K. J. F., BOLAND M. J. 1982. Purification and properties of glutamine synthetase from the plant cytosol fraction of lupin nodules. *Arch. Biochem. Biophys.* **218**: 561–571.
- [64] McGRATH R. B., CORUZZI G. M. 1991. A gene network controlling glutamine and asparagine biosynthesis in plants. *Plant J.* **1**: 275–280.
- [65] McNALLY S. F., HIREL B., GADAL P., MANN A. F., STEWARD G. R. 1983. Glutamine synthetase of higher plants. *Plant Physiol.* **72**: 22–25.
- [66] MIAO G. H., HIREL B., MARSOLIER M. C., RIDGE R. W., VERMA D. P. S. 1991. Ammonia regulated expression of soybean gene encoding cytosolic glutamine synthetase in transgenic *tatus-corniculatus*. *Plant Cell*. **3**: 11–22.
- [67] MIFLIN B. J., LEA P. J. 1976. The Pathways of nitrogen assimilation in plants. *Phytochemistry*, **15**: 873–885.
- [68] MIFLIN B. J., LEA P. J. 1977. Amino acids metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **28**: 299–329.
- [69] MIFLIN B. J., LEA P. J. 1980. Ammonia assimilation. In *The Biochemistry of Plants: A comprehensive Treatise* (B. J. Miflin ed.), Academic Press, New York, vol. **5**: 169–202.
- [70] MUSSELMAN J. 1980. The biology of strige, Orabanche and other root parasitic weeds. *Ann. Rev. Phytopathol.* **18**: 463–489.
- [71] NATO F., HIREL B., NATO A., GADAL P. 1984. Chloroplastic glutamine synthetase from tobacco leaves: glycosylated protein. *FEBS Lett.* **175**: 443–446.
- [72] OAKS A., GADAL P. 1979. Nitrogen utilization in cells of higher plants. W: NOVER C., LYNEN F., MOTHES K., (red.), *Cell compartmentations and metabolic channeling*. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, ss. 245–254.
- [73] OAKS A. 1986. Biochemical aspects of nitrogen metabolism in whole plant content. W: LOMBERS H., NEETSON Z. J., STULEN J. (red.), *Fundamental, ecological and agricultural aspects of nitrogen fixation in higher plants*. Martines Nünoff Publishers, Dordrecht. ss. 133–151.
- [74] O'NEAL D., JOY K. W. 1974. Glutamine synthetase of pea leaves. Divalent cation effects, substrate specificity and other properties. *Plant Physiol.* **54**: 773–779.
- [75] PETERMAN T. K., GOODMAN H. M. 1991. The glutamine synthetase gene family of Arabidopsis thaliana: light – regulation and differential expression in leaves roots and seeds. *Mol. General Genetics* **230**: 145–154.
- [76] PORTIS A. R., HELDT M. W. 1976. Light – dependent changes of the  $Mg^{2+}$  concentration in the stroma in relation to the  $Mg^{2+}$  dependency of  $CO_2$  fixation in intact chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.* **449**: 434–446.
- [77] PUSHKIN A. V., TSUPRUN V. L., DZHOKHARIDZE T. Z., EVSTEGNEEVA Z. G., KRETOVICH W. L. 1981. Glutamine synthetase from pumpkin leaf cytosol. *Biochim. Biophys. Acta* **662**: 160–162.
- [78] RAMAMURTHY S., LÜDDERS P. 1982. Influence of nitrate and ammonium on activity of the enzymes glutamine synthetase, glutamate dehydrogenase and glutamate oxalacetate transaminase in citrus modurensis. *Laur. Angew. Bot.* **56**: 371–382.
- [79] ROBERT F. M., WONG P. P. 1986. Isoenzymes of glutamine synthetase in *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus lunatus* L. Root nodules. *Plant Physiol.* **81**: 142–148.
- [80] ROBINSON S. A., SLADE A. P., FOX G. G., PHILIPS R., RATCLIFFE R. G., STEWARD G. R. 1991. The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism. *Plant Physiol.* **95**: 509–516.
- [81] SAKAMOTO A., TAKEBA G., SHIBATA D., TANAKA K. 1990. Phytochrome – mediated activation of gene for cytosolic glutamine synthetase ( $GS_1$ ) during inhibition

- of photosensitive lettuce seeds. *Plant Mol. Biol.* **15**: 317–323.
- [82] SMALL J. S., GRAY J. C. 1984. Synthesis of wheat leaf reductase de novo following induction with nitrate and light. *Eur. J. Biochem.* **145**: 291–297.
- [83] SMITH I. K. 1985. Simulation of glutathione synthesis in photorespiring plants by catalase inhibitors. *Plant Physiol.* **79**: 1044–1047.
- [84] STASIEWICZ S., DUNHAM K. 1979. Isolation and characterisation of two forms of glutamine synthetase from soybean hypocotyl. *Biochem. Biophys. res. Commun.* **87**: 627–634.
- [85] STUMPF P. K., CONN E. E. 1986. A comprehensive treatise. *The Biochemistry of Plant*. 382–390.
- [86] SUZUKI A., VIDAL, GADAL P. 1982. Glutamate synthase isoforms in rice. Immunological studies of enzymes in green leaf, etiolated leaf and root tissues. *Plant Physiol.* **70**: 827–832.
- [87] SWARUP R., BENNET M. J., CULLIMORE J. V. 1990. Expression of glutamine synthetase genes in cotyledons of germinating *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* **183**: 51–56.
- [88] TINGEY S. V., TSAI F. Y., EDWARDS J. W., WALKER E. L., CORUZZI G. H. 1988. Chloroplast and cytosolic glutamine synthetase are encoded by homologous nuclear genes which are differentially expressed in vivo. *J. Biol. Chem.* **263**: 9651–9657.
- [89] TISCHNER R., SCHMIDT A. 1982. A thioredoxin mediated activation of glutamine synthetase and glutamate synthase in Synchronous *Chlorella sorokiniana*. *Plant Physiol.* **70**: 113–116.
- [90] TOBIN A. K., RIDLEY S. M., STEVART G. R. 1985. Changes in the activities of chloroplast and cytosolic isoenzymes of glutamine synthetase during normal leaf growth and plastid development in wheat. *Planta* **163**: 544–548.
- [91] VOLLBERCHT P., KLEIN E., KASEMIR M. 1989. Different effects of supplied ammonium on glutamine synthetase activity in mustard (*Sinapis alba*) and pine (*Pinus sylvestris*) *Physiol. Plant.* **77**: 129–135.
- [92] WALLSGROVE R. M., LEA P. J., MIFLIN B. J. 1982. The development of NAD(P)H dependent and ferredoxin dependent glutamate synthase in greening pea and barley leaves. *Planta* **154**: 473–474.
- [93] WALLSGROVE R. M., TURNER J. C., HALL N. P., KENDALLY A. C., BRIGHTS S. W.J. 1987. Barley mutants lacking chloroplast glutamine synthetase – Biochemical and genetic analysis. *Plant Physiol.* **83**: 155–158.
- [94] WEISSMAN G. S. 1972. Influence of ammonium and nitrate nutrition on enzymatic activity in soybean and sunflower. *Plant Physiol.* **49**: 38–141.
- [95] WERDAN K., HELDT H. W., MILOVANCEV M. 1975. The role of pH in the regulation of carbon fixation in the chloroplast stroma. Studies on CO<sub>2</sub> fixation in the light and dark. *Biochem. Biophys. Acta.* **396**: 276–292.
- [96] YEMM E. W., WILLIS A. J. 1956. The respiration of barley plants. IX. The metabolism of roots during the assimilation of nitrogen. *New Phytol.* **55**: 229–252.